

MILENA SOUSA FREITAS

**INVESTIGAÇÃO DE *LEISHMANIA SP* EM CARRAPATOS DE CÃES DE BAIROS  
DE IMPERATRIZ-MA, ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE  
(PCR)**

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

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna AobaYassui Ishikawa

IMPERATRIZ-MA  
2012

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

---

Freitas, Milena Sousa.

Investigação de *Leishmania SP* em carrapatos de cães de bairros de Imperatriz-MA, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) / Milena Sousa Freitas; orientadora, Edna Aoba Yassui Ishikawa. – 2012

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

1. Leishmania – Imperatriz (MA). 2. Leishmaniose – Imperatriz (MA). 3. Carrapato como transmissor de doenças. 4. Reação em cadeia de polimerase. I. Ishikawa, Edna Aoba Yassui, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 614.534098121



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

MILENA SOUSA FREITAS

**INVESTIGAÇÃO DE *LEISHMANIA SP* EM CARRAPATOS DE CÃES DE BAIROS  
DE IMPERATRIZ-MA, ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE  
(PCR)**

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

Aprovada em:  
Conceito:

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna AobaYassui Ishikawa  
Orientadora – NMT/UFPA

---

Prof. Dr. Givago da Silva Souza – NMT/UFPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Conceição N. Pinheiro – NMT/UFPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Brasil Xavier – NMT/UFPA

Aos meus pais,  
José Maria de Freitas e  
Antônia Sousa Freitas, por acreditarem  
em mim e não medirem esforços para  
me ver dar um novo passo a cada dia.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, pelo amor incondicional e força que me fazem continuar sempre.

À família que me apoia e incentiva em todos os objetivos, em especial ao meu Pai (José Maria de Freitas), para quem já nasci “doutora”.

Ao Senhor Paulo Henrique Soares e Silva, médico veterinário e coordenador do Centro de Controle de Zoonoses de Imperatriz, pela essencial colaboração junto à pesquisa.

À orientadora, Edna Aoba Yassui Ishikawa por contribuir de forma grandiosa para realização deste trabalho.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

## RESUMO

A Leishmaniose é uma doença causada pelo protozoário *Leishmania sp*, podendo acometer homem e animais dependendo da espécie do parasita, São transmitidos pelos flebotomíneos fêmeas, insetos do gênero *Lutzomyia*, que ao exercer o hematofagismo inoculam as formas promastigota infectantes, mas recentemente, tem sido levantado hipóteses sobre a transmissão por carrapatos. Segundo a vigilância epidemiológica de Imperatriz-MA a cidade é endêmica tanto para Leishmaniose Tegumentar (LT) quanto para a Leishmaniose Visceral (LV). Este trabalho teve como objetivo principal investigar a presença de DNA de *Leishmania sp* em carrapatos coletados de cães atendidos em petshop e Centro de Controle de Zoonoses do município de Imperatriz utilizando a técnica de PCR. O DNA foi extraído a partir de 640 carrapatos fêmeas e testadas utilizando o primer que amplifica o gene de mini-exon de *Leishmania sp*. Os carrapatos foram coletados de 41 cães de diferentes bairros da cidade de Imperatriz. A maioria dos carrapatos foram identificados como *Rhipicephalus sanguineus*. Os seguintes sinais clínicos sugestivos de leishmaniose foram observados nos cães: onicogribose em 53,65% (22/41); úlceras em 63,41% (26/41), a perda de cabelo e inapetência em 39,02% (16/41). Cento e setenta carrapatos (26,56%) coletados de 16 cães apresentaram DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, responsável pela forma cutânea da doença. Não foi detectado nenhum DNA de *Leishmania infantum chagasi*. Carrapatos infectados foram coletados de ambos os cães sintomáticos e assintomáticos. Embora ainda não tenha sido demonstrado que os carrapatos possam transmitir *Leishmania* aos cães sob condições naturais, o resultado deste estudo tem vários aspectos importantes, pois é um método não-invasivo de detecção, capaz de diferenciar os grupos de parasitas em circulação, em especial se os animais não têm lesões, pode ser um indicador biológico em locais onde não é feito uma investigação sorológica e nem entomológica, podendo dar suporte aos programas de vigilância de saúde local.

**Palavras-chave:** *Leishmania*; leishmaniose; Carrapato; Reação em Cadeia da Polimerase

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by the protozoan *Leishmania*, can affect humans and animals depending on the species of the parasite, transmitted by sandflies are female insects of the genus *Lutzomyia*, that in exercising hematophagism inoculated infective promastigote forms, but recently has been raised hypotheses about the transmission by ticks. According to the epidemiological surveillance of Imperatriz-MA is a city endemic for both Cutaneous Leishmaniasis (LT) and for Visceral Leishmaniasis (VL). This study aimed to investigate the presence of *Leishmania spp* in ticks collected from dogs presented to petshop and Zoonoses Control Centre of the Municipality of Imperatriz using the PCR technique. DNA was extracted from 640 female ticks and tested using the primer which amplifies the mini-exon gene of *Leishmania sp*. Ticks were collected from 41 dogs of different neighborhoods of Imperatriz. Most ticks were identified as *Rhipicephalus sanguineus*. The following clinical signs of leishmaniasis in dogs were observed: onychogryphosis in 53.65% (22/41); ulcers 63.41% (26/41), hair loss and loss of appetite in 39.02% (16 / 41). One hundred and seventy ticks (26.56%) of 16 dogs had collected DNA from *Leishmania* subgenus *Viannia*, responsible for the cutaneous form of the disease. DNA was not detected none of *Leishmania infantum chagasi*. Infected ticks were collected from both symptomatic and asymptomatic dogs. Although it has not been shown that ticks can transmit *Leishmania* to dogs under natural conditions, the outcome of this study has several important because it is a non-invasive method of detection, able to differentiate groups of parasites in circulation, particularly if animals do not have lesions, may be a biological indicator in places where there is an investigation done serological and entomological not and can support the programs of the local health surveillance.

**Keywords:** *Leishmania*, leishmaniasis, tick; Polymerase Chain Reaction



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CE = Ceará

DNA = Ácido desoxirribonucléico

Fg = fentogramas

HIV = Vírus da Imunodeficiência Humana

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL = Interleucina

INF- $\gamma$  = Interferon Gama

LC = Leishmaniose Cutânea

LCAD = Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa

LCD = Leishmaniose Cutânea Difusa

LCL = Leishmaniose Cutânea Localizada

LCM = Leishmaniose Cutâneo-Mucosa

LT = Leishmaniose Tegumentar

LTA = Leishmaniose Tegumentar Americana

LV = Leishmaniose Visceral

NMT-UFPA = Núcleo de Medicina Tropical – Universidade Federal do Pará

Pb = Pares de Base

PCR = Reação em Cadeia de Polimerase

RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta

*Rh. sanguineus* = *Rhipicephalus sanguineus*

Rpm = Rotações Por Minuto

SFM = Sistema Fagocítico Monocitário

TNF- $\alpha$  = Fator de Necrose Tumoral-alfa

$\mu$ l = Microlitros

OMS = Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	14
<b>3 OBJETIVOS</b>	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos	16
<b>4 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	17
4.1 SOBRE O PARASITA <i>LEISHMANIA SP</i>	17
4.1.2 Ciclo de vida de <i>Leishmania sp</i>	18
4.1.3 Animais atuantes no ciclo de vida de <i>Leishmania sp</i>	19
4.1.3.1 Ectoparasitas – Carrapatos	20
4.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	21
4.3 LEISHMANIOSE VISCERAL	25
4.3.1 PATOGENIA	27
4.4 DIAGNÓSTICO	28
4.4.1 Diagnóstico Clínico	28
4.4.2 Diagnóstico laboratorial	29
4.4.2.1 Diagnóstico parasitológico	29
4.4.2.2 Diagnóstico Imunológico	29
4.4.2.3 Métodos Moleculares	30
4.4.2.3.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	30
4.5 TRATAMENTO	31
4.6 EPIDEMIOLOGIA	32
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b>	34

	11
5.1 TIPO DE ESTUDO	34
5.2 LOCAL DE ESTUDO	34
5.3 DADOS DO HOSPEDEIRO	35
5.4 POPULAÇÃO DE ESTUDO	35
5.5 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	35
5.6 COLETA E CONSERVAÇÃO DA AMOSTRA	35
5.7 EXTRAÇÃO DE DNA	36
5.8 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR	36
5.9 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	37
5.10 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	37
5.11 ANÁLISE DOS RESULTADOS	38
<b>6 RESULTADOS</b>	39
6.1 EPIDEMIOLOGIA DOS CÃES UTILIZADOS COMO FONTES DE AMOSTRAS	39
	40
6.2 RESULTADOS DA PCR	
6.3 PREVALÊNCIA DOS CASOS POSITIVOS EM RELAÇÃO AOS BAIRROS DE IMPERATRIZ	43
6.4 EPIDEMIOLOGIA DOS CÃES CUJO AMOSTRAGEM DE CARRAPATOS OBTIVEU PCR POSITIVA.	43
<b>7 DISCUSSÕES</b>	45
<b>8 CONCLUSÃO</b>	47
<b>REFERÊNCIAS</b>	48
<b>ANEXOS</b>	52

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, podendo acometer o ser humano com variações clínicas bem distintas, de acordo com a espécie em questão e o órgão acometido. Sendo assim, as diferentes formas clínicas podem ser popularmente conhecidas como calazar indiano, botão do oriente, ferida brava, úlcera de Bauru, uta e úlcera de chiclero. A doença afeta mais de 80 países e segundo a organização Mundial da Saúde (OMS) o número de pessoas infectadas está em torno de 12 milhões em todo mundo. Sua crescente ocorrência pode ser justificada pelo desmatamento de florestas, falta de saneamento básico e higiene, desnutrição e imunossupressão. É causa importante de morbi-mortalidade reduzindo drasticamente a qualidade de vida dos infectados e assim intensificando ainda mais sua associação com a desigualdade social (GIL et al, 2007).

Infecções por *Leishmania sp* tem grande ocorrência em diversos países tropicais, contribuindo para o retardo no desenvolvimento econômico dos países endêmicos para a doença (MÜLLER, 2008).

A leishmaniose pode atingir diversos mamíferos, como cães, equídeos, gatos e homens. Diversas espécies estão associadas ao desenvolvimento da doença que pode se apresentar como leishmaniose visceral, leishmaniose tegumentar ou leishmaniose mucocutânea (NEVES, 2005).

A leishmaniose canina é causada principalmente por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, porém, outras espécies também podem afetar os cães como *Leishmania amazonensis* (DANTAS-TORRES et al, 2010).

A transmissão para hospedeiros vertebrados ocorre através da picada da fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, que durante o hematofagismo inocula no hospedeiro as formas promastigotas metacíclicas. O hospedeiro invertebrado, por sua vez, se infecta ao realizar repasto sanguíneo em hospedeiro infectado, havendo ingestão da forma amastigota de *Leishmania* (REY, 2010).

Apesar de *Lutzomyia longipalpis* ser considerado o principal vetor de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, existem outras formas suspeitas de transmissão. Carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* estão sendo

apontados como vetores, principalmente em regiões onde o flebotomíneo responsável pela transmissão está ausente (DANTAS-TORRES et al, 2010).

Estudos estão sendo realizados com intuito de investigar a possibilidade da atuação de artrópodes hematófagos na transmissão da leishmaniose. Cães, equídeos e gatos podem albergar importantes vetores de doenças, como pulgas e carrapatos, e por isso é necessário que se façam investigações precisas que determinem o real papel destes animais na disseminação de doenças como leishmanioses, tendo em vista a possibilidade de serem importantes fontes de infecção para humanos. (OTRANTO et al, 2010).

Desta maneira, o presente estudo realizou uma investigação em carrapatos de cães da cidade de Imperatriz – MA, com ou sem diagnóstico de leishmaniose, com a finalidade de detectar a infecção por *Leishmania sp* por meio do uso da reação em cadeia da polimerase (PCR).

## 2 JUSTIFICATIVA

*Leishmania sp* é um protozoário causador de diversas formas clínicas de doenças, com alta incidência nos países tropicais. A doença é uma importante causa de morbidade e mortalidade nessas áreas endêmicas trazendo prejuízo à saúde do indivíduo infectado, bem como causando atraso no desenvolvimento dos países acometidos. Este fato traz a necessidade de um amplo conhecimento acerca do parasita, da doença por ele causada e do seu ciclo de vida, pois só assim poderão ser tomadas as medidas necessárias para a prevenção da infecção.

Até o presente momento acredita-se que flebotomíneos (*Lutzomyia sp*) sejam os únicos vetores do parasita, transmitindo a doença do animal para o homem ou do homem para o animal.

Alguns estudos estão sendo realizados com intuito de elucidar a possibilidade da transmissão de *Leishmania sp* acontecer, também, através de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*. Entretanto, até o momento, essa é uma questão ainda sem comprovação, o que mostra a necessidade da realização de diferentes estudos que possam comprovar ou descartar esta possibilidade.

Imperatriz é uma cidade localizada a oeste do estado do Maranhão, possuindo clima quente e úmido e condições precárias de saneamento básico, fatores estes, que contribuem para uma alta taxa de incidência das doenças causadas por *Leishmania sp*. No ano de 2010 a cidade registrou uma incidência de 29 casos de Leishmaniose Tegumentar (LT) e 33 casos de Leishmaniose Visceral (LV) em humanos, sendo considerada, pela secretaria de saúde, como intensa incidência.

Devido a essa alta taxa de ocorrência, estudos devem ser realizados na tentativa de elucidar hipóteses que levantam a possibilidade de outros vetores estarem atuando na disseminação da doença, como por exemplo, pulgas e carrapatos que por realizarem hematofagia poderiam ser também vetores de *Leishmania sp* contribuindo assim para que se complete o ciclo de vida deste protozoário.

A comprovação desta forma de transmissão explicaria a ocorrência de leishmaniose em locais onde não há evidências da existência do flebótomo transmissor e ainda. O conhecimento de todos os meios de disseminação da doença

é imprescindível para um combate eficaz da sua transmissão e como consequência trará consigo melhoria na qualidade de vida da população e desenvolvimento das regiões endêmicas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de carrapatos infectados por *Leishmania sp* em cães do município de Imperatriz-MA.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a prevalência de carrapatos, colhidos de cães de diferentes bairros da cidade, infectados por *Leishmania sp*;
2. Verificar a prevalência de *Leishmania sp* em carrapatos colhidos de cães, através da reação em cadeia da polimerase (PCR);
3. Caracterizar demograficamente cães com ou sem suspeita de leishmaniose.



## 4 REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 SOBRE O PARASITA *LEISHMANIA SP*

O gênero *Leishmania* (Ross, 1903) é composto por espécies de protozoários, unicelulares, heteroxênicos, possuidores das formas evolutivas promastigota (fig.1) e paramastigota (flagelados livres ou aderidos ao trato digestivo de hospedeiros invertebrados) e amastigota (fig. 2) (forma intracelular, sem flagelo livre). Pertence à ordem *Kinetoplastida*, e à família *Trypanosomatidae* (NEVES, 2007).

No Brasil, Os parasitos do gênero *Leishmania* podem causar doenças denominadas leishmanioses ou leishmaníases que podem se apresentar de diferentes formas clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea ou leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), leishmaniose cutânea-anérgica-difusa (LCAD) e leishmaniose visceral (LV). As leishmanioses cutâneas e mucocutâneas são, muitas vezes, denominadas Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (REY, 2001).

Até algum tempo atrás, as espécies causadoras de leishmaniose eram diferenciadas apenas pela forma clínica de doença que causavam, assim sendo, eram reconhecidas apenas três espécies de *Leishmania*, que correspondiam às entidades clínicas de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. Nos últimos anos outros critérios começaram a ser utilizados para diferenciação das espécies desses parasitas: análise de restrição do DNA do cinetoplasto, hibridização do DNA nuclear, padrões de isoenzimas e testes sorológicos com anticorpos monoclonais (MARKELL et al, 2003).



Figura 1: Forma promastigota  
Fonte:<http://www.parasitoliga.com/protozooses.htm>

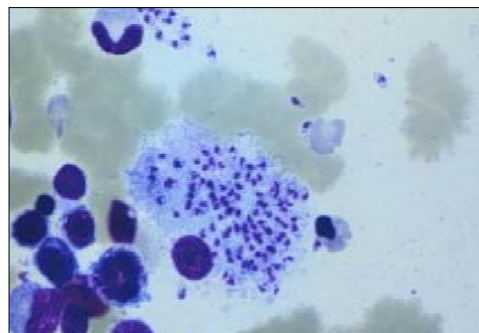


Figura 2: Forma amastigota. Fonte:  
<http://www.parasitoliga.com/protozooses.htm>

#### 4.1.2 Ciclo de vida de *Leishmania sp*

Ao picar a pele do hospedeiro infectado, o flebótomo ou flebotomíneo ingere histiócitos da pele contendo a forma amastigota de *Leishmania* em seu citoplasma. Essas formas chegam ao intestino médio do inseto e se transformam em promastigotas, contendo flagelo livre, que se aderem ao epitélio do tubo digestivo e se multiplicam por divisão binária. Essas promastigotas, então, migram para a parte anterior do tubo digestivo do inseto e em torno de 3 a 4 dias diferenciam-se para formas promastigotas infectantes, invadindo a faringe do inseto. Durante novo repasto sanguíneo, o flebótomo inocula juntamente com sua saliva as formas infectantes no interior da derme de outro hospedeiro com conseqüente invasão de macrófagos. As formas amastigotas daí resultantes se multiplicam nos vacúolos parasitóforos até o rompimento dos macrófagos parasitados e invasão de novos macrófagos, ocorrendo disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do Sistema Fagocítico Monocitário (SFM) como linfonodos, baço, fígado, medula óssea etc (CIMERMAN, 2005).

A figura 3 ilustra de forma resumida o ciclo de vida do parasita *Leishmania sp* no homem e no inseto vetor

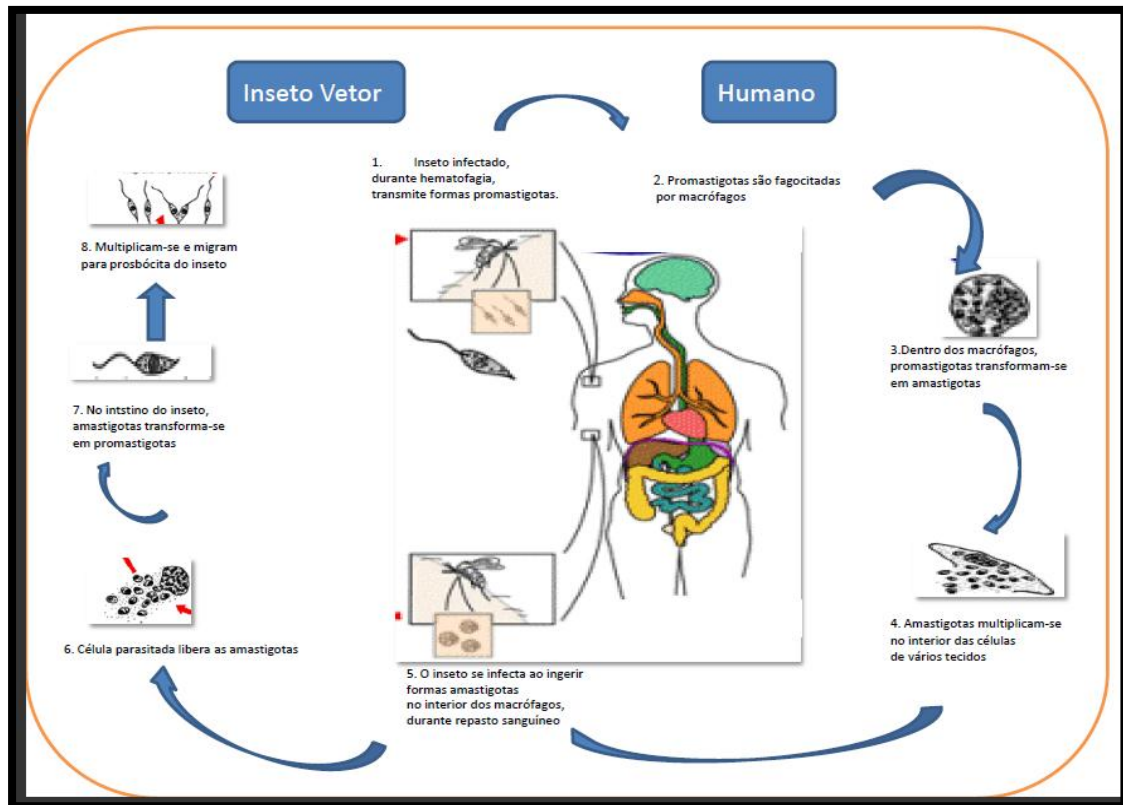


Figura 3. Ciclo biológico de *Leishmania sp*  
 Fonte: adaptado de <http://www.sociedadeparasitologia.com.br>

#### 4.1.3 Animais Atuantes No Ciclo De Vida De *Leishmania sp*

Alguns animais silvestres podem ser hospedeiros de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, atuando como reservatórios do parasita. Entre esses animais temos a raposa e os marsupiais. No ambiente doméstico o cão é considerado um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores (GONTIJO E MELO, 2004).

Estudos realizados a partir da década de 80 demonstram a participação de cães no ciclo de transmissão das leishmanioses. Estes estudos consideraram que os achados clínicos, histopatológicos e sorológicos em cães experimentalmente infectados foram similares aos verificados na infecção canina natural, bem como na doença humana. Trabalhos mais recentes têm mostrado ser relativamente comum a presença de cães infectados por *Leishmania (V) braziliensis* em diferentes focos de LT, contudo demonstrou-se haver uma estreita relação entre casos de leishmaniose

tegumentar em humanos e a positividade para *Leishmania braziliensis* em cães domésticos (JUNIOR, 2010).

Estima-se que milhões de cães, nas Américas, tenham a infecção, principalmente no Brasil. Esse hospedeiro apresenta variações no quadro clínico da doença, passando de animais aparentemente saudáveis a oligossintomáticos podendo chegar a estágios graves da doença com intenso parasitismo cutâneo. Assim, o cão 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 (ALMEIDA, 2009).

Os equídeos são animais que também vêm sendo investigados como hospedeiros de *Leishmania sp.* Na Venezuela foi encontrada *Leishmania braziliensis* em lesões cutâneas de *Equus caballus* e *Equus asinus*. No Brasil, foram registradas lesões leishmanióticas, também causadas pela *Leishmania braziliensis*, em *Equus asinus* e *Equus caballus*. Estes animais são muito utilizados na zona rural como meio de transporte, tendo assim, contato direto com o homem. São fontes importantes de alimentação para os flebótomos e ectoparasitas, podendo assim, por serem hospedeiros de *Leishmania sp.*, estarem atuando como fonte de infecção. Porém, é necessário que se realizem estudos para investigar se é possível que estes hematófagos se infectem ao se alimentar do sangue dos equídeos podendo assim transmitir a *Leishmania* para outros animais (CERQUEIRA, 2003).

#### 4.1.3.1 Ectoparasitas – Carrapatos

Até o momento, a transmissão das diferentes espécies de *Leishmania* tem sido associada exclusivamente aos flebótomos vetores. Entretanto, outras formas de transmissão vêm sendo discutidas nos últimos anos. Em particular, a hipótese da atuação de carrapatos como vetores de *Leishmania infantum* vem sendo estudada através de técnicas de biologia molecular. Recentes estudos têm aberto novas linhas de discussão, mas tem levado a confusas conclusões a cerca da possibilidade de carrapatos como possíveis vetores de *Leishmania sp.* (DANTAS-TORRES, 2011).

Carrapatos são artrópodes, da classe *Arachnida*, subclasse *Acari* e todos são ectoparasitas de vertebrados. *Rhipicephalus sanguineus* é uma das 680 espécies

conhecidas da família *Ixodidae*. Essa espécie de carrapato parasita comumente cães, mas pode também parasitar humanos principalmente trabalhadores rurais (FREIRE, 2009).

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* é conhecido como “carrapato vermelho” do cão, pois este é seu principal hospedeiro. É muito comum nas áreas urbanas do Brasil podendo transmitir diversas doenças como, por exemplo, as causadas por *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*. O *R.sanguineus* é parasita natural de cães mas já foi encontrado parasitando humanos, e devido a esse parasitismo humano pode provocar o aumento da incidência de erliquiose. Macerados de *R.sanguineus*, retirados de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) i. chagasi*, transmitiram o protozoário para hamster experimentalmente inoculados, o que mostra a possibilidade desse carrapato ser transmissor mecânico do calazar entre cães, pois esse animal ingere carrapatos (NEVES, 2005).

Paz et al (2010), após estudar a associação entre presença de anticorpos anti-*Leishmania* em cães da cidade de Belo Horizonte-MG e a prevalência de infestação por *R. sanguineus*, demonstrou uma maior positividade da presença destes anticorpos nos cães infestados pelos carrapatos *R. sanguineus* e por pulgas. De acordo com o autor, esses dados evidenciam a capacidade vetorial desses ectoparasitas na transmissão da *Leishmania sp.* Porém, novos estudos devem ser realizados para a confirmação dessa hipótese.

Um estudo realizado após injeção de promastigotas de *L. infantum* em fêmeas de *R. sanguineus* demonstrou a presença de kDNA de *L. infantum*, através de técnicas de PCR, não só em todas as fêmeas inoculadas mas também nos ovos e larvas por elas gerados (DANTAS, 2010).

## 4.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A leishmaniose tegumentar (LT), também conhecida como leishmaniose cutânea (LC), é uma doença endêmica em vários países tropicais da América, África e Ásia. Estimativas calculam que 400.000 novos casos aconteçam por ano no mundo (ALMEIDA, 2005).

No Brasil, a leishmaniose tegumentar é causada por sete espécies, listadas no quadro 1, sendo as mais importantes, sob ponto de vista nosológico humano, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (HEUSSER JUNIOR, 2010).

<b>Subgênero <i>Viannia</i> Lainson &amp; Shaw, 1972</b>	<b>Acometimento Clínico no Homem</b>	<b>Distribuição Geográfica</b>
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> (Vianna, 1911)	Lesões cutâneas e mucosas	Da América Central ao norte da Argentina
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> (Floch, 1954)	Predominantemente lesões Cutâneas	Calha norte da Bacia Amazônica, Guianas e países do noroeste sulamericano
<i>Leishmania (V.) lainsoni</i> (Silveira <i>et al.</i> , 1987)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas	Norte do Estado do Pará
<i>Leishmania (V.) naiffi</i> (Lainson <i>et al.</i> , 1990)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>Leishmania (V.) shawi</i> (Shaw <i>et al.</i> , 1991)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>Leishmania (V.) lindenberg</i>	Lesões Cutâneas	Pará
<b>Subgênero <i>Leishmania</i> (Saf'lanova, 1982)</b>	<b>Acometimento clínico no homem</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i> (Lainson & Shaw, 1972)	Lesões cutâneas e, eventualmente, cutâneo-difusas	América Central e regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil

Quadro 1. Espécies de *Leishmania* dermatotrópicas, encontradas no Brasil.

Fonte: Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, 2006.

GONTIGO e CARVALHO (2003) descrevem as mais importantes espécies causadoras de leishmaniose tegumentar da seguinte forma:

***Leishmania (Viannia) braziliensis:***

Espécie mais prevalente no homem, podendo causar lesões cutâneas e mucosas. É encontrada em todas as zonas endêmicas do país e está geralmente, associada a presença de animais domésticos. Diferentes espécies de flebotomíneos podem atuar como transmissores, tais como, *Lutzomyia whitmani*, *Lu. Wellcomei* e *Lu. intermedia*.

***Leishmania (Leishmania) amazonensis:***

Agente etiológico de LTA, incluindo a forma anérgica ou leishmaniose cutânea difusa. Seus reservatórios são roedores e marsupiais e a *Lu. flaviscutellata* e *Lu. olmeca* os principais vetores.

***Leishmania (Viannia) guyanensis:***

Espécie causadora, principalmente, de lesões cutâneas. Ocorre na margem norte do Rio Amazonas em áreas de colonização recente, estando associada com desdentados e marsupiais. As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão são a *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani*.

A transmissão da LT ocorre através da picada de insetos hematófagos do gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente por birigui, mosquito-palha e tatuquira. Apenas as fêmeas são capazes de transmitir a doença, pois só elas exercem hematofagismo, devido a necessidades de aminoácidos e proteínas, presentes no sangue dos hospedeiros vertebrados, para o desenvolvimento dos ovos. Durante este repasto sanguíneo, a fêmea corta com suas mandíbulas o tecido subcutâneo logo abaixo da epiderme, formando sob esta um afluxo de sangue, onde são inoculadas as formas promastigotas provenientes das regiões anteriores do trato digestivo (NEVES, 2005).

A doença está incluída entre as seis infecções parasitárias mais frequentes no mundo, é um importante problema de saúde pública não só por sua frequência, mas também pelas lesões e mutilações que causa no paciente. A doença manifesta-se inicialmente pelo aparecimento de uma única ulceração encontrada, predominantemente, nos membros inferiores por serem locais frequentemente expostos e de fácil acesso ao flebótomo transmissor (TEIXEIRA, 1999).

Após a picada do flebótomo, as formas promastigotas inoculadas na pele do mamífero invadem os macrófagos ali presentes, se transformam em amastigotas e

se multiplicam até o rompimento celular, invadindo novas células. Após a inoculação da *Leishmania* ocorre formação de lesão cutânea na porta de entrada, de aspecto pápulo-vesiculoso ou impetigóide, que não raro evolui para regressão espontânea. A infecção pode continuar sua marcha, surgindo lesões cutâneas disseminadas e invasão da mucosa nasofaríngea (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

O período de incubação da forma cutânea pode variar de uma semana a um mês, enquanto lesões mucosas geralmente surgem um a dois anos após o início da infecção (MURBACK et al, 2010).

A forma cutânea da leishmaniose tegumentar apresenta como principais sinais e sintomas: lesão ulcerada, indolor, com bordas elevadas em moldura, sendo fundo granuloso com ou sem exsudação. Pode ser única, múltipla, disseminada ou difusa. E na forma mucosa da doença pode ser encontrado: obstrução nasal, eliminação de crostas, epistaxe, disfagia, odinofagia, rouquidão, dispneia e tosse, podendo apresentar lesões destrutivas, principalmente nas cavidades nasal e oral, faringe e laringe (HORIMOTO, 2009).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma variante da LT, considerada rara e caracterizada por maciço comprometimento dérmico, de natureza crônica, com recidivas frequentes e anergia ao teste intradérmico de Montenegro. As primeiras descrições foram feitas no Brasil, Venezuela e Bolívia. As pesquisas chamaram atenção para as manifestações clínicas do tipo maculopapulonodulares, a disseminação da doença, sua cronicidade, riqueza parasitária, refratariedade aos tratamentos e sua semelhança com a hanseníase virchowiana (COSTA et al, 2009).

No Brasil, essa forma da doença é causada pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, e caracteriza-se por lesões nodulares, precedidas por úlcera única que evolui com disseminação linfática do parasito e está associada a uma resposta imune celular deprimida que leva o paciente a um estado de anergia imunológica (MURBACK et al, 2010).

Em algumas regiões é possível a realização do diagnóstico clínico-epidemiológico, contudo o diagnóstico laboratorial é de suma importância para a diferenciação entre LTA e outras dermatoses granulomatosas. O diagnóstico laboratorial pode ser realizado através da pesquisa direta por aposição de tecido em lâmina, cultura em meio específico e inoculação em hamster, além de exame histopatológico e reação em cadeia de polimerase (PCR). Exames imunológicos,



como intradermorreação de Montenegro e imunofluorescência indireta, são métodos indiretos que também auxiliam na definição diagnóstica (MURBACK et al, 2010).

Quanto a epidemiologia, a LT está amplamente distribuída, afetando quase todos os continentes, onde apenas a Oceania não apresenta casos. Afeta vinte e dois países no novo mundo e sessenta e seis no velho mundo. Em geral a América do Sul é endêmica tendo Brasil e Peru com maior prevalência.

No Brasil as regiões mais afetadas são norte e nordeste, com um total de 50% de todos os casos registrados no país, porém, sua distribuição é ampla não sendo encontrada apenas no estado do Rio Grande do Sul. Os estados da região nordeste mais afetados são Bahia, Maranhão e Ceará (TEIXEIRA, 1999).

Foram registrados no Brasil, no período de 1998 a 2008, aproximadamente 282.000 casos de LTA. Ao longo dos anos, a LTA comportou-se como doença classicamente profissional, acometendo de forma típica homens adultos expostos a regiões de mata. Contudo, tem apresentado, nas últimas décadas, mudanças em relação ao seu comportamento epidemiológico, diante do extenso processo de urbanização, com crescente acometimento de mulheres e crianças (MURBACK et al, 2010).

#### 4.3 LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral, no Brasil, é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (ALVARENGA et al, 2010).

O primeiro caso de leishmaniose visceral (LV) no Brasil foi relatado em 1934 quando foram encontradas amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígados de pacientes com suspeita de febre amarela. Vinte anos após este achado, foi confirmado o surto de leishmaniose em Sobral-CE. Na década de 80 houve uma grande mudança na distribuição da doença, que antes se restringia à áreas rurais da região nordeste, agora sendo encontrada na maioria dos estados brasileiros incluindo as grandes cidades. Nos últimos anos foram registrados casos autóctones em 19 dos 27 estados brasileiros. Atualmente os estados do Pará, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo, além dos estados do nordeste, passaram

a influir consideravelmente na alta incidência da doença no Brasil (GONTIJO E MELO, 2004).

A transmissão ocorre por meio da picada das fêmeas de dípteros da família *Psychodidae* subfamília *Phlebotominae*. A principal espécie transmissora é a *Lutzomyia longipalpis*. O inseto mede entre 3 e 4 mm e está bem adaptado ao ambiente peri-domiciliar podendo ser encontrado em toda América Latina. No Brasil, *L. (L) i. chagasi* também pode ser transmitida pela espécie *Lutzomyia cruzi* (ROMERO, BOELAERT, 2010).

Os flebotomíneos transmissores de *Leishmania sp* são insetos noturnos ou crepusculares, tipicamente de matas; porém, devido à ação antrópica, os habitats desses insetos estão sendo modificados, havendo uma redução dos ambientes por eles utilizados. Portanto, as espécies estão se aproximando cada vez mais do peridomicílio por terem se tornado de alguma forma, resistentes às condições adversas e conseguirem explorar novos ambientes (ALMEIDA, 2010).

*Lutzomyia longipalpis* foi identificado pela primeira vez como possível inseto transmissor de leishmaniose visceral quando Chagas observou que estes insetos hematófagos eram comumente encontrados em domicílios e áreas peridomiciliares de pacientes diagnosticados com a doença (NASCIMENTO, 2007).

Apesar de *Lutzomyia longipalpis*, (figura 4), ser o principal agente transmissor de leishmaniose visceral, a ocorrência da doença em áreas onde este flebótomo não é encontrado evidenciou a possibilidade de a transmissão ocorrer através de outra espécie. Um estudo entomológico realizado na cidade de Jaciara- Mato Grosso mostrou que apesar da presença de casos de leishmaniose visceral no município, não foram identificadas espécies de *L. longipalpis*. O inseto predominante no estudo foi o da espécie *Lutzomyia cruzi*, após análise de DNA através de técnicas de PCR foi possível demonstrar a infecção dos insetos por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* caracterizando-os como potenciais transmissores da doença (MISSAWA, 2011).



Figura 4: *Lutzomyia longipalpis*  
Fonte: <http://www.sociedadedeparasitologia.com.br>

#### 4.3.1 PATOGENIA

Indivíduos infectados evoluem para um estado sintomático que é caracterizado por febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e pancitopenia. Em alguns casos, pode também ocorrer diarreia e linfadenopatia. O protozoário provoca uma doença crônica e sistêmica (MURRAY, 2003).

Um achado importante em pacientes com leishmaniose visceral é a anemia severa, que embora seja um achado frequente, sua patogênese envolve mecanismos complexos. Os estudos mostram, frequentemente, uma diminuição da sobrevivência das hemácias na fase aguda da doença, bem como positividade para o teste de coombs (VILELA, 1995).

Outros sintomas que podem aparecer incluem fadiga, hemorragia e infecções bacterianas causadas pela diminuição de neutrófilos. Acometimento do sistema nervoso em paciente com leishmaniose visceral é raro, mas em 2010 um relato de caso comprovou danos neurológicos em uma criança com leishmaniose visceral no Brasil. Os mecanismos pelos quais ocorre o dano neurológico ainda não estão esclarecidos (DINIZ, 2010).

*Leishmania sp* é um parasita intracelular, e na fase sintomática da doença são demonstradas amastigotas presentes nos macrófagos localizados na medula óssea, fígado e baço sendo estes os locais mais afetados no organismo. Estes pacientes sintomáticos devem receber tratamento específico para a doença, no entanto estudos mostram que grande parcela dos indivíduos infectados são assintomáticos e cursam com evolução benigna (MURRAY, 2003).

Cerca de 90% dos casos sintomáticos são fatais se não houver tratamento adequado, sendo que hemorragias e infecção generalizada são as causas da morte pela doença. Com o surgimento da AIDS, a leishmaniose ganhou importância devido à suscetibilidade dos portadores do HIV (BOTELHO, 2009).

A associação de co-morbidades como a desnutrição, o diagnóstico tardio da doença e a presença de complicações, como as infecções bacterianas principalmente por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e as hemorragias concorrem para o aumento da letalidade por este agravo (OLIVEIRA et al, 2010).

#### 4.4 DIAGNÓSTICO

A leishmaniose visceral é uma doença com alta ocorrência no Brasil podendo levar a 95 % de letalidade quando não tratada adequadamente. O diagnóstico precoce tanto do homem quanto do hospedeiro reservatório se faz necessário para a realização do tratamento adequado e para a realização de medidas de controle da doença, incluindo o sacrifício do animal infectado (ALVES, 2004).

##### 4.4.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral é complexo devido a semelhança dos sintomas com os apresentados em outras doenças tais como doença de chagas, malária, esquistossomose, febre tifóide e tuberculose. Os principais sinais e sintomas apresentados pelo paciente com LV são: febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, leucopenia, anemia, tosse hipergamaglobulinemia, dor abdominal, diarreia, perda de peso e caquexia.

O diagnóstico clínico da LV canina é muitas vezes um problema para o veterinário. Há um amplo espectro de sinais clínicos, desde animais aparentemente saudáveis, passando por oligossintomáticos, até estágios severos da doença. Uma característica importante é a permanência da doença clinicamente inaparente por longos períodos. Nos cães, a doença é sistêmica crônica e pode levar o animal à morte. Dependendo da fase da doença e das condições imunológicas, muitos cães infectados se apresentam assintomáticos.

Entretanto, já foi demonstrado que cães infectados, mesmo assintomáticos, são fonte de infecção para os flebotomíneos e, conseqüentemente, têm papel ativo na transmissão de *Leishmania* (GONTIJO, 2004).

#### 4.4.2 Diagnóstico laboratorial

##### 4.4.2.1 Diagnóstico parasitológico

O método diagnóstico da leishmaniose considerado “padrão ouro” é a visualização de amastigotas através de aspirados ou biópsia de medula óssea, baço, fígado ou linfonodo (DINIZ, 2010).

O material obtido é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório. As punções de baço e medula óssea são consideradas técnicas invasivas, não sendo adequadas para estudos epidemiológicos em larga escala e muitas vezes são também inadequadas para diagnóstico individual (GONTIJO, 2004).

Apesar de o exame direto através da demonstração do parasita em tecidos como fígado, baço e pele serem muito confiáveis quanto a positividade de casos, essa técnica não é eficaz para realizar uma cobertura total de casos positivos (ALVES, 2004).

##### 4.4.2.2 Diagnóstico Imunológico

A leishmaniose visceral é caracterizada por estimulação de linfócitos B que resulta em hipergamaglobulinemia e grande produção de anticorpos, facilitando a realização de testes imunológicos e evitando a realização dos invasivos testes parasitológicos (GONTIJO, 2004).

A partir de 1938 a técnica de Reação de Fixação do Complemento (RFC) começou a ser utilizada e foi considerada melhor que o exame direto em sensibilidade e especificidade. Contudo, reações cruzadas podem ser observadas em títulos baixos com a doença de chagas e a LTA.

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) começou a ser utilizada a partir da década de 60, com sensibilidade variando entre 90 e 100 % e especificidade aproximada de 80 % para amostras de soro, podendo também haver

reação cruzada com outros tripanossomatídeos como o da doença de chagas e os da LTA. Em meados da década de 70, com objetivo de tornar o diagnóstico mais sensível e específico, vários estudos foram realizados para avaliar e aprimorar o teste de ELISA padrão. A utilização de antígenos recombinantes ou purificados como as glicoproteínas de membranas gp63, gp72, gp70 e rK39 específicas do gênero *Leishmania*, melhoram a sensibilidade e a especificidade da técnica. Entretanto, reações cruzadas com enfermidades causadas por outros tripanossomatídeos podem ainda ocorrer (ALVES, 2004).

#### 4.4.2.3 Métodos Moleculares

##### 4.4.2.3.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Apesar dos diversos testes disponíveis para o diagnóstico da leishmaniose, a necessidade de um teste que possibilite detecção precoce, e que possua alta especificidade para um determinado patógeno fez com que a utilização da análise de ácidos nucleicos na detecção de parasitos ganhasse espaço no ramo das pesquisas (GERALDO, 2008)

O desenvolvimento da reação em cadeia de polimerase (PCR) por Mullis e colaboradores foi um marco na biotecnologia e o prenúncio do diagnóstico molecular. A PCR é a estratégia de amplificação mais amplamente utilizada, é uma reação química *in vitro* que permite a síntese de quantidades essencialmente ilimitadas de sequências do ácido nucleico alvo. Isso pode ser obtido pela ação de uma DNA polimerase que, sob as condições apropriadas, é capaz de copiar uma fita de DNA (HENRY, 2008).

Diferentes sequências de DNA têm sido utilizadas com propósito de diagnosticar leishmaniose, apresentando boa sensibilidade. Entre essas sequências podem-se citar os minicírculos de kDNA. A sensibilidade de detecção do DNA de *Leishmania sp* tem girado em torno de fentogramas (fg) de DNA. Recentemente, variações da técnica de PCR ou associação da PCR com outras técnicas têm permitido, além da detecção do parasita, sua identificação específica. A PCR específica, utilizando diferentes pares de iniciadores, pode revelar a espécie do

parasito envolvido. Entretanto, deve-se proceder a uma reação diferente para cada espécie do parasito a ser considerada. Recentemente, através da utilização da técnica PCR-RFLP, demonstrou-se que a clivagem do fragmento amplificado de 120 pb com as enzimas de restrição *AvaI* e *HaeIII* permite a diferenciação entre *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Esta metodologia abre uma perspectiva importante no sentido de identificar as principais espécies de *Leishmania*, constituindo uma importante ferramenta, com alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico das doenças parasitárias, tendo um grande potencial para o diagnóstico das diferentes formas de leishmaniose e permitindo identificar o agente etiológico diretamente da amostra clínica (DE CARLI, 2007).

#### 4.5 TRATAMENTO

Existem no mercado mundial, diversos fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose. Entretanto tais fármacos podem apresentar uma série de problemas como, por exemplo, resistência do parasita e indução de efeitos colaterais que limitam a utilização e, principalmente, a eficácia destes fármacos. Os fármacos existentes no mercado são de administração parenteral, fato que dificulta a realização completa e eficaz do tratamento, pois há necessidade da colaboração do paciente que muitas vezes desiste do tratamento (BEZERRA, 2004).

A primeira linha de tratamento envolve o uso de uma combinação antimonial pentavalente, onde as drogas frequentemente utilizadas são o estibogliconato sódico (Pentostam<sup>®</sup>) e o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>). Comumente, o tratamento com estas drogas pode trazer efeitos colaterais, tais como, dor abdominal, anorexia, náuseas, vômitos, mialgia, artralgia, dor de cabeça. Elevação nos níveis de amilase e lipase pode ocorrer em alguns pacientes, mas apenas a minoria pode apresentar sinais clínicos de pancreatite. Os antimoniais pentavalentes devem ser usados com cautela em idosos, pacientes com doença renal e cardíaca, assim como em mulheres grávidas.

O ministério da saúde recomenda uma dose de 20mg/Kg/dia de Glucantime<sup>®</sup> durante aproximadamente 28 dias, atingindo um máximo de 40 dias (VELEZ, 2009).

No Brasil, estudos realizados *in vitro*, mostraram que não existem cepas de *L. (L) i. chagasi* resistentes aos antimoniais. Em caso de recidiva da doença é recomendado um segundo tratamento, de maior duração, sem extrapolar 40 dias (NEVES, 2005).

Alguns países, no entanto, já demonstraram resistência ao tratamento com antimoniais. Na África foi observado 1% de resistência ao tratamento, enquanto na Índia até 60% dos tratamentos realizados com antimoniais não obtém sucesso. Na Índia o tratamento indicado para leishmaniose causada por *L. donovani* é realizado com o Miltefosine<sup>®</sup>, porém este tratamento não se mostrou eficaz contra *L. infantum*. Outros compostos vêm sendo usados, com sucesso, para o tratamento de pacientes com LV. O desoxicolato de sódio de anfotericina B (Fungisone<sup>®</sup>) é efetivo, mas requer administração parenteral por longos períodos e está associado a nefrotoxicidade, entre outros efeitos colaterais. Contudo, em casos de leishmaniose causada por cepa resistente aos antimoniais, estudos apontam a anfotericina B como droga de escolha (VELEZ, 2009).

A anfotericina B é um antibiótico polieno que interage com o ergosterol da membrana celular, formando poros que alteram a permeabilidade celular e o balanço iônico, causando morte celular. O mecanismo de ação dos antimoniais não é ainda totalmente conhecido, sendo provável a inibição de adenosina (ATP) e guanosina trifosfatos (AGP) através da inibição do ciclo do ácido cítrico e da glicólise, e a ativação e conversão do antimonial para a forma trivalente (SbIII). A atividade anti-*Leishmania* dos antimoniais também pode ser devida ao estímulo do macrófago do hospedeiro (LIMA et al, 2007).

#### 4.6 EPIDEMIOLOGIA

A leishmaniose visceral ficou historicamente conhecida como uma endemia rural, mas a partir da década de 1980 registrou-se um notável processo de urbanização da doença. A primeira epidemia urbana registrada no país ocorreu em Teresina. Posteriormente, foram descritas epidemias em Natal e São Luís, e a partir daí registrou-se sua disseminação para outras regiões do país. Recentemente foram



descritos casos autóctones no Rio Grande do Sul, estado que a até pouco tempo era considerado livre de leishmaniose.

O panorama epidemiológico mostra a gravidade da situação e a franca expansão geográfica da LV. De 1980 a 2008, foram notificados mais de 70 mil casos de LV no país, levando mais de 3.800 pessoas à morte. O número médio de casos registrados anualmente cresceu de 1.601 (1985-1989), para 3.630 (2000-2004), estabilizando-se a partir de então. Na década de 1990, apenas 10% dos casos ocorriam fora da Região Nordeste, mas em 2007, esta cifra chegou a 50% dos casos. Entre os anos de 2006 e 2008, a transmissão autóctone da LV foi registrada em mais de 1.200 municípios em 21 Unidades Federadas (WERNEK, 2010).

De acordo com GOTO 2009, a doença pode ser encontrada em 66 países de regiões tropicais e subtropicais, e 90 % dos casos ocorrem na Índia, Sudan, Bangladesh, Nepal e Brasil. É estimada uma ocorrência de 500.000 novos casos por ano no mundo, e no Brasil estima-se que ocorram 3.000 novos casos por ano.

Leishmaniose visceral é uma doença descrita em praticamente todos os estados brasileiros, com exceção do Acre. No período compreendido entre 2001 e 2006, os estados que apresentaram o maior número de casos foram Maranhão (3.562 casos), Minas Gerais (2.512 casos), Ceará (2.431 casos), Pará (1.970 casos) e Mato Grosso do Sul (1.189 casos) (BOTELHO, 2004)

Entre 1980 e 2005, o Brasil registrou 59.129 casos de leishmaniose visceral, sendo 82,5% na Região Nordeste. Gradativamente, a leishmaniose visceral expandiu-se para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, passando de 15% dos casos em 1998 para 44% em 2005. Entre 1998 e 2005 foram registrados casos autóctones em 1.904 (34,2%) diferentes municípios brasileiros (MAIA-ELKHOURY, 2008).

No Maranhão, desde o ano de 1982, a LV representa uma endemia, com surtos epidêmicos nos anos de 1984-1985, 1993-1994 e 1998-2001, sendo que nos anos de 1999 e 2000 o estado foi o maior notificador de casos à Fundação Nacional de Saúde (NASCIMENTO et al, 2006).

Imperatriz, de acordo com dados da vigilância epidemiológica, registrou 29 casos de LT e 33 de LV em 2010. Até maio de 2011, foram registrados 22 casos de LT e 12 de LV.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo do tipo descritivo, compreendendo o período de abril a julho de 2012, no município de Imperatriz – MA.

### 5.2 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi realizado no município de Imperatriz, estado do Maranhão, nordeste brasileiro. De acordo com o senso realizado pelo IBGE-2010 a cidade possui uma população de 247.553 pessoas, onde deste total 119.230 habitantes são do sexo masculino e 128.323 são do sexo feminino. Imperatriz é o segundo município mais populoso do estado, possuindo uma área de 1367,91 Km<sup>2</sup> e densidade demográfica de 180,97 hab/Km<sup>2</sup>. Com uma [latitude](#) de 5°31'33 sul e [longitude](#) de 47°28'33 oeste, localiza-se próximo à divisa com o Tocantins, num território razoavelmente plano e fértil, ao Sudoeste do estado, em uma [altitude](#) de 95 metros, em média.

Imperatriz está situada no oeste maranhense onde o clima predominante é o tropical sub-úmido com médias pluviométricas e térmicas altas. As chuvas são distribuídas nos primeiros meses do ano, mas o estado não sofre com longos períodos de seca. Apenas duas estações bem definidas podem ser identificadas na cidade: inverno ou estação das chuvas (novembro a março) e verão ou estação da seca (abril a outubro). A temperatura média no município oscila entre 20° e 38°, com picos de mais de 40° graus em dias mais quentes. Com sensações térmicas que chegam a 44° mesmo no inverno e chega a bater os 50° no verão.

O município de Imperatriz é o segundo maior do estado em população e em área territorial, tendo havido um grande crescimento populacional nas últimas décadas com a formação de favelas e bairros com precária infraestrutura. Soma-se a este aspecto o clima tropical, favorecendo o desenvolvimento de diversas doenças como, por exemplo, a leishmaniose.

### 5.3 DADOS DO HOSPEDEIRO

Para compreensão da epidemiologia dos cães envolvidos na pesquisa, algumas informações foram obtidas através do preenchimento de formulário, realizado no ato da coleta. Estes formulários continham dados do animal como: local de captura, sinais clínicos apresentados, realização de exame laboratorial, etc (ANEXO I).

### 5.4 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram coletados carrapatos de caninos com ou sem diagnóstico clínico ou laboratorial de leishmaniose. Os animais incluídos na pesquisa foram capturados pelo centro de controle de zoonoses ou levados a uma clínica veterinária localizada no bairro Nova Imperatriz.

### 5.5 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Durante o período de abril a julho de 2012 foi realizada coleta de carrapatos de 48 animais, havendo variação quanto ao número de ectoparasitas coletados de cada animal. Coletou-se o maior número possível de amostra, porém alguns cães tinham infestação discreta. Com isso o número de carrapatos coletados variou entre 3 e 89 totalizando 1049 carrapatos, onde destes, 409 eram machos e 640 eram fêmeas. O presente estudo priorizou a realização da pesquisa de *Leishmania sp* apenas nas fêmeas e com isso 7 cães foram excluídos da investigação, pois nestes apenas foram encontrados carrapatos machos. Portanto, com a exclusão dos carrapatos machos, foi realizada PCR de 640 ectoparasitas de 41 diferentes animais.

### 5.6 COLETA E CONSERVAÇÃO DA AMOSTRA

Os ectoparasitas coletados, foram conservados em isopropanol e mantidos em tubos tipo falcon que foram identificados separadamente por animal e

aconicionados em temperatura de 2 °C a 8 °C. Posteriormente os tubos foram enviados ao Laboratório de Biologia Molecular e Celular do NMT-UFPA em Belém-PA, para processamento.

## 5.7 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras (fêmeas dos carrapatos) foram trituradas individualmente com auxílio de ponteira descartável em 100 µl de solução para trituração (10X Grinding Tampão, 20X Espermina/Espermidina, 10% Sucrose). Após, foi adicionado imediatamente 10 µl de solução SDS (2X SDS Tampão, 10% SDS, 10% Sucrose, Dietilpirocarbonato), incubando-se por aproximadamente 30 minutos a 65°C em banho-maria.

As amostras foram colocadas em gelo por aproximadamente 5 minutos, centrifugadas rapidamente e então adicionou-se 30 µl de solução de acetato de potássio (8M KOAc) e levado a agitação. Colocou-se em gelo por mais 45 minutos. Centrifugou-se os tubos por 2 minutos a 14000 rpm e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo. Adicionou-se duas vezes o volume de etanol a 96% mantido em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram mantidas a -20 °C por uma noite.

O etanol foi descartado por inversão, lavou-se 3 vezes o sedimento com etanol a 75% seguindo com centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos. As amostras foram secadas em estufa a 37°C e o DNA redissolvido com 20 µl de solução TE (10mM Tris HCl, 1mM EDTA, Ph 8,0). Deixou-se os tubos à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos e estocados a -20°C.

## 5.8 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR

A PCR foi realizada em um volume total de 10µl, contendo: 1X Tampão de *Taq* DNA polimerase, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% de dimetilsulfoxido (DMSO), 250µM de

cada dNTP (Invitrogen), 20µM de cada iniciador (Operon), 2,5U/µl de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1,5µl de DNA extraído. Os marcadores utilizados amplificam aproximadamente 400 pb do gene de Mini-exon das espécies de *Leishmania* viscerotrópicas e 250 pb para o subgênero *Viannia* e 350 pb para a *Leishmania (L.) amazonensis* (Fernandes et al, 1994; Degraive et al, 1994).

A sequência dos iniciadores são: S1629 (5'-GGGAATTCAATAWAGTACAGAACTG-3') e S1630 (5'-GGGAAGCTTCTGTACTWTATTGGTA-3').

Foi utilizado como controle positivo o DNA de *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) i. chagasi* e a água para o controle negativo.

No termociclador programado, a reação foi submetida a uma temperatura inicial de 95°C por 3 minutos para a desnaturação do DNA, seguido de 5 ciclos nas seguintes temperaturas: 95°C por 1 minuto, 45°C por 30 segundos e 65°C por 1 minuto. Em seguida, a reação foi levada a uma temperatura de 95°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos nas condições: 95°C por 1 minuto, 50°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Ao final, a etapa de extensão foi mantida por 10 minutos a 72°C.

## 5.9 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Dez microlitros dos produtos da PCR foram migrados em gel de agarose a 1% em solução TAE (Tris-HCl, Ácido acético e EDTA), com 2 µl de solução indicadora de azul de bromofenol.

A eletroforese foi realizada a 100 V/50 mA por uma hora. O DNA foi corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio e visualizado em translumindor de UV para análise dos fragmentos obtidos (READY et al, 1997).

## 5.10 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no trabalho:

- Carrapatos extraídos de cães capturados pelo centro de controle de zoonoses e de animais que realizaram consulta em uma clínica veterinária da cidade de Imperatriz-MA.

Foram excluídos do trabalho:

- Todos os carrapatos machos.

### 5.11 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos na pesquisa foram inseridos em planilha no programa Excel 2010, onde foram organizados através de gráficos e tabelas para melhor compreensão.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Epidemiologia dos cães utilizados como fontes de amostras

A pesquisa foi realizada através da coleta de carrapatos de cães da cidade de Imperatriz-Ma. Foram incluídos no estudo carrapatos de 41 cães onde 18 cães eram provenientes de uma clínica veterinária e 23 foram capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), oriundos de diversos bairros da cidade. Dos 41 cães, 23 (56,1%) eram machos e 18 (43,9%) fêmeas. Entre estes animais 26 apresentavam sinais clínicos de leishmaniose, descritos no quadro 01.

**Quadro 01.** Sinais Clínicos sugestivos de leishmaniose apresentados pelos cães

Nº do animal	Sinais Clínicos				PCR dos carrapatos
	Onicogrifose	Úlceras	Queda de Pelo	Inapetência	
03		X	X		NEG
04		X	X		POS
07	X	X	X		POS
11	X	X		X	NEG
15		X		X	NEG
22	X	X	X		NEG
23	X	X	X		POS
24	X	X	X	X	POS
25	X	X	X	X	NEG
26	X	X	X		NEG
28		X	X		POS
31	X	X		X	NEG
32	X	X	X	X	NEG
33	X	X		X	NEG
34	X	X		X	NEG
35	X	X	X	X	NEG
36	X	X			NEG

37	X	X	X	X	NEG
38	X	X	X		NEG
39	X	X	X	X	POS
40	X	X	X	X	NEG
41	X	X	X		NEG
43	X	X		X	POS
44	X	X		X	POS
47	X	X		X	NEG
48	X	X		X	NEG
Total	22	26	16	16	

Dos 26 cães com sinais clínicos, em apenas 8 (30,7%) foram detectados carrapatos positivos com DNA de *Leishmania*, pela PCR.

## 6.2 Resultados da PCR

Foi realizada PCR para *Leishmania sp* de 640 carrapatos coletados dos 41 cães incluídos na pesquisa (Quadro 02). Destes carrapatos, 170 obtiveram resultado positivo, sendo de 16 diferentes cães (gráfico 01).

**Quadro 02.** Número de carrapatos com PCR positiva.

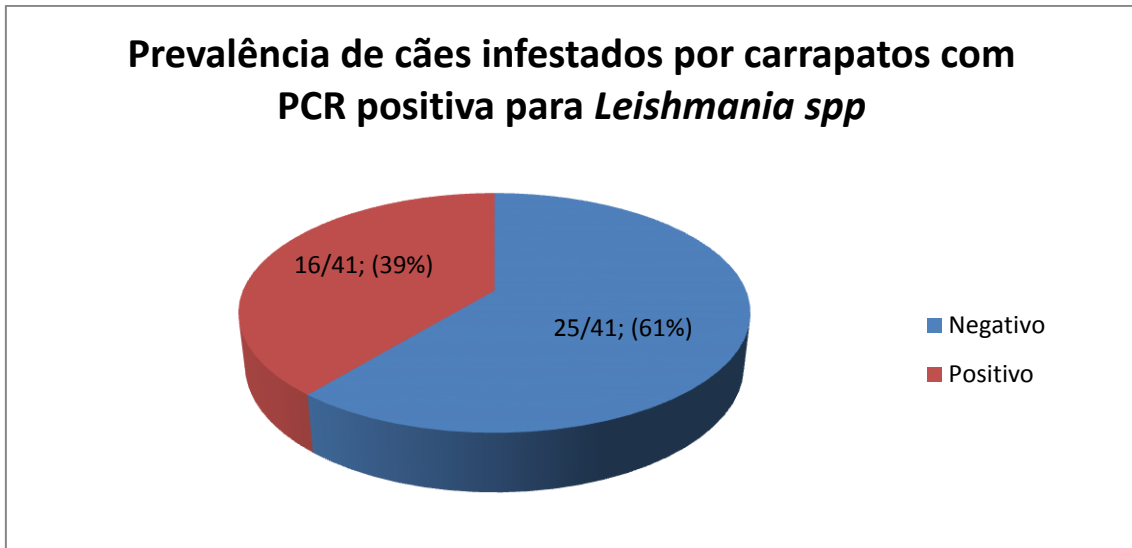
Nº do animal	Bairro	Carrapatos (N)		PCR positivo (n <sub>♀</sub> )	Espécie de <i>Leishmania</i>
		(n <sub>♂</sub> )	(n <sub>♀</sub> )		
01	Nova Imperatriz	1	30	13	<i>L.(Viannia) sp</i>
02	Juçara	4	12	6	<i>L.(Viannia) sp</i>
03	Nova Imperatriz	14	22	0	-
04	Santa Rita	17	24	12	<i>L.(Viannia) sp</i>
05	Juçara	45	13	5	<i>L.(Viannia) sp</i>
06	Nova Imperatriz	22	18	3	<i>L.(Viannia) sp</i>
07	São José	53	36	12	<i>L.(Viannia) sp</i>
08	Nova Imperatriz	0	50	45	<i>L.(Viannia) sp</i>
09	Nova Imperatriz	8	32	23	<i>L.(Viannia) sp</i>
10	Santa Inês	28	39	22	<i>L.(Viannia) sp</i>
11	Nova Imperatriz	0	50	0	-
12	Bom Sucesso	9	24	0	-
13	Nova Imperatriz	3	16	8	<i>L.(Viannia) sp</i>



14	Centro	0	45	0	-
15	Nova Imperatriz	15	18	0	-
16	Nova Imperatriz	0	10	0	-
17	Centro	0	82	0	-
18	Centro	5	3	0	-
19	Vilinha	0	3	0	-
20*	Santa Rita	8	0	-	-
21*	Nova Imperatriz	12	0	-	-
22	Vila Lobão	9	3	0	-
23	Conjunto Vitória	9	2	1	<i>L.(Viannia) sp</i>
24	Bacuri	4	7	7	<i>L.(Viannia) sp</i>
25	Santa Rita	0	10	0	-
26	Nova Imperatriz	0	11	0	-
27*	Conjunto Vitória	11	0	-	-
28	Bacuri	0	3	3	<i>L.(Viannia) sp</i>
29	Nova Imperatriz	5	5	0	-
30*	Bacuri	5	0	-	-
31	Imigrante	3	1	0	-
32	Conjunto Vitória	4	6	0	-
33	Alto da Boa Vista	7	3	0	-
34	Desconhecido	10	4	0	-
35	Santa Rita	7	4	0	-
36	Santa Rita	0	11	0	-
37	Santa Rita	4	5	0	-
38	Santa Rita	5	5	0	-
39	Conjunto Vitória	5	8	4	<i>L.(Viannia) sp</i>
40	Imigrante	4	3	0	-
41	Vila Lobão	10	1	0	-
42*	Vila Lobão	10	0	-	-
43	Ouro Verde	3	8	6	<i>L.(Viannia) sp</i>
44	PQ Alvorada I	6	6	2	<i>L.(Viannia) sp</i>
45*	Vila Nova	23	0	-	-
46*	Novo Horizonte	12	0	-	-
47	Senharol	6	1	0	-
48	Vila Vitória	3	6	0	-

\* Cães excluídos do estudo

A PCR para *Leishmania sp* foi realizada apenas em carrapatos fêmeas totalizando 640 carrapatos. Devido a essa seleção, 7 cães foram excluídos do estudo pois destes, foram coletados apenas carrapatos machos. Todos os carrapatos foram identificados como *Rhipicephalus sanguineus*. A taxa de infecção dos carrapatos variou entre 16,6 e 100 %.



**Gráfico 01.** Número de cães com carrapatos com PCR positiva para leishmaniose.

Apesar de 26 cães terem apresentado sinais clínicos sugestivos de leishmaniose, apenas em 16 animais, dos 41, foram encontrados carrapatos infectados com *Leishmania sp*. Em todos os carrapatos com PCR positiva o DNA encontrado foi compatível com *Leishmania (viannia) spp* (figura 01).

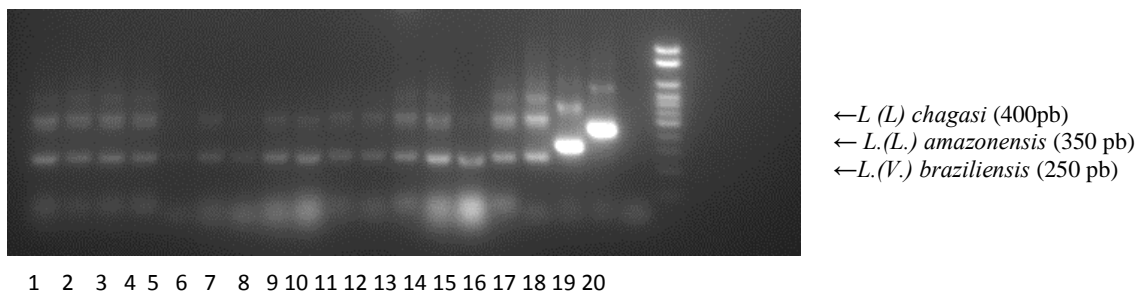


Figura 01. Gel de agarose em TAE. Coluna - 1 a 15 amostras de carrapato; coluna 16 – amostra de *Leishmania (Viannia) braziliensis*; coluna 17 – amostra de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; coluna 18 – amostra de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*; coluna 19 - controle negativo e coluna 20 – Marcador de peso molecular de 100 pb.

### 6.3 Prevalência dos casos positivos em relação aos bairros de Imperatriz

A tabela 01 mostra a distribuição dos casos positivos em relação ao bairro de origem dos animais, onde dos 16 casos positivos 5 (31,25%) eram do bairro Nova Imperatriz. Os bairros Juçara, Conjunto Nova Vitória e Bacuri obtiveram, cada um, 2 (12,5%) casos positivos, enquanto os bairros Santa Rita, São José, Santa Inês, Ouro verde, e Parque Alvorada I obtiveram, cada um, 1 (6,25%) caso positivo.

**Tabela 01.** Número de casos positivos por bairro.

Bairro	n	%	Espécie de <i>Leishmania</i>
<b>Nova Imperatriz</b>	5	31,25	<i>L.(Viannia) spp</i>
<b>Juçara</b>	2	12,5	<i>L.(Viannia) spp</i>
<b>Conjunto Vitória</b>	2	12,5	<i>L.(Viannia) spp</i>
<b>Bacuri</b>	2	12,5	<i>L.(Viannia) spp</i>
<b>Santa Rita</b>	1	6,25	<i>L.(Viannia) spp</i>
<b>São José</b>	1	6,25	<i>L.(Viannia) spp</i>
<b>Santa Inês</b>	1	6,25	<i>L.(Viannia) spp</i>
<b>Ouro Verde</b>	1	6,25	<i>L.(Viannia) spp</i>
<b>Parque Alvorada I</b>	1	6,25	<i>L.(Viannia) spp</i>
<b>TOTAL</b>	16	100	

### 6.4 Epidemiologia dos cães cujo amostragem de carrapatos obteve PCR positiva

Entre os 16 cães em que a PCR dos carrapatos apresentou DNA de *Leishmania (Viannia) spp*, 9 (56,25%) eram machos enquanto 7 (43,75%) eram fêmeas. Dos 16 cães apenas 8 (50%) apresentavam sintomas de leishmaniose. Dois (12,5%) cães tinham idade inferior a seis meses, 6 tinham entre 6 (37,5%) meses e um ano de idade e 8 (50%) tinham mais que 1 ano de idade.

**Tabela 02.** Dados epidemiológicos dos cães cujos carrapatos obtiveram PCR positiva.

<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>SEXO</b>		
Macho	09	56,25
Fêmea	07	43,75
<b>SINTOMAS</b>		
Presente	08	50
Ausente	08	50
<b>IDADE</b>		
< 6 meses	2	12,5
6 a 12 meses	6	37,5
> 12 meses	8	50

## 7 DISCUSSÕES

O estudo identificou a presença de DNA de *Leishmania (Viannia) sp* em carrapatos de 16 dos 41 cães incluídos na pesquisa. Destes 16 cães 08 não apresentavam nenhum sinal clínico de leishmaniose. Este achado pode demonstrar que a utilização da PCR em ectoparasitas pode funcionar como um marcador ou indicador precoce da infecção.

A hipótese de que estes carrapatos tenham se infectado em outro animal não pode ser descartada, porém, a taxa de carrapatos infectados variando entre 16,6 a 100%, indica que o cão era a fonte de infecção.

Em todas as amostras positivas o DNA encontrado foi compatível com *Leishmania (Viannia) sp*. Colombo et al, 2010, pesquisaram a presença de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em ectoparasitas de 60 cães com sorologia positiva para Leishmaniose Visceral Canina (LVC) onde se encontrou DNA do protozoário em 48 (80%) destes cães. O presente estudo não encontrou DNA de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. A causa para este fato é desconhecida pois de acordo com a vigilância epidemiológica de Imperatriz a forma visceral de leishmaniose é comum na cidade. Dantas-Torres2009, ao pesquisar DNA de *Leishmania (L) infantum chagasi* em ectoparasitas de cães da cidade de Bezerros-PE encontrou uma positividade de 12%.

Quatro dos 41 animais incluídos neste estudo haviam sido diagnosticados com leishmaniose através de sorologia, porém em nenhum deles se encontrou carrapatos infectados. Dantas-Torres (2009) analisou 73 carrapatos de 25 cães soropositivos de Bezerros – PE onde apenas 9 (12,3%) tiveram PCR positiva, portanto, em 87,7% dos cães soropositivos os carrapatos não apresentaram DNA de *Leishmania sp*.

O achado de DNA de *Leishmania (Viannia) sp* sugere que carrapatos que realizam hematofagia em cães com leishmaniose podem se infectar. Porém estudos devem ser realizados para demonstrar se estes carrapatos infectados podem transmitir o protozoário para outros animais.

Imperatriz é uma cidade de clima quente e úmido o que propicia o desenvolvimento de *Lutzomyia sp*. Os cães com sintomas de leishmaniose e com carrapatos infectados por *Leishmania (Viannia) sp* eram oriundos de diferentes bairros da cidade.

Alguns bairros como o bacuri, possuem agravantes para a disseminação da doença como falta de saneamento e presença de vegetação peridomiciliar. Porém houve incidência de cães infestados por carrapatos infectados em bairros sem estes agravantes, como o bairro juçara. A cidade possui um grande número de cães vadios que podem ser vistos vagando pelas ruas, com presença de sinais de leishmaniose. Estes animais podem atuar como fontes da doença sendo alvos de artrópodes como *Lutzomyia sp* e carrapatos.

## 8 CONCLUSÃO

-O estudo mostrou a presença do DNA de *Leishmania (Viannia) sp* em carrapatos de cães com e sem sintomatologia de leishmaniose circulando em bairros de Imperatriz.

-A espécie dos carrapatos era *Rhipicephalus sanguineus*, apresentando taxa de infecção variando de 16,6 a 100%, demonstrando ser elevada.

-O bairro Nova Imperatriz apresentou o maior número de carrapatos positivos com DNA de *Leishmania (Viannia) sp*, por PCR. No entanto não se tem conhecimento sobre o local de infecção desses ectoparasitas.

-A detecção da infecção por *Leishmania sp* em ectoparasitas não comprova a atuação destes artrópodes como vetores na cadeia de transmissão da doença, sendo necessário a continuidade da pesquisa com a utilização de cobaias para comprovar esta transmissão, porém pode ser um importante indicador podendo detectar cães infectados assintomáticos ou subclínicos circulando na comunidade, podendo auxiliar nos programas de combate a disseminação da doença.

## REFERÊNCIAS

- 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** 42(2):156-159, mar-abr, 2009. N. 42, p. 156-159, 2009.
- ALMEIDA, P.S., MINZÃO, E.R., MINZÃO, L.D., SILVA, S.R., FERREIRA, A.D., FACCENDA, O., ANDRADE FILHO, J.D. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 43, n. 6, 2010.
- ALMEIDA, R.P., BRITO, J., MACHADO, P.L., JESUS, A.R., SCHRIEFER, A., GUIMARÃES, L.H., CARVALHO, E.M. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with gm-csf and antimonials. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. n.73, p. 79-81, 2005.
- ALVARENGA, D.G., ESCALDA, P.M.F., COSTA, A.S.V., MONREAL, M.T.F.D. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 194-197, 2010.
- ALVES, W.A., BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**. p. 259-265, 2004.
- BEZERRA, R.J.S., LEON, L., GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.
- BOTELHO, A.C.A., NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 42, n. 5, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**. Brasília: MS, 2006. p. 1-138.
- CARLI, G.A. **Parasitologia Clínica. Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2007.



CERQUEIRA, E.J.L., SHERLOCK, I., GUSMÃO, A., BARBOSA JUNIOR, A.A., NAKATANI, M. Inoculação experimental de *Leishmania* em cães com *Leishmania chagasi*. Cunha & Chagas, 1937. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 36, n. 6, p. 695-701, nov-dez, 2003.

CIMERMAN, B., CIMERMAN, S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. 2ed. São Paulo. Atheneu, 2005

COSTA, J.M.L. *et al.* Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. **Gazeta Médica da Bahia**. n.9, p. 16-24, 2009.

**VISCERAL CANINA NO ESTADO DE PERNAMBUCO** DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 155-159, 2011.

DANTAS-TORRES, F., MARTINS, T.F., PAIVA, M.C., FIGUEIREDO, L.A. LIMA, B.S., BRANDÃO FILHO, S.P. Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. **Experimental Parasitology**, v. 125, n. 2, p.184-185, 2010.

DINIZ, L.M.O., DUANI, H., FREITAS, C.R., FIGUEIREDO, R.M., XAVIER, C.C. Envolvimento neurológico na leishmaniose visceral: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 6, p. 743-745, 2010.

ELKHOURY, A.N.S.M., ALVES, W.A., GOMES, M.L.S., SENA, J.M., LUNA, E.A. Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

FREIRE, N.M.S. Parasitismo por carrapatos (Acari: Ixodidae) em humanos, em três municípios do Estado do Pará. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 141-147, 2010.

GIL, E.S., *et al.* Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares. **Vita et Sanitas**. v. 1, n. 01, p. 1-26, 2007.

GONTIJO, C.M.F., MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. n. 3. p. 338-349, 2004.

GOTO, H., PRIANT, M.G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 51, n. 5, p. 241-246, 2009.

HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20ed. São Paulo: Manole, 2008.

HEUSSER JUNIOR, A., BELLATO, V., SOUZA, A.P., MOURA, A.B., SARTOR, A.P., SANTOS, E.G.O.B., SILVA, V.L. Leishmaniose tegumentar canina no município de Balneário Camboriú, Estado de Santa

Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 6, 2010.

HORIMOTO, A.M.C., COSTA, I.P. Frequência de autoanticorpos e dosagem de complemento sérico em pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea ou visceral. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 5, p. 529-546, 2009.

LIMA, E.B., PORTO, C., MOTTA, J.O.C., SAMPAIO, R.N.R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

MARKELL, E.K, JOHN, D.T, KROTOSKI, W.A. **Parasitologia médica**. 8ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003.

MISSAWA, N.A., VELOSO, M.A.E., MACIEL, 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**.

MULLER, I., HAILU, A., CHOI, B.S., ABEBE, T., FUENTES, J.M., MUNDER, M., MODOLLELL, M., KROPF, P. Age-Related Alteration of Arginase Activity Impacts on Severity of Leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 2008.

MURBACK, N.D.N., HANS FILHO, G., NASCIMENTO, R.A.F., NAKAZATO, K.R.O., DORVAL, M.E.M.C. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 55-63, 2011.

MURRAY, H.W. Treatment of Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar): A Decade of Progress and Future Approaches. **International Journal of Infectious Diseases**. v.4, n. 3, p.158-177, 2000.

NASCIMENTO, J.C., PAIVA, B.R., MALAFRONTA, R.S., FERNANDES, W.D., GALATI, E.A.B. Infecção natural de flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. V. 49, n. 2, 2007.

NASCIMENTO, M.D.S.B., BEZERRA, G.F.B., BANDEIRA NETO, A.P., SILVA, L.M., BEZERRA, J.M., VIANA, G.M.C. Estudo comparativo de anticorpos IgG e IgE antileishmaniacos como marcadores de infecção e doença em indivíduos de área endêmica de leishmaniose visceral, em São Luis, MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n. 1, p. 38-42, 2006.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11ed. São Paulo, Atheneu, 2005.  
OLIVEIRA, J.M., FERNANDES, A.C., DORVAL, M.E.C., ALVES, T.P., FERNANDES, T.D., OSHIRO, E.T., OLIVEIRA, A.L.L. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 188-193, 2010.

OTRANTO, D., TORRES, F.D. Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. **Parasites & Vectors**, n 3:2, p. 1-12, 2010.

OTRANTO, D., TESTINI, G., DANTAS, F.T., LATROFA, M.S., DINIZ, P.P.V.P., CAPRARIIS, D., LIA, R.P., MENCKE, N., STANNECK, D., CAPELLI, G. Diagnosis of Canine Vector-Borne Diseases in Young Dogs: a Longitudinal Study. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 48, n. 9, p. 3316-3324, 2010.

PASTORINO, A.C., JACOB, C.M.A., OSELKA, G.W., SAMPAIO, M.M.S.C. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 2, p. 120-127, 2002.

PAZ, G.F., RIBEIRO, M.F., MAGALHÃES, D.F., SATHLER, K.P., FIUZA, V.O., BRANDÃO, S.T., WERNECK, G.L., FORTES, D.C.L., DIAS, E.S. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 97, n. 2.P. 131-133, 2010.

(READY, P.D., DAY, J.C., SOUZA, A.A., RANGEL, E.F., DAVIES, C.R. Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and silvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, 87: 187-195, 1997).

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2010.

ROMERO, G.A.S., BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 2010.

TEIXEIRA, M.J. **Avaliação do efeito leishmanicida in vitro e in vivo de constituintes químicos ativos derivados de plantas medicinais**. 1999, 88f Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. Ceará.

TORRES, F.D. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, n 1:25, p. 1-17, 2008.

VÉLEZ, I.D., COLMENARES, L.M., MUÑOZ, C.C. Case report: two cases of visceral leishmaniasis in Colombia resistant to meglumine antimonial treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 4, p. 231-236, 2009.

VILELA, R.Q.B. Análise prospectiva das alterações imunohematológicas eritrocitárias em pacientes com leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 32, n. 5, p. 589-590, 1999.

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

## ANEXOS

Anexo 1: formulário

<b>Formulário para preenchimento</b>	Animal Nº
--------------------------------------	-----------

### INVESTIGAÇÃO DE *LEISHMANIA SP* EM CARRAPATOS DE CÃES DE BAIROS DE IMPERATRIZ-MA, ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Espécie do animal:

Canina ( ) Equina ( )

( ) Animal capturado pelo centro de controle de zoonoses ( ) Entregue pelo proprietário

Local de captura do animal: ( ) Zona urbana ( ) Zona rural

Bairro: \_\_\_\_\_

Sexo do animal: ( ) fêmea ( ) Macho

Idade do animal: ( ) <6 meses ( ) 6 meses a 1 ano ( ) > 1 ano

Raça \_\_\_\_\_ Pelagem \_\_\_\_\_

Já foi vacinado contra leishmaniose? Sim( ) Não( ) Ignorado( )

Avaliação **laboratorial** para leishmaniose? ( ) Positiva ( ) Negativa ( ) Ignorada

Qual método laboratorial utilizado? \_\_\_\_\_

Avaliação **clínica** positiva para leishmaniose? ( ) Sim ( ) Não

Diagnóstico clínico foi realizado através de: \_\_\_\_\_

Possue alterações físico-clínicas? Sim ( ) Não ( )

( ) Onicogribose

( ) Inapetência

( ) Úlceras na orelha

( ) Falta de apetite

( ) Úlceras nasais

( ) Queda de pêlo

( ) Úlceras pelo corpo

( ) Outras \_\_\_\_\_

Ectoparasitas coletados: carrapatos = \_\_\_\_\_, pulgas = \_\_\_\_\_

Espécie dos carrapatos: \_\_\_\_\_

Espécie das Pulgas: \_\_\_\_\_

Coleta realizada por: \_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_