



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - ENSP
Departamento de Ciências Biológicas - DCB
Dissertação de Mestrado Acadêmico



**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA ÁREA URBANA DE
CUIABÁ –MT: COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS LABORATORIAIS,
TENTATIVA DE DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA O
DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE DE *Leishmania*
CIRCULANTE EM AMOSTRA SELECIONADA**

Bianca De Santis Gonçalves

Orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Elizabeth Gloria Oliveira Barbosa dos Santos

Prof. Dr. Sérgio Augusto Chaves de Miranda

Rio de Janeiro
Junho de 2010

*Às Minhas Meninas,
Edna, D.Hilda e Larinha,
com todo o meu amor.*

AGRADECIMENTOS

Como não poderia ser diferente, agradeço primeiramente a Deus, quem tornou possível que um sonho meu se tornasse realidade. Deus colocou em meu caminho pessoas iluminadas que me ensinaram a construir esta Dissertação, e nutriram-me com conhecimentos de uma vida inteira, que me fazem querer, a cada dia, tornar-me um ser humano melhor.

À minha orientadora-mãe-amiga, Prof^ª Dr^ª Elizabeth Gloria Oliveira Barbosa dos Santos, primeiramente porque acreditou em mim, deu-me um voto de confiança pelo qual serei eternamente grata. Beth guiou-me pelas veredas da construção desta dissertação e, ao seu lado, aprendi e apreendi ensinamentos acadêmicos e de vida. Também foi, e é, uma amiga sem medidas, sob um olhar zeloso de mãe. A ela devo o tanto que aprendi durante esta breve passagem.

À Prof^ª Dr^ª Rosely Magalhães de Oliveira, Coordenadora da subárea Endemias, Ambiente e Sociedade do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, por seus aconselhamentos quanto a decisões acerca do projeto, por suas sugestões e contribuições, acertadas, feitas ao Projeto desta Dissertação durante muitas aulas, por sua constante preocupação com o andamento dos trabalhos e sua disponibilidade em ajudar no que estvéssemos precisando.

Agradeço ao apoio de minha família, em especial à minha mãe, Edna, e à minha avó, D.Hilda, que sempre me incentivaram a perseverar na caminhada, por mais difícil que fosse, com muita alegria e amor, e com suas palavras de alento, confiança e fé. Agradeço à minha irmãzinha, Lara, maravilhoso presente de Deus, fonte diária de aprendizado, alegria, muito amor e carinho. Agradeço às minhas amigas, Fátima, Mary, Aninha, TT, que muito me incentivaram, consolaram e ensinaram-me, com seu exemplo, a sempre lutar por nossos sonhos e jamais pensar em desistir de nós mesmos.

Aos amigos feitos neste curso de Mestrado, Mary Lança Alves, Fernanda Nunes Santos, Kátia Mendes de Souza, Alonso Martinez Monteiro, Margarete Bernardo Tavares e Thais Coutinho de Oliveira, pelo aprendizado contínuo, apoio, estímulo, carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Sérgio Augusto de Miranda Chaves, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, pelas contribuições feitas ao Projeto desta Dissertação durante a Qualificação do mesmo, por sua disposição e solicitude em ajudar a melhorar este trabalho.

Ao amigo Prof. Dr. Saulo Teixeira de Moura, pelas sugestões feitas para este trabalho, pela oportunidade de realizar o trabalho de campo em Cuiabá, pelas contribuições feitas na Qualificação do Projeto, pela amizade que foi construída ao longo do tempo, e pelo imenso carinho e atenção com que me acolheram, Dr Saulo e sua família, em Cuiabá.

Ao Prof. Dr. Valmir Laurentino da Silva, do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, que me privilegiou com sua amizade e sábios aconselhamentos, também por suas contribuições feitas durante a Qualificação do Projeto desta Dissertação, além de, com sua mansidão, paciência e vasta experiência, ter se empenhado em ensinar-me as técnicas RIFI e ELISA.

Ao Prof. Dr. Antônio Teva, do Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz, pelas observações e contribuições feitas ao Projeto desta Dissertação durante a Qualificação do mesmo, e durante as conversas bem-humoradas pelos corredores; por sua amizade, incentivo e sugestões.

Ao amigo Emilson Domingos da Silva, do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, com quem tive muitas conversas elucidativas e bem-humoradas, e que sempre se mostrou paciente, atencioso e solícito em esclarecer-me quanto aos desafios da prática laboratorial e no campo.

Ao Edmilson Domingos da Silva, de Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ, que gentilmente nos disponibilizou kits do teste rápido imunocromatográfico DPP™.

À Secretária Estadual de Saúde do Estado do Mato Grosso por ter consentido com a coleta de dados dos cães no Centro de Controle de Zoonoses do Município de Cuiabá.

Aos amigos do CCZ-Cuiabá, Kellen Malhado, Carla Patrícia Amarante, Gustavo Mestre, Fernão Franco, Eliane Cristina Costa, Roniel Pereira, Juliana Grisostomo, Wanderson de Arruda, Zenilda Mendes, que me receberam com tanto carinho em Cuiabá-MT, e contribuíram sobremaneira no trabalho de campo.

Aos amigos Nilton Francisco da Conceição, do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Prof Dr Renato Porrozzini e Amanda dos Santos Cavalcanti, ambos do Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz, que muito contribuíram para a realização dos trabalhos de campo.

À Profª Drª Elisa Cupolillo pela atenção ao nosso pedido de ajuda, gentileza e generosidade de nos receber no Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz, e pela disponibilidade e dedicação com que se envolveu na realização da técnica de eletroforese de isoenzimas.

Ao Prof Dr Sylvio Celso Gonçalves da Costa e à Kátia Calabrese, pela atenção ao nosso pedido de auxílio e colaboração, gentileza e generosidade de nos receber no Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz.

À amiga Celeste da Silva Freitas de Souza, do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz, pela amizade, carinho e ajuda incansável na realização das técnicas RIFI e ELISA.

Ao amigo Luiz Ney d'Escoffier, do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz, pela amizade e vigilante auxílio na realização da técnica PCR.

À Bárbara Neves dos Santos, Grazielle Cardoso da Graça, Caroline Batista Marques de Souza, pessoas queridas do Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz, cuja participação foi fundamental para a realização da técnica de eletroforese de isoenzimas.

À Profª Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira, do IPEC/ FIOCRUZ, por sua gentileza em elucidar-me quanto às análises estatísticas desta dissertação.

À Profª Drª Paola Cardarelli Leite, do Departamento de Microbiologia do INCQS/FIOCRUZ, por sua gentileza em elucidar-me quanto a questões da prática molecular.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, pela ajuda e colaboração nas práticas do laboratório, e pelo carinho, amizade e incentivo no dia-a-dia.

A todos que me ajudaram, compartilharam momentos de alegria deste trabalho, foram solidários no esforço para sua construção, e que me incentivaram, mesmo que indiretamente, de perto ou de longe, a perseverar frente aos obstáculos que surgiam pelo caminho, e, enfim, concluir minha Dissertação.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“O que é verdadeiramente imoral é ter desistido de si mesmo.”

Clarice Lispector

“É uma consolação da vida termos alguém a quem descobramos o nosso coração, a quem confiemos os nossos segredos, amigo fiel que nos felicite na prosperidade, que se solidarize com as nossas tristezas, que nos ampare em nossa desgraça.”

Santo Ambrósio

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

LRNTL – Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de Leishmania

BOD – Estufa incubadora de demanda bioquímica de oxigênio

NB2 – Nível de segurança biológica 2

Na₂EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético dissodium

MTT – (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

sin – sinônimo

n^o – número

g – grama

° C – Grau Celsius

h – Hora

l – litro

pb – pares de base

fg – fitograma

pg – picograma

mM – milimolar

M – molar

pM – picomol

μl – microlitro

ml – mililitro

cm – centímetro

v – volts

v/cm – volts/centímetro

P.M. – Peso Molecular

PMS – Phenazine methosulfate

pH – Potencial hidrogeniônico

NADP – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

rpm – rotações por minuto

IM – intramuscular

LV – Leishmaniose Visceral

LVA – Leishmaniose Visceral Americana

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

L VH – Leishmaniose Visceral Humana

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

PCR – Reação em cadeia pela polimerase

SES-MT – Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Mato Grosso

LACEN-MT – Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Mato Grosso (MT - Laboratório)

NNN - meio de cultura Novy, MacNeal, Nicolle

BHI – *Brain Heart Infusion* – Infusão de coração e cérebro em base de ágar

q.s.p. – quantidade suficiente para

Leishmaniose Visceral Canina na Área Urbana de Cuiabá –MT: Comparação de Técnicas Laboratoriais, Tentativa de Desenvolvimento de Metodologia para o Diagnóstico e Caracterização da Espécie de *Leishmania* Circulante em Amostra Seleccionada

RESUMO

Segundo o Ministério da Saúde, o diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) permanece como um problema para os serviços de saúde, e está relacionado a três fatores: variedade de sinais clínicos semelhantes aos observados em outras doenças infecciosas, alterações histopatológicas inespecíficas e a inexistência de um teste de diagnóstico próximo a 100% de especificidade e sensibilidade. Esta questão, associada ao fato de haver registro de cães infectados por *Leishmania* sp, agente etiológico da LVC, desde o final da década de 1990 em Mato Grosso, motivou a realização deste trabalho. O objetivo geral desta dissertação foi analisar amostras de cães com suspeita clínica ou não de leishmaniose visceral, recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), oriundos de área urbana de Cuiabá (MT), a partir da comparação de técnicas laboratoriais de RIFI, ELISA, teste rápido imunocromatográfico DPPTM e cultivo *in vitro* com o exame parasitológico direto (esfregaço de medula óssea), desenvolver uma metodologia de diagnóstico utilizando, como substrato, o papel de filtro FTA[®] Card embebido com o aspirado de tecido subcutâneo dos animais e caracterizar a espécie de *Leishmania* circulante. Foram analisados 45 cães, de ambos os sexos e de diferentes raças. Os sinais clínicos verificados nos cães amostrados, provenientes de área urbana de Cuiabá foram em ordem decrescente de frequência: descamação (53,33%), alopecia (44,44%), lesões ulceradas (40%), caquexia (26,67%), onicogribose (26,67%), mucosas hipocoradas (26,67%), ceratoconjuntivite (26,67%) e apatia (13,33%). Os resultados positivos, obtidos pelas técnicas: parasitológico direto (padrão ouro), cultivo *in vitro*, RIFI, ELISA e DPPTM, corresponderam a, 37,21% (16/43), 44,44% (8/18), 84,44% (38/45), 42,22% (19/45) e 46,67% (21/45), respectivamente. O teste rápido imunocromatográfico DPPTM (sensibilidade=68,42%, especificidade=87,5%, concordância=73,07%, k=0,57) mostrou-se mais sensível, mais específico e com maior confiabilidade que RIFI (sensibilidade=44,44%, especificidade=100%, concordância=53,49%, k=0,21) e ELISA (sensibilidade=58,52%, especificidade=76,92%, concordância=69,77%, k=0,36). A combinação do aspirado de tecido subcutâneo dos cães, em papel de filtro FTA[®] Card, com a PCR não obteve resultados positivos nesta pesquisa. Portanto, esta metodologia deve ser aprimorada mediante novos testes. *A priori*, com abordagem diferente para a coleta do aspirado de tecido subcutâneo em cães e realização da PCR. A espécie de *Leishmania*, caracterizada pela enzima 6PGDH, circulante em cinco cães amostrados, provenientes de área urbana de Cuiabá, foi a *Leishmania (Leishmania) infantum*

Canine Visceral Leishmaniasis in Cuiabá Urban Area – MT: Comparing Laboratory Techniques, Attempt to Develop Methodology for Diagnosis and Characterization of the Species of *Leishmania* Stock in the Sample Selected

ABSTRACT

According to the Ministry of Health, the laboratory diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) remains as a problem for health services, and is linked to three factors: variety of clinical evidence similar to those observed in other infectious diseases, histopathologic-unspecific changes and the lack of a diagnostic test near 100% specificity and sensitivity. This issue associated with having infected dogs record for *Leishmania sp.*, etiological microorganism of the CVL, since the late 1990s in Mato Grosso state, motivated this study. The main purpose of this dissertation was analyzing samples of dogs with clinical suspicion or not with leishmaniasis, collected by Zoonoses Control Center (ZCC) from Cuiabá (MT) urban area by comparing laboratory techniques IFR, ELISA, rapid test imunocromatographic DPPTM and cultivation in vitro with parasitological direct examination (smear of bone marrow), to develop a methodology for diagnosis using as substrate, the filter paper FTA ® card wet and embedded with the infiltrate of subcutaneous tissue of animals and characterize the species of *Leishmania* stock present in the culture. The results showed that 45 dogs were examined, of both sexes and of different races. The clinical evidences recorded in dogs sampled from Cuiabá urban area were, in descending order of frequency: desquamation (53.33%), alopecia (44.44%), injuries (40%), cachexia (26.67%), onychogryphosis (26.67%), mucosal pale (26.67%), keratoconjunctivitis, (26.67%) and apathy (13.33%). The positive results obtained by direct parasitological techniques (gold standard), cultivation in vitro IFR, ELISA and DPPTM accounted for 37.21% (16/43), 44.44% (8/18), 84.44% (38/45), 42.22% (19/45) and 46.67% (21/45), respectively. The rapid test sensitivity = imunocromatographic DPPTM (68.42%, specificity = 87.5%, accurate = 73.07%, k = 0.57) proved to be more sensitive, more specific and with greater reliability than IFR (sensitivity = 44.44%, specificity = 100%, accurate = 53.49%, k = 0.21) and ELISA (sensitivity = 58.52%, specificity = 76.92%, accurate = 69.77%, k = 0.36). The combination of subcutaneous infiltrate dogs tissues in filter paper FTA ® card with the PCR did not succeed in this poll. Therefore, this methodology must be enhanced by further testing. A priori with different approach to the collection of induction of subcutaneous in dogs tissues and the proceedings of PCR. The species of *Leishmania*, characterized by the enzyme 6PGDH, stock in five dogs sampled from Cuiabá, urban area was *Leishmania (Leishmania) infantum*.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS.....	7
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	7
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
3 – SITUAÇÃO PROBLEMA.....	8
4 – JUSTIFICATIVA.....	10
5 – REFERENCIAL TEÓRICO	13
5.1 – LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	13
5.2 – LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E CANINA NO ESTADO DO MATO GROSSO, BRASIL	18
5.3 – DIAGNÓSTICO RÁPIDO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	20
5.4 – MÉTODOS LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	21
5.5 – A QUALIDADE DA MEDIDA.....	29
5.6 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA POR ELETROFORESE DE ISOENZIMAS DAS ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i>	31
6 – MATERIAIS E MÉTODOS	32
6.1 – DESENHO DO ESTUDO	32
6.2 – ÁREA DE ESTUDO.....	32
6.3 – CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DOS CÃES.....	33
6.4 – ANIMAIS DO ESTUDO	34
6.5 – PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	34
6.6.1 – <i>Punção de Medula Óssea</i>	37
➤ Cultivo <i>in vitro</i>	38
➤ Exame parasitológico direto	38
6.6.2 – <i>Punção de baço e fígado</i>	39
➤ Cultivo <i>in vitro</i>	39
6.6.3 – <i>Coleta de sangue</i>	39
➤ Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI	40
➤ Ensaio Imunoenzimático – ELISA	41
➤ Teste rápido imunocromatográfico DPP™	42
6.6.4 – <i>Aspirado de tecido subcutâneo</i>	44
➤ Reação em Cadeia pela Polimerase Multiplex (PCR multiplex)	45
6.6.5 – <i>Análise estatística</i>	46
6.7 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA POR ISOENZIMAS	47
6.7.1 – <i>Aplicação das amostras no gel de corrida</i>	47
6.7.2 – <i>Revelação</i>	47
6.8 – CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	50
7 – RESULTADOS	51
7.1 – ANIMAIS DO ESTUDO	51
7.1.1 – <i>Sexo, idade e raça</i>	51
7.2 – <i>Distribuição da procedência dos animais por bairros e regiões</i>	51
7.3 – DESCRIÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS	54
7.4 – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	57
7.4.1 - <i>Exame Parasitológico Direto</i>	57
➤ Esmregaço de medula óssea.....	57
➤ Cultivo <i>in vitro</i>	59
7.4.3 – <i>Reações Sorológicas</i>	59
➤ RIFI.....	59
➤ ELISA	61
➤ DPP™	61
7.4.4 – PCR	63
7.4.5 – <i>Panorama dos resultados do diagnóstico laboratorial</i>	65

➤ Exame Parasitológico Direto e Cultivo <i>in vitro</i>	70
➤ Exame Parasitológico Direto e RIFI – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ.....	70
➤ Exame Parasitológico Direto e ELISA – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ.....	71
➤ Exame Parasitológico Direto e DPP TM – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ.....	72
➤ Comparação das técnicas EPD, RIFI, ELISA e DPP TM com seus respectivos materiais mediante seus atributos de potencialidades e limites.....	72
➤ Exame Parasitológico Direto e PCRm.....	75
➤ ELISA Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ e RIFI Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ.....	75
➤ ELISA Bio-Manguinhos/FIOCRUZ e DPP TM Bio-Manguinhos/FIOCRUZ.....	75
➤ RIFI Bio-Manguinhos/FIOCRUZ e DPP TM Bio-Manguinhos/FIOCRUZ.....	76
7.5 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA.....	76
7.5.1 – CULTIVO <i>IN VITRO</i>	76
7.5.3 – <i>Caracterização por eletroforese de isoenzimas</i>	77
8 – DISCUSSÃO.....	78
8.1. – ANÁLISE DESCRITIVA DA AMOSTRA.....	79
8.2. – ANÁLISE CLÍNICA DOS ANIMAIS ESTUDADOS.....	80
8.2 – ANÁLISES LABORATORIAIS.....	82
8.2.1 – <i>Exame Parasitológico Direto</i>	82
8.2.2 - <i>Cultivo in vitro</i>	83
8.2.3 – <i>Reação de Imunofluorescência Indireta</i>	84
8.2.4 – <i>Ensaio Imunoenzimático (ELISA)</i>	84
8.2.5 – <i>Teste Rápido Imunocromatográfico DPPTM</i>	86
8.2.6 – <i>Comparação entre as Técnicas Laboratoriais e o Padrão Ouro</i>	87
8.3 – <i>PCR de aspirado de tecido subcutâneo impregnado em FTA® Card</i>	94
8.4 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA.....	97
9 – CONCLUSÕES.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
ANEXO 1.....	112
ANEXO 2.....	113
➤ <i>Meio de Cultura de Fase Sólida NNN</i>	113
➤ <i>Meio de Cultura de Fase Líquida Schneider</i>	113
➤ <i>Solução de Tampão Salina-Fosfato - PBS 0,018M pH 7,2</i>	114
➤ <i>Corante Giemsa (concentrado) para 100 ml</i>	115
➤ <i>Tampão de Sorensen pH 7,2</i>	115
ANEXO 3.....	116
ANEXO 4.....	117
ANEXO 5.....	118
QUANTO À ELETROFORESE DE ISOENZIMAS:.....	118
➤ <i>Cultivo de Leishmania para o preparo de massa parasitária</i>	118
➤ <i>Preparo do Tampão de corrida</i>	119
➤ <i>Preparo do gel de corrida</i>	120
➤ <i>Preparo da base de corrida</i>	120
➤ <i>Preparo da agarose a 1%</i>	121
➤ <i>Preparo do ácido acético a 5%</i>	121
ANEXO 6.....	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Delimitação do município de Cuiabá, estado de Mato Grosso, Brasil, a partir de mapas da cidade.....	33
Figura 2: Fluxograma da sequência de procedimentos.....	36
Figura 3: FTA [®] Classic Card Whatman [®]	43
Figura 4: Dispositivo DPP TM Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ.....	44
Figura 5: Localização das regiões, com os respectivos bairros, de acordo com a procedência dos cães estudados, no município de Cuiabá (MT).....	53
Figura 6: Dispositivo DPP TM com amostra sérica positiva (P3).....	63
Figura 7: Dispositivo DPP TM com amostra negativa.....	63
Figura 8: PCR multiplex de DNA obtido a partir de aspirado de tecido subcutâneo impregnado em FTA [®] Card de cães com Exame Parasitológico Direto positivo para <i>Leishmania sp</i> e sororreagentes para infecção por <i>Leishmania sp</i> pelo ELISA e pela RIFI.....	64
Figura 9: Continuação: PCR multiplex de DNA obtido a partir de aspirado de tecido subcutâneo impregnado em FTA [®] Card de cães com Exame Parasitológico Direto positivo para <i>Leishmania sp</i> e sororreagentes para infecção por <i>Leishmania sp</i> pelo ELISA e pela RIFI.....	64
Figura 10: Gel das amostras por eletroforese isoenzimática com a enzima 6PGDH.....	77

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição gráfica do número de cães positivos e negativos por técnica sorológica (Exame Parasitológico Direto, RIFI, ELISA e DPP TM e PCRm.....	68
Gráfico 2: Percentuais de cães positivos e negativos por técnica sorológica (Exame Parasitológico Direto, RIFI, ELISA e DPP TM e PCRm	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Comparação das técnicas EPD, RIFI, ELISA e DPP TM com seus respectivos materiais mediante seus atributos de potencialidades e limites	74
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de Revelação Enzimática para um gel contendo até 12 amostras.....	49
Tabela 2: Distribuição por bairros, regiões, números e percentuais de cães capturados ou levados ao CCZ-Cuiabá (MT), nos meses de agosto e novembro de 2009.....	52
Tabela 3: Relação dos sinais clínicos com os respectivos números e percentuais descritos nos cães estudados.....	54
Tabela 4: Relação completa dos sinais clínicos identificados pelos médicos veterinários nos cães do estudo.....	55
Tabela 5: Resultados do Exame Parasitológico Direto verificado em cada um dos cães estudados.....	58
Tabela 6: Distribuição por zona de procedência e frequência de infecção por <i>Leishmania</i> sp. dos cães estudados.....	59
Tabela 7: Distribuição dos títulos fluorescentes e negativos detectados nos soros dos animais.....	60
Tabela 8: Apresentação dos resultados verificados em cada cão quando analisados pelo ELISA.....	61
Tabela 9: Resultados obtidos com o teste rápido imunocromatográfico DPP TM nas amostras séricas dos respectivos cães.....	62
Tabela 10: Comparação entre as análises realizadas (parasitológico direto, PCR multiplex, RIFI, ELISA e DPP TM) nas amostras do estudo.....	66
Tabela 11: Comparação entre as análises realizadas (parasitológico direto, PCR, RIFI, ELISA e DPP TM) nas amostras do estudo.....	69
Tabela 12: Comparação dos resultados obtidos no Exame Parasitológico Direto e no Cultivo <i>in vitro</i>	70
Tabela 13: Comparação dos resultados obtidos pelo Exame Parasitológico Direto e pela RIFI.....	71
Tabela 14: Comparação dos resultados obtidos pelo Exame Parasitológico Direto e pelo ELISA.....	71
Tabela 15: Comparação dos resultados obtidos pelo Exame Parasitológico Direto e pelo teste DPP TM	72
Tabela 16: Comparação dos resultados obtidos pelo ELISA e pela RIFI.....	75
Tabela 17: Comparação dos resultados obtidos pelo ELISA e pelo teste DPP TM	76
Tabela 18: Comparação dos resultados obtidos pela RIFI e pelo teste DPP TM	76
Tabela 19: Reagentes e medidas para o preparo da solução de tampão salina-fosfato (PBS) 0,018M pH 7,2.....	114
Tabela 20: Reagentes e medidas para o preparo do tampão de Sorensen pH 7,2.....	115
Tabela 21: Reagentes e medidas para o preparo da solução de lavagem.....	118
Tabela 22: Solução tampão Tris-Maleico pH 7.4.....	119
Tabela 23: Solução tampão Tris-Fosfato pH 8.0.....	119
Tabela 24: Solução tampão Tris-Cítrico pH 8.1.....	120

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO DO PROGRAMA DE SAÚDE PÚBLICA

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA ÁREA URBANA DE CUIABÁ – MT: COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS LABORATORIAIS, TENTATIVA DE DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA O DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE DE *Leishmania* CIRCULANTE EM AMOSTRA SELECIONADA

1 – INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Humana (LVH) é considerada pelo *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases* (TDR, 2008) uma das doenças parasitárias de maior impacto sobre a Saúde Pública mundial, afetando, anualmente, uma média de 500.000 pessoas em 65 países onde é endêmica. Cerca de 90% dos casos notificados ocorrem em regiões da Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil. A LVH pertence ao grupo das doenças emergentes e parasitárias mais importantes do mundo (Tesh, 1995), e devido à expansão da área de acometimento, com o aumento significativo no número de casos, a LVH passou a ser considerada uma das prioridades do conjunto das doenças tropicais (Gontijo e Melo, 2004; TDR, 2008).

A LVH é uma doença causada por um complexo de espécies de protozoários da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*; são parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear de mamíferos, e são encontradas no hospedeiro vertebrado, sob a forma amastigota, e no hospedeiro invertebrado, com a forma promastigota (Prata e Silva, 2005). Esses parasitas estão distribuídos da seguinte forma: *Leishmania (Leishmania) chagasi*, encontrada na América Latina exceto Chile e Uruguai, *Leishmania (Leishmania) donovani*, na Índia e África Oriental, *Leishmania (Leishmania) infantum*, sul da Europa (Mediterrâneo), Oriente Médio, sul da Rússia, África, Ásia e China, e a *Leishmania colombiensis*, espécie encontrada na Colômbia, Panamá e Venezuela (Falqueto e Ferreira, 2005).

A partir de estudos quanto ao quadro clínico desenvolvido pelos cães infectados por *Leishmania infantum* e por *Leishmania chagasi*, e quanto à epidemiologia da LV quando da infecção por estas espécies, Cunha (1938) afirmou não haver diferença entre elas. O referido

autor observou que a evolução da doença humana e as lesões observadas nos animais infectados se assemelhavam ao que se tinha observado na LV até então, e assim a LVA se aproximava de maneira singular da LV do Mediterrâneo. A infecção na pele dos cães estudados e as lesões por ela provocadas não diferiram das lesões descritas na infecção natural dos cães e já assinaladas também na infecção experimental destes animais (Cunha, 1938). Portanto, o agente da LVA é idêntico à *Leishmania infantum* (Cunha, 1938).

De acordo com estudos de caracterização molecular, a *L.(Leishmania) infantum* e *L.(Leishmania) chagasi*, seriam a mesma espécie (Momen, Grimaldi e Deane, 1987; Cupolillo, Grimaldi e Momen, 1994; Tesh, 1995; Maurício et al, 1999; Maurício, Stothard e Miles, 2000). Momen, Grimaldi e Deane (1987) propuseram que o agente etiológico da leishmaniose visceral americana (LVA) seja designado *L.infantum*, de modo a refletir a identidade do agente etiológico da LV do Mediterrâneo, haja vista que ambas são praticamente indistinguíveis.

Segundo Maurício, Stothard e Miles (2000), as amostras de *L.chagasi* não podem ser distintas da *L.infantum* em função de uma separação geográfica. O grau de diversidade entre as amostras de *L.chagasi* e *L.infantum* é menor que o encontrado em amostras de *L.donovani*, até mesmo em amostras de *L.donovani* da mesma área. Sendo assim, os autores ratificaram o reconhecimento formal de que a *L.infantum* e a *L.chagasi* são dois nomes para a mesma espécie e que o primeiro (*L.infantum*) deverá se sobrepôr ao segundo (*L.chagasi*); conclusão endossada por Dantas-Torres (2006) e acompanhada neste estudo.

Em áreas de circulação da *L.infantum*, como no Brasil, a LV comporta-se como uma zoonose, para a qual os principais reservatórios são: doméstico, os cães (*Canis familiaris*); e silvestre, outros canídeos (Gontijo e Melo, 2004; WHO, 2008) como as raposas (*Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Gontijo e Melo, 2004; Falqueto e Ferreira, 2005). Alguns desses animais possuem hábitos sinantrópicos, o que pode consistir em um possível elo entre os ciclos doméstico e silvestre (Gontijo e Melo, 2004).

A doença no homem, segundo Prata e Silva (2005) é caracterizado por três estágios: (i) inicial – que pode ser abrupto ou insidioso-, (ii) de estado e (iii) final. Quando o início ocorre de forma abrupta (geralmente em adultos e adolescentes), os indivíduos acometidos apresentam febre (primeira manifestação clínica e mais frequente), que pode chegar a 39-40°C, ao longo de uma semana, ou bruscamente com calafrios e mal-estar. Poderá desenvolver também, esplenomegalia, dispnéia, perturbações digestivas, palidez, anorexia, astenia e alterações de humor (Prata e Silva, 2005). Segundo os autores, quando insidioso, os

adultos e geralmente crianças, quando acometidos não sabem precisar o início da doença, mas descrevem os sintomas clínicos anteriormente citados. Os autores acrescentaram ainda que o período de estado inicia-se após alguns meses, e é caracterizado pela intensificação dos sintomas do estágio inicial, pela hipertermia, com pouco ou nenhum desconforto e sintomas toxêmicos, hepatoesplenomegalia (aumento de volume do fígado e do baço), distensão abdominal, e pela anemia. Prata e Silva (2005) afirmaram que “a anemia, a febre e a esplenomegalia compõem a tríade clássica da doença.”

Em 1930, o Serviço de Febre Amarela buscava casos não diagnosticados da doença na região nordeste do Brasil. Nesse inquérito, Penna (1934) encontrou lesões semelhantes às de LV em biópsias de fígado, coletadas de pacientes que foram a óbito. De acordo com análises histopatológicas, o autor afirmou que: “ há toda a probabilidade de que o parasito encontrado com a forma leishmania pertença ao gênero *Leishmania* Ross 1903”. Esse achado confirmou os primeiros casos autóctones de calazar no país (Penna, 1934).

Antes da década de 1980, a maior parte dos casos humanos de LV era encontrada em ambientes de baixo nível socioeconômico, principalmente no meio rural e na periferia das grandes cidades, que apresentavam características rurais (Brasil, 2006a). Não obstante, ao final da década de 1980, observou-se a adaptação do vetor principal, *L.longipalpis*, aos ambientes urbanos de grandes metrópoles - com destaque para os estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil - onde pode ser encontrado tanto no peridomicílio (galinheiros, chiqueiro, canil, paiol, entre outros ambientes) como também no intradomicílio (Brasil, 2006a).

Entretanto, nos estados de Mato Grosso (Missawa e Lima, 2006) e Mato Grosso do Sul, Galati et al (1997) e Santos et al (1998) já haviam identificado a espécie *L. cruzi*, como vetor principal do calazar. Entre setembro de 1996 e dezembro de 1999, Souza et al (2003) realizaram capturas de flebotomíneos em localidades nas encostas do maciço da Pedra Branca (RJ), e verificaram que *L.longipalpis* predominou apenas em Barra de Guaratiba, permanecendo ausente em Camorim, Colônia, Grota Funda, Grumari, Ilha de Guaratiba e Carapiá, áreas em que foram notificados casos humanos autóctones de LV desde 1993, Barra de Guaratiba inclusive. Recentemente, Pinto et al (2010) identificaram municípios do estado do Espírito Santo, com casos autóctones de calazar sem a presença da *L.longipalpis*. Nesse estudo os autores encontraram as espécies, *L. alencari*, *L. intermedia* e *Micropygomyia schreiberi*, entre outras, em ambientes modificados e preservados.

A adaptação dos vetores potenciais do calazar aos ambientes urbanos foi descrita por vários autores. Dantas-Torres e Brandão-Filho (2006) apontaram a capacidade de domiciliação, na região metropolitana do Recife, do flebotomíneo *L.longipalpis*, o qual já pode ser encontrado em praticamente todo o território pernambucano. Mestre e Fontes (2007) atribuíram diversos fatores determinantes para a adaptação desses vetores no município de Várzea Grande-MT, mas que também podem ser encontrados em outras localidades, como: o processo de ocupação urbana desordenada, a destruição de ecótopos silvestres, o intenso convívio das pessoas com animais domésticos, as condições precárias de moradia, de coleta do lixo e de saneamento. E confirmado por Oliveira, Cosenza e Gesteira (1997), em Belo Horizonte-MG, com a urbanização da LV em áreas nobres da cidade.

Dantas-Torres (2009) atribuiu mudanças na ecologia do vetor aos fatores que favorecem a disseminação das leishmanioses caninas na América do Sul. Outrossim, o autor inferiu que a introdução de cães infectados, em áreas não-endêmicas e que apresentam vetores potenciais, configuram-se como áreas propícias ao estabelecimento de um novo foco de transmissão. Por outro lado, Rotureau et al (2006) afirmaram que o intercâmbio de cães entre áreas endêmicas e não-endêmicas também pode facilitar a propagação da LV.

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil (2006a), em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LVH somaram 48.455, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos dez anos, a média anual de casos no País foi de 3.156, com a incidência de dois casos/100.000 hab (Brasil, 2006a).

Nas duas últimas décadas, a LVH re-emergiu no mundo de forma ainda mais grave, apresentando diferentes padrões (Brasil, 2006b). No Brasil, atualmente, a LVH é identificada como epidemia urbana, observada em grandes centros das regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, ocasionando a expansão do processo endêmico, facilitado pelo intenso fluxo migratório (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006) e acometendo grupos de indivíduos jovens ou com co-morbidades, como a AIDS, o que pode levar a um número elevado de óbitos (Brasil, 2006b).

Até o ano de 2003, a LVH havia sido notificada em 19 dos 27 estados do país (Brasil, 2003; Gontijo e Melo, 2004), com registro de transmissão autóctone em aproximadamente 1600 municípios (Brasil, 2003). Dados mais recentes informaram que a doença já está distribuída em 20 Unidades Federativas nas regiões Nordeste, Sudeste, Norte e Centro-Oeste que representam, respectivamente, 56%, 19%, 18% e 7% dos casos humanos notificados (Brasil, 2008a, em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizartexto.cfm?idtxt=27082>>).

Segundo matéria publicada no jornal *on-line* do estado de Mato Grosso, A Tribuna-MT, o Ministério da Saúde havia elegido 25 municípios prioritários para LV no estado, isto é, municípios que apresentavam indivíduos e cães infectados. Dentre os municípios, encontrava-se Cuiabá. O estado do Mato Grosso registrou a ocorrência de 19 casos, sendo que três resultaram em óbito até final de novembro de 2007. Em Cuiabá foram registrados dois óbitos conforme nota a seguir (<<http://www.tribunamt.com.br/geral/alerta-sobre-ocorrencias-de-leishmaniose-visceral/>>):

“Até o final de novembro de 2007 a Secretaria de Estado de Saúde (SES) recebeu confirmação para 19 casos de Leishmaniose Visceral no Estado de Mato Grosso. Desse total, seis casos foram localizados no município de Rondonópolis e os outros quatro em municípios próximos. Dos 19 casos registrados em todo o Estado, 16 foram tratados e evoluíram para a cura. Três casos resultaram em óbito, um em Rondonópolis e dois em Cuiabá.

O Ministério da Saúde elegeu como municípios prioritários onde foram encontradas pessoas com resultado positivo para o vetor e cães com a doença, 25 localidades: Alto Araguaia, Barão do Melgaço, Barra do Garças, Cáceres, Canabrava do Norte, Chapada dos Guimarães, Cuiabá, General Carneiro, Jaciara, Juscimeira, Luciara, Mirassol D'Oeste, Nossa Senhora do Livramento, Novo São Joaquim, Nobres, Nova Brasilândia, Peixoto de Azevedo, Poconé, Poxoréu, Primavera do Leste, Rondonópolis, Rosário Oeste, Santo Antonio do Leverger e Várzea Grande. “Nesses municípios, é feito o controle vetorial e inquérito canino (coleta de sangue nos cães).”

Moura et al (1999), durante o inquérito canino que realizaram em área urbana do município de Cuiabá no período de julho de 1997 a agosto de 1998, detectaram 64,5% de soropositividade para leishmaniose em sua amostragem de cães por meio da técnica da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), e 88% dessas amostras positivas apresentaram titulação elevada (50% com 1:640, 33,3% com 1:320 e 4,8% com 1:160). Esses resultados sugeriram fortemente que a leishmaniose visceral canina (LVC) estava presente na área urbana de Cuiabá-MT. Entretanto, a espécie etiológica circulante no município ainda permanecia desconhecida.

Um estudo realizado com cães das áreas urbana e rural no Estado do Rio Grande do Norte (Amóra et al, 2006) verificou a urbanização da LVC em Mossoró-RN e apontou a necessidade de maior atenção ao papel dos cães como reservatório desta zoonose.

Para o diagnóstico da LVC, o Ministério da Saúde preconiza a utilização da RIFI como técnica de referência (IFI Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) e do ensaio imunoenzimático, isto é, ELISA (EIE Bio-Manguinhos/FIOCRUZ), com a eliminação dos cães soropositivos. Para a confirmação diagnóstica é realizada a punção aspirativa da medula óssea e esfregaço em lâmina para posterior leitura em microscopia ótica (Brasil, 2006a).

O Ministério da Saúde do Brasil (2006b) admite que as estratégias de controle da LV ainda não são efetivas o bastante; são elas: o diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, a redução da população de flebotomíneos, a eliminação dos reservatórios domésticos (cães) e atividades de educação em saúde.

Neste trabalho, pretende-se testar uma nova metodologia de diagnóstico para a LVC: o uso da técnica de reação em cadeia pela Polimerase (PCR) em papel de filtro contendo o aspirado de tecido subcutâneo de cães suspeitos e residentes em Cuiabá-MT. Esta metodologia é uma modificação daquela já empregada por Silva et al (2004), que utilizou sangue periférico como insumo sobre o papel de filtro para o diagnóstico da LV. A nossa proposta é a utilização do aspirado subcutâneo, baseada na característica biológica da LVC, quando é encontrado intenso parasitismo cutâneo presente nesses animais por ocasião da infecção por *L. infantum* (sin. *L. chagasi* para Deane, 1956).

Espera-se que a substituição do insumo possa aumentar a eficiência da PCR em papel de filtro, pois traz a vantagem da dispensa da fase intermediária, de cultivo *in vitro* do material puncionado da medula óssea. Com isso, poderemos obter resultados mais rápidos ao período despendido atualmente, que oscila em torno de 30 dias. Outrossim, a PCR multiplex é uma técnica confiável, mais específica e sensível que as técnicas de diagnóstico sorológico empregadas e que podem apresentar reações cruzadas com outras parasitoses (Brasil, 2006b),

Já o uso do papel de filtro como substrato para insumos biológicos permite a sua obtenção em condições muitas vezes restritas, como acontece no trabalho de campo (Rab e Evans, 1997; Silva et al, 2004); seu armazenamento não precisa de baixas temperaturas e permanece viável por vários meses. Ou seja, o aspirado de tecido subcutâneo em papel de filtro associado à PCR multiplex poderá proporcionar um diagnóstico mais rápido da LVC, facilitando a intervenção oportuna na identificação e posterior eliminação dos animais infectados, contribuindo assim para a vigilância e o controle da LV.

Ainda neste trabalho foi proposto realizar a comparação entre vários métodos de diagnóstico da LV, incluindo RIFI, ELISA, teste rápido imunocromatográfico DPPTM e Exame Parasitológico Direto, assim como identificar, por meio da análise eletroforética isoenzimática, o agente etiológico da LVC nas amostras estudadas de Cuiabá-MT, o qual permanece desconhecido neste município.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Analisar amostras de cães com suspeita clínica ou não de leishmaniose visceral, recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), oriundos de área urbana de Cuiabá (Mato Grosso), a partir da tentativa de desenvolver uma metodologia de diagnóstico, comparar técnicas laboratoriais e caracterizar a espécie de *Leishmania* circulante.

2.2 – Objetivos Específicos

- Avaliar clinicamente os animais capturados ou levados ao CCZ-Cuiabá, com suspeita ou não de LV;
- Realizar as técnicas RIFI, ELISA e DPPTM, em amostras séricas, e o Exame Parasitológico Direto a partir de esfregaço de medula óssea dos animais;
- Efetuar a PCR multiplex utilizando fragmentos de papel de filtro embebidos com aspirado de tecido subcutâneo;
- Comparar, em função dos parâmetros de: sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e concordância total ou acurácia, os resultados encontrados nas técnicas de RIFI, ELISA e DPPTM com o Exame Parasitológico Direto e entre si;
- Utilizar a técnica de eletroforese de isoenzimas para identificação da espécie de *Leishmania* nas amostras isoladas.

3 – SITUAÇÃO PROBLEMA

O diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina, preconizado pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2006b), é realizado durante os inquéritos no campo, quando é feita a coleta de sangue periférico para a realização da RIFI e do ELISA em laboratório. Somente em casos de consulta ao veterinário, os cães com quadro sugestivo da LV são submetidos à punção de medula óssea e, posterior esfregaço para identificação parasitológica do agente.

A utilização do papel de filtro vem facilitar enormemente a coleta das amostras no campo, já que atende as necessidades para a realização dos procedimentos de diagnóstico, até mesmo em áreas com pouca ou nenhuma infra-estrutura. Uma das vantagens deste método é o fato de não requerer armazenamento em baixa temperatura, podendo ser guardado, por até um ano, aproximadamente, em temperatura ambiente (Silva et al, 2004).

Em estudo prévio, Silva et al (2004) demonstraram o uso do papel de filtro com sangue coletado de indivíduos com LV, com resultados em torno de 71,8% de positividade pela PCR. Manna et al (2004) realizaram um estudo comparando diversos tipos de amostras biológicas de cães com LV. Os autores concluíram que a melhor escolha para seleção do espécime clínico foram as biópsias de pele, quando processadas pela PCR (alvo: fragmento de 116 pb da região conservada do kDNA).

Sabe-se que na LVC há intenso parasitismo do tecido subcutâneo, sob a forma de lesões, principalmente descamações, eczemas, úlceras e dermatites e ainda, em pele sã. Uma vez que o treinamento para o pessoal de campo para punção de pele é simples, seria possível combinarmos a técnica da PCR multiplex, aplicada ao papel de filtro, com o aspirado de tecido subcutâneo de cães sugestivos de LV e/ou naturalmente infectados por *Leishmania sp*, obtermos resultados confiáveis para o diagnóstico, e de forma mais rápida que as técnicas preconizadas pelo Ministério da Saúde e utilizadas até hoje?

As referidas técnicas utilizadas em inquéritos caninos são a RIFI e o ELISA. Para tanto, resolvemos comparar os resultados obtidos nesses testes com o exame parasitológico direto (leitura de lâmina com esfregaço de medula óssea), considerado nesse estudo como padrão ouro. Incluímos ainda, o cultivo *in vitro* e o teste rápido imonocromatográfico DPPTM (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) na comparação. Como essas técnicas, de diferentes fundamentos, se comportarão frente ao padrão ouro e entre si?

Segundo Mestre e Fontes (2007), em Mato Grosso, durante o período de 1998 a 2005 foram registrados 138 novos casos de LV, resultando em coeficientes de incidência

acumulada e letalidade de 5,4 casos/100.000 habitantes e 11,6%, respectivamente. Segundo os autores, os casos foram distribuídos nos municípios de Várzea Grande, Chapada dos Guimarães, Nossa Senhora do Livramento, Poxoréu, Barra do Garças, Jaciara, entre outros, caracterizando uma epidemia da doença. Os autores apontaram ainda que, o município de Várzea Grande foi o que mais notificou a doença com 50 (36,2%) casos no período.

Na capital Cuiabá, vizinha de Várzea Grande, os primeiros registros de casos humanos de LV foram verificados em 2005, com cinco (3,6%) casos durante o ano (Mestre e Fontes, 2007). Contudo, a presença de cães sorologicamente positivos tem sido detectada desde o final da década de 1990, permanecendo até os dias atuais (Moura et al, 1999).

Por ocasião da epidemia em Várzea Grande, foi realizada captura de flebotomíneos, sendo *L.longipalpis* e *L.cruzi* encontradas em 14 dos 18 municípios com transmissão tanto de LVC como de LVH (Mestre e Fontes, 2007). Entretanto, Delgado et al (1993) e Tolezano et al (2007) identificaram a presença da espécie *L. colombiensis*, na Venezuela, e *L. amazonensis*, em Araçatuba (SP), respectivamente, em cães com quadro clínico de LV.

Em Cuiabá, a espécie etiológica da LVC é desconhecida, e sua identificação é necessária. Seria a espécie *L. infantum*, de distribuição ampla no Brasil, de fato o agente etiológico da LVC em Cuiabá, no estado do Mato Grosso?

4 – JUSTIFICATIVA

Segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2003), o diagnóstico laboratorial da LVC permanece como um problema para os serviços de saúde e está relacionado a três fatores: variedade de sinais clínicos semelhantes aos observados em outras doenças infecciosas, alterações histopatológicas inespecíficas e a inexistência de um teste de diagnóstico próximo a 100% de especificidade e sensibilidade.

O diagnóstico laboratorial da doença canina pode ser parasitológico ou sorológico. O primeiro é o diagnóstico de certeza e se baseia na demonstração do parasito obtido de material de punções de fígado e/ou de baço, de linfonodos e de medula óssea ou ainda, biópsia ou escarificação de tecido cutâneo. Tais métodos variam quanto ao potencial invasivo e requerem médico-veterinário para executar o procedimento, tornando-se impraticável nos inquéritos. Além disso, muitas vezes são obtidos resultados falso-negativos no exame parasitológico direto de esfregaços de medula óssea e de linfonodos (Silva et al, 2004; Manna et al, 2004; Gomes et al, 2008).

Os exames sorológicos atualmente realizados nos programas de saúde pública são a RIFI e o ELISA, ambos produzidos por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. A RIFI pode apresentar reações cruzadas com a leishmaniose tegumentar e a doença de Chagas, por exemplo, se considerarmos o ponto de corte à diluição de 1:40 (Silva et al, 2001b; Silva et al, 2004; Alves e Bevilacqua, 2004). O resultado do ELISA é considerado positivo quando o valor da densidade óptica for igual ou superior a três desvios-padrões do ponto de corte do resultado encontrado no controle negativo (Brasil, 2003).

Em seu estudo, Andrade et al (2006) observaram que a PCR, cujo alvo foi um fragmento de 120pb da região conservada do minicírculo de kDNA de *Leishmania*, foi capaz de identificar cães positivos para as leishmanioses, os quais foram inicialmente classificados como negativos pelos testes de diagnóstico preconizados pelo Ministério da Saúde: RIFI e exame parasitológico direto. Essa constatação nos alerta quanto à subestimação do número real de animais infectados quando diagnosticados pelos métodos empregados em áreas endêmicas, segundo os autores. Desta forma, um número considerável de cães positivos para as leishmanioses poderá permanecer como reservatórios do calazar (sin LV), comprometendo a eficácia das ações de controle da LV (Andrade et al, 2006).

Embora preconizadas pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2006b), as reações sorológicas de RIFI e ELISA necessitam de armazenamento dos soros em temperatura em torno de 4° C e

transporte apropriado para o laboratório onde serão realizados os procedimentos. A média esperada para o resultado final é em torno de 20 dias para o diagnóstico de infecção ou doença (Brasil, 2003), podendo levar até mais dias (Braga et al, 1998; Oliveira e Araújo, 2003).

Em um estudo sobre a ocorrência de leishmaniose em cães da área urbana de Cuiabá, Moura et al (1999) encontraram titulações elevadas (acima de 1:160) em 92,5% (37 amostras) dos soros coletados. Segundo os autores, esses dados sugerem fortemente ser uma área na qual a LVC encontra-se presente, constituindo-se no primeiro relato da detecção de cães sorologicamente positivos para leishmaniose em área urbana da cidade de Cuiabá.

A utilização da PCR (fragmento 116 pb da região conservada do kDNA) (Manna et al, 2004; Silva et al, 2004), do papel de filtro (Silva et al, 2004) e de biópsias de pele (Manna et al, 2004) de cães sugestivos de calazar e/ou naturalmente infectados por *Leishmania sp* possuem fundamentação teórica, garantindo resultados satisfatórios. Na nossa proposta, a substituição da biópsia de pele pelo aspirado de tecido subcutâneo permitirá que o procedimento seja realizado por agentes de saúde, durante os inquéritos. Além disso, essa é uma conduta que requer poucos cuidados com assepsia, pois o infiltrado subcutâneo, uma vez aspirado em seringa estéril, será imediatamente absorvido pelo papel de filtro.

Diferentemente das técnicas sorológicas, o aspirado de tecido subcutâneo impregnado no papel de filtro para realização da PCR poderá identificar até mesmo resquícios de material genético do parasito presentes na amostra (Moreira et al, 2007), e assim, poderá minimizar sobremaneira a chance de resultados equivocados. A coleta do aspirado de tecido subcutâneo, parece ser um procedimento muito mais simples, rápido, requerendo apenas, treinamento para sua execução.

Portanto, parece-nos que a combinação, papel_de_filtro-aspirado_subcutâneo-PCR poderá oferecer subsídios para facilitar o diagnóstico da LVC em qualquer uma de suas fases, seja ela assintomática, oligossintomática ou sintomática, devido à presença constante de parasitos no tecido subcutâneo desses animais. Esta metodologia pode ser uma contribuição à vigilância e ao controle da LV em áreas endêmicas e epidêmicas.

Acrescentaram-se a esse estudo metodologias variadas de diagnóstico da LVC para comparar entre si o comportamento das técnicas preconizadas pelo Ministério da Saúde. Coube ainda, a caracterização da espécie etiológica da LV, presente nos cães capturados e procedentes da cidade de Cuiabá, e que se faz necessária para o conhecimento da dinâmica de transmissão entre esses animais, em áreas rurais e urbanas (Dantas-Torres, 2009) e para o

aprimoramento no uso de estratégias e medidas de controle da transmissão (Shaw, Grimaldi e Cupolillo, 2005).

A identificação da espécie de *Leishmania* é indispensável, pois reforça a necessidade de um diagnóstico específico da infecção canina em áreas onde diversas espécies são simpátricas (Andrade et al, 2006).

5 – REFERENCIAL TEÓRICO

5.1 – Leishmaniose Visceral Canina

A manutenção da *Leishmania sp* na natureza depende principalmente do ciclo zoonótico (Prata e Silva, 2005). A leishmaniose visceral (LV) é considerada, no Brasil, uma zoonose canina, sendo o homem atingido acidentalmente pela infecção (Deane, 1956). A *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a espécie responsável, até então, pela doença no Brasil (Brasil, 2008b, <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27081>). No entanto, alguns autores consideram *L.(L.) infantum* sinônimo da *L.(L.) chagasi*, por apresentarem baixo grau de diversidade entre si, verificada por meio de análises bioquímicas e moleculares, não caracterizando espécies distintas (Momen et al, 1987; Cupolillo, Grimaldi e Momen, 1994; Tesh, 1995; Mauricio et al, 1999; Mauricio et al, 2000; Dantas-Torres, 2006).

No Brasil, os vetores da LV são insetos pertencentes à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae* e Gênero *Lutzomyia* (Camargo-Neves e Santucci, 2001; Gontijo e Melo, 2004), principalmente, além de outros gêneros (Souza et al, 2003; Pinto et al, 2010). Duas espécies foram incriminadas como vetoras da *L.infantum* no estado de Mato Grosso: a *L.longipalpis* (Gontijo e Melo, 2004; Prata e Silva, 2005), que apresenta distribuição idêntica a da LV, predominando em relação a outras espécies de flebotomíneos nos locais de surto de calazar, e ainda apresenta alta infestação no intradomicílio; e a *L. cruzi* (Galati et al, 1997; Santos et al, 1998), encontrada também no estado do Mato Grosso do Sul. Santos et al (2003) também identificaram *Lutzomyia longipalpis* no estado do Mato Grosso do Sul.

Segundo Tesh (1995), a emergência da LV como um problema crescente de saúde pública parece dever-se a vários fatores, sendo um deles, e provavelmente o mais importante, as mudanças ecológicas e demográficas, que são nítidas nas áreas tropicais do Novo Mundo. Atualmente, a ocorrência da LV em inúmeras localidades da América Latina, até então livres da doença, é consequência nítida desse processo (Tesh, 1995). Outro fator importante para a emergência da LV como um problema de saúde pública consistiu na interrupção da campanha de controle da malária nas regiões nordeste e sudeste do país, e a manutenção de cães infectados próximos à população (Tesh, 1995).

Para Nascimento et al (2005), a presença do vetor parece ser um fator de risco mais relevante para a disseminação da infecção por *L. infantum* (sin *L.chagasi* para os autores) do

que a presença de cães no domicílio e peridomicílio. Segundo os autores, o controle vetorial pode ser mais efetivo que a eliminação de cães no combate à infecção.

Outrossim, a disseminação da AIDS como uma epidemia global contribui para a emergência da LV: casos de co-infecção parecem dever-se à reativação de antigas infecções por *Leishmania sp*, enquanto em outros são provavelmente causados por infecções novas, em indivíduos imunossuprimidos (Gradoni, Scalone e Gramiccia, 1993; Tesh, 1995).

A falha em controlar a propagação da LV indica que os cães podem não ser os únicos, ou os mais importantes, reservatórios da infecção (Costa et al, 2000). Costa et al (2000) realizaram um estudo no intuito de determinar se pessoas infectadas pela *L. infantum* (sin *L.chagasi* para os autores) podem infectar os vetores, e encontraram uma resposta afirmativa: pessoas com a doença ativa podem infectar o vetor *L.longipalpis* com *L.infantum*. Os autores afirmaram que as formas amastigotas presentes no tecido cutâneo e subcutâneo são, provavelmente, uma fonte adicional de parasitas para os flebotomíneos, haja vista a dificuldade para detectar parasitemia pelo exame de esfregaço de sangue. Se apenas pessoas com a doença sintomática são infectivas aos flebotomíneos, os determinantes da competência humana como reservatório seriam semelhantes aos fatores que determinam a evolução da infecção à doença: a idade, a condição nutricional e a competência imunológica (Costa et al, 2000).

O risco da doença após a infecção é baixo na população em geral, porém indivíduos em condições que os vulnerabilizem, como crianças mal-nutridas, ou pessoas co-infectadas com HIV, podem ser reservatórios importantes (Costa et al, 2000). O elevado número de casos de calazar por *L.infantum* (sin *L.chagasi* para os autores) em Teresina-PI pode ter sido determinado por condições que favorecem a proliferação dos vetores, como é o caso da fixação de residência em comunidades de baixa renda com precários serviços de saneamento (Costa et al, 2000).

Como já esclarecido anteriormente (Brasil, 2006b), a estratégia de controle da LV baseia-se em três abordagens: detecção e tratamento de casos humanos, controle vetorial e eliminação de cães sororreagentes. Todavia, a detecção e o tratamento de casos humanos não contribuem para o decréscimo na incidência da LV, uma vez que a transmissão da infecção na comunidade é mantida por tratar-se de uma zoonose (Tesh, 1995). Além disso, a questão da resistência de cepas de *L.infantum* às drogas antimoniais, em condições de laboratório, deve ser levada em consideração, pois o mesmo já ocorreu com várias outras espécies de

leishmanias, e a co-infecção com HIV tende a acelerar a emergência de cepas resistentes (Ouellette e Papadopoulos, 1993).

Quanto ao controle vetorial, os esforços são direcionados para os flebotômíneos adultos, haja vista que os criadouros da maioria das espécies são desconhecidos. Os programas de pulverização são descontinuados, e as comunidades sofrem com a re-infestação, resultando no ressurgimento dos casos humanos e caninos de LV.

A eliminação de cães sororreagentes para *L.infantum* suscita muitos questionamentos. Fato é que muitos cães sororreagentes têm aparência saudável, não aparentando estar acometidos pela infecção da *L.infantum* nos estágios iniciais desse processo infeccioso, o que dificulta a aquiescência dos proprietários em ter seu cão eliminado (Tesh, 1995). Outro ponto importante a ser mencionado consiste na subestimação da verdadeira prevalência da infecção canina, uma vez que a sensibilidade dos testes sorológicos empregados pelos programas de vigilância canina deixa, ainda, a desejar. Esses programas são laboriosos e onerosos, e sofrem descontinuidade (Tesh, 1995).

Interessante observar o papel dos cães como reservatórios importantes do calazar em grandes centros. Em um estudo realizado em Pancas-ES objetivando avaliar o efeito da eliminação de cães sororreagentes na transmissão da LVH, não houve diferença estatisticamente significativa na incidência da doença na população ao longo de 12 meses de observação, quando comparada a área em que cães infectados pela *L.infantum* (sin. *L.chagasi* para os autores) foram mantidos (Dietze et al, 1997).

Para os autores, como o estudo foi desenvolvido em meio a um surto de LV, a estratégia de eliminação de cães infectados não pôde ser efetiva, isto é, a eliminação completa dos animais infectados, comprometendo, assim, os resultados obtidos. Outro fator agravante foi a migração cruzada de indivíduos e cães entre as localidades estudadas. Segundo Dietze et al (1997), uma possível explicação diz respeito ao fato de o reservatório primário, responsável pela manutenção da doença na população humana, ser mantido por outros animais, como a raposa e o gambá, principalmente em áreas urbanas, com características rurais.

Deane (1956) constatou que a LV canina poderia ser considerada, do ponto de vista epidemiológico, mais importante que a LV humana, uma vez que a doença canina é muito mais prevalente que a doença humana, além de apresentar um contingente grande de cães assintomáticos albergando a *Leishmania sp.* no tecido cutâneo, o que os torna, juntamente com os cães sintomáticos e oligossintomáticos, fontes de infecção mais fáceis para os flebótomos.

A distribuição cosmopolita do cão, e o fato de alguns grupos sociais terem um contato mais próximo com o cão doente, favorecem a transmissão da LV e, portanto, são fatores essenciais para a propagação do ciclo da doença (Prata e Silva, 2005). Em áreas de calazar é frequente a enzootia canina precedendo a infecção humana (Alencar, 1959).

Werneck et al (2008) afirmaram que o cão, considerado o reservatório doméstico do protozoário, desempenha o papel de fonte de infecção para indivíduos. Cães abandonados, ao vagar pela periferia da cidade, entrariam em contato direto com reservatórios selvagens da doença e, rapidamente, adquiririam a infecção. Ao retornarem para o interior da cidade, esses animais serviriam de amplificadores da infecção para outros cães e humanos. Nesse contexto, condições sociais favoráveis e a presença constante de um grande número de indivíduos não imunes, reservatórios infectados e vetores em abundância, configurariam as condições básicas para a ocorrência de casos autóctones da doença.

Mancianti et al (1988), mediante exame clínico, classificaram os cães com LV em: casos assintomáticos, nos quais não há sinais nem sintomas sugestivos de infecção por *Leishmania*; oligossintomáticos, nos quais encontram-se apenas alguns sinais clínicos da doença, como adenopatia linfóide – aumento generalizado dos linfonodos-, discreta perda de peso e/ou pelagem opaca; e casos sintomáticos, nos quais encontram-se todos ou alguns dos sinais severos da doença: alterações cutâneas, onicogribose (crescimento exagerado das unhas), ceratoconjuntivite e rigidez dos membros pélvicos.

De acordo com Freitas et al (2006), os primeiros sinais clínicos, e os mais comuns, são alterações dermatológicas, com destaque para dermatite esfoliativa e acentuada perda de pelo ao redor dos olhos. A doença evolui com o surgimento de úlceras, alopecia local ou generalizada e hiperpigmentação da pele (Freitas et al, 2006).

Moreira et al (2007) encontraram em seu estudo que os sinais clínicos mais frequentes, tanto para cães sintomáticos como para cães oligossintomáticos, são a linfadenomegalia, perda de peso, alterações dermatológicas e onicogribose. Silva et al (2001a) também observaram, durante seu estudo, lesões cutâneas pequenas e únicas ou múltiplas, com bordos, e altamente simétricas, sem prurido, que podiam ser vistas em diferentes partes do corpo, inclusive nas orelhas, no focinho, nas patas e nos genitais dos cães com LV. Grande número de parasitos foi encontrado em biópsias de determinados pontos do tecido cutâneo (Silva et al, 2001a). Segundo Prata e Silva (2005), as lesões e a perda de pelos, ocasionadas pelo intenso tropismo das leishmanias pelo tecido cutâneo dos cães, facilitariam a infecção dos flebotomíneos.

Barros (1998) apontou que os cães com LV apresentam anemia não-regenerativa e hipergamaglobulinemia policlonal (aumento inespecífico e generalizado de gamaglobulinas) com concentrações de proteína total que podem passar de 100g/L (valor de referência: 10 g/L).

Não obstante, é interessante notar que esses cães frequentemente não apresentam sinais clínicos da doença, embora possam apresentar grande número de formas amastigotas no exame parasitológico de medula óssea e em fragmentos de tecido subcutâneo. Tal constatação, aliada ao intenso parasitismo subcutâneo, à presença desses cães no ambiente peridoméstico, assim como à sua dispersão, seja acompanhando famílias ou isoladamente, confirmam a importância epidemiológica do cão como a maior fonte de infecção pela *Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi* na transmissão da LV para indivíduos e animais (Silva et al, 2001a).

Até recentemente, a transmissão de formas livres intracelulares de *Leishmania* no sangue via transfusão sanguínea não era reconhecida como uma fonte potencial da infecção e desenvolvimento de LV (Freitas et al, 2006). Em contrapartida, Freitas et al (2006) obtiveram resultados que evidenciam a possibilidade de transmissão, via transfusão sanguínea, de *Leishmania infantum*, experimentalmente, pelo sangue total ou por frações de células mononucleares de cães infectados para animais receptores, independentemente da condição clínica do doador. Os pesquisadores demonstraram que as formas amastigotas presentes nas células mononucleares dos cães infectados foram transmitidas para o hamster receptor e conservaram seu potencial de infectividade. Esta informação é um alerta muito importante para prevenir a disseminação da infecção por *L. infantum* através de transfusão sanguínea, dado que os cães doadores de sangue não são devidamente monitorados (periódica e rigorosamente), podendo servir como fonte de infecção, não apenas de *Leishmania sp.*, para cães receptores (Freitas et al, 2006).

Importante ressaltar que a necessidade de transfusão está relacionada, principalmente, à incapacidade da medula óssea de produzir e substituir componentes celulares, devido à falha funcional da própria (Freitas et al, 2006). O sistema imunológico comprometido favorece infecções de inúmeros patógenos, ainda mais daqueles que são injetados diretamente na corrente sanguínea e disseminados através do organismo até a colonização de outros órgãos (Freitas et al, 2006).

A evidência clínica da LV adquirida via transfusão sanguínea dependerá do estabelecimento do estado de equilíbrio entre a *Leishmania sp.* e os mecanismos de defesa

imunológica e genética do hospedeiro, assim como ocorre nas transmissões naturais (Freitas et al, 2006). Muitos cães que sofreram transfusão podem ser assintomáticos e servir como reservatório, tendo sua pele como fonte de infecção para flebotomíneos (Freitas et al, 2006).

Em um estudo correlacionando a presença da infecção por *L.infantum* (sin *L.chagasi* para os autores) a variáveis sócio-econômicas e epidemiológicas em uma área endêmica de LV no Maranhão, Brasil, os resultados obtidos mostraram associação dessas variáveis com a IDR (intradermorreação de Montenegro), porém não houve associação com o teste ELISA empregando o antígeno rK39 (Nascimento et al, 2005). Verificou-se que a existência ou não de portas e janelas, bem como o tipo de abastecimento de água estavam relacionados à IDR (Nascimento et al, 2005). O fato de apenas 2,5% da população estudada ter água encanada favorecia maior exposição ao vetor, haja vista que essas pessoas se deslocavam para buscar água no intuito de abastecer sua casa. Observou-se que o cão, isoladamente, não foi fator de risco para a infecção por *L.infantum* (sin *L.chagasi* para os autores), enquanto a aspersão com inseticida foi fator protetor (Nascimento et al, 2005).

5.2 – Leishmaniose Visceral Humana e Canina no estado do Mato Grosso, Brasil

Após anos transcorridos com notificações de casos isolados, em 1998 ocorreu uma epidemia de LV no estado do Mato Grosso, que teve início no município de Várzea Grande, onde foram registrados 13 casos humanos autóctones, e que favoreceu a expansão da transmissão da doença para outros municípios do estado (Mestre e Fontes, 2007).

Os autores observaram que os casos notificados no biênio de 1998 a 1999 restringiram-se a três municípios da Baixada Cuiabana: Várzea Grande, Chapada dos Guimarães e Nossa Senhora do Livramento, sendo Várzea Grande o que registrou o maior número de casos. De acordo com os autores, somente em 2005 foram registrados os primeiros cinco casos autóctones de Cuiabá, capital do estado.

De acordo com Missawa e Borba (2009), as taxas mais elevadas de incidência de LV em pacientes humanos nos anos de 1998 e 1999 em Várzea Grande podem estar relacionadas à crescente expansão e urbanização da LV, e também pela busca ativa de casos e melhoria no diagnóstico pelos serviços de atenção primária.

Mestre e Fontes (2007) apontaram que a transmissão da LV no Mato Grosso expandiu sobremaneira, e atingiu outros municípios do Centro-Sul do estado, região de grande mobilidade populacional, além dos municípios próximos à Baixada Cuiabana. Nestes foram

identificados novos focos de transmissão ao longo dos corredores de circulação do estado, especialmente em direção ao Sudeste e Norte mato-grossenses.

De acordo com Camargo-Neves (2008), padrão de transmissão semelhante a esse foi observado também no interior de São Paulo: a LV foi identificada em zona urbana de municípios seguindo os eixos rodoviários e ferroviários daquele estado. O fluxo migratório entre os municípios desses corredores de circulação, aliado ao processo de ocupação urbana desordenada, perpetuam a interiorização da LV no Mato Grosso (Mestre e Fontes, 2007; Missawa e Borba, 2009).

Para Missawa e Borba (2009), a distribuição espacial da LV no município de Várzea Grande não foi aleatória: identificou-se um padrão de agregação no espaço, devido às condições sócio-econômicas da população. Os autores afirmaram que tanto o surgimento de núcleos residenciais como a ocupação de áreas pela população de baixa renda causaram a destruição de ecótopos silvestres, contribuindo assim para a disseminação da LV, confirmando que a doença está diretamente associada ao processo de ruralização de áreas periurbanas.

O estado do Mato Grosso do Sul faz fronteira com o estado do Mato Grosso. Em Campo Grande, capital do estado do Mato Grosso do Sul, a LV apresentou tendência de expansão a partir de 2002, com o aumento no número de casos, sendo que a maioria dos pacientes residia em área urbana (a partir de 2003 não foram mais notificados casos em área rural) (Botelho e Natal, 2009). Considera-se que, em Campo Grande, foi deflagrado um processo de endemização urbana da LV, com elevada incidência de casos.

Mestre e Fontes (2007) atribuíram o desenvolvimento de condições propícias à transmissão da LV em Várzea Grande, ocorrido nas duas últimas décadas, ao aparecimento, de núcleos residenciais de migrantes de baixa renda nas periferias urbanas; é uma população que sobrevive em precárias condições de moradia, de coleta de lixo e de saneamento básico. O intenso êxodo rural favorece ainda a destruição de ecótopos silvestres e consequente afastamento, mesmo que temporário, de animais silvestres que existiam nessas localidades e que serviam como fonte de alimento para as fêmeas de flebótomos. Com a chegada das famílias, muitas delas trazendo animais domésticos, como cães, que segundo Marzochi e Marzochi (1997), muitas vezes são trazidos já infectados da região de origem, passam a contribuir como novas fontes alimentares para os vetores, tornando-se infectados e/ou infectando flebótomos de hábitos ecléticos.

As presenças da LVC no Mato Grosso e da *L.longipalpis* neste estado já foram relatadas anteriormente: Moura et al (1999) encontraram cães sorologicamente positivos para LV em áreas urbanas de Cuiabá em 1997 e 1998, enquanto Missawa e Lima (2006) capturaram aquele vetor em 23 municípios dos 68 pesquisados entre 1996 e 2004, inclusive em Várzea Grande. D`Andrea et al (2009) afirmaram que a *L.longipalpis* foi detectada nas cidades que formam a microrregião de Dracena, interior paulista, entre um e três anos antes da identificação de casos humanos e caninos.

Mestre e Fontes (2007), em um levantamento entomológico realizado em 68 municípios do estado, incluindo 34 com casos de LV humana, afirmaram que em 32 destes foi identificada a espécie vetora *L. longipalpis*. A presença dos vetores *L. longipalpis* e *L. cruzi* foi registrada em 14 dos 18 municípios com transmissão de LV humana e de LVC. Destaque para a ocorrência de *L. cruzi*, encontrada em 78,6% dos municípios com registro simultâneo de LV humana e LVC, o que sugere a possível incriminação desta espécie na transmissão da LV no estado do Mato Grosso, assim como em Mato Grosso do Sul (Galati et al, 1997; Santos et al, 1998).

Em um inquérito soroepidemiológico de leishmaniose em cães domiciliados na zona urbana de Cuiabá-MT, Almeida et al (2009) encontraram prevalência de 3,4%, o que corresponde a 16 positivos dentre 468 animais estudados. Os autores inferiram que a ocorrência de casos caninos em área urbana de Cuiabá pode ser entendida como reflexo de mudança nos aspectos da cadeia de transmissão, que possibilitaram o acesso do vetor a essas localidades. A cidade de Cuiabá passa por modificações ambientais intensas, com o desmatamento para a construção civil, que favorecem o desenvolvimento dos vetores, configurando quadro relevante para o entendimento da dinâmica das leishmanioses em áreas urbanas das cidades.

5.3 – Diagnóstico Rápido para Leishmaniose Visceral

Métodos de diagnóstico precisos para LV (elevadas sensibilidade e especificidade), de fácil realização e interpretação, que forneçam resultados rápidos, que independam de infraestrutura laboratorial e de profissionais especializados, têm sido cada vez mais buscados (Dourado et al, 2007). Assis et al (2008) acrescentaram que o discreto avanço no diagnóstico da LV nas últimas décadas pode dever-se à complexidade biológica da infecção, bem como ao

fato da LV ser uma doença negligenciada e, portanto, com baixo lucro comercial, apesar de ser atraente às pesquisas.

O Kalazar DetectTM Rapid Test (Kalazar Detect® InBios International, Seattle, WA, USA) é um teste rápido imunocromatográfico empregado para a determinação qualitativa de anticorpos para o antígeno recombinante k39 de *L.infantum* (sin *L.chagasi* para os autores) em seres humanos (Lemos et al 2003).

O DiaMed IT-LEISH® (produzido pela DiaMed AG Cressier sur Morat, Suíça, e distribuído pela DiaMed Latino América S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) é um teste rápido imunocromatográfico que permite a detecção rápida de anticorpos, também contra o antígeno recombinante k39 de *L.infantum* em seres humanos (Sundar et al, 2003).

O TRALd (Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani*) é um teste rápido que detecta anticorpos anti-leishmania, que foi elaborado a partir da adaptação da proteína recombinante k39 para um teste imunocromatográfico (Badaró, 1996 *apud* Dourado et al, 2007).

5.4 – Métodos laboratoriais para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

Para Silva et al (2004), o diagnóstico rápido e preciso da infecção por *Leishmania* sp em cães é de grande importância, de forma a permitir a retirada dos animais infectados das casas. Silva et al (2006) afirmaram, não obstante, que este diagnóstico continua sendo problemático, uma vez que o diagnóstico parasitológico depende dos exames sorológico e parasitológico de punção de medula óssea. Este último é um procedimento doloroso para os cães e requer a execução por um médico veterinário experiente. Ainda assim, o diagnóstico parasitológico permanece como padrão ouro quanto às leishmanioses devido à sua alta especificidade (Romero et al, 2009). Todavia, ferramentas diagnósticas, as quais são consideradas para a implementação da vigilância ou programas de controle, precisam ter elevada sensibilidade e especificidade, a fim de evitar o sacrifício de cães falsamente positivos (Silva et al, 2006).

O padrão de referência atual para o diagnóstico da LV é a demonstração de formas amastigotas de *Leishmania* em esfregaços de tecidos e/ou de formas promastigotas em cultura dos mesmos tecidos (Gomes et al, 2007). As técnicas parasitológicas são altamente específicas, mas sua sensibilidade varia de acordo com o tipo de tecido, e, além disso, requerem experiência clínica e laboratorial (Boelaert et al, 2008).

Em um estudo desenvolvido por Silva et al (2001b), os autores verificaram que em 644 cães estudados, 139 (21,6%) eram positivos pela RIFI; em 52 amostras soropositivas, 39 (75%) foram PCR positivas e todas as 52 amostras foram positivas pela hibridização. Para a realização da PCR, um fragmento de DNA de 120 pb da região conservada da molécula dos minicírculos (DNA mitocondrial do cinetoplasto; kDNA) foi amplificado; nesse procedimento hot-start PCR, foi utilizado *primer A*, 5'-(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3' , e *primer B*, 5'-GGGGA-GGGGCGTTCTGCGAA-3'. O produto esperado da amplificação

Portanto, para Silva et al (2001b), a combinação PCR-hibridização é uma metodologia de diagnóstico altamente sensível para detecção da LVC. Silva et al (2006) enfatizaram que os testes sorológicos constituíam-se em uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico das leishmanioses caninas. O resultado de qualquer teste sorológico deve ser sempre julgado criteriosamente a partir dos dados clínicos, epidemiológicos e outros dados diagnósticos.

De modo a comparar formas de controle do calazar canino em áreas endêmicas do Ceará, Braga et al (1998) empregaram um programa de eliminação rápida (em torno de sete dias) de cães sororreagentes para LV através do ELISA e outro de eliminação tardia (em torno de 80 dias) de cães sororreagentes através da RIFI realizada com eluato de papel de filtro. Os resultados encontrados atestaram a sensibilidade significativamente maior do ELISA em detrimento da RIFI. Os autores afirmaram que a maior sensibilidade do ELISA seria fundamental para o controle da LV, pela redução do tempo de permanência de um reservatório animal em uma comunidade. Apesar de não ser possível definir com precisão o que de fato provocou a redução na prevalência da LV canina nesse estudo, se foi a maior sensibilidade do teste ou a eliminação imediata dos cães infectados, os autores concluíram que ambas as ações são importantes para o incremento do controle da LV.

No entanto, o grande número de métodos empregados como testes sorológicos demonstra a dificuldade em desenvolver um método suficientemente confiável para o diagnóstico clínico (Barroso-Freitas et al, 2009).

Técnicas moleculares têm contribuído para um melhor entendimento quanto a infecções de reservatórios primários, os quais são responsáveis pela manutenção do ciclo zoonótico do parasita na natureza (Silva, Gontijo e Melo, 2005). Várias técnicas moleculares estão sendo desenvolvidas para a detecção e a identificação de *Leishmania* sp. em hospedeiros invertebrados e em mamíferos, sem a necessidade de cultivo, o que pode ser observado nos

inúmeros protocolos de PCR (Silva, Gontijo e Melo, 2005), como é o caso da PCR multiplex (Harris et al, 1998).

Os alvos da PCR multiplex de Harris et al (1998) eram sequências para a região SL RNA das espécies de *Leishmania* do Novo Mundo; os *primers* escolhidos amplificam tanto regiões conservadas em todas as espécies de *Leishmania* (LU-5A [5'-TTT ATT GGT ATG CGA AAC TTC-3']) como regiões específicas para cada complexo do Novo Mundo (LB-3C [5'-CGT (C/G)CC GAA CCC CGT GTC-3'] – complexo *L.braziliensis*, LM-3A [5'-GCA CCG CAC CGG (A/G)CC AC-3'] – complexo *L.mexicana*, e LC-3L [5'-GCC CGC G(C/T)G TCA CCA CCA T-3'] – complexo *L.donovani*). Os tamanhos esperados do produto da PCR eram: 351 a 397pb para o complexo *L.donovani*, 218 a 240 pb para o complexo *L.mexicana*, 146 a 149pb para o complexo *L.braziliensis*.

Andrade et al (2006) utilizaram a RIFI, a microscopia ótica e a PCR para investigar a presença de formas amastigotas de *Leishmania* em *imprints* de pele, baço, linfonodos, fígado e medula óssea de cães provenientes de área endêmica para as leishmanioses. A PCR foi realizada empregando os *primers* 150 forward: [5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(G/C)CGAA-3'], e 152 reverse: [5'-(G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3'] que amplificaram um fragmento de DNA de 120 pb da região conservada dos minicírculos kDNA de *Leishmania*. Para os autores deste estudo, a PCR provou ser superior à RIFI e ao exame parasitológico direto através da microscopia ótica para o diagnóstico da LVC, independentemente do tecido canino utilizado ou da manifestação clínica no cão. Assim como Solano-Gallego et al (2001), que utilizou os *primers* SP176 (5'-TCTTGCGGGGAGGGGGTG-3') e SP177 (5'-TTGACCCCCAACCACATTTTA-3') para amplificar um fragmento de 120pb de DNA dos minicírculos do cinetoplasto da *Leishmania*, os autores observaram ainda que a PCR foi capaz de detectar a presença da *L. infantum* nos cães, mesmo naqueles com infecções subclínicas. Desta forma, Andrade et al (2006) concluíram que a aplicação conjunta da PCR com a sorologia permite determinar a extensão das infecções subclínicas de áreas endêmicas para a LVC, e estimar o número de cães que serão alvo das medidas de controle.

Tanto na medicina humana como na prática veterinária, a confiabilidade do diagnóstico da LV baseado na técnica da PCR (fragmento 116 pb da região conservada do kDNA) é bem conhecida (Manna et al, 2004). A PCR é um método mais sensível do que a microscopia para a identificação de *Leishmania* em aspirados de medula óssea e linfonodos,

sendo especialmente útil na confirmação de casos suspeitos de LV em pacientes humanos (Osman et al, 1997).

Ashford et al (1995) encontraram sensibilidade de 100% pela PCR em cães com diagnóstico parasitológico positivo para LV. O produto esperado da PCR empregada pelos autores era a amplificação de um fragmento de 120pb de DNA da região conservada dos minicírculos do kDNA de todas as espécies do gênero *Leishmania* testadas, utilizando os *primers* 13A [5'-dGTGGGGGAGGGGCGTTCT-3'] e 13B [5'-dATTTTACACCAACCCCCAGTT-3'] e a amplificação de um fragmento de 650pb de DNA da região variável do kDNA de *Leishmania* sp., através do par de *primers* V 1 [5'-TTCG(G/C)AGAACGCCCT(C/A)CCC-3'] e V2 [5'-GGGGTTGGTGTA(A/T)ATAG(G/T)(G/C)(G/C)C-3'].

A aplicação da PCR para a detecção do DNA da *Leishmania* a partir de espécimes clínicos (sangue e aspirado de medula óssea para seres humanos e cães, além de biópsias de tecido cutâneo para cães) tem contribuído para resolver os problemas de diagnóstico devido à baixa sensibilidade do exame microscópico ou aos baixos valores preditivos da sorologia, cujos resultados podem ser afetados tanto por anticorpos persistentes (falso-positivos) como pela imunossupressão (falso-negativos) (Manna et al, 2004). Os autores apontaram ainda que a sensibilidade e a especificidade dos testes sorológicos podem variar consideravelmente, e podem subestimar a incidência da doença.

Gomes et al (2007) desenvolveram um estudo cujo objetivo foi investigar uma metodologia específica e sensível para distinguir *L.infantum* (sin *L.chagasi* para os autores) de *L.braziliensis* em amostras biológicas (fragmentos de fígado, baço e linfonodo e aspirados do último). *L.(L.) chagasi* foi determinada pelos *primers* RV1 (sense) 5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3' e RV2 (antisense) 5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3', que amplificaram uma sequência de 145pb do fragmento LT1 dos minicírculos e kDNA como alvo. *L.braziliensis* foi determinada por um par de *primers*, que amplificaram uma sequência de 146-149pb do gene SL (*multicopy spliced leader*) do RNA (mini-exon) como alvo. Um *primer* foi LU-5A (sense) 5'-TTTATTGGTATGCGAACTTC-3', de um intron SL conservado (55-101 nucleotídeos) em *Leishmania* spp. O outro era LC-3L (antisense) 5'-GCCCCGCG(C/T)GTCACCACCAT-3' de um espaçador não-transcrito variável, que é uma região específica para *L.braziliensis*. *Leishmania* spp. foi determinada nas amostras por um par de *primers* que amplificaram uma sequência de 120pb da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* como

alvo. Os *primers* foram: 150 (sense) 5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA-3' e 152 (antisense) 5'-(C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3'. A PCR utilizando *primers* específicos demonstrou sensibilidade e especificidade suficientes, de modo a evitar-se a hibridização ou o tratamento do produto da PCR com enzimas de restrição. Os resultados obtidos pelos autores apontaram para a relevância da inclusão da PCR no diagnóstico das leishmanioses, pois esta técnica provou ser uma ferramenta eficaz o bastante de modo a propiciar diagnósticos rápidos. Uma metodologia específica baseada na técnica da PCR torna-se interessante por ser rápida, sensível e específica, além de evitar a etapa de cultivo de parasitas (Gomes et al, 2007). A PCR, portanto, apresenta potencial para ser empregada em programas de vigilância em leishmanioses, os quais requerem análises laboratoriais eficientes visando a ações rápidas e concisas (Gomes et al, 2007).

Manna et al (2004) obtiveram o melhor resultado de seu estudo através da realização da PCR em biópsias de pele de animais suspeitos. O alvo do DNA para a amplificação pela PCR era um fragmento de 116 pb na região conservada do DNA do cinetoplasto do minicírculo. Os *primers* utilizados foram os pares 13A [5'-dGTGGGGGAGGGGCGTTCT-3'] e 13B [5'-dATTTTACACCAACCCCAGTT-3']. Ainda assim, os autores salientaram que o exame microscópico de fragmentos de pele ou de amostras de biópsias de lesão, apesar de rápidos e de baixo custo, possuem sensibilidade limitada, particularmente se as lesões forem crônicas. Por outro lado, as técnicas de cultura *in vitro* são ligeiramente mais sensíveis que o exame microscópico de esfregaços de biópsias de lesão ou de amostras histológicas, embora também sejam mais trabalhosas e onerosas, além de estarem mais suscetíveis à contaminação microbiológica (Manna et al, 2004).

Em seu estudo, Manna et al (2004) compararam análises de sangue, linfonodos ou biópsias de pele de cães infectados pela *L. infantum*, pela PCR, e verificaram que esses insumos são mais sensíveis que a RIFI. Propuseram que este resultado deveria ser analisado como uma desvantagem da sorologia, uma vez que os resultados da PCR foram validados pela aplicação do método em mais de um tipo de amostra clínica. Os autores entenderam que o diagnóstico baseado na técnica da PCR em sangue ou biópsia de tecido cutâneo é vantajoso, uma vez que as amostras podem ser obtidas de forma menos invasiva do que em aspirados de linfonodos dos cães, além de serem relativamente fáceis de processar.

Os resultados do estudo de Manna et al (2004) indicaram que, independentemente da presença de lesões cutâneas, a pele representa um substrato confiável para o diagnóstico da LVC para a PCR (fragmento 116 pb da região conservada do kDNA).

Madeira et al (2004) conseguiram isolar *Leishmania infantum* (sin *L.chagasi* para os autores) a partir de fragmentos de pele sã de cães sororreagentes, sintomáticos e assintomáticos. Os autores não encontraram correlação entre os sinais clínicos e a presença de parasitos na pele.

Solano-Gallego et al (2001) comparam a prevalência da infecção por *L. infantum* com os resultados obtidos pela sorologia em uma população canina residente em área endêmica. Para o diagnóstico, os autores realizaram sorologia e PCR, que empregou os *primers* SP176 (5'-TCTTGCGGGGAGGGGGTG-3') e SP177 (5'-TTGACCCCCAACCACATTTTA-3') para amplificar um fragmento de 120pb de DNA dos minicírculos do cinetoplasto da *Leishmania* presente nas amostras de biópsias da pele e da conjuntiva do olho e de punção da medula óssea. Os autores concluíram que o tecido cutâneo é o substrato que apresenta a principal reserva de *L. infantum* e que independe da presença de lesões e/ou outras indicações da doença.

Da mesma forma, Andrade et al (2006) encontraram positividade mais elevada, quando empregavam, em seu estudo, a PCR, cujo alvo era um fragmento de 120pb da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania*, em amostras de pele e baço.

Segundo Reale et al (1999), em muitos casos, a ausência de lesões visíveis não pode excluir a presença de infecção prévia, e o resultado da RIFI pode ser negativo para cães imunocomprometidos já devido à doença. Os autores afirmaram que os dados de exames sorológicos, por si só, não são suficientes para diagnosticar corretamente as leishmanioses, visto que esses exames dependem das condições gerais de saúde do animal. Todavia, o diagnóstico baseado na PCR é independente do estado imunológico do cão, bem como é um teste direto que examina minuciosamente a presença de DNA do parasito na amostra, o que pode auxiliar na descoberta de mais casos de cães infectados (Reale et al, 1999). Os autores empregaram a PCR em seu trabalho, cujo alvo era um fragmento de 116pb de DNA na região conservada dos minicírculos de kDNA, e os *primers* foram o par de oligonucleotídeos 13A [5'-dGTGGGGGAGGGGCGTTCT-3'] e 13B [5'-dATTTTACACCAACCCCAAGTT-3']. Com o fragmento de 116pb, os autores desenharam uma sonda específica de 70pb.

Ainda nesse trabalho, utilizando o exame parasitológico como referência, os autores encontraram 100% de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo quando os insumos utilizados eram aspirados de linfonodos de animais com sinais claros de infecção. Entretanto, resultados diferentes foram encontrados quando analisadas amostras de sangue: valores de 85%, 80%, 95% e 57%, respectivamente (Reale et al, 1999).

Moreira et al (2007) obtiveram os melhores resultados de sensibilidade em seu estudo ao utilizar a técnica da PCR, cujo alvo era um fragmento de 120pb de DNA da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania*; os *primers* empregados foram 13A [5'-dGTGGGGGAGGGGCGTTCT-3'] e 13B [5'-dATTTTACACCAACCCCAAGTT-3']. Os autores concluíram, portanto, que este é um método bastante eficiente para o diagnóstico da leishmaniose canina, apesar de não refletir a gravidade da infecção nem o estágio da doença. Os autores encontraram valores de sensibilidade de 87,8%, 68% e 95,65% no teste ELISA para as amostras de soro dos cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos, respectivamente, e 100% de especificidade nas três categorias; os valores encontrados de sensibilidade da PCR realizada com aspirado de linfonodos foram 100% para cães sintomáticos, 96% para oligossintomáticos e 95,65% nos grupos assintomáticos, sendo 100% de especificidade nas três categorias também.

Nunes et al (2007) empregaram a PCR em seu estudo, cujo alvo era um fragmento de 120pb de DNA da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania*; utilizaram os *primers* 13A [5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3'] e 13B [5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3']. Os autores observaram a amplificação de kDNA referente a 0,1 parasita/500µl de sangue circulante. Os autores compararam ainda seus resultados com os obtidos por Reale et al (1999) nas mesmas condições e verificaram a detecção do parasito em uma concentração dez vezes menor de sangue em seu estudo. Contudo, os autores afirmaram que a qualidade das amostras clínicas pode influenciar os resultados de sensibilidade e especificidade observados na PCR. Coletas de sangue homogeneizadas incorretamente, por exemplo, podem levar à formação de coágulos que vão dificultar a extração do DNA alvo. Além disso, o grau de parasitemia dos animais infectados é outro fator que pode conduzir à baixa sensibilidade da PCR em amostras de sangue.

Nunes et al (2007) concluíram, ao utilizar como insumo o sangue de cães, que a PCR não se revelou uma boa ferramenta para o diagnóstico da LVC, em função das baixas sensibilidade (55%) e especificidade (66,3%) quando comparada à RIFI. Acrescentaram ainda que os testes sorológicos apresentaram maior facilidade de realização e custo mais baixo em áreas endêmicas.

No entanto, um estudo, que objetivou a avaliação da reprodutibilidade de um teste diagnóstico baseado na PCR-kDNA para leishmaniose tegumentar utilizando DNA extraído de biópsias de pele em papel de filtro, apresentou desempenho melhor quando comparado à abordagem convencional de cultura parasitária, além de ter conseguido superar também

outros métodos baseados na PCR (Romero et al, 2009). A PCR foi realizada utilizando os *primers* 150 forward: [5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(G/C)CGAA-3'] e 152 reverse: [5'-(G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3'] para amplificar um fragmento de DNA de 120pb da região conservada do minicírculo de kDNA de *Leishmania*. Os autores encontraram uma positividade extremamente satisfatória quanto à técnica molecular: mais de 85% de detecção dos pacientes suspeitos, e mais de 95% de casos confirmados pelo cultivo de parasitas quando do emprego da PCR-kDNA. Os autores concluíram que a sensibilidade do papel de filtro é satisfatória e poderia ser utilizada em ensaios clínicos e em trabalho de campo.

Ressalta-se, no entanto, que a sensibilidade e a especificidade de qualquer técnica diagnóstica são passíveis de alterações durante o curso de uma infecção. Segundo Quinnell et al (2001), no início da infecção, o exame parasitológico ou a técnica da PCR podem ser os mais sensíveis, embora não haja um único teste que identifique, de forma confiável, a infecção em todos os cães. Dois pares de *primers* foram empregados nesse estudo. Os *primers* DBY e AJS31, com sonda B4Rsa, amplificam e detectam um minicírculo de 805 pb e são específicos para os parasitas do grupo *L.donovani*. Os *primers* R221 e R332 amplificam um segmento de 604 pb da subunidade pequena do ribossomo do RNA do gene de todas as espécies de *Leishmania*; um oligonucleotídeo interno (R331) foi usado como uma sonda.

Os autores encontraram sensibilidade da PCR de 97,6% nas amostras positivas (confirmação dos parasitos pela cultura ou microscopia ótica), enquanto a sorologia foi menos sensível (sensibilidade= 80-84%). No entanto, a especificidade, tanto da PCR como da sorologia, foi alta (98-100%) para as mesmas amostras. Quinnell et al (2001) afirmaram que a sensibilidade da sorologia em detectar as amostras PCR-positivas foi de 86% quando o ponto de corte era mais baixo, e 77,7% quando o ponto de corte era mais elevado. Já a PCR apresentou resultado positivo em apenas 59% das amostras soropositivas, enquanto apenas 15% das amostras soronegativas eram PCR-positivas.

Os resultados de Quinnell et al (2001) sugerem que a sorologia, quando bem definida, pode ser um teste altamente sensível para a maior parte do curso da infecção, além de ser mais sensível que a PCR para detectar todos os animais infectados pela *L. infantum*. Quinnell et al (2001) apontaram que estudos já verificaram que nem a sorologia nem a PCR são capazes de identificar todos os animais infectados; divergências entre os estudos podem refletir diferenças entre as populações caninas estudadas ou variações na sensibilidade relativa às técnicas utilizadas nos estudos.

Quinnell et al (2001) complementaram que o tipo de material para a biópsia também é importante, uma vez que a medula óssea (material utilizado pelos autores) pode apresentar altas cargas parasitárias, embora seja possível que os parasitos sejam mais facilmente identificados pela PCR realizada em material oriundo de baço, linfonodos ou biópsias de pele.

Silva et al (2004) utilizaram amostras de sangue em papel de filtro para diagnosticar LV humana por meio da PCR. Foi utilizada hot-start PCR, cujo alvo era um fragmento de 120pb de DNA da região conservada do minicírculo do cinetoplasto da *Leishmania*, e que empregaram os *primers* [5'(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACAACCCC-3'] e [5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3']. Os autores afirmaram que o papel de filtro consistiu em uma técnica simples, rápida e que dispensou o uso de solventes orgânicos para a extração do DNA da amostra, durante a realização em laboratório. A metodologia de utilização do papel de filtro com esfregação de sangue mostrou que detém atributos que permitem sua utilização como diagnóstico em áreas carentes de infra-estrutura nos serviços de saúde ou no caso de cães, quando as coletas são realizadas no campo.

5.5 – A Qualidade da Medida

Os parâmetros para descrever a confiabilidade de um teste diagnóstico geralmente incluem a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo (Barroso-Freitas et al, 2009).

A sensibilidade de um teste pode ser entendida como a probabilidade desse teste resultar positivo quando a infecção está presente (Barroso-Freitas et al, 2009), isto é, a capacidade do teste de identificar os resultados verdadeiramente positivos (Palmeira, 2000). Nada mais é do que o número de resultados positivos obtidos pelo teste dividido pelo número de resultados positivos obtidos pelo padrão ouro (Palmeira, 2000).

$$S = \frac{\text{amostras positivas (teste)}}{\text{amostras positivas (padrão ouro)}}$$

A especificidade, por sua vez, pode ser entendida como a capacidade de um teste de identificar as amostras verdadeiramente negativas (Palmeira, 2000). Esquemáticamente, é o

número de resultados negativos obtidos pelo teste dividido pelo número de resultados negativos obtidos pelo padrão ouro (Palmeira, 2000).

$$E = \frac{\text{amostras negativas (teste)}}{\text{amostras negativas (padrão ouro)}}$$

O Valor Preditivo Positivo, de acordo com Palmeira (2000), pode ser entendido como a proporção de verdadeiros positivos entre os identificados como positivos pelo teste.

$$VP+ = \frac{\text{Verdadeiros positivos}}{\text{amostras positivas (teste)}}$$

Já o Valor Preditivo Negativo pode ser entendido como a proporção de verdadeiros negativos entre os identificados como negativos pelo teste (Palmeira, 2000).

$$VP- = \frac{\text{Verdadeiros negativos}}{\text{amostras negativas (teste)}}$$

De acordo com a tabela a seguir, os conceitos apresentados acima podem ser assim apresentados:

Tabela de concordância

Teste	Doente	Não Doente	Total
Positivo	A	B	A + B
Negativo	C	D	C + D
Total	A + C	B + D	A + B + C + D

$$S = \frac{A}{A + C}$$

$$VP+ = \frac{A}{A + B}$$

$$E = \frac{D}{B + D}$$

$$VP- = \frac{D}{C + D}$$

5.6 – Caracterização bioquímica por eletroforese de isoenzimas das espécies de *Leishmania*

A técnica de eletroforese de isoenzimas permite a identificação da espécie de isolados de microrganismos. Estudos realizados por Cupolillo, Grimaldi e Momen (1994) e Pacheco et al (1999), classificaram, por espécie, cepas de *Leishmania*, provenientes do Novo e Velho Mundo e, especificamente do Paraguai.

A caracterização das espécies de *Leishmania* é necessária para fins epidemiológicos, como a documentação da distribuição das espécies de *Leishmania*, bem como para a definição de um programa de controle apropriado (Harris et al, 1998).

A partir da análise isoenzimática foi possível a detecção do agente etiológico da infecção por Tripanosomatídeo monoxeno (um único hospedeiro) de um paciente com sinais clínicos de LV e que era HIV positivo, a partir do crescimento em cultura de amostra de punção de medula óssea (Pacheco et al, 1998).

Da mesma forma, a eletroforese de isoenzimas permitiu a identificação da *Leishmania infantum*, isolada de pele sã de cães sororreagentes para LV, sintomáticos e assintomáticos, no Rio de Janeiro-RJ (Madeira et al, 2004). Segundo os autores, a identificação das espécies de *Leishmania* circulantes, possibilitada por técnicas como a eletroforese de isoenzimas, é muito importante para estudos epidemiológicos e para a compreensão do papel do cão nos ciclos de transmissão da LV e da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

A relevância da técnica de isoenzimas pode ser ainda ratificada pela identificação das espécies de *Leishmania* no primeiro caso de co-infecção de um cão naturalmente infectado no Rio de Janeiro: *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. infantum* (sin *L. chagasi* para os autores) (Madeira et al, 2006). Nesse estudo, foram identificadas ambas as espécies em material colhido de lesão cutânea, sangue e linfonodos do cão.

6 – MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 – Desenho do estudo

Trata-se de um estudo descritivo voltado para o desenvolvimento de tecnologia para diagnóstico de LVC, por meio da PCR, utilizando como insumo, o aspirado de tecido subcutâneo de cães infectados, e a caracterização da espécie de *Leishmania* circulante entre esses animais no município de Cuiabá-MT. Para este estudo serão utilizadas as seguintes análises de diagnóstico laboratorial: exame parasitológico direto (leitura de lâminas com esfregaço de medula óssea coradas com Giemsa), sorológico (ELISA e RIFI) e imunocromatográfico (DPPTM).

Para a caracterização bioquímica foi realizada a técnica de eletroforese de isoenzimas, com amostras provenientes de cultivo de punções de medula óssea, baço e fígado e aspirado de pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp em Cuiabá-MT, Brasil.

6.2 – Área de estudo

O presente estudo foi realizado com cães domiciliados na cidade de Cuiabá, capital de Mato Grosso e mantidos nas dependências do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ-Cuiabá), nos meses de julho e novembro de 2009. A cidade de Cuiabá está localizada na latitude 15°35'56' ao sul da linha do Equador, e longitude 56°06'05'' a oeste do meridiano de Greenwich (*site* da Câmara Municipal de Cuiabá, <<http://www.camaracba.mt.gov.br> >). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, em 2009, Cuiabá apresentava população aproximada de 550.562 habitantes, distribuída em 3.538 km² de área. A cidade limita-se, geograficamente, com os municípios Várzea Grande, Chapada dos Guimarães, Campo Verde, Santo Antônio do Leverger, Jangada e Acorizal. A página eletrônica da Prefeitura de Cuiabá (www.cuiaba.mt.gov.br) caracteriza o município como um entroncamento rodoviário-aero-fluvial, que interliga o norte do Brasil e o oeste da América do Sul, além de representar o centro geodésico da América do Sul. O quadro geomorfológico do município é, em grande parte, representado pela Chapada dos Guimarães, predominando-se relevo de baixa amplitude com altitudes que variam de 146 a 250 metros na área da própria cidade (*site* da Prefeitura de Cuiabá, <www.cuiaba.mt.gov.br>).

O perímetro urbano de Cuiabá apresenta extensas áreas de vegetação de Cerrado, subsistema matas, onde o clima que predomina é o tropical, apresentando duas estações bem

definidas: uma chuvosa, entre outubro e abril; e outra seca, entre maio e setembro. A cidade é cortada por rios e córregos, configurando um ecossistema adequado para o desenvolvimento de vetores (Fernandes et al, 2000). Cuiabá apresenta, durante todo o ano, temperaturas elevadas (média das máximas em torno de 35°C no mês de setembro e média das mínimas 15,3°C no mês de julho para o ano de 2004) e estação chuvosa bem definida de outubro a março. O município está a 165 metros do nível do mar e, no verão, de dezembro a fevereiro, apresenta clima tropical úmido, enquanto no inverno (de junho a agosto), o clima é seco (*site da Prefeitura de Cuiabá*, <www.cuiaba.mt.gov.br>). Vide Figura 1.

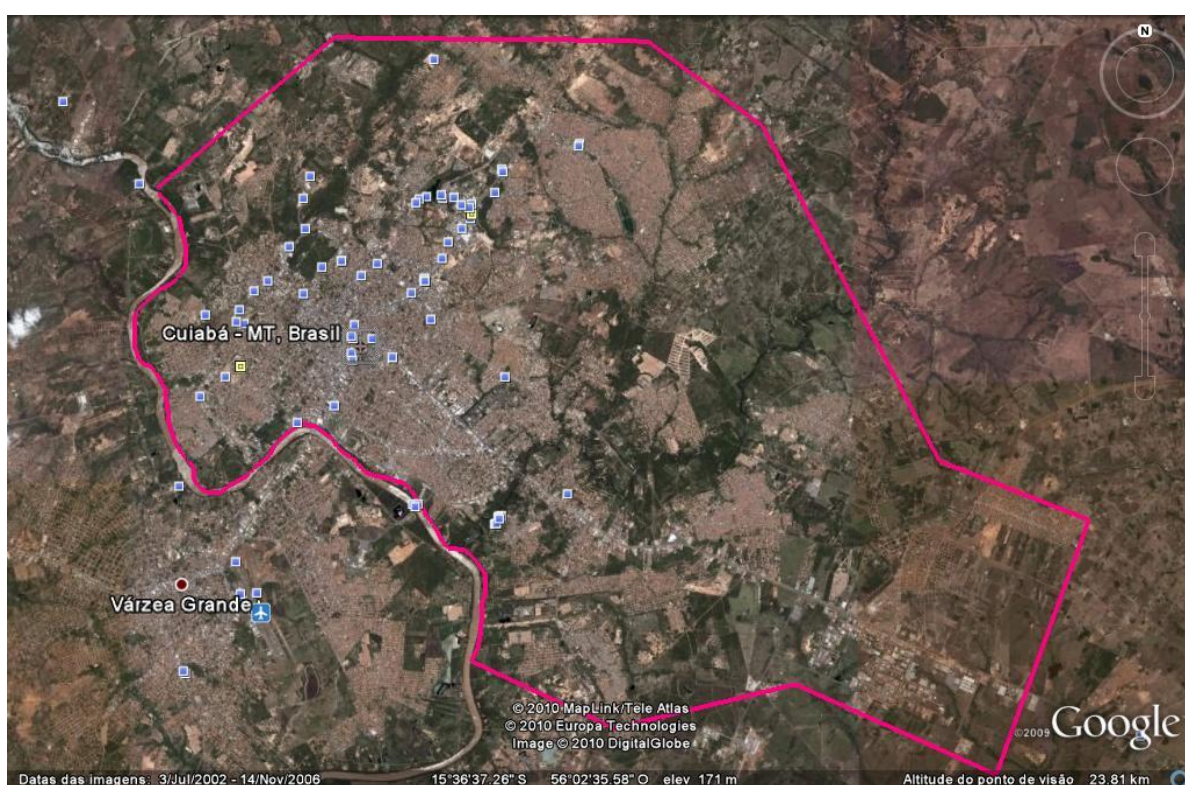


Figura 1: Delimitação do município de Cuiabá, estado de Mato Grosso, Brasil, a partir de mapas da cidade. Imagem retirada de Google Earth 2009. Disponível em <<http://earth.google.com>>. Acesso em abril 2010.

6.3 – Critérios de seleção dos cães

Os critérios de seleção dos cães, recolhidos ou levados pelos proprietários ao CCZ-Cuiabá, eram baseados em: (i) sorologia prévia positiva, por RIFI e/ou ELISA; (ii) procedência de áreas onde outros animais eram reconhecidamente infectados e/ou (iii) áreas vizinhas, e ainda em (iv) localidades com presença de vetores do calazar e/ou (v) limítrofes.

6.4 – Animais do estudo

Durante os meses de julho e novembro de 2009 foram selecionados, segundo os critérios do CCZ-Cuiabá, 45 cães de ambos os sexos e diferentes raças, identificados por ordem crescente de manipulação (do nº 1 ao nº 45), sendo todos acima de seis meses de idade, com residências distribuídas nas quatro regiões urbanas: Norte, Sul, Leste e Oeste de Cuiabá-MT.

Por diferentes motivos, o número de amostras diferiu para os ensaios de diagnóstico laboratorial e de caracterização bioquímica, da seguinte forma: nas reações sorológicas (RIFI, ELISA e DPPTM) foram analisados 45 soros, referentes ao número total de animais. Para o Exame Parasitológico Direto, feito a partir da punção de medula óssea, foram confeccionados 44 esfregaços, referentes a cada animal do estudo; o cão de nº 33 foi a óbito antes do procedimento. Para o cultivo *in vitro*, foram coletadas punções de medula óssea, de baço e de fígado, perfazendo o total de 44 amostras em meio de NNN/Schneider ou NNN/salina 0,85% autoclavada. Algumas punções foram realizadas nos animais ainda vivos, sob efeito de anestésico, e outras, após a eutanásia dos cães. O aspirado de tecido subcutâneo para impregnação em papel de filtro FTA[®] Card foi feito em 44 animais, visto que não foi possível a coleta do cão nº 38.

6.5 – Procedimentos metodológicos

Após a seleção dos cães, procedia-se ao preenchimento da Ficha Clínico-Epidemiológica e Laboratorial Canina (Anexo 1), na qual constavam as seguintes informações: (i) identificação e dados epidemiológicos: nome do cão e do proprietário, endereço, raça, sexo e idade do animal, tipo de residência e moradia anterior do cão, além de origem e deslocamento recente do animal; (ii) aspectos clínicos: exame físico dos animais, como presença de apatia ou se o mesmo mostrava-se ativo, alopecia local ou generalizada, onicogribose, ceratoconjuntivite, observação das mucosas (gengivas), se estavam hipo ou normocoradas, se havia paresia dos membros posteriores, presença e quantificação de lesões, descamação cutânea, diarreia, edema de focinho e condição de escore corporal (se havia caquexia); (iii) caracterização do quadro clínico, se sintomático, oligossintomático ou assintomático. Em seguida, os animais eram contidos adequadamente, segundo as recomendações do Ministério da Saúde (2006b), para a coleta dos seguintes insumos:

- sangue, a partir da veia cefálica, para a realização da RIFI (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ), ELISA (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) e o teste rápido imunocromatográfico DPP™ (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ);
- punção de medula óssea do esterno ou da crista ilíaca: para a confecção de esfregaço em lâmina e posterior coloração por Giemsa, e cultivo *in vitro*, com meio bifásico de NNN e Schneider (Anexo 2) ou NNN e salina 0,85% (Anexo 2), para isolamento parasitário. O meio era suplementado com 10% de soro fetal bovino para crescimento dos parasitos e realização da análise eletroforética isoenzimática (Cupolillo, Grimaldi e Momen, 1994);
- punção de baço e/ou fígado: para cultivo *in vitro*, com meio bifásico de NNN e Schneider (Anexo 2) ou NNN e salina 0,85% (Anexo 2), para isolamento parasitário.
- aspirado de tecido subcutâneo: o material aspirado era absorvido na área delimitada do papel de filtro (Silva et al, 2006), denominado FTA® Card (Whatman® - USA), para a realização da PCR Multiplex (Harris et al, 1998).

Do total de animais selecionados para o estudo, 44 foram posteriormente eutanasiados, conforme procedimentos internos do CCZ-Cuiabá (animais soronegativos que não foram adotados, e os soropositivos, esses últimos conforme regulamentação preconizada pelo Ministério da Saúde do Brasil, 2006b), e um cão foi a óbito, durante a noite.

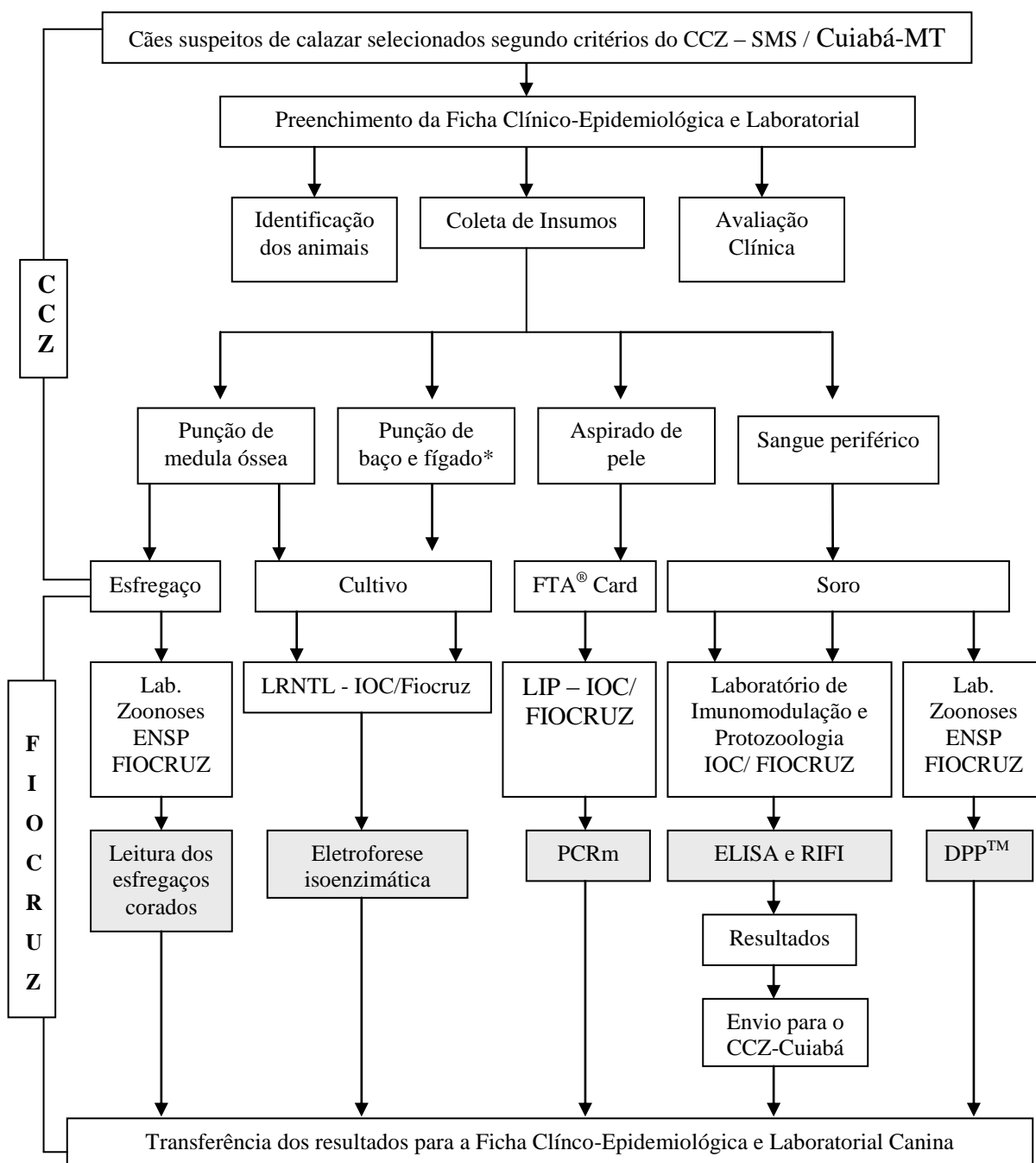
Para a realização da eutanásia, tomou-se como base a Resolução 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), que dispõe sobre os procedimentos e métodos de eutanásia de animais, e dá outras providências. O método escolhido foi pelo uso do cloreto de potássio (KCl), via intravenosa, realizado por médico veterinário do CCZ-Cuiabá, posterior à anestesia geral com o tiopental sódico (25 mg/kg), via intravenosa.

Os insumos coletados para análises foram enviados, segundo as Normas de Biossegurança para transporte de materiais biológicos (IATA, 2010), ao Laboratório de Zoonoses, do Departamento de Ciências Biológicas/ENSP/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, onde foram feitas as leituras das lâminas e a realização do teste rápido imunocromatográfico DPP™. Contudo, devido à falta de condições adequadas no referido departamento, contamos

com a parceria do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia (LIP) e do Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de Leishmania (LRNTL), ambos pertencentes ao Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), para realização das demais análises.

Este estudo fez parte do projeto de pesquisa intitulado “Leishmaniose Visceral no Município de Cuiabá: Investigação sobre o Processo de Expansão e Urbanização da Infecção Natural Canina e Humana”, de Pós-Doutorado de Saulo Teixeira de Moura. Segue abaixo o fluxograma (Figura 2) com a seqüência de procedimentos que foi empregada neste estudo.

Figura 2: Fluxograma da seqüência de procedimentos:



* Animais eutanasiados.

6.6 – Diagnóstico Laboratorial

Os cães selecionados para o estudo eram mantidos no canil do CCZ-Cuiabá, com alimentação balanceada e água *ad libitum*, até o momento da manipulação, quando eram transferidos para a sala de procedimentos. Antes de iniciar a colheita dos insumos (medula óssea e sangue) e do aspirado de tecido subcutâneo, os cães recebiam acepromazina (0,05 mg/kg), via intramuscular, como medicação pré-anestésica (Olsson et al, 2008).

A manipulação dos animais era realizada de acordo com as recomendações do Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (Brasil, 2006b). Todos os procedimentos laboratoriais foram executados de acordo com as boas práticas de laboratório segundo os Princípios das Boas Práticas de Laboratório (Inmetro, Norma NIT-DICLA-035 aprovada em julho de 2009) para proteção do manipulador, amostra e ambiente.

6.6.1 – Punção de Medula Óssea

Sob efeito do pré-anestésico Acepram a 1% (acepromazina 0,1 mg/kg IM, 30 a 40 minutos antes), alguns cães eram facilmente contidos para tricotomia na região referente à ponta do esterno ou à crista ilíaca para a punção de medula óssea (Olsson et al, 2008; Müller et al, 2009). Porém, outros, ainda agitados, requeriam anestesia geral, com uso de 25 mg/kg de tiopental sódico para a realização do procedimento. Para a tricotomia, era realizada a assepsia do local, com o uso de detergente, seguida de lavagem com água corrente, secagem e rinsagem com álcool a 70%.

A medula óssea foi puncionada em 44 cães (o cão nº 33 foi a óbito um dia antes da realização da punção de medula óssea), com auxílio de agulhas, tamanho 40 x 12 mm (Embramac[®]) e seringa de 20ml (Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltda), segundo procedimentos adotados por Silva (1997) e Müller et al (2009). Em seguida, o material recolhido era separado: parte destinada à confecção de esfregaços em lâminas de vidro para o diagnóstico parasitológico direto e o restante transferido para os tubos contendo meio sólido NNN para cultivo.

Após a conclusão da punção de medula óssea, os animais eram observados até o seu restabelecimento completo, quando, então, eram devolvidos ao canil e mantidos sob mesma dieta alimentar.

Posteriormente, o CCZ-Cuiabá procedia à eutanásia conforme procedimento interno, mencionado anteriormente (item 6.5).

➤ **Cultivo *in vitro***

O material recolhido da medula óssea e da punção de fígado e\ou baço dos 44 cães era transferido para tubos de cultura com NNN e Schneider ou NNN e salina estéril 0,85%, e mantidos em estantes, dentro de caixas de isopor. Por ocasião da viagem para o Rio de Janeiro, os tubos eram colocados em embalagem apropriada (categoria da embalagem: A – P620).

Ao chegarem à Fundação Oswaldo Cruz, os tubos de cultivo eram encaminhados ao Laboratório de Referência Nacional de Tipagem de *Leishmania* (LRNTL). No LRNTL, os cultivos eram mantidos em estufa biológica úmida à temperatura de 26°C, e semanalmente eram feitas observações para o acompanhamento do isolamento e crescimento de *Leishmania* sp. Os cultivos negativos eram mantidos até quatro semanas. Os cultivos positivos eram mantidos por mais tempo, com as passagens semanais regulares, para crescimento suficiente de parasitos, que permitisse a caracterização bioquímica da espécie de *Leishmania* isolada.

➤ **Exame parasitológico direto**

As 44 lâminas feitas com o esfregaço de parte da medula óssea eram identificadas e, em seguida fixadas com metanol e posteriormente secas à temperatura de 28°C, no laboratório do CCZ-Cuiabá. As lâminas fixadas eram, então, guardadas em caixas apropriadas para o transporte. Ao chegarem no Laboratório de Zoonoses, do Departamento de Ciências Biológicas-DCB/ENSP/FIOCRUZ, as lâminas eram coradas por Giemsa (VETEC).

A solução de coloração de Giemsa foi realizada em duas fases: a preparação da solução corante e do tampão de Sorensen, ambos conforme instruções no Anexo 2. Em seguida, foram misturadas três gotas da solução corante para cada 2ml de tampão de Sorensen. Após, as lâminas eram cobertas com 3ml desta solução, durante 12 minutos, quando, então, eram lavadas em água corrente e, por último, em água destilada. A secagem era feita em estufa a 37°C.

Os campos das lâminas eram observados em microscópio ótico, com auxílio de uma objetiva de 100X (imersão). Foram examinados 200 campos antes de se considerar uma lâmina como negativa. O resultado positivo indicava a presença de formas amastigotas

(formas arredondadas, com presença de núcleo e cinetoplasto) livres e/ou inclusas em células do sistema fagocítico mononuclear.

6.6.2 – Punção de baço e fígado

Dos 45 cães selecionados, exceto um que foi a óbito (número 33), os demais foram eutanasiados, sendo os animais soronegativos que não foram adotados e os soropositivos, conforme regulamentação preconizada pelo Ministério da Saúde do Brasil (2006b). A eutanásia seguiu os procedimentos recomendados pelo CFMV (Resolução 714, de 20 de junho de 2002). Após o recebimento do anestésico tiopental sódico, por via intravenosa, os animais receberam cloreto de potássio, conforme descrição no item 6.5. Seguiram-se a tricotomia e assepsia da área referente à cavidade abdominal dos cães, de modo a minimizar a contaminação do material a ser coletado e, em seguida, a incisão da área. A coleta do material foi realizada a partir do movimento consecutivo, com auxílio de uma seringa de 5 ml e agulha hipodérmica 25 x 0,70 mm (Becton Dickinson Ind. Cirúr. Ltda), de: introdução e retirada de 2,0 ml de salina estéril 0,85% ou de meio de cultura líquido Schneider, de cinco (animais de nº 35, 36, 42, 43 e 45) e 36 cães (animais de nº 1 a 32 e 38 a 41), respectivamente até a obtenção de um líquido viscoso originário do baço ou do fígado. As amostras colhidas eram transferidas para tubos com meios de cultura NNN e Schneider, ou NNN e salina 0,85%.

➤ Cultivo *in vitro*

Para o cultivo *in vitro*, seguiram-se os mesmos procedimentos adotados no item **6.6.2**.

6.6.3 – Coleta de sangue

Foram coletados 5ml de sangue periférico da veia cefálica do membro torácico, direito ou esquerdo, dos 45 cães, com auxílio de agulha 25 x 0,8 mm e seringa de 5ml ou de 10 ml. Em alguns cães, quando não foi possível a coleta a partir desta veia, a coleta foi realizada na veia femoral do membro pélvico, direito ou esquerdo, do cão. O sangue coletado foi acondicionado em tubos de vidro com dimensão 16 x 100 mm (tubo e tampa siliconizados).

➤ **Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI**

A reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico da LVC foi realizada com o Kit IFI – Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ, de acordo com as orientações do fabricante. A relação dos insumos está no Anexo 3.

Os insumos, antígeno de *Leishmania*, o conjugado anti-cão/ FITC, a glicerina tamponada pH 9,0 ± 0,5, o azul de Evans 0,1% e os controles negativo e positivo eram estocados entre 2°C e 8°C e conservados nessa temperatura durante a realização da reação.

Inicialmente, foi preparada a solução de tampão fosfato (PBS) pH 7,2 (Anexo 2) para a titulação do conjugado anti-cão/FITC, conforme as instruções contidas no kit. Procedeu-se a utilização de soro positivo, com título conhecido e diluído, nas concentrações de 1:40 a 1:1280, em duplas seriadas e soro negativo a 1:40, sobre leishmanias fixadas em campos delimitados nas lâminas; as diluições séricas foram realizadas em placas de fundo em U.

Em seguida, as lâminas eram incubadas em câmara úmida a 37°C. Após o período de 30 minutos, as lâminas eram lavadas em PBS, três vezes, por cinco minutos cada e rinsadas com água destilada. Por último, o conjugado era diluído em azul de Evans, de 1:50 a 1:600 e adicionado sobre as áreas demarcadas nas lâminas; seguia nova incubação e lavagem nas condições citadas acima. Em seguida, as lâminas eram montadas com glicerina tamponada pH 9,0 e lamínula.

Para a leitura e interpretação das reações, foi empregado o microscópio de fluorescência (ZEISS AXIOLAB), com os filtros de UV HBO 50/AC e objetiva de 40 X. O título do conjugado foi definido baseado na última diluição do mesmo que confirmava o título do soro positivo conhecido. No presente estudo, o título obtido do conjugado foi de 1:600.

Os procedimentos para a titulação dos soros dos cães do estudo seguiram o mesmo protocolo descrito acima, com algumas modificações: as amostras foram diluídas de 1:40 a 1:1280, em duplas seriadas e os controles positivos e negativos foram diluídos apenas a 1:40. Foram adicionados 10µl de cada diluição dos soros obtidos dos animais nos campos previamente definidos, assim como os controles positivos e negativos que foram repetidos em todas as lâminas.

Seguindo o protocolo, as lâminas eram incubadas (com o soro e posteriormente com o conjugado), lavadas, montadas e lidas em microscópio ótico de fluorescência (ZEISS AXIOLAB), utilizando os mesmos filtros de UV HBO 50/AC.

Para a leitura e interpretação da reação de fluorescência focalizavam-se, inicialmente, os controles positivos e negativos de cada lâmina para confirmação do padrão esperado:

fluorescência esverdeada, com contorno completo dos parasitas (controle positivo) ou ausência/contorno parcial/embaçamento de fluorescência (controle negativo). Os títulos dos soros dos animais suspeitos seguiam o mesmo padrão visualizado na última diluição sérica.

De modo a confirmar os resultados obtidos pela leitura e interpretação da reação, contou-se com auxílio de profissional experiente nesta técnica, objetivando minimizar possíveis vieses.

➤ **Ensaio Imunoenzimático – ELISA**

Para a realização do ensaio imunoenzimático (EIE ou ELISA) foi utilizado o Kit EIE – Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, seguindo as orientações do fabricante, com as diluições dos soros deste estudo a 1:100. A relação dos insumos está no Anexo 4.

Os controles, positivo e negativo, assim como o conjugado e as molduras com os dispositivos de poços já sensibilizados, foram mantidos a 20°C negativos. Enquanto o diluente de amostra/conjugado, a lecitina de leite, o tampão de lavagem, o diluente do substrato, o cromógeno (TMB), o substrato (H₂O₂) e o ácido sulfúrico 2M foram mantidos entre 2°C e 8°C.

Mediante os cuidados e precauções alertados pelo fabricante, deu-se o procedimento do teste com as 45 amostras de soro dos cães. Foram utilizadas as molduras com os dispositivos de poços sensibilizados de acordo com o número de amostras e controles; da mesma forma, procedeu-se à preparação do diluente de amostras/conjugado, da lecitina de leite e da água destilada.

Os controles e as amostras de soro foram diluídos no diluente de amostras/conjugado na proporção 1:100 e, em seguida, distribuídos nas colunas e fileiras da placa. Os controles, positivo, negativo e sem soro, foram distribuídos em duplicata. Os dispositivos de poços sensibilizados foram selados com a folha adesiva, e a placa foi incubada a 37°C. Depois de preparado o tampão de lavagem, e removida a folha adesiva da placa, o conteúdo foi aspirado e lavado seis vezes, sendo 200 µl/orifício, a cada 30 a 60 segundos entre uma lavagem e outra.

O conjugado foi diluído no diluente de amostra/conjugado, homogeneizado devidamente e 100µl da diluição do conjugado foram distribuídos em cada poço dos dispositivos da moldura. Os dispositivos de poços foram selados com a folha adesiva

novamente e incubados a 37°C durante 30 minutos, aspirados e lavados como feito anteriormente.

Em seguida, o substrato foi preparado, tomando-se o cuidado de fazê-lo em um frasco escuro. Obedeceram-se as recomendações do fabricante quanto aos volumes e reagentes. O substrato foi distribuído rapidamente, 100µl/orifício. Os dispositivos com os poços foram incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos ao abrigo da luz. Para bloquear a reação, foram adicionados 50µl de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios.

A leitura foi realizada no leitor de ELISA (BIO-RAD Benchmark) para microplacas equipado com filtro de 450nm, sem a utilização de filtro de referência. O cálculo do ponto de corte obedeceu às orientações do fabricante: dobro da média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo. Sendo assim, as amostras consideradas reagentes foram aquelas que apresentaram densidade ótica igual ou superior ao ponto de corte; enquanto as amostras não reagentes apresentaram densidade ótica inferior ao ponto de corte.

O teste foi considerado válido, uma vez que atendeu aos critérios determinados pelo fabricante, isto é, os valores da densidade ótica do controle positivo foram iguais ou superiores a 0,500 (0,557 e 0,560), assim como os valores da densidade ótica do controle negativo estavam compreendidos entre 0,050, inclusive, e 0,120, inclusive também (0,071 e 0,073).

➤ **Teste rápido imunocromatográfico DPP™**

O teste rápido imunocromatográfico DPP™ Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos/FIOCRUZ (Figura 4), foi realizado segundo as instruções contidas no kit. Os dispositivos do teste (igual número de soros) foram removidos de suas respectivas embalagens e dispostos sobre uma superfície plana. Os soros, armazenados a 20°C negativos, foram descongelados em temperatura ambiente, 25°C. Em paralelo, procedia-se à identificação dos soros (código do cão e data da reação), em local determinado nos dispositivos.

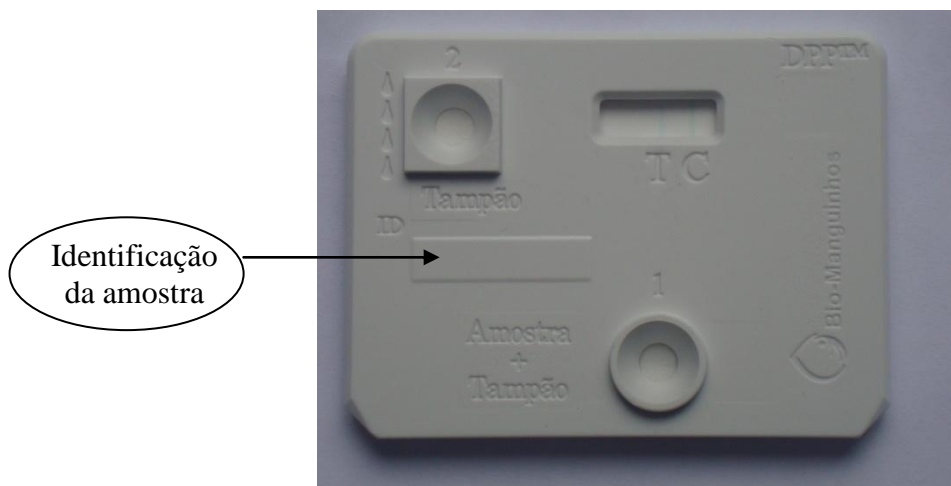


Figura 3: Dispositivo DPP™ Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ
Tamanho Original: 6,7cm X 5,0 cm X 0,5cm

Para facilitar a leitura do teste, inicialmente, foram realizadas três amostras de cada vez (três dispositivos), sendo o número de dispositivos aumentado gradativamente, até completar os 45 soros do estudo, à medida que se adquiria mais prática e confiança na manipulação do teste. Inicialmente, foram aplicados 5 μ l do soro e duas gotas do tampão no poço *sample+buffer* #1 do dispositivo, em seguida, aguardamos cinco minutos. Continuando a reação, foram adicionados, no poço *buffer well* #2, quatro gotas do tampão. Após o período de 10 a 15 minutos, a leitura do resultado era feita visualmente, a partir da observação do aparecimento de linhas avermelhadas na janela definida do dispositivo. Nos soros positivos era possível observar duas linhas, ao passo que nos soros negativos, apenas uma linha.

Nas instruções do kit DPP™ estão os modelos de verificação da positividade e negatividade. Uma reação positiva pode ser graduada em três estágios crescentes: P1, P2 e P3 e para a leitura negativa, a mesma poderá ser identificada, de forma também crescente em: N1 ou N2. Para esse estudo optou-se por trabalhar com os três níveis de positividade, mas apenas um de negatividade. Importante ressaltar ainda, que o fabricante recomendou não ler o resultado do teste após 15 minutos do último procedimento. Os resultados obtidos com os soros dos animais foram anotados em cada dispositivo.

6.6.4 – Aspirado de tecido subcutâneo

Após tricotomia e assepsia da área eleita para o aspirado de tecido subcutâneo (terço médio dorsal e/ou região inguinal), foram injetados de 0,5 a 0,7 ml de solução salina a 0,85%, autoclavada, no tecido subcutâneo de 44 cães (não foi possível a coleta de aspirado do cão nº 38), com auxílio de seringa de 1,0 ml e agulha hipodérmica de dimensão 13 x 4,5 mm. O aspirado de pele foi obtido a partir de movimentos em leque com a agulha acoplada à seringa.

O volume obtido foi mínimo, muitas vezes, menos de 0,1 ml; outras vezes, o volume restringia-se apenas a uma gota aderida à parede da seringa, apesar de ter sido injetado volume muito superior no tecido subcutâneo dos cães. Todavia, foi o suficiente para a absorção pelo papel de filtro FTA® Card.

O papel de filtro FTA® Classic Card Whatman® (Whatman International Ltd, Maidstone England, Cat Nº WB120205, Lote J11467704) é composto por quatro áreas circulares de 2,65 cm de diâmetro (Figura 3), nos quais, as amostras foram aspergidas, tomando-se o cuidado de evitar o contato no interior dessas áreas. O papel de filtro foi sempre manipulado com luvas descartáveis. Foi necessário aguardar alguns minutos até que as amostras estivessem completamente adsorvidas no papel de filtro e secassem. Em seguida, foram acondicionadas, junto aos demais, em temperatura ambiente, em torno de 30°C, até sua utilização na reação em cadeia pela polimerase multiplex (PCR multiplex), no Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia (LIP – IOC/ FIOCRUZ).

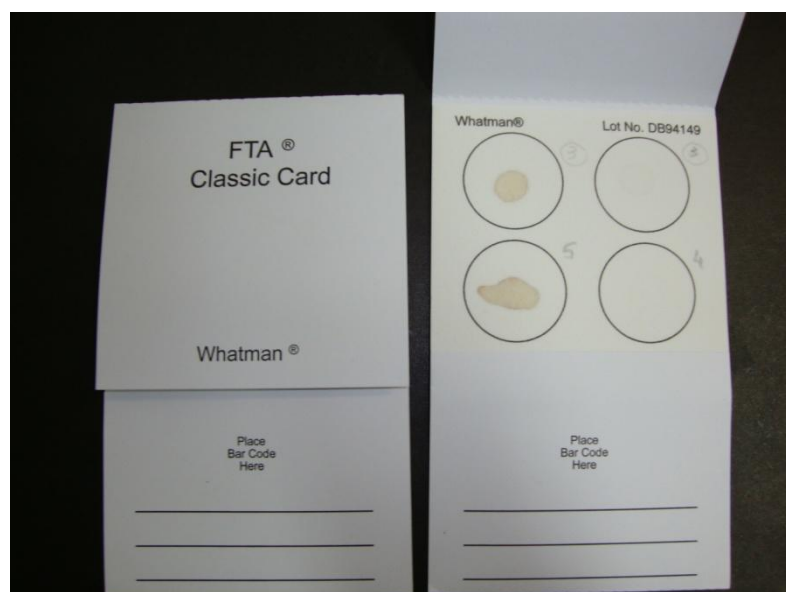


Figura 4: FTA® Classic Card Whatman®
Tamanho original de 7,6cm X 12,65cm X 0,05cm

➤ **Reação em Cadeia pela Polimerase Multiplex (PCR multiplex)**

De cada área do papel de filtro FTA[®] Card, impregnada com o aspirado de tecido subcutâneo, foi removido, com auxílio de um *puncher*, um círculo de três milímetros de diâmetro dos FTA[®] Cards impregnados pelo tecido subcutâneo dos cães 5, 16, 19, 26, 27, 31, 36, 40 e 42. O critério para seleção das amostras desses animais levou em consideração o reduzido número de *primers*. Como consequência, as nove amostras foram escolhidas em função da combinação da avaliação clínica com os resultados obtidos nas análises laboratoriais.

O círculo de FTA[®] Card referente a cada animal foi acondicionado em tubos de fundo cônico, com tampa, da marca Axigen, com capacidade para 200µl, e devidamente identificados. Entre a manipulação do papel de filtro de cada animal, o *puncher* era limpo com álcool a 92,8° GL, de modo a remover qualquer vestígio de DNA presente no FTA[®] Card manipulado anteriormente. Os tubos contendo os círculos do papel de filtro foram mantidos a 24° C até a manipulação para a preparação da amostra de DNA.

Para a preparação da amostra de DNA, os tubos contendo os discos de três milímetros de diâmetro receberam, individualmente, 200µl do Reagente de Purificação de FTA (Whatman Cat. N° WB120204), foram incubados durante cinco minutos a 23°C, e em seguida, o volume adicionado do Reagente de Purificação de FTA foi removido (utilizou-se uma pipeta). Esse procedimento foi repetido duas vezes, de modo que houvesse três lavagens com o Reagente de Purificação de FTA. Em cada tubo, depois das três lavagens, foram acrescentados 200µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl e 0,1 mM EDTA pH 8,0); os tubos foram incubados durante cinco minutos a 23°C. O volume de tampão TE foi removido utilizando-se uma pipeta. O procedimento de lavagem com tampão TE foi repetido, de modo que houvesse duas lavagens com tampão TE em cada tubo. Em seguida, os tubos permaneceram destampados em uma placa aquecedora a 56°C, aproximadamente 10 minutos, até secarem.

Para a realização da PCR multiplex (Harris et al, 1998), em cada tubo com as amostras de FTA[®] Card foram acrescentados Tampão da Taq 10X (SIGMA D1806), 400 pM do primer LU-5A (Gene Link), 5'-TTT ATT GGT ATG CGA AAC TTC-3'; 200 pM de cada primer: LB-3C (Gene Link), 5'-CGT (C/G)CC GAA CCC CGT GTC-3'; LM-3A (Gene Link), 5'-GCA CCG CAC CGG (A/G)CC AC-3'; e LC-3L (Gene Link), 5'-GCC CGC G(C/T)G TCA CCA CCA T-3'; 0,2 mM de dNTP's (MP cat. #NTPMX100); 1,5 mM MgCl₂ (Promega cat.

A351B); 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (SIGMA D1806); e água destilada até que o volume total no tubo atingisse 50 µl.

A PCR multiplex foi realizada em um termociclador NYXTECHNIK modelo ATC 401. Inicialmente, deu-se uma etapa de desnaturação, durante cinco minutos, a 95°C. Em seguida, foram 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 54°C, e 30 segundos a 72°C. A etapa de extensão teve duração de cinco minutos a 72°C, mantendo-se a 4°C até a retirada dos tubos do termociclador.

Os produtos da PCR multiplex foram analisados em um gel de agarose 1,5% em TBE (89 mM Tris Base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8,3). Foram necessários 5 µl do marcador de peso molecular para 100 pb (Fermentas 100bp DNA ladder ready-to-use O'Gene Ruler™), 8µl de cada amostra e 2µl do Tampão de Aplicação (25% glicerol, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xileno cianol). A eletroforese foi realizada em uma cuba com oito poços, a 80v em tampão TBE, durante, aproximadamente, 40 minutos. Em seguida, o gel foi removido da cuba de eletroforese e acondicionado em um recipiente contendo brometo de etídio 1 µg/ml durante 10 minutos, sendo transferido para outro recipiente contendo água destilada para remover o excesso de brometo de etídio. O gel foi analisado em transiluminador UV SIGMA T1201, e fotografado utilizando o sistema de documentação Gel Logic 100 Imaging System (Kodak).

O tamanho esperado dos produtos da PCR multiplex eram de 351pb para *L.infantum*, 397pb para *L.donovani*, 218pb para *L.amazonensi*, 240pb para *L.mexicana*, e 146 a 149pb para o Complexo *L.braziliensis*.

6.6.5 – Análise estatística

A análise estatística empregada nessa pesquisa fez uso da porcentagem de concordância observada segundo Gomes et al (2007), considerando o número de resultados concordantes/ o número total de amostras x 100. E o coeficiente Kappa, para a medição da concordância entre as técnicas laboratoriais propostas, retirando o efeito do acaso, e aferindo a confiabilidade dos testes. Para Landis e Koch (1977), o coeficiente Kappa pode apresentar concordâncias classificadas como pobre ($k \leq 0$), leve ($0 < k < 0,2$), razoável ($0,2 \leq k < 0,4$), moderada ($0,4 \leq k < 0,6$), substancial ($0,6 \leq k < 0,8$), quase perfeita ($0,8 \leq k < 1$), perfeita ($k=1$).

6.7 – Caracterização bioquímica por isoenzimas

Todos os cultivos *in vitro* foram processados para obtenção de massa parasitária suficiente para a realização da caracterização bioquímica das amostras com *Leishmanias* isoladas.

6.7.1 – Aplicação das amostras no gel de corrida

As amostras, ao todo 16, foram aplicadas em um gel de agarose a 1,0% (Anexo 5), preparado no dia anterior e mantido à temperatura de 4°C até o seu uso. Inicialmente utilizou-se uma folha de papel absorvente para retirar o excesso de umidade do gel. Colocou-se sobre o gel a fita de aplicação EPH (Sample Application F01®) com 24 orifícios, sendo marcados com corante o início, o meio e o final das amostras que foram aplicadas em seguida.

As 16 amostras, referentes a oito cães foram retiradas do *container* de nitrogênio líquido e colocadas em uma caixa de isopor com gelo. A aplicação das amostras teve início após a absorção do corante pelo gel. As amostras foram aplicadas individualmente, em cada orifício da fita de aplicação, e respeitando o volume de 3µl/orifício.

Aguardou-se até que o gel secasse para então colocá-lo em uma cuba de eletroforese horizontal Multiphor II®, preenchida com solução tampão Tris Maleico pH 7,4, e devidamente refrigerada, com temperatura de aproximadamente 5°C. O gel, já aplicado na cuba, foi colocado a partir da linha três, tomando-se o cuidado para não haver formação de bolhas entre o gel e a placa da cuba. A parte superior do gel foi coberta rente à linha do marcador com as placas de esponja vegetal (Limpano®) umedecidos em solução tampão Tris Maleico pH 7,4, sendo parte da esponja mergulhada no líquido e parte sobre o gel. A parte inferior do gel, final da corrida, seguiu o mesmo procedimento. Em seguida, aplicou-se tensão de 15 v/cm e finalizou-se a corrida quando o segundo corante tocou a esponja.

6.7.2 – Revelação

Ao final da corrida, o gel foi retirado da cuba, e nele, próximo à marca da aplicação, foi feito um pequeno corte de modo a indicar onde as amostras começaram a ser aplicadas.

Em seguida, o gel foi acondicionado em um recipiente plástico ou de vidro, retangular, com tampa.

Os reagentes utilizados nesta etapa que eram mantidos congelados foram previamente descongelados, à temperatura de 4°C. Para o preparo do Tampão de Revelação, foram utilizados Tampão de Reação Tris-HCl pH 8,0, o substrato 6-fosfo-gluconato 20mg/ml, a coenzima NADP 4mg/ml, o ativador $MgCl_2$ 4mg/ 10ml, e visualização por MTT, PMS e agarose. A reação era cessada com banhos de ácido acético glacial a 5%, até que a mistura se tornasse translúcida. Segue abaixo o protocolo de reagentes utilizados para a revelação dos géis (Tabela 1).

Tabela 1: Tabela de Revelação Enzimática para um gel contendo até 12 amostras

Enzima	Tampão de Reação Tris-HCl	H ₂ O	Substratos ¹ 20 mg/ml	Coenzimas ² 4 mg/ml	Ativadores 4g/10ml ³	Enzimas de ligação ⁴	Método de Visualização
6PGDH E.C.1.1.1.43	4 ml pH 8,0		2 ml 6-fosfo-gluconato (Sigma P7877)	1 ml NADP	500 µl MgCl ₂		2 ml MTT 1 ml PMS 10 ml Agarose

As quantidades indicadas na tabela foram suficientes para a revelação de um gel contendo até 12 amostras. Quando o gel era maior, isto é, para 24 amostras no máximo, era necessário dobrar a quantidade de todos os reagentes.

¹ Todos os substratos cujas quantidades estão indicadas em ml foram diluídos em água Tipo II em uma concentração de 20 mg/ml. Foram preparados 15 ml que ficaram estocados em temperatura de -20° C, sendo descongelados na hora do uso.

² As coenzimas foram dissolvidas em água Tipo II em uma concentração de 4mg/ml. Foram preparados 15 ml que ficaram estocados em temperatura de -20° C, sendo descongelados na hora do uso.

³ MgCl₂ foi dissolvido em água Tipo II na concentração indicada 4 g/10 ml). Foram preparados 10 ml que ficaram estocados em temperatura de -20° C, sendo descongelados na hora do uso.

⁴ As enzimas foram diluídas em água Tipo II de forma a obter a concentração indicada.

⁵ Foi preparada uma solução de 200 ml de MTT a 3 mg/ml, que foi estocada em frasco de vidro protegido da luz, em geladeira.

⁶ Foi preparada uma solução de 200 ml de PMS a 2 mg/ ml, que foi estocada em frasco de vidro protegido da luz, em geladeira.

⁷ A agarose a 1% foi dissolvida em água Tipo II.

6.8 – Considerações éticas

Esse projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - FIOCRUZ), como parte integrante do projeto de pesquisa de Pós-Doutorado de Saulo Teixeira de Moura, intitulada: “Leishmaniose Visceral no Município de Cuiabá: Investigação sobre o Processo de Expansão e Urbanização da Infecção Natural Canina e Humana” e obteve parecer favorável à sua execução, sob o número 0300/2006 com validade de cinco anos.

7 – RESULTADOS

7.1 – Animais do estudo

Para a obtenção dos dados referentes aos cães, foi utilizada a Ficha Clínico-Epidemiológica e Laboratorial (Anexo 1). A partir desse instrumento, foi possível o conhecimento acerca do sexo, idade, quadro clínico, residência de todos os animais manipulados no CCZ-Cuiabá, nos meses de julho e novembro de 2009.

Dos 45 cães capturados ou levados ao CCZ-Cuiabá, todos pertenciam a proprietários conhecidos. A Ficha Clínico-Epidemiológica e Laboratorial elaborada para esse estudo, não pôde ser preenchida totalmente em função da falta de informações nos registros desses animais, junto ao CCZ-Cuiabá. Assim sendo, dados como: “outras localidades onde o cão residiu”, “o período”, “se o cão viajou nos últimos seis meses”, “a origem do cão”, não puderam ser registrados.

7.1.1 – Sexo, idade e raça

O número de animais, segundo o sexo, foi muito próximo: 23 (51,1%) machos e 22 (48,9%) fêmeas. Todos os cães foram avaliados com idade superior a seis meses e possuíam raças variadas: Basset (4,4%), Rottweiler (8,9%), Pit Bull (4,4%), Boxer (2,2%), Daschund (2,2%), Pinscher (2,2%) e Sem Raça Definida (SRD) (75,5%).

7.2 – Distribuição da procedência dos animais por bairros e regiões

Os animais eram oriundos de diferentes bairros do município, distribuídos nas regiões Norte, Sul, Leste e Oeste. Um número maior de cães concentrou-se nos bairros da região Norte e Oeste, com 16 (35,55%) e 12 (26,66%) animais, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 2 e Figura 5.

Tabela 2: Distribuição por bairros, regiões, números e percentuais de cães capturados ou levados ao CCZ-Cuiabá (MT), nos meses de agosto e novembro de 2009.

ÁREAS	BAIRROS (Nº de Animais)	TOTAL DE ANIMAIS (%)
Norte	Morada do Ouro (um), Jardim União (um), CPA 2 (um), 1º de Março (dois), CPA (um), CPA 3 (dois), CPA 4 (dois), Alto da Serra (dois), Altos da Glória (um), Três Barras (um), Novo Horizonte (um) e CPA 1 (um).	16 (35,55)
Sul	Parque Atalaia (um), Parque Cuiabá (dois), Jardim Gramado (dois), Nossa Senhora Aparecida (um), Real Parque (um) e Nova Esperança 3 (um).	08 (17,78)
Leste	Jardim Itália (dois), Jardim Leblon (um), Bandeirante (um), Pedregal (um), Dom Aquino (dois), Residencial Dom Bosco (um) e Santa Cruz 2 (um).	09 (20,00)
Oeste	Alvorada (dois), Jardim Novo Colorado (um), Duque de Caxias (três), Santa Angelita (um), Araés (um), Flor do Cerrado (dois) e Estrada da Guia (dois).	12 (26,66)
TOTAL		45 (100)

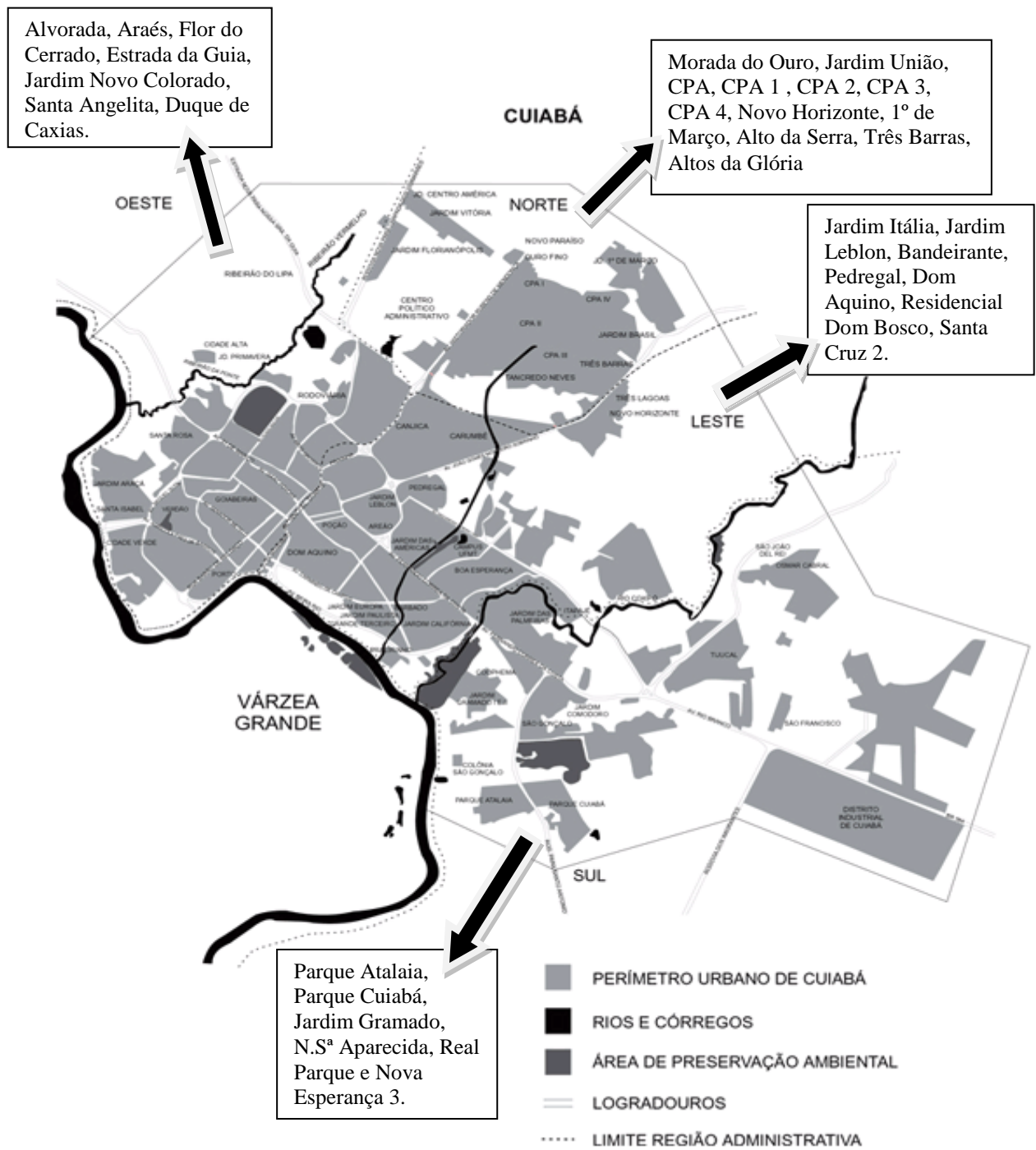


Figura 5: Localização das regiões, com os respectivos bairros, de acordo com a procedência dos cães estudados, no município de Cuiabá (MT).

Disponível em: < www.webbusca.com.br/pagam/cuiaba/mapa_cuiaba.gif>. Acesso em: março 2010.

7.3 – Descrição dos sinais clínicos

Os animais ao chegarem ao CCZ-Cuiabá eram imediatamente examinados por médicos veterinários que registravam a presença ou ausência de sinais clínicos compatíveis com o calazar. Em 34 (75,56%) animais, foram observados um ou mais sinais patognomônicos, e em 11 cães (24,44%), ausência destes. No Anexo 6, encontra-se a descrição completa de cada animal estudado.

Os principais sinais observados, em forma decrescente de percentual, foram: descamação (53,33%), alopecia (44,44%), presença de úlceras (40,00%) e, mucosas hipocoradas (26,67%), ceratoconjuntivite (26,67%), caquexia (26,67%) e onicogribose (26,67%) (Tabela 3).

Tabela 3: Relação dos sinais clínicos com os respectivos números e percentuais descritos nos cães estudados:

Sinais Clínicos	Nº de cães	%
Presença de um ou mais sinais clínicos	34	75,56
Ausência de sinais clínicos	11	24,44
Descamação	24	53,33
Alopecia	20	44,44
Úlceras	18	40,00
Mucosas hipocoradas	12	26,67
Ceratoconjuntivite	12	26,67
Onicogribose	12	26,67
Caquexia	12	26,67
Apatia	6	13,33

A Tabela 4 foi elaborada com os dados completos acerca dos sinais clínicos descritos nos respectivos cães para melhor compreensão desses resultados:

Tabela 4: Relação completa dos sinais clínicos identificados pelos médicos veterinários nos cães do estudo

Aspectos Clínicos								
Cão	apatia	alopecia	mucosas hipocoradas	Ceratoconjutivite	úlceras	onicogrifose	descamação	caquexia
1	-	-	-	-	X	-	X	-
2	-	-	-	-	-	-	X	-
3	X	X	-	X	X	X	X	X
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	X	-	-	-	-
7	X	X	X	X	X	X	X	X
8	-	X	-	-	-	-	X	-
9	X	X	-	X	X	-	X	-
10	X	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	X	-	X	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	X	-	-	-
14	-	X	-	-	X	-	X	X
15	-	X	X	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	X	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	X	-	-	X	-	X	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	X	-	-	-	X	-	-

Aspectos Clínicos

Cão	apatia	alopecia	mucosas hipocoradas	Ceratoconjutivite	úlceras	onicogrifose	descamação	caquexia
22	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	X	-	-	X	-	-	-
27	-	-	X	-	X	-	X	-
28	-	-	-	X	X	-	X	-
29	-	X	X	-	-	-	X	X
30	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	X	-	-
32	-	X	X	X	X	X	X	X
33	-	X	X	X	-	X	X	X
34	-	-	-	-	X	-	X	X
35	-	-	X	X	-	X	X	-
36	-	X	-	X	X	-	X	X
37	-	X	X	-	X	-	X	-
38	-	X	-	-	X	X	X	X
39	-	X	-	X	X	-	X	-
40	-	X	X	X	-	-	X	X
41	X	X	-	-	-	X	X	-
42	X	X	X	X	-	-	-	-
43	-	X	X	-	-	X	X	X
44	-	-	-	-	-	X	X	-
45	-	-	-	-	-	X	X	X

Os sinais clínicos compatíveis com a LVC, como: edema de focinho e paresia dos membros posteriores, apresentaram pequena representatividade, sendo encontrados, em apenas três animais (nº 9, 16 e 38) e um cão (nº 40), respectivamente; nenhum animal apresentou diarreia.

7.4 – Diagnóstico Laboratorial

7.4.1 - Exame Parasitológico Direto

➤ Esfregaço de medula óssea

O exame parasitológico direto realizado com o esfregaço obtido da punção de medula óssea foi empregado nesse estudo como padrão ouro para comparação com os demais resultados de análises laboratoriais. As distensões foram preparadas com amostras de 44 animais; o cão de número 33 foi a óbito antes de ter sido realizada a punção, inviabilizando a confecção de esfregaço do mesmo, e uma lâmina (nº 43) apresentou falha na fixação e foi descartada. As demais lâminas (total de 43) puderam ser lidas em microscópio ótico, com aumento de 100X, em cerca de 200 campos para definição do resultado. Em 16 lâminas (37,21%), foram observadas amastigotas livres e inclusas em células do sistema fagocítico mononuclear, portanto, revelando-se positivas, e em 27 lâminas (62,79%), o resultado foi negativo (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados do Exame Parasitológico Direto verificado em cada um dos cães estudados.

Cão	Exame Parasitológico Direto	Cão	Exame Parasitológico Direto
1	negativo		
2	negativo	24	Negativo
3	Positivo	25	Negativo
4	negativo	26	Positivo
5	Positivo	27	Negativo
6	Positivo	28	Negativo
7	negativo	29	Positivo
8	negativo	30	Negativo
9	negativo	31	Positivo
10	negativo	32	Negativo
11	negativo	33	Óbito
12	negativo	34	Positivo
13	negativo	35	Positivo
14	negativo	36	Positivo
15	Positivo	37	Positivo
16	Positivo	38	Positivo
17	negativo	39	Positivo
18	negativo	40	Positivo
19	Positivo	41	Negativo
20	negativo	42	Negativo
21	negativo	43	Falha na fixação
22	negativo	44	Negativo
23	negativo	45	Negativo

Na Tabela 6, pode-se observar a distribuição dos animais positivos para o exame parasitológico direto por regiões de moradia.

Tabela 6: Distribuição por área de procedência e frequência de infecção por *Leishmania* sp. dos cães estudados

Zona	Nº de cães examinados	Nº de cães positivos*	% cães positivos nas regiões	% cães positivos em cada região
Norte	16	09	56,25	56,25
Sul	08	03	18,75	37,50
Leste	09	01	6,25	11,11
Oeste	12	03	18,75	25,00
	45	16	100,00	

*Exame Parasitológico Direto

➤ Cultivo *in vitro*

Dos animais da pesquisa, 44 foram submetidos à punção de medula óssea; desses, 41 e 40 também tiveram, respectivamente, o baço e o fígado puncionados, após a eutanásia. Houve crescimento de *Leishmania* em 16 amostras (nove de medula óssea, três baço e quatro de fígado), referentes a oito cães (31, 32, 36, 40, 41, 42, 43 e 45). Os cultivos positivos foram expandidos para a realização da caracterização bioquímica por eletroforese de isoenzimas.

7.4.3 – Reações Sorológicas

➤ RIFI

Ao todo, de 45 amostras de soro referentes aos cães estudados, 38 amostras (84,44%) apresentaram-se sororreagentes para *Leishmania* sp. pelo kit IFI - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ para LVC; os títulos variaram de 1:40 a \geq 1:1280. Ao fracionarmos os resultados dos títulos positivos, observamos que: 65,79% (25/38) apresentaram titulação elevada, acima de 1:160; destes, 13,16% (5/38) possuíam título \geq 1:1.280, 10,53% (4/38) com titulação de 1:640, 18,42% (7/38) com título de 1:320 e 23,68% (9/38) com titulação de 1:160. Os demais, sete cães (15,56%), foram negativos (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição dos títulos fluorescentes e negativos detectados nos soros dos animais

Cão	RIFI	Cão	RIFI
1	negativo		
2	1:160	24	1:160
3	1:320	25	1:80
4	1:80	26	≥1:1280
5	1:160	27	1:320
6	1:80	28	1:320
7	1:80	29	1:320
8	1:80	30	1:80
9	1:40	31	1:160
10	1:80	32	1:640
11	negativo	33	1:160
12	negativo	34	1:160
13	negativo	35	1:320
14	1:160	36	≥1:1280
15	1:320	37	1:40
16	1:640	38	≥1:1280
17	1:40	39	1:40
18	negativo	40	1:640
19	≥1:1280	41	1:40
20	1:160	42	≥1:1280
21	negativo	43	1:320
22	negativo	44	1:40
23	1:160	45	1:640

➤ **ELISA**

Em 45 amostras de soro, 19 (42,2%) apresentaram-se positivas e 26 (57,78%) negativas para *Leishmania* sp pelo kit de Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ para LVC (Tabela 8).

Tabela 8: Apresentação dos resultados verificados em cada cão quando analisados pelo ELISA

Cão	ELISA	Cão	ELISA
1	negativo		
2	negativo	24	negativo
3	negativo	25	negativo
4	negativo	26	Positivo
5	Positivo	27	Positivo
6	negativo	28	Positivo
7	negativo	29	negativo
8	negativo	30	Positivo
9	negativo	31	Positivo
10	negativo	32	Positivo
11	negativo	33	Positivo
12	negativo	34	Positivo
13	negativo	35	negativo
14	negativo	36	Positivo
15	Positivo	37	negativo
16	Positivo	38	Positivo
17	negativo	39	negativo
18	negativo	40	Positivo
19	Positivo	41	Positivo
20	negativo	42	Positivo
21	negativo	43	Positivo
22	negativo	44	negativo
23	negativo	45	Positivo

➤ **DPP™**

O teste rápido imunocromatográfico DPP™ Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ, realizado nas 45 amostras de soro, revelou 21 (46,67%) resultados positivos. O teste DPP™ é qualitativo, porém a linha de verificação de positividade varia na

intensidade da cor vermelha, desde o mais suave (P1), passando pelo intermediário (P2) até o mais forte (P3), de acordo com o manual incluído no kit. No presente estudo, encontramos para P1 e P2, quatro soros distintos e para P3, 13 amostras. Os resultados negativos para LVC foram observados em 24 (53,33%) soros (Tabela 9).

Tabela 9: Resultados obtidos com o teste rápido imunocromatográfico DPP™ nas amostras séricas dos respectivos cães.

Cão	Teste DPP™	Cão	Teste DPP™
1	negativo		
2	negativo	24	Negativo
3	Positivo P3	25	Negativo
4	negativo	26	Positivo P3
5	Positivo P2	27	Positivo P3
6	Positivo P1	28	Positivo P2
7	negativo	29	Negativo
8	negativo	30	Negativo
9	negativo	31	Positivo P3
10	negativo	32	Positivo P2
11	negativo	33	Positivo P3
12	negativo	34	Positivo P1
13	negativo	35	Positivo P1
14	negativo	36	Positivo P3
15	negativo	37	Negativo
16	Positivo P3	38	Positivo P3
17	negativo	39	Positivo P1
18	negativo	40	Positivo P3
19	Positivo P3	41	Positivo P3
20	negativo	42	Positivo P3
21	negativo	43	Positivo P3
22	negativo	44	Negativo
23	negativo	45	Positivo P2

As Figuras 6 e 7 mostram, respectivamente, dois dispositivos DPP™ com uma amostra positiva (P3) e outra negativa. Nos testes imunocromatográficos deverá ser observada, inicialmente a presença da linha controle para validar a reação. O aparecimento de uma segunda linha, referente ao teste, comprova a positividade da amostra.

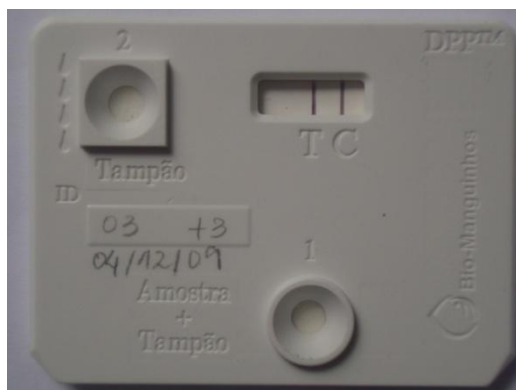


Figura 6: Dispositivo DPP™ com amostra sérica positiva (P3).
Tamanho Original: 6,7cm X 5,0 cm X 0,5cm

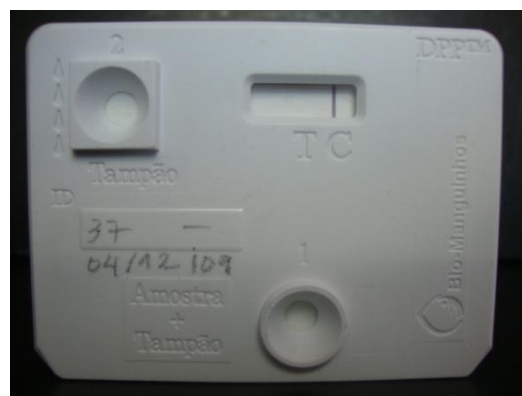


Figura 7: Dispositivo DPP™ com amostra negativa.
Tamanho Original: 6,7cm X 5,0 cm X 0,5cm

7.4.4 – PCR

Dentre os 44 animais submetidos ao aspirado subcutâneo, para a reação em cadeia pela polimerase multiplex (PCR multiplex) foram selecionados nove cães (nº 5, 16, 19, 26, 27, 31, 36, 40 e 42), sendo que oito apresentavam um ou mais sinais clínicos compatíveis com a LVC (exceto o de nº 5) e dois (nº 27 e nº 42) não foram positivos pelo exame parasitológico direto, porém todos obtiveram resposta positiva aos testes sorológicos de RIFI, ELISA e DPP™. A PCR, realizada com fragmentos de papel de filtro FTA® Card, utilizou como controle positivo a cepa de referência IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75) de *L. infantum*.

Pode-se observar, nas figuras 6 e 7, que houve formação de bandas referentes ao produto da PCR multiplex do controle, mas não houve formação de bandas referentes aos produtos da PCR multiplex provenientes das amostras selecionadas. Desta forma, configurou-se um quadro de resultado negativo para a reação, utilizando fragmentos de papel de filtro FTA® Card impregnados com aspirado de tecido subcutâneo, segundo a metodologia empregada nesse estudo.

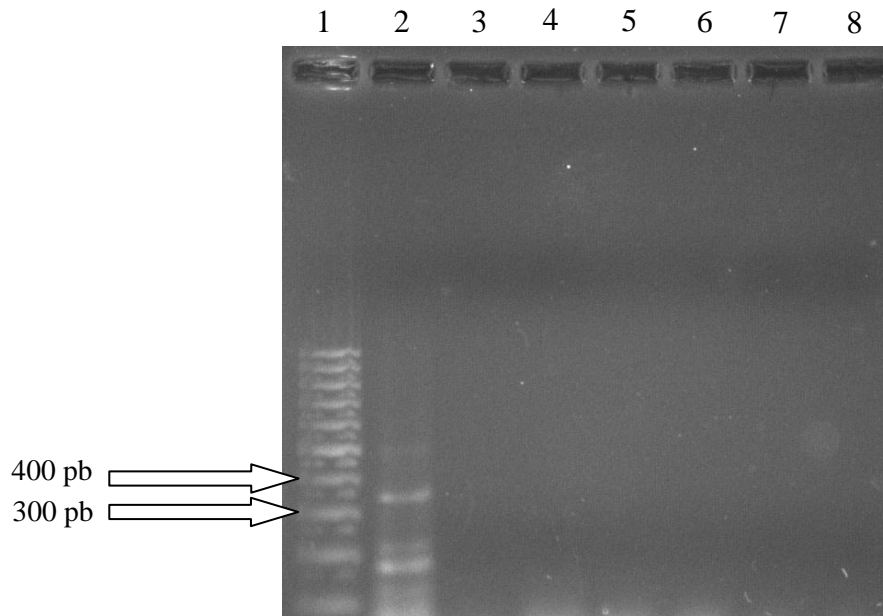


Figura 8: PCR multiplex de DNA obtido a partir de aspirado de tecido subcutâneo impregnado em FTA[®] Card de cães com Exame Parasitológico Direto positivo para *Leishmania sp* e sororreagentes para infecção por *Leishmania sp* pelo ELISA e pela RIFI. Linha (1), Marcador de peso molecular para 100 pb; linha (2), Controle positivo cepa de referência IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75) *L. (L.) infantum*; linha (3), cão 5; linha (4), cão 19; linha (5), cão 26; linha (6), cão 27; linha (7), cão 31; e linha (8), cão 36.

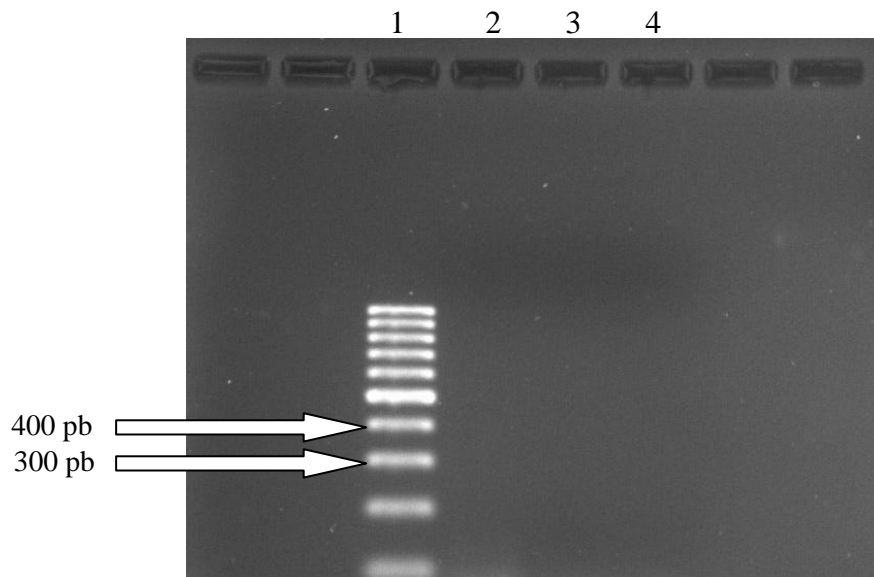


Figura 9: PCR multiplex de DNA obtido a partir de aspirado de tecido subcutâneo impregnado em FTA[®] Card de cães com Exame Parasitológico Direto positivo para *Leishmania sp* e sororreagentes para infecção por *Leishmania sp* pelo ELISA e pela RIFI. Linha (1), marcador de peso molecular para 100 pb; linha (2), cão 42; linha (3), cão 16; e linha (4), cão 40.

7.4.5 – Panorama dos resultados do diagnóstico laboratorial

Para esse estudo foram coletadas amostras de punção de medula óssea e/ou baço e/ou fígado de 18 animais, manipulados no mês de novembro de 2009; ao todo eram 19 cães, mas um foi a óbito. A partir dessas amostras foi possível o cultivo *in vitro*, diferente do que ocorreu em julho, quando a falta de infra-estrutura, na ocasião, em Cuiabá, não permitia o mesmo procedimento com os 26 animais puncionados.

Das amostras que foram cultivadas, oito ou 44,44% apresentaram *Leishmanias*. A sensibilidade da técnica de cultivo *in vitro* foi de 42,86% (3/7) e a especificidade de 40,0% (4/10). Os valores preditivos positivo e negativo foram, respectivamente, 33,33% e 50,0%.

A partir dos exames laboratoriais propostos para serem realizados em cada animal desse estudo: Parasitológico Direto, ELISA, RIFI, DPPTM – Bio-Manguinhos/FIOCRUZ e PCR foram apresentados em conjunto os resultados obtidos em cada uma das análises, sob forma de tabela e de gráficos. A Tabela 10 apresenta os resultados descritivos alcançados nas amostras analisadas. Nos Gráficos 1 e 2 estão representados, respectivamente, os dados quantitativos e de percentuais, referentes aos resultados positivos e negativos.

Tabela 10: Comparação entre as análises realizadas (parasitológico direto, RIFI, ELISA e DPP™) nas amostras do estudo.

Cão	Exame Parasitológico Direto	RIFI	ELISA	DPP™
1	Negativo	negativo	negativo	Negativo
2	Negativo	1:160	negativo	Negativo
3	Positivo	1:320	negativo	P3
4	negativo	1:80	negativo	Negativo
5	Positivo	1:160	Positivo	P2
6	Positivo	1:80	negativo	P1
7	Negativo	1:80	negativo	Negativo
8	Negativo	1:80	negativo	Negativo
9	Negativo	1:40	negativo	Negativo
10	Negativo	1:80	negativo	Negativo
11	Negativo	negativo	negativo	Negativo
12	Negativo	negativo	negativo	Negativo
13	Negativo	negativo	negativo	Negativo
14	Negativo	1:160	negativo	Negativo
15	Positivo	1:320	Positivo	Negativo
16	Positivo	1:640	Positivo	P3
17	Negativo	1:40	negativo	Negativo
18	Negativo	negativo	negativo	Negativo
19	Positivo	≥1:1280	Positivo	P3
20	Negativo	1:160	negativo	Negativo
21	Negativo	negativo	negativo	Negativo
22	Negativo	negativo	negativo	Negativo
23	Negativo	1:160	negativo	Negativo

Cão	Exame Parasitológico Direto	RIFI	ELISA	DPP™
24	negativo	1:160	negativo	negativo
25	negativo	1:80	negativo	negativo
26	positivo	≥ 1:1280	Positivo	P3
27	negativo	1:320	Positivo	P3
28	negativo	1:320	Positivo	P2
29	positivo	1:320	negativo	negativo
30	negativo	1:80	Positivo	negativo
31	Positivo	1:160	Positivo	P3
32	negativo	1:640	Positivo	P2
33	ÓBITO	1:160	Positivo	P3
34	positivo	1:160	Positivo	P1
35	positivo	1:320	negativo	P1
36	positivo	≥ 1: 1280	Positivo	P3
37	positivo	1:40	negativo	Negativo
38	positivo	≥1:1280	Positivo	P3
39	positivo	1:40	negativo	P1
40	positivo	1:640	Positivo	P3
41	negativo	1:40	Positivo	P3
42	negativo	≥1:128	Positivo	P3
43	Falha na fixação da lâmina	1:320	Positivo	P3
44	negativo	1:40	negativo	Negativo
45	negativo	1:640	Positivo	P2

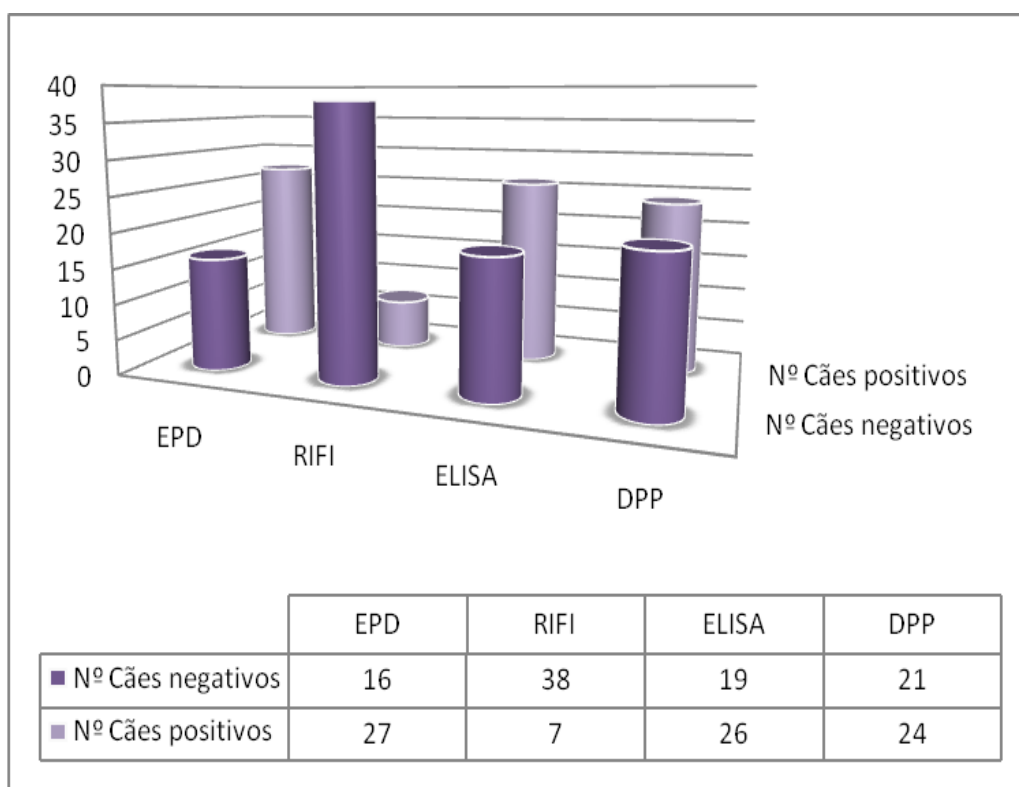


Gráfico 1: Distribuição gráfica do número de cães positivos e negativos pelas técnicas Exame Parasitológico Direto, RIFI, ELISA e DPPTM

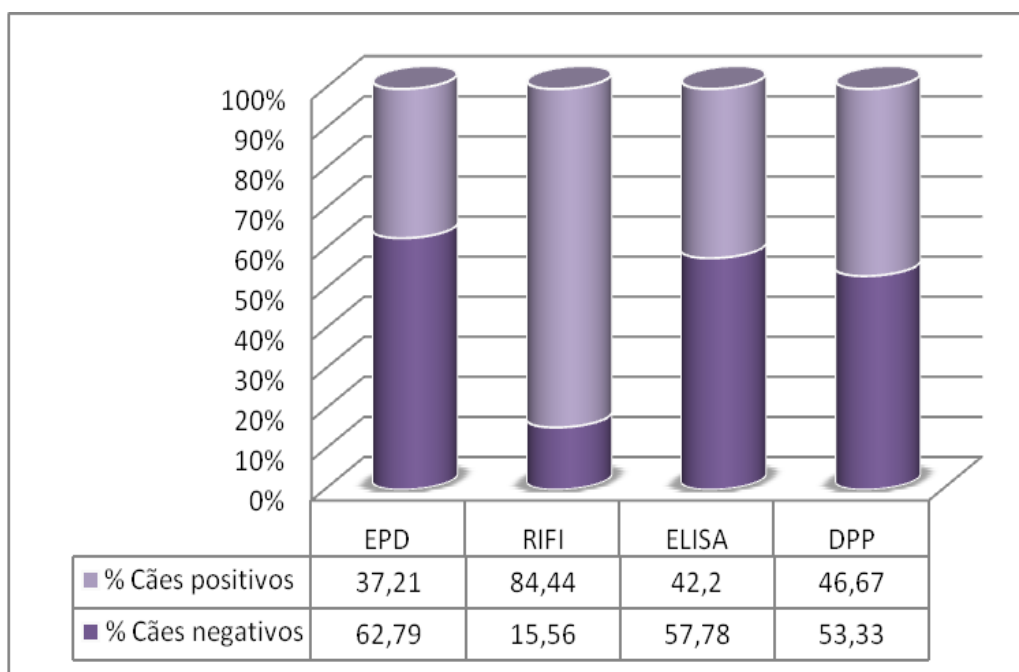


Gráfico 2: Percentuais de cães positivos e negativos pelas técnicas Exame Parasitológico Direto, RIFI, ELISA e DPPTM

Ao compararmos as cinco técnicas, foi necessário reduzir a amostra para nove, as mesmas empregadas na PCR (nº 5, 16, 19, 26, 27, 31, 36, 40 e 42), e que resultaram em ausência de positividade. Observou-se concordância de positividade nas reações em sete amostras, exceto as de nº 27 e 42, cujos resultados do parasitológico direto foram negativos, embora apresentassem sinais clínicos característicos da LVC, como descamação, úlceras cutâneas, apatia, alopecia, mucosas hipocoradas e ceratoconjuntivite. Por outro lado, o animal de nº 5, não apresentou sinais clínicos característicos, mas foi positivo em todas as análises laboratoriais.

Diante da possibilidade de titulação dos soros na RIFI, foi constatado que todas as amostras positivas apresentavam títulos relativamente elevados, variando de 1:160 a \geq 1:1280 (Tabela 11).

Tabela 11: Comparação entre as análises realizadas (parasitológico direto, PCR, RIFI, ELISA e DPPTM) nas amostras do estudo.

Cão	Exame Parasitológico Direto	PCRm	RIFI	ELISA	DPPTM
5	Positivo	SF	1:160	Positivo	P2
16	Positivo	SF	1:640	Positivo	P3
19	Positivo	SF	\geq 1:1280	Positivo	P3
26	Positivo	SF	\geq 1:1280	Positivo	P3
27	Negativo	SF	1:320	Positivo	P3
31	Positivo	SF	1:160	Positivo	P3
36	Positivo	SF	\geq 1:1280	Positivo	P3
40	Positivo	SF	1:640	Positivo	P3
42	Negativo	SF	\geq 1:1280	Positivo	P3

SF – Sem formação da banda

O exame parasitológico direto, realizado em 43 amostras, foi considerado padrão ouro para a comparação com as análises laboratoriais (RIFI, ELISA, DPPTM e PCR). Os percentuais de resultados concordantes (entre o exame parasitológico direto e cada teste) foram calculados segundo Gomes et al (2007) e o coeficiente Kappa, seguindo a classificação de Landis e Koch (1977).

➤ **Exame Parasitológico Direto e Cultivo *in vitro***

Para esse estudo foram coletadas amostras de punção de medula óssea e/ou baço e/ou fígado de 18 animais, manipulados no mês de novembro de 2009 (ao todo eram 19 cães, mas um foi a óbito). A partir dessas 18 amostras, foi possível o cultivo *in vitro*, diferente do que ocorreu em julho, quando a falta de infra-estrutura, na ocasião, em Cuiabá, não permitia que se executasse o mesmo procedimento com os 26 animais puncionados. Das amostras cultivadas, oito ou 44,44% foram positivas para *Leishmanias*.

Ao estabelecermos os parâmetros de comparação entre as duas técnicas, foi necessário excluir o resultado de uma amostra positiva de cultivo (cão nº 43), em função da não fixação da lâmina no exame parasitológico deste animal (Tabela 12). A sensibilidade da técnica de cultivo *in vitro* foi de 42,86% (3/7), a especificidade de 40,0% (4/10) e os valores preditivos positivo e negativo foram, respectivamente, 33,33% e 50,0%. A concordância encontrada foi de 41,18% (7/17) e o coeficiente kappa foi igual a (-) 0,16, portanto, considerada uma concordância pobre, segundo Landis e Koch (1977).

Tabela 12: Comparação dos resultados obtidos no Exame Parasitológico Direto e no Cultivo *in vitro*

Exame Parasitológico Direto	Cultivo <i>in vitro</i>		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	3	6	9
Negativos	4	4	8
Total	7	10	17

➤ **Exame Parasitológico Direto e RIFI – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ**

Na Tabela 13 estão os resultados obtidos pelo Exame Parasitológico Direto e pela RIFI. Foram obtidos 16 resultados positivos concordantes e sete resultados negativos concordantes entre a RIFI Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ e o padrão ouro, representando 53,49% $\{[(16+7)/43] \times 100\}$ de concordância entre estas duas técnicas. A RIFI foi discordante em 20 amostras (46,51%). O coeficiente Kappa encontrado foi de, aproximadamente, 0,21, portanto, a concordância encontrada entre as duas técnicas é considerada razoável, de acordo com Landis e Koch (1977).

A sensibilidade encontrada para a RIFI foi 44,44% (16/36); a especificidade, 100% (7/7); valor preditivo positivo, 100% (16/16); e valor preditivo negativo, 25,93% (7/27).

Tabela 13: Comparação dos resultados obtidos pelo Exame Parasitológico Direto e pela RIFI

Exame Parasitológico Direto*	RIFI		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	16	0	16
Negativos	20	7	27
Total	36	7	43

*Os cães 33 e 43 foram excluídos desta tabela por não terem resultado do Exame Parasitológico Direto. Ambos eram positivos para o teste RIFI.

➤ Exame Parasitológico Direto e ELISA – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ

Como pode ser observado na Tabela 14, foram obtidos 10 resultados positivos concordantes e 20 resultados negativos concordantes entre o ELISA e o padrão ouro, o que representou 69,77% $\{[(10+20)/43] \times 100\}$ de concordância entre estas duas técnicas. O teste de ELISA foi discordante em seis amostras (13,95%). O coeficiente Kappa encontrado foi de, aproximadamente, 0,36, portanto, a concordância encontrada entre as duas técnicas é considerada também razoável (Landis e Koch, 1977).

Os valores de sensibilidade e especificidade corresponderam a 58,82% (10/17) e 76,92% (20/26), respectivamente. E os valores preditivos positivo e negativo foram 62,5% (10/16) e 74,07% (20/27), respectivamente.

Tabela 14: Comparação dos resultados obtidos pelo Exame Parasitológico Direto e pelo ELISA

Exame Parasitológico Direto*	ELISA		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	10	6	16
Negativos	7	20	27
Total	17	26	43

*Os cães 33 e 43 foram excluídos desta tabela por não terem resultado do Exame Parasitológico Direto. Ambos eram positivos para o teste ELISA.

➤ **Exame Parasitológico Direto e DPPTM – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ**

Como pode ser observado na Tabela 15, foram obtidos 13 resultados positivos concordantes e 21 resultados negativos concordantes entre o teste DPPTM e o padrão ouro, o que representou 79,07% $\{[(13+21)/43] \times 100\}$ de concordância entre estas duas técnicas. O teste rápido imunocromatográfico DPPTM foi discordante em nove (20,93%) amostras. O coeficiente Kappa encontrado foi, aproximadamente, 0,57, portanto, a concordância encontrada entre as duas técnicas foi moderada (Landis e Koch, 1977).

Os valores de sensibilidade e especificidade encontrados para o teste DPPTM foram, respectivamente, 68,42% (13/19) e 87,5% (21/24). Os valores preditivos positivo e negativo encontrados foram, respectivamente, 81,25% (13/16) e 77,78% (21/27).

Tabela 15: Comparação dos resultados obtidos pelo Exame Parasitológico Direto e pelo teste DPPTM

Exame Parasitológico Direto*	DPP TM		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	13	3	16
Negativos	6	21	27
Total	19	24	43

*Os cães 33 e 43 foram excluídos desta tabela por não terem resultado do Exame Parasitológico Direto. Ambos eram positivos para o teste DPPTM.

➤ **Comparação entre as técnicas de EPD, RIFI, ELISA e DPPTM com seus respectivos materiais mediante seus atributos de potencialidades e limites**

As técnicas laboratoriais empregadas neste estudo (exame parasitológico direto, RIFI, ELISA e DPPTM) foram analisadas segundo os aspectos: material necessário para a realização de cada uma, potencialidades e limites. De forma simplificada, esses atributos das técnicas utilizadas nesta pesquisa foram organizados no Quadro 1.

O exame parasitológico direto é uma técnica empregada como diagnóstico de certeza da LVC e, em função desta característica, foi utilizado como padrão ouro neste estudo. Contudo, pode fornecer resultados falso-negativos. Para um diagnóstico preciso pelo exame parasitológico direto, é importante ter um banco de imagens. Além disso, deve-se ter esfregaços em lâmina das amostras (medula óssea, *imprint* de baço e/ou fígado) fixados em

metanol, solução corante Giemsa, tampão de Sorensen, pipeta Pasteur, microscópio ótico (aumento de 100 X) e óleo de imersão.

Para a realização da RIFI, que é uma técnica quantitativa, precisamos de amostras de soro, kit IFI Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ), pipetas volumétricas, PBS (Tampão Salina Fosfato), estufa a 37° C e microscópio de fluorescência. A RIFI mostrou-se de simples realização. No entanto, esta técnica pode apresentar leitura subjetiva, requerendo pessoal qualificado para a leitura das lâminas. O kit deve ser mantido em temperatura de 4° C e pode apresentar resultados falso-negativos (anticorpos inativos, janela imunológica) e falso-positivos (sangue hemolisado, anticorpos persistentes de infecção antiga). Títulos baixos podem apresentar reações cruzadas com outras parasitoses.

O teste ELISA é uma técnica qualitativa de simples realização. Contudo, assim como a RIFI, pode apresentar resultados falso-positivos (sangue hemolisado, anticorpos persistentes de infecção antiga) e falso-negativos (anticorpos inativos, janela imunológica). Para o diagnóstico pelo ensaio imunoenzimático, precisamos do Kit EIE-Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ), amostras de soro, PBS, pipetas volumétricas e estufa a 37° C.

Ambos os kits (EIE Leishmaniose Visceral Canina e IFI Leishmaniose Visceral Canina) são produzidos por Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ e distribuídos gratuitamente pelo Ministério da Saúde para os Laboratórios Centrais Estaduais de Saúde Pública (LACEN) para o diagnóstico da LVC.

Para a obtenção do diagnóstico pelo teste rápido imunocromatográfico DPP™, utilizamos o kit DPP™ Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ), amostras de soro (também pode ser sangue) e pipeta Pasteur (mesmo número de amostras). Neste estudo, o DPP™ apresentou-se como um bom preditor de infecção e/ou doença ativa, além de ser um procedimento simples, rápido (resultados em até 15 minutos) e fácil, podendo ser realizável tanto em campo como em laboratório. O DPP™ está em fase de experimentação por Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ.

Quadro 1: Comparação das técnicas EPD, RIFI, ELISA e DPPTM com seus respectivos materiais mediante seus atributos de potencialidades e limites

Técnicas	Material Necessário	Potencialidades	Limites
EPD	<ul style="list-style-type: none"> • Esfregaço em lâmina • Metanol (fixação) • Pipeta Pasteur • Corante Giemsa • Tampão de Sorensen • Microscópio ótico • Óleo de imersão 	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnóstico de certeza 	<ul style="list-style-type: none"> • Nº razoável de resultados falso-negativos • Necessidade de um banco de imagens para um diagnóstico preciso.
RIFI	<ul style="list-style-type: none"> • Soro • Kit IFI-Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos) • Pipetas • PBS (tampão salina fosfato) • Estufa a 37°C • Microscópio de fluorescência 	<ul style="list-style-type: none"> • Simples realização • Técnica quantitativa 	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de leitura subjetiva • Resultados falso-negativos (anticorpos inativos, janela imunológica) • Resultados falso-positivos (sangue hemolisado, anticorpos persistentes de infecção antiga)
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Soro • Kit EIE-Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ) • Pipetas • PBS (tampão salina fosfato) • Estufa a 37°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Simples realização • Técnica qualitativa 	<ul style="list-style-type: none"> • Resultados falso-negativos (anticorpos inativos, janela imunológica) • Resultados falso-positivos (sangue hemolisado, anticorpos persistentes de infecção antiga)
DPPTM	<ul style="list-style-type: none"> • Sangue ou soro • Kit DPPTM Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) • Pipeta Pasteur 	<ul style="list-style-type: none"> • Simples, rápida, fácil realização • Realizável em campo • Bom preditor de infecção/ doença ativa • Resultado visível quase imediatamente (15 min) 	<ul style="list-style-type: none"> • Leitura subjetiva: P1, P2, P3, N1 ou N2 • Resultados falso-negativos (anticorpos inativos, janela imunológica) • Resultados falso-positivos (sangue hemolisado, anticorpos persistentes de infecção antiga) • Em fase de experimentação

➤ **Exame Parasitológico Direto e PCRm**

A técnica de PCR multiplex funcionou, conforme demonstrado no item 7.4.4, porém não houve formação de bandas para as nove amostras selecionadas, comprometendo, assim, a sua comparação com o exame parasitológico direto.

➤ **ELISA Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ e RIFI Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ**

Como pode ser observado na Tabela 16, foram obtidos 19 resultados concordantes positivos e sete concordantes negativos entre a RIFI e o ELISA, representando 57,78% $\{[(19+7)/45] \times 100\}$ de concordância entre estas duas técnicas. O coeficiente Kappa encontrado foi, aproximadamente, 0,24 (razoável) (Landis e Koch, 1977).

Tabela 16: Comparação dos resultados obtidos pelo ELISA e pela RIFI

ELISA	RIFI		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	19	0	19
Negativos	19	7	26
Total	38	7	45

➤ **ELISA Bio-Manguinhos/FIOCRUZ e DPPTM Bio-Manguinhos/FIOCRUZ**

Como pode ser observado na Tabela 17, foram obtidos 17 resultados concordantes positivos e 22 concordantes negativos entre o teste DPPTM e o ELISA, o que representou 86,67% $\{[(17+22)/45] \times 100\}$ de concordância entre estas duas técnicas. O coeficiente Kappa encontrado foi, aproximadamente, 0,73, portanto, a concordância encontrada entre as duas técnicas é considerada substancial (Landis e Koch, 1977).

Tabela 17: Comparação dos resultados obtidos pelo ELISA e pelo teste DPPTM

ELISA	DPP TM		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	17	2	19
Negativos	4	22	26
Total	21	24	45

➤ **RIFI Bio-Manguinhos/FIOCRUZ e DPPTM Bio-Manguinhos/FIOCRUZ**

Como pode ser observado na Tabela 18, foram obtidos 21 resultados concordantes positivos e sete concordantes negativos entre o teste DPPTM e a RIFI, o que representou 62,22% $\{[(21+7)/45] \times 100\}$ de concordância entre estas duas técnicas. O coeficiente Kappa encontrado foi, aproximadamente, 0,28, com concordância razoável (Landis e Koch, 1977).

Tabela 18: Comparação dos resultados obtidos pela RIFI e pelo teste DPPTM

RIFI	DPP TM		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	21	17	38
Negativos	0	7	7
Total	21	24	45

7.5 – Caracterização Bioquímica

7.5.1 – Cultivo *in vitro*

A partir do cultivo *in vitro*, em meio NNN e Schneider, e/ou NNN e salina 0,85%, realizado com 44 amostras biológicas, referentes aos 44 cães estudados, foi observado crescimento de *Leishmania* sp em 16 amostras (nove de medula óssea, quatro de aspirado de fígado e três de aspirado de baço), equivalentes a oito cães. As culturas com isolamento parasitário foram utilizadas para a caracterização da espécie de *Leishmania* pela técnica de eletroforese de isoenzimas.

7.5.3 – Caracterização por eletroforese de isoenzimas

A caracterização da espécie de *Leishmania*, que foi cultivada em meio de cultura *in vitro*, foi realizada utilizando a técnica de eletroforese de isoenzimas. Ao todo houve crescimento de *Leishmania sp* nas amostras biológicas de oito cães. No entanto, foi possível a caracterização isoenzimática, realizada com a enzima 6PGDH, das amostras (medula óssea e/ou baço e/ou fígado) de cinco cães. A caracterização isoenzimática comprovou que a espécie de *leishmania* presente nas amostras foi compatível com o padrão da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*. O perfil isoenzimático das nove amostras pode ser observado na Figura 10.

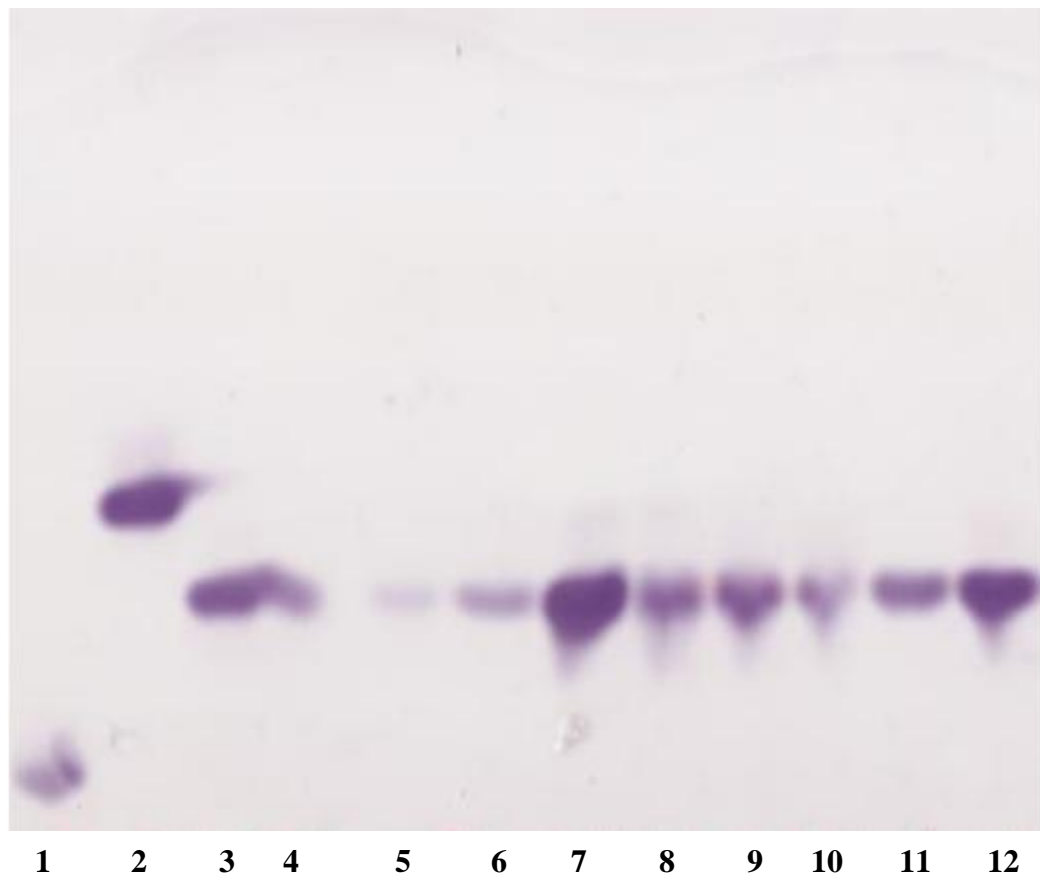


Figura 10: Gel das amostras por eletroforese isoenzimática com a enzima 6PGDH. A numeração acima corresponde a: (1) cepa de referência IOC/L0566 (MHOM/BR/1975/M2903) *L. (V.) braziliensis*; (2) cepa de referência IOC/L0575 (IFLA/BR/1967/PH8) *L.(L.) amazonensis*; (3) cepa de referência IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75) *L. (L.) infantum*; (4 e 8) amostras de aspirado de baço; (5 e 7) amostras de aspirado de fígado; (6, 9, 10, 11 e 12) amostras de punção de medula óssea.

8 – DISCUSSÃO

O CCZ-Cuiabá desenvolve um trabalho para a vigilância e controle da LVC por meio de três abordagens. A primeira consiste na demanda voluntária da população da cidade: os proprietários de cães que apresentam alterações cutâneas sugestivas (úlceras, hiperqueratose, alopecia) telefonam para o CCZ-Cuiabá e relatam a suspeita. Em seguida, o CCZ-Cuiabá envia sua equipe de campo para a verificação dos sinais clínicos compatíveis com a LVC (onicogribose, caquexia, úlceras nas orelhas, ceratoconjuntivite), faz o preenchimento do prontuário e solicita, verbalmente, a permissão para a coleta de sangue para fins da análise sorológica no LACEN-MT. Tendo em mãos os resultados da análise sorológica (RIFI e ELISA), o proprietário é comunicado; quando os resultados são positivos (em um dos testes ou em ambos), a Secretaria de Vigilância Epidemiológica do município de Cuiabá é notificada, e a equipe de campo do CCZ-Cuiabá retorna ao domicílio para recolher cães sororreagentes.

Da mesma forma, o CCZ-Cuiabá recolhe cães infectados mediante solicitação do proprietário que realizou sorologia do animal em laboratório particular. Para isso, é necessário que o proprietário apresente o laudo laboratorial no qual conste a sororreatividade do animal.

A segunda abordagem é feita a partir de notificação de caso(s) humano(s): no bairro de procedência do(s) indivíduo(s) infectado(s), o CCZ-Cuiabá realiza uma investigação, envolvendo 100% dos cães domiciliados próximo(s) ao(s) caso(s) índice(s). Na Zona Rural, a investigação abrange um raio de um quilômetro a partir do foco, e na Zona Urbana, 200 metros, sendo esse raio ampliado à medida que forem identificados cães positivos. Os procedimentos são: a coleta de sangue dos animais, o preenchimento do prontuário, e das fichas de bloqueio e de captura de flebotomíneo. Os cães sororreagentes, com títulos elevados, acima de 1:160, para leishmaniose são recolhidos pelo CCZ-Cuiabá. Em paralelo, são distribuídas armadilhas para captura de flebotomíneos pela área. Realiza-se o inventário entomológico a partir das coletas realizadas com armadilhas do tipo CDC durante três dias consecutivos. Os vetores do calazar em Cuiabá são *L. cruzi* e *L. longipalpis*; uma vez realizada a identificação dos flebotomíneos pelo Núcleo de Entomologia da Secretaria de Saúde do estado, tem início a borrifação no domicílio e arredores a um raio de 100 metros.

A terceira abordagem consiste em um levantamento que abrange a cidade inteira: são distribuídas armadilhas para flebotomíneos pelos bairros da cidade, que apresentaram maior número de notificações de cães infectados no ano anterior. Se houver captura apenas de *L. witmani* e *L. flaviscutelata* em determinados bairros, o CCZ-Cuiabá realiza uma investigação

amostral, segundo a qual, a coleta de sangue e o preenchimento do prontuário são realizados apenas em uma pequena porcentagem desses bairros. O procedimento é o mesmo que nas abordagens supracitadas: a equipe de campo do CCZ-Cuiabá preenche o prontuário e realiza a coleta de sangue dos cães; os resultados positivos são notificados à Secretaria de Vigilância Epidemiológica do município de Cuiabá e os cães em questão são recolhidos pelo CCZ-Cuiabá. Todos os cães recolhidos, em qualquer uma das abordagens, são transferidos para o CCZ-Cuiabá para serem eutanasiados.

8.1. – Análise descritiva da amostra

A amostra consistiu de 45 cães, doados ao CCZ-Cuiabá, e que foram mantidos nos meses de julho e novembro de 2009 para execução desta pesquisa. Foi observado que não houve diferença entre os sexos (machos, 51,11% e fêmeas, 48,9%), todos possuíam idade estimada superior a seis meses, sendo a maioria de adultos, segundo seus proprietários, e sem raça definida (75,5%). A distribuição dos cães nas quatro regiões de Cuiabá mostrou que o maior número de animais era proveniente das regiões Norte (35,55%) e Oeste (26,21%). Nessas regiões, encontra-se o Parque Nacional Mãe Bonifácia e durante visita ao local, pode-se constatar que parte da mata do referido Parque houve construções de casas recentemente, porém sem equipamentos públicos, caracterizando invasões. Essa forma de ocupação do espaço beneficia a adaptação de flebotomíneos, próximo a essas residências, onde comumente vivem cães, que adentram a mata com fins de caça. Além disso, no lado oeste, Cuiabá faz fronteira com Várzea Grande, onde se observa intenso comércio de mercadorias e indivíduos e onde há alguns anos foram registrados casos de LVC.

A tendência de maior prevalência de cães positivos para LV serem provenientes das regiões Norte e Oeste são semelhantes aqueles encontrados por Almeida et al. (2009), em um estudo realizado entre setembro de 2007 a março de 2008. É possível que esteja havendo o deslocamento da área de maior acometimento de LVC, visto que em 1999, Moura et al, a partir do levantamento aleatório de cães da cidade de Cuiabá, observaram maior prevalência (72,5%) de animais sororreagentes para RIFI nas regiões Leste e Sul.

A urbanização da LVC é decorrência de mudanças na organização do espaço nas grandes cidades, principalmente das regiões Sudeste, Sul e Centro Oeste. Almeida et al (2009) apontaram a permanência do cão no peridomicílio e a proximidade das residências em relação à mata como os principais fatores de risco para a infecção canina: 100% dos cães

sororeagentes pesquisados pelos autores permaneciam em ambiente peridomiciliar. No entanto, também foi observada prevalência significativa de LVC em residências sem os fatores ambientais analisados (presença de mata, proximidade de terreno baldio, proximidade de rio, córrego/ represa, ausência de equipamentos urbanos, entre outros). Portanto, podemos inferir que fatores ambientais analisados isoladamente podem não ser determinantes para a infecção canina por *Leishmania sp.*

8.2. – Análise clínica dos animais estudados

Esses animais eram registrados pela equipe do CCZ. As informações quanto ao quadro clínico, epidemiológico e os resultados laboratoriais previamente realizados de alguns eram compartilhados e repassados para a Ficha Clínio-Epidemiológica e Laboratorial, elaborada para este estudo.

Os sinais clínicos mais frequentemente encontrados nos animais estudados foram descamação (53,33%), alopecia (44,44%) e úlceras, como úlcera de ponta de orelha (40%), sendo que caquexia, onicogribose, ceratoconjuntivite e mucosas hipocoradas, cada uma, foram verificadas em 26,67% dos cães. Comportamento semelhante quanto aos sinais clínicos verificou-se na região nordeste do Brasil (Deane, 1956), em Belo Horizonte-MG (Silva, 1997; Silva et al, 2001a; Quaresma et al, 2009), no Rio de Janeiro-RJ (Madeira et al, 2004), Araçatuba-SP (Tolezano et al, 2007), no estado de São Paulo (Gomes et al, 2007) e nos Estados Unidos (Rosypal et al, 2003).

Na cidade de Belo Horizonte-MG, Silva (1997) observou emagrecimento, dermatite com perda de pelo, onicogribose, úlceras no corpo, ceratoconjuntivite, descoordenação motora, diarreia de sangue, vômitos, ascite, catarata e pneumonia nos cães com LV, procedentes de área urbana de Belo Horizonte. O autor encontrou emagrecimento como sinal clínico mais frequente, diferentemente do observado neste estudo, no qual os sinais clínicos dermatológicos foram os mais frequentemente encontrados.

Almeida et al (2009), em área urbana de Cuiabá, encontraram resultados próximos, sendo os de maior frequência: alopecia, úlcera de ponta de orelha e descamação, ou seja, sinais dermatológicos. Da mesma forma, os autores também observaram onicogribose e conjuntivite em menor frequência.

Em área urbana de Natal-RN, Queiroz et al (2009) encontraram com maior frequência sinais de emagrecimento, conjuntivite e onicogribose nos cães estudados. Os autores

observaram também, porém com menor frequência, lesões crostosas, especialmente ao redor dos olhos, nas orelhas e nos membros, alopecia, lesões ulceradas, hiperqueratose e descamação.

A descamação foi verificada ao longo do corpo dos cães, sendo que alguns animais apresentavam-se intensamente acometidos com generalização do processo. Ao passo que outros animais apresentavam áreas localizadas de descamação, principalmente no dorso. Acreditamos que a descamação encontrada pode dever-se não somente à LV, mas também a infecções que acometiam os animais provavelmente pela baixa imunidade como consequência do calazar. O fato de os animais permanecerem confinados nas baias do canil sem serem higienizados adequadamente (banhos semanais, por exemplo) pode explicar a elevada frequência de descamação em detrimento da caquexia, sinal clínico marcante na LV e mais frequentemente encontrado que a descamação, segundo a literatura (Silva et al, 2001a).

Outra possível explicação deve-se ao fato de os animais permanecerem nas baias enquanto as mesmas são lavadas e higienizadas diariamente. Os animais se molhavam durante o processo, não tinham acesso a ambiente aberto para se secarem ao sol e, portanto, permaneciam com o pelo e a pele úmidos ao longo do dia, sendo o processo repetido diariamente. Essa rotina é prejudicial aos animais, favorecendo a descamação cutânea nos mesmos.

A alopecia foi encontrada tanto generalizada quanto localizada no corpo dos animais, assim como a descamação. Havia cães que apresentavam corpo quase sem pelagem, tinham apenas pequenas áreas com pelo, ao passo que outros apresentavam falhas ao redor dos olhos, no focinho, nas orelhas e nas patas.

Perda de pelo e dermatite no corpo foram observadas nas orelhas, em torno dos olhos e no dorso dos cães, e estavam presentes em 61% dos animais estudados por Silva (1997).

Foram observadas lesões cutâneas únicas ou múltiplas, crostosas ou não, sem prurido, nas orelhas, no dorso, no focinho e nas patas. Silva (1997) e Silva et al (2001a) também encontraram lesões com características semelhantes em seus estudos.

Apenas 24,44% (11/45) dos cães estudados não apresentavam sinais clínicos para LV. Ao passo que Queiroz et al (2009) encontraram, em área urbana de Natal-RN, 37% (20/54) dos animais sem sinais clínicos para LV.

Tolezano et al (2007), ao analisarem cães com sinais clínicos de LV em Araçatuba-SP, observaram que a infecção dos animais não era pela *Leishmania (L.) infatum* (sin *L.(L.) infatum chagasi* para os autores), e sim pela *L. (L.) amazonensis*. Os autores concluíram que

sinais clínicos semelhantes àqueles causados pela *Leishmania (L.) infantum* em cães, podem estar associados a outras *Leishmanias* sp., assim como *L. (L.) amazonensis*, e que o diagnóstico da LVC na América Latina deveria ser feito pela PCR que é capaz de definir gênero e espécie. Os autores complementaram que resultados do passado, assim como atuais, sugeriram que a *L. (L.) amazonensis* zoonótica ocorre em ambiente peridoméstico.

8.2 – Análises Laboratoriais

8.2.1 – Exame Parasitológico Direto

O exame parasitológico direto é um dos métodos de certeza para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, haja vista a observação direta de formas amastigotas da *Leishmania* sp., por microscopia ótica, em esfregaços confeccionados a partir de material biológico oriundo de punções de fígado, linfonodos, baço ou medula óssea, além de biópsias ou de escarificação da pele (Brasil, 2003; Brasil, 2006a) e foi utilizado nesse estudo como padrão ouro. Segundo ainda Brasil (2003) e Brasil (2006a), o exame parasitológico direto é altamente específico (aproximadamente 100%), com sensibilidade de aproximadamente 80% para cães sintomáticos, podendo ser inferior em cães assintomáticos, dependendo do grau de parasitemia do animal, tipo de material biológico coletado e tempo de leitura da lâmina.

A partir do exame parasitológico direto, realizado em 43 esfregaços provenientes dos cães deste estudo, foram obtidos 16 resultados positivos, o que corresponde a uma frequência de 37,21% dos animais com resultados positivos utilizando, como insumo, a punção de medula óssea. Embora a frequência obtida tenha sido baixa, 37,21%, o exame parasitológico direto é sabido como pouco sensível, porém altamente específico.

Saridomichelakis et al (2005) encontraram especificidade de 100% para microscopia ótica utilizando como insumos punção de linfonodos e de medula óssea. Os autores, utilizando a PCR como padrão ouro em seu estudo, encontraram sensibilidade maior da técnica em cães sintomáticos para LVC, 92,6%, em detrimento dos cães assintomáticos, 7,8%. Portanto, o exame parasitológico direto, realizado pela microscopia ótica e tendo punção de linfonodos e de medula óssea como substratos, é um método altamente sensível e específico para o diagnóstico das leishmanioses caninas, apesar da sensibilidade ser relativamente baixa em infecções assintomáticas.

Igualmente, Dourado et al, 2007 afirmaram que a forma de diagnóstico laboratorial da LV, segura e determinante, é o exame parasitológico direto, por meio do qual é possível a observação de formas amastigotas em amostras de medula óssea.

Não obstante, o Ministério da Saúde (Brasil, 2006a) preconiza o exame parasitológico direto como forma diagnóstica laboratorial da LVC. Este método foi eleito como padrão ouro neste estudo, assim como fizeram Reale et al (1999), Gomes et al (2007), Diro et al (2007), Pedras et al (2008), Romero et al (2009), dentre outros autores.

8.2.2 - Cultivo *in vitro*

Vale apontar que outros métodos parasitológicos, como o cultivo *in vitro* ou a inoculação em animais de experimentação, apresentam interferências complexas, como contaminações bacterianas, dificultando a observação de parasitos nos esfregaços corados com Giemsa (Gomes et al, 2007; Boelaert et al, 2008). Ashford et al (1995) sugeriram que a PCR fosse o método empregado como padrão ouro para o diagnóstico laboratorial da LVC em detrimento do isolamento pelo cultivo *in vitro* ou da inoculação em hamster.

De 18 amostras cultivadas, oito (44,44%) foram positivas, com a observação do crescimento de promastigotas de *Leishmanias*, resultado semelhante ao alcançado por Tolezano et al (2007), quando observou positividade de 40% em seu estudo. Nesse estudo, não foi possível realizar o cultivo *in vitro* com todas as amostras puncionadas dos 44 animais (um foi a óbito). Essa impossibilidade deveu-se à falta de acondicionamento adequado para as culturas durante o período de permanência em julho de 2009. Contudo, na segunda viagem de trabalho de campo, as condições foram melhoradas para permitir a manutenção das amostras.

Fato é que as condições exigidas por algumas técnicas, como o cultivo *in vitro*, requerem infra-estrutura que nem sempre é possível, quando realizamos trabalhos em laboratórios de poucos recursos. A manutenção do cultivo *in vitro* para *Leishmanias* implica a compra de insumos (reagentes), manutenção de animais (suprimento de sangue), equipamentos (câmara de segurança biológica entre outros) e pessoal treinado para a sua execução. Portanto, tantas demandas acabam dificultando a utilização desse método para o diagnóstico da leishmaniose visceral. Contudo, nesse estudo, encontramos 44, 44% de positividade (visualização de formas promastigotas nas culturas) no cultivo *in vitro*, porcentagem superior à frequência de positividade encontrada no padrão ouro (exame parasitológico direto).

Desta forma, parece ainda faltar um método específico e sensível o bastante para servir como referência para avaliar a sensibilidade e a especificidade de outros métodos diagnósticos.

8.2.3 – Reação de Imunofluorescência Indireta

Pela reação de imunofluorescência indireta, foram obtidos 38 resultados positivos dentre as 45 amostras de soro, o que representou a frequência de 84,44% (38/45) de positividade. De modo semelhante, Manna et al (2004) encontraram 85,3% (81/95) de resultados positivos pela RIFI (ponto de corte igual ou superior à diluição 1:40), quando analisaram cães naturalmente infectados do sul da Itália; desses, 12 (15%) apresentaram titulação próxima ao ponto de corte.

No entanto, Silva et al (2001b), ao estudarem cães com LVC na região metropolitana de Belo Horizonte-MG, encontraram frequência inferior, 21,6% (139/644) de resultados positivos pela RIFI. Semelhante ao encontrado por Tolezano et al (2007), em Araçatuba-SP, quando foram detectados 15,54% (71/457) de resultados positivos, com diluições iguais ou superiores a 1:40.

Moura et al (1999), ao realizarem um trabalho de investigação epidemiológica canina na cidade de Cuiabá, encontraram resultados inferiores aos obtidos nesse estudo para o percentual de soros positivos pela RIFI. Enquanto observamos positividade de 84,44%, os autores detectaram 64,5% (40/62). Essa diferença deveu-se à utilização para essa pesquisa de uma amostragem selecionada, isto é, direcionada, em que os cães eram suspeitos de calazar. Contudo, Moura et al (1999) encontraram 88% (37/40) de soros com valores de titulação elevada, isto é, $\geq 1:160$, enquanto registramos 65,79%. Portanto, concluímos que a utilização apenas da RIFI não é suficiente para a identificação da etiologia das leishmanioses, mas que titulações elevadas sugeririam forte indício da presença de calazar.

8.2.4 – Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

No ensaio imunoenzimático, ELISA, foram obtidos 19 resultados positivos dentre as 45 amostras de soro analisadas, o que correspondeu à frequência de 42,22% (19/45). Bisugo et al (2007), em um inquérito com cães domiciliados e provenientes de regiões endêmicas para LV no estado de São Paulo, utilizaram o mesmo kit empregado nesse estudo, o kit EIE-

Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ) e obtiveram 27,2% (271/997) de positivos para infecção por *Leishmania*, resultado inferior ao alcançado no presente estudo, provavelmente devido à amostra.

Reithinger et al (2002), na cidade de Capitão Enéas, área endêmica para *L.infantum* no estado de Minas Gerais, empregou a técnica de ELISA em um ensaio com cães domiciliados e encontraram 37% (65/175) de positividade.

Positividade, também baixa, foi observado por Figueiredo et al (2009), em área de LTA, Santa Rita de Cássia (município de Barra Mansa, RJ), quando realizaram um inquérito com cães domiciliados. Os autores registraram percentual de positividade de 10,7% (19/177) pelo teste ELISA; na ocasião foram utilizadas, como antígeno, proteínas provenientes de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Observamos que o teste ELISA, com o emprego do kit EIE-Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ), mostrou-se de simples realização e interpretação em laboratório, prático, rápido, e não demandou conhecimento técnico especializado nem experiência prévia com a prática.

Contudo, acreditamos que o ELISA, assim como outras sorologias, apresente resultados falso-negativos, devido ao comprometimento da estrutura dos anticorpos presentes nos soros, em função da manutenção, nem sempre assistida, da temperatura ideal de congelamento das amostras. Portanto, ainda que sejam tomados cuidados com a refrigeração e com o isolamento dos soros em relação à temperatura mais elevada do meio externo, pode ocorrer diminuição do nível de anticorpos, principalmente quando são utilizadas amostras originárias do campo.

De forma semelhante, resultados positivos são obtidos de cães sem infecção (ativa ou não) por *Leishmania* sp. Amostras de sangue sob movimentação brusca e contínua, além de exposição a calor mais intenso que a temperatura corporal, ou, mesmo a congelamento, sofrem hemólise e liberam o pigmento cromático hemoglobina. Uma vez que o ELISA é uma técnica colorimétrica, o ensaio de amostras hemolisadas pode acarretar leituras elevadas, propiciando possível resultado positivo.

Apesar de não termos medido esforços para manter condições adequadas para a execução da técnica referida, não excluímos a possibilidade de algumas amostras terem sofrido com adversidades do trabalho de campo, favorecendo a obtenção de resultados falso-positivos e falso-negativos.

8.2.5 – Teste Rápido Imunocromatográfico DPP™

O teste rápido imunocromatográfico DPP™ apresentou 21 resultados positivos dentre as 45 amostras de soro analisadas, o que representou 46,67% (21/45) de positividade.

Bisugo et al (2007) realizaram um ensaio imunocromatográfico com a rK39, com sangue total e soro de cães capturados aleatoriamente, no estado de São Paulo. Os autores observaram que, entre aqueles que residiam em municípios autônomos para LVC, o teste apresentou intensidade de reatividade positiva em ambas as amostras: 17,4% e 31,3% para o sangue total e soro, respectivamente; embora resultados negativos tenham sido observados nas amostras dos animais de áreas de LTA.

O antígeno rK39 é um epítipo repetitivo altamente conservado entre os membros do complexo *L.donovani*. Esse antígeno foi validado para o diagnóstico da LV humana por Assis et al (2008), e segundo Badaró et al (1996), o antígeno rK39 pode ser usado no diagnóstico sorológico da LV como um indicador da doença ativa.

Já o teste rápido imunocromatográfico DPP™, foi desenvolvido por Bio-Manguinhos (FIOCRUZ) em parceria com a Chembio (USA) para o diagnóstico rápido do calazar canino. Esta técnica, embora ainda experimental, mostrou-se mais sensível que as demais técnicas, de fácil manipulação e adaptada para ser utilizada no campo ou no laboratório. A leitura do dispositivo pode ser feita tanto sem auxílio de instrumentos, como com o leitor imunocromatográfico apropriado.

8.2.6 – Comparação entre as Técnicas Laboratoriais e o Padrão Ouro

A validade de uma técnica laboratorial pode ser aferida por meio de seu desempenho frente aos resultados obtidos com outras técnicas consideradas “verdadeiras” para determinada infecção/doença; essa técnica considerada “verdadeira” é denominada “padrão ouro”.

Para essa pesquisa, comparamos as análises, parasitológica (cultivo *in vitro*), sorológicas (RIFI, ELISA e DPPTM) e molecular (PCR), com o exame parasitológico direto, recomendado pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2006a), como padrão ouro.

Inicialmente, foram comparados em conjunto os resultados obtidos separadamente em cada uma das análises acima referidas. Entretanto, como o número de amostras provenientes dos cães variou, foi necessário reduzir esse número para um denominador comum, que foi nove (cães de nº 5, 16, 19, 26, 27, 31, 36, 40 e 42); essas amostras selecionadas são referentes às mesmas processadas na PCR. O critério de seleção dessas amostras foi baseado na combinação dos melhores resultados obtidos nas avaliações clínica (sinais clínicos compatíveis com a LVC) e laboratoriais (RIFI \geq 1:160 e parasitológico direto, cultivo *in vitro*, ELISA e DPPTM positivos).

Embora as amostras empregadas fossem positivas em três ou mais critérios, a PCR utilizando o papel de filtro impregnado com aspirado de tecido subcutâneo, como insumo, foi negativa. A utilização de outros insumos (sangue, soro, papel de filtro impregnao com sangue, fragmentos de pele, fígado e baço e punção de medula óssea e de linfonodos) garantiu a eficácia da técnica da PCR (Reale et al, 1999; Silva et al, 2001b; Manna et al, 2004; Francino et al, 2006; Nunes et al, 2007; Saridomichelakis et al, 2005; Andrade et al, 2006; Madeira et al, 2006; Silva et al, 2006; Tolezano et al, 2007; Gomes et al, 2007). Esse resultado pode ter sido devido ao volume insuficiente de infiltrado de tecido subcutâneo.

Diante dos resultados negativos encontrados na PCR, este foi excluído das comparações, enquanto os demais foram mantidos. Os resultados encontrados mostraram concordância com o parasitológico direto em: 41,18%, 53,49%, 69,77% e 79,07%, respectivamente, para o cultivo *in vitro*, RIFI, ELISA e o teste DPPTM.

A sensibilidade do cultivo *in vitro* foi de 42,86% (3/7) e especificidade de 40,0% (4/10). A análise desses resultados ficou prejudicada em função da eliminação das amostras recolhidas na primeira viagem. No entanto, a inserção dessa técnica foi orientada para a

caracterização bioquímica da espécie circulante de *Leishmania* na amostra do estudo. De fato, o cultivo *in vitro* não é regularmente utilizado em inquéritos ou para confirmação de diagnóstico devido à sua pouca praticidade.

O valor de sensibilidade encontrado neste estudo para a RIFI correspondeu a 44,44% (16/36), enquanto o valor de especificidade encontrado foi de 100% (7/7), quando comparada ao exame parasitológico direto (padrão ouro). Segundo as orientações contidas no kit IFI – Leishmaniose Visceral Canina de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, os valores esperados para sensibilidade e para especificidade são mais elevados, e oscilam em torno de 90% e 80%, respectivamente.

Silva et al (2006), em Belo Horizonte-MG, ao estudarem 103 cães, encontraram valores superiores de concordância. Os referidos autores encontraram sensibilidade de 61,02%, mas especificidade igual, 100%, quando compararam a RIFI com o padrão ouro utilizado no estudo (combinação de microscopia direta-cultura-PCR). A concordância entre ambas as reações foi de 77,67%, também mais elevada que a encontrada nessa pesquisa, que foi de 53,49%, acompanhada do coeficiente kappa igual a 0,57. Pode-se afirmar que os autores obtiveram resultados mais satisfatórios para o uso da RIFI no diagnóstico da LVC, em relação a esse estudo.

Quanto ao ensaio imunoenzimático, encontramos sensibilidade de 58,82% (10/17), e especificidade de 76,92% (20/26). Nesse caso, Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ tomou como padrão ouro a RIFI, em seu kit EIE-Leishmaniose Visceral Canina, e obteve 94,54% de sensibilidade e 91,76% de especificidade, valores também elevados. Quando o fabricante empregou o papel de filtro como substrato para coleta de sangue, encontrou percentuais um pouco mais baixos: 79,45% de sensibilidade e 90,24% de especificidade.

Lira et al (2006), ao compararem os kits EIE-Leishmaniose Visceral Canina e IFI-Leishmaniose Visceral Canina, ambos fabricados por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, encontraram sensibilidade de 72% para o ELISA e 68% para a RIFI, e especificidade de 87,5% para ambas as técnicas. Os autores concluíram que os resultados obtidos foram inferiores aos valores indicados pelo fabricante dos kits, tal como encontrado nesse estudo.

No teste rápido imunocromatográfico DPPTM, a sensibilidade encontrada correspondeu a 68,42% (13/19), e a especificidade, 87,5% (21/24). O DPPTM, como explicado anteriormente, ainda é um teste em fase experimental. No entanto, devido à sua praticidade para utilização no campo e no laboratório, e à sua relativa sensibilidade e elevada especificidade, podemos afirmar que se justifica sua introdução na busca de casos ativos de

calazar canino, como os verificados no presente estudo, quando todos (exceto o de nº 5) exibiam sinais clínicos (descamações, alopecia, onicogribose, lesões ulceradas e apatia).

Quando comparados ao padrão ouro, o valor preditivo positivo encontrado nas análises foram: no cultivo *in vitro* foi de 33,33% (3/9), para a RIFI, 100% (16/16), enquanto para o ELISA foi de 62,5% (10/16) e para o teste rápido DPPTM, 81,25% (13/16). O valor preditivo negativo calculado para os mesmos testes foram, respectivamente: 50,0% (4/8), 25,93% (7/27), 74,07% (20/27) e 77,78% (21/27).

A concordância total ou acurácia, medida entre os testes, revelou que no cultivo *in vitro* obteve-se a menor concordância: 41,18%, ou 58,82% de discordância. Nas demais reações, obtiveram-se, em ordem crescente, os seguintes valores de concordância e discordância, respectivamente: na RIFI, 53,49% e 46,51%; no ELISA, 69,77% e 30,23% e, finalmente, no DPPTM, 79,01% e 20,99%. O DPPTM apresentou a melhor concordância.

Os valores do índice Kappa (Landis e Koch, 1977), que medem a concordância retirando o efeito do acaso para aferir a confiabilidade dos testes, foram: $k=(-)0,16$ (cultivo *in vitro* – concordância pobre), $k=0,21$ (RIFI – concordância razoável), $k=0,36$ (ELISA – concordância razoável) e $k=0,57$ (DPPTM - concordância moderada). Podemos concluir que para esse estudo, que a concordância da técnica do cultivo *in vitro* com o parasitológico direto foi menor que o acaso, provavelmente em função do nº amostral baixo (sete). Quanto aos testes de RIFI e ELISA, ambos mostraram concordância razoável, terceira na escala de Landis e Koch (1977), quando o acaso foi próximo (RIFI) e menor (ELISA). Entretanto, no DPPTM, a concordância foi maior, significando que o acaso foi, ainda mais, inferior (Landis e Koch, 1977).

Os valores baixos encontrados para os coeficientes de concordância entre o padrão ouro e as técnicas RIFI (53,49%), ELISA (69,77%) e entre a RIFI e o ELISA (57,78%), ambas recomendadas pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2003), refletem a incerteza quanto aos resultados do diagnóstico laboratorial da LVC. Podendo ocasionar, até mesmo com frequência, resultados falso-positivos e falso-negativos. Desta forma, acreditamos que a realização das técnicas de RIFI e ELISA, mesmo em conjunto (Brasil, 2003), não se mostraram suficientemente confiáveis neste estudo, podendo incorrer em equívocos quando da notificação e consequente eliminação dos cães sororreagentes.

Quando analisamos os resultados do teste rápido imunocromatográfico DPPTM, embora apresentasse concordância moderada, o acaso foi inferior, revelando ser a técnica que obteve os melhores resultados quando comparada ao padrão ouro. Para esse estudo, o DPPTM

foi o teste mais confiável para ser utilizado, como diagnóstico de certeza de doença ativa canina, independentemente da presença de sinais clínicos característicos do calazar canino, como mencionado anteriormente.

Na comparação entre as técnicas de RIFI e ELISA, a concordância encontrada foi de 57,78%, com kappa igual a 0,24 (razoável) (Landis e Koch, 1977). Entretanto, Távora et al (2007) encontraram concordância bem superior, de 97,6% quando compararam esses testes para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp em cães errantes apreendidos em Campos dos Goytacazes-RJ, área presumivelmente de LTA. Nos dois estudos foram utilizados os kits elaborados por Bio-Manguinhos e que são adquiridos pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico do calazar canino no Brasil. Vale ressaltar que o Ministério da Saúde (Brasil, 2006a) preconiza a eutanásia dos animais, quando os mesmos são sororreagentes em ambas as análises.

Quando o ELISA foi comparado ao DPPTM a concordância positiva encontrada entre seus resultados foi de 86,67%, exibindo um Kappa de 0,73 e considerada uma concordância substancial (Landis e Koch 1977). Este foi o melhor índice de concordância Kappa verificado nesse estudo. Podemos presumir que na composição do antígeno do kit de ELISA (EIE – Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ), a proteína rK39 de *L. infantum* esteja presente.

Na comparação da técnica de RIFI (como padrão ouro) com o ELISA, utilizando como antígeno, o rK39_{HIS}, Scalone et al (2002) encontrou resultados altamente concordantes, 99,4% (156/157) nas amostras séricas de cães com ou sem sinais clínicos de infecção por *L. infantum*, no sudeste da Itália. A concordância pelo índice Kappa foi quase perfeita (k=0,89) (Landis e Koch, 1977), e o único soro que foi negativo no ELISA obteve título de 1:40 na RIFI.

A concordância alcançada nesse estudo para as análises de RIFI e DPPTM foi de 62,22%, com coeficiente Kappa igual a 0,28, o que significa concordância razoável (Landis e Koch, 1977). Interessante ressaltar que os resultados positivos do teste rápido DPPTM coincidiram com os resultados positivos da RIFI cujos títulos eram superiores a 1:160, exceto por dois com títulos de 1:40 e um soro com título de 1:80.

Otranto et al (2004) realizaram um estudo comparativo entre o teste rápido imunocromatográfico, dipstick, que utiliza a proteína rK39 e a RIFI, realizado com cães com parasitológico positivo, oriundos de área endêmica para o calazar na Itália. A concordância calculada, seguindo dados fornecidos pelos autores, foi de 98,53% e Kappa de 0,66, que

corresponde à concordância substancial (Landis e Koch, 1977). Valores superiores aos alcançados nesse estudo.

O teste DPPTM (68,42%) apresentou maior sensibilidade quando comparado às técnicas ELISA (58,82%) e RIFI (41,67%). Da mesma forma, quanto à especificidade, o teste DPPTM apresentou o maior valor, 87,5%, seguido pela RIFI (85,71%) e pelo ELISA (76,92%). Esses resultados nos permitem inferir que o DPPTM pode ser utilizado como o teste de eleição para o diagnóstico da LVC.

O DPPTM emprega em sua composição antigênica, entre outros antígenos, o rK39, extraído de *L. infantum* (sin *L. chagasi* para os autores) e comprovado como marcador de infecção ativa do calazar humano (Burns et al, 1993; Badaró et al, 1996) e da doença canina (Otranto et al, 2005).

Cada vez mais, procura-se desenvolver técnicas de diagnóstico que apresentem resultado rápido, sensível e específico, e que possam ser utilizadas em campo, em baixas condições de infra-estrutura. O TRALd é um teste rápido imunocromatográfico contendo rK39 como antígeno (Dourado et al, 2007) e foi testado por Genaro et al (1997) em cães de área endêmica de calazar em Minas Gerais. Embora os autores tenham observado elevadas sensibilidade (92%) e especificidade (99,5%), o teste, segundo os autores, não foi capaz de detectar infecção em cães que apresentaram títulos de imunofluorescência entre 1:40 e 1:320.

Otranto et al (2005) consideraram o teste imunocromatográfico Dipstick, com o antígeno rK39, uma ferramenta útil para o diagnóstico sorológico de leishmaniose canina, tanto em cães sintomáticos quanto em assintomáticos. Os autores ainda constataram a rapidez, a sensibilidade, a especificidade, e a utilidade do teste em condições de campo e em inquéritos de larga escala, além de ser importante também na rotina veterinária por demandar um mínimo de equipamentos e de treinamento do manipulador.

Em um estudo para a avaliação do antígeno recombinante K39, específico para as espécies do complexo *L. donovani* (Gontijo e Melo, 2004), como um marcador para as leishmanioses caninas, a técnica de ELISA com rK39 foi avaliada e padronizada, mostrando-se relativamente simples e rápida para a avaliação do status da infecção em cães, além de poder ser uma alternativa à técnica RIFI, principalmente ao se trabalhar com grande número de amostras. Interessante notar que o uso de uma proteína recombinante purificada e específica como o K39 permite uma melhor padronização do que a cultura de leishmania (Scalone et al, 2002).

Ainda nesse estudo, os anticorpos que reagiram com o rK39 eram mais comuns em infecções caninas assintomáticas do que em infecções subclínicas humanas para LV (Gontijo et al, 2002). Os autores observaram que, tanto a RIFI quanto o ELISA com o rK39, falharam em revelar anticorpos específicos quando se tratava de cães com infecção em estágio inicial, ao longo de um período variável de tempo (Scalone et al, 2002), o que é explicado por Acedo-Sánchez et al (1998) como latência sorológica, comum em cães, e diz respeito tanto ao período de incubação quanto ao período transiente de soroconversão negativa.

Porrozzi et al (2007) avaliaram, comparativamente, as técnicas de ELISA baseadas em antígenos recombinantes e brutos de *L. infantum* para o sorodiagnóstico de cães sintomáticos e assintomáticos. Os autores observaram que o rK39 utilizado no ELISA conferiu maior sensibilidade (100%) nas amostras provenientes dos animais sintomáticos, comprovando a elevada antigenicidade deste antígeno.

No presente estudo, houve concordância de 62,22% entre o teste rápido imunocromatográfico DPPTM e a RIFI, e de 86,67% quando o DPPTM foi comparado ao ELISA. Embora com uma amostragem de 45 soros, esse resultado pode apontar para a possibilidade de compartilhamento de antígenos comuns entre as duas técnicas. Nesse caso, o DPPTM poderia, no futuro, substituir o ELISA como uma das técnicas recomendadas pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LVC, que ainda traz a vantagem de ser um teste rápido e apropriado ao campo.

Quanto ao valor preditivo positivo encontrado, a RIFI apresentou o valor mais expressivo, 93,75%, seguida pelo teste DPPTM (81,25%) e pelo ELISA (62,5%). No entanto, o valor preditivo negativo mostrou comportamento diferente: o valor mais expressivo encontrado foi o do teste DPPTM, 77,78%, seguido pelo ELISA (74,07%) e pela RIFI (22,22%).

Reithinger et al (2002), ao estudarem cães de Capitão Eneas-MG, área endêmica para *L. infantum*, encontraram 100% de especificidade para o ELISA e para a PCR, enquanto a sensibilidade do ELISA oscilou entre 71% e 88%, e a sensibilidade da PCR, entre 51 e 64%. Os autores encontraram sensibilidade de 72% a 77% para o teste rápido imunocromatográfico com rK39, e especificidade de 61% a 75%. As amostras testadas em condições de campo apresentaram 53% de positividade para o teste rápido com rK39, 37% para o ELISA e 27% para a PCR. Os valores preditivos positivo e negativo do teste rápido foram de 58% a 77% e 75%, respectivamente. Os autores concluíram que o teste rápido imunocromatográfico com rK39 pode ser uma alternativa vantajosa quanto ao custo-benefício frente aos testes

diagnósticos disponíveis, especialmente quando em inquéritos. O teste possibilita o processamento de um grande número de amostras rapidamente com mínimo de esforço, além de demandar treinamento técnico básico para sua realização quando comparado à microscopia ótica, ao ELISA e à PCR, apesar de ser comparativamente oneroso.

Bisugo et al (2007) empregaram o teste rápido imunocromatográfico com rK39 e o compararam com as técnicas sorológicas RIFI e ELISA em cães de municípios paulistas com transmissão de LV. Para as amostras de soro, a positividade do teste com rK39 foi de 31,3%, e para as amostras de sangue total, 17,4%. A positividade para a RIFI foi de 25,1% e para o ELISA, 27,2% das amostras. No entanto, quando realizado com sangue total e em condições de campo, o teste rápido com rK39 não demonstrou boa performance quando comparado com o mesmo teste realizado com soro e, portanto, em condições de laboratório, com a RIFI e com o ELISA. Segundo os autores, o teste rápido com rK39 foi negativo nas amostras provenientes de cães domiciliados nos municípios autóctones para LTA e em cães portadores de outras mazelas, o que reforça a especificidade do teste rápido com rK39 para definição do complexo *L. donovani*. Os autores afirmaram que o teste rápido com rK39, ao empregar soro como substrato, mostrou-se ensaio simples, rápido, de baixo custo, e satisfatoriamente específico para as espécies do complexo *Leishmania donovani*, sendo, desta forma, adequado para ser empregado como técnica alternativa de triagem diagnóstica.

Em função dos resultados obtidos neste estudo, confirmamos que o teste rápido imunocromatográfico DPPTM foi capaz de detectar com maior frequência os cães com suspeita de infecções por *Leishmania infantum*, quando comparado com as técnicas de RIFI e ELISA. Essa assertiva é comprovada pelo percentual de 79,07% de concordância entre o DPPTM e o padrão ouro, enquanto entre o ELISA e o padrão ouro apresentaram percentual de 69,77% de concordância, e entre a RIFI e o padrão ouro, 53,49%.

O teste DPPTM, realizado com soro canino, apresentou elevada concordância com as técnicas sorológicas RIFI e ELISA, sendo também capaz de identificar cães sororreagentes assim como essas, além de ter-se mostrado mais sensível e específico, com maior valor preditivo negativo que as mesmas, e ainda com satisfatório valor preditivo positivo.

O teste imunocromatográfico DPPTM foi desenvolvido por Bio-Manguinhos em parceria com a Chembio (USA), e mostrou-se de realização simples e rápida quando em laboratório, permitindo o diagnóstico do calazar canino com leitura fácil e demandando pouca capacitação técnica. O teste DPPTM permite, ainda, que as intervenções ocorram *in situ*, uma

vez que o resultado pode ser visto no momento da realização do teste pelos proprietários dos cães.

De acordo com Dye, Vidor e Dereure (1993), até os métodos sorológicos mais eficientes perderão mais de 20% de positividade em estágios iniciais. Portanto, técnicas sorológicas deveriam ser complementadas por outras técnicas (Campino et al, 2000), e também entre si. Para o diagnóstico confiável da LVC, é necessário haver a confirmação do diagnóstico por mais de uma técnica diagnóstica, daí a importância conferida à complementariedade entre os testes. Desta forma, acreditamos que o teste DPPTM, pelo presente estudo, configura-se como um método diagnóstico adequado, e poderia ser preconizado pelo Ministério da Saúde, em substituição à RIFI e ao ELISA, especialmente quando em inquéritos caninos em áreas endêmicas para LVC.

8.3 – PCR de aspirado de tecido subcutâneo impregnado em FTA® Card

A utilização da técnica de PCR para o diagnóstico do calazar canino tem se mostrado eficiente, segundo alguns autores, que empregam como insumos: sangue (Reale et al, 1999; Silva et al, 2001b; Manna et al, 2004; Francino et al, 2006; Nunes et al, 2007), medula óssea (Saridomichelakis et al, 2005; Francino et al, 2006; Andrade et al, 2006), biópsia de tecido cutâneo (Manna et al, 2004; Madeira et al, 2006; Andrade et al, 2006; Tolezano et al, 2007; Gomes et al, 2007) e de baço e fígado (Andrade et al, 2006; Tolezano et al, 2007; Gomes et al, 2007) e linfonodos (Reale et al, 1999; Manna et al, 2004; Andrade et al, 2006; Tolezano et al, 2007; Gomes et al, 2007).

A conjugação desta técnica com o papel de filtro FTA Card, impregnado com os insumos acima referidos, mostrou-se um excelente conjunto para o diagnóstico, principalmente para utilização no campo (Silva et al, 2004). A elevada carga parasitária presente em tecido subcutâneo de animais infectados com *L.infantum* (sin *L.chagasi* para Deane, 1956) nos levou a acreditar na possibilidade de diagnosticar a LVC, por PCR, utilizando papel de filtro FTA® Card, porém substituindo os insumos conhecidos pelo aspirado de tecido subcutâneo.

Esse procedimento foi realizado em 44 cães da amostra e selecionamos nove (nº 5, 16, 19, 26, 27, 31, 36, 40 e 42) para a análise pela PCR multiplex, segundo os critérios clínicos (exceto o de nº 5) e laboratoriais, como títulos elevados, em torno de 1:160 na RIFI, positivos

pelo ELISA, pelo DPPTM (P2 e P3) e pelo parasitológico direto (exceto os de nº 27 e 42), encontrados nesse estudo. Foram selecionados os cães que apresentavam melhor combinação de resultados clínico-laboratoriais.

Importante acrescentar que a opção pelos *primers* empregados e pelo ciclo da PCR multiplex é devida aos achados de Harris et al (1998), segundo os quais o ensaio utilizado mostrou-se útil para a identificação de *Leishmania* sp em raspados de lesões cutâneas de leishmanioses, particularmente quando diferentes complexos do parasita eram encontrados na mesma área geográfica.

Houve formação da banda, referente ao controle positivo, com a cepa de *Leishmania infantum* (IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75), equivalente a 351 a 397 pares de base (pb). Porém, houve formação de uma segunda banda, entre 100 e 200pb, também referente ao mesmo controle positivo, mas que foi devida à ação sobreposta dos *primers* específicos empregados. É provável que os *primers* específicos LB-3C, LM-3A e LC-3L, que deveriam, junto com o *primer* universal LU-5A, amplificar fragmentos de DNA específicos dos Complexos de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania donovani*, respectivamente, acabaram formando pares entre si: LB-3C e LM-3A, LB-3C e LC-3L, e LM-3A e LC-3L, amplificando o fragmento de DNA inespecífico e indesejado, resultando na formação da banda entre 100 e 200 pb.

Os *primers* utilizados nesse estudo foram os mesmos empregados por Harris et al (1998) para a identificação simultânea de três complexos de *Leishmania* (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania donovani*), em apenas uma única etapa da PCR multiplex. Segundo os autores, essa metodologia é específica para o gênero *Leishmania*, não sendo capaz de reconhecer protozoários como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* ou *Crithidia fasciculata*, e consiste na formação de produtos da PCR com tamanhos diferentes para cada complexo. A metodologia conseguiu minimizar o material necessário para análise e maximizar a simplicidade, rapidez e conteúdo informativo de modo a tornar possível sua utilização em laboratórios de áreas endêmicas.

A PCR é uma técnica diagnóstica mais precisa que a microscopia para a detecção da *Leishmania* em aspirados de linfonodos e medula óssea, sendo especialmente útil para a confirmação de casos suspeitos de LV (Osman et al, 1997). Assim como a coleta de sangue através de uma única picada no dedo de indivíduos, o aspirado de tecido subcutâneo em cães é muito menos invasivo e de simples obtenção que a punção de medula óssea, de baço e de linfonodos (Osman et al, 1997).

Resultados positivos e satisfatórios foram obtidos com a PCR a partir de biópsias de pele de cães com LV (Manna et al, 2004; Oliveira et al, 2005; Andrade et al, 2006; Gomes et al, 2007; Tolezano et al, 2007; Quaresma et al, 2009). Madeira et al (2004) afirmaram que o parasitismo cutâneo é encontrado na pele íntegra de cães naturalmente infectados com *L.(L.) infantum* (sin *L.(L.) chagasi* para os autores), independentemente da presença de sinais clínicos sugestivos de LV. Os autores utilizaram fragmentos de pele íntegra dos cães estudados, e encontraram o parasita na pele íntegra do abdômen desses animais.

Manna et al (2004) também encontraram resultados que sugerem que a amostra de pele é a melhor opção para o diagnóstico baseado na PCR (fragmento 116 pb da região conservada do kDNA) e o acompanhamento da LVC. Para Andrade et al (2006), o maior valor encontrado para a sensibilidade da técnica PCR foi para amostras de fragmento de pele (87,2%) em detrimento das amostras de baço (84,6%), fígado (80%), linfonodos (76,9%) e medula óssea (66,7%).

De fato, a técnica da PCR ou mesmo a PCR multiplex são vistas por muitos autores como eficientes para o diagnóstico rápido da LV e que poderia ser incluída nos programas de vigilância e controle da doença (Silva et al, 2001b; Silva et al, 2004; Gomes et al, 2007), principalmente, introduzindo o papel de filtro como insumo. O papel de filtro FTA® Card mostrou ser de simples utilização e armazenamento, ideal para o trabalho de campo, podendo permanecer em temperatura ambiente, 25°C, acondicionado em recipientes comuns como vasilhames de plástico ou sacos plásticos, devendo apenas ser mantido sem umidade (Rab e Evans, 1997; Marques et al, 2001; Silva et al, 2004; Romero et al, 2009).

Apesar dos resultados negativos obtidos nesse estudo, o controle positivo, com a cepa de referência IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75) de *L. (L.) infantum*, se confirmou, comprovando, assim, a integridade da reação de PCR multiplex realizada simultaneamente com as amostras.

Considerando o intenso tropismo parasitário detectado em tecido cutâneo e subcutâneo de cães infectados por *L. infantum*, facilitando, assim, a infecção dos flebotomíneos, a impossibilidade de detectar os parasitos pode ainda ter sido causada pelo protocolo empregado. Acreditamos que este requeira ajustes (como de temperatura, número de ciclos, quantidade de MgCl₂, entre outros), quando da utilização do papel de filtro embebido em aspirado subcutâneo para a eficiência da técnica no diagnóstico do calazar canino.

8.4 – Caracterização Bioquímica

A eletroforese de isoenzimas foi empregada visando à caracterização da espécie de *Leishmania* circulante nos cães reunidos para esse estudo, provenientes da área urbana da capital Cuiabá-MT. A partir das amostras positivas, quando cultivadas em meio de NNN com Schneider e suplementado com soro fetal bovino, as culturas foram expandidas para obtenção de massa parasitária e posterior caracterização bioquímica pela técnica de eletroforese de isoenzimas.

Quando foram utilizadas as enzimas IDH (Isocitrato desidrogenase, E.C.1.1.1.42), PGM (Fosfo-glucose-mutase, E.C.1.4.1.9), G6PDH (Glicose-6-fosfato-desidrogenase, E.C.1.1.1.49) e NH (Nucleotidase, E.C.3.2.2.1), para a realização da eletroforese de isoenzimas, não obtivemos visualização satisfatória dos géis revelados. Porém, quando foi empregada a isoenzima 6PGDH (6-fosfo-glicose-desidrogenase, E.C.1.1.1.43), esta se mostrou satisfatória para a caracterização da espécie de *Leishmania* presente nas amostras selecionadas, confirmando o perfil da *Leishmania (Leishmania) infantum*, como responsável pelo calazar canino nas amostras selecionadas.

Dentre as técnicas de caracterização da espécie de *Leishmania* em amostras biológicas, está também a hibridização (Silva et al, 2004) e os diversos tipos de PCR (Gomes et al. 2007). A realização da caracterização, obtida a partir da eletroforese de isoenzimas, envolve procedimentos de longa duração e que podem ser onerosos (Antinori et al, 2007), dependendo do número de enzimas utilizadas (Cupolillo, Grimaldi e Momen, 1994) e demandam o cultivo de leishmanias em larga escala, bem como aparato laboratorial sofisticado (Harris et al, 1998). Ainda assim, a eletroforese de isoenzimas tem se mostrado valiosa para a caracterização de diferentes espécies de *Leishmania* (Madeira et al. 2006).

No Brasil, onde a LVC é encontrada, a espécie incriminada é a *Leishmania infantum*. Porém, Toledo et al. (2007) identificou a espécie *Leishmania amazonensis* como a responsável pelo quadro de calazar apresentado por um cão. Esse registro confirma a relevância da caracterização da espécie nos estudos envolvendo cães em áreas de calazar ou mesmo silenciosas, como contribuição ao conhecimento do gênero *Leishmania* e como medida de (re)orientação das medidas de vigilância epidemiológica para o controle das leishmanioses.

9 – CONCLUSÕES

- A amostra consistiu em 45 cães, doados ao CCZ-Cuiabá. Não houve diferença entre os sexos (51,11% de machos e 48,9% de fêmeas). Todos possuíam idade estimada superior a seis meses, sendo a maioria adultos, e sem raça definida (75,5%). O maior número de animais procedia da região norte (56,25%). Essa região apresentou, também, o maior número de cães infectados (56,25%).
- Os sinais clínicos verificados nos cães amostrados, provenientes de área urbana de Cuiabá, em ordem decrescente de frequência, foram: descamação (53,33%), alopecia (44,44%), lesões ulceradas (40%), caquexia (26,67%), onicogribose (26,67%), mucosas hipocoradas (26,67%), ceratoconjuntivite (26,67%) e apatia (13,33%).
- Os resultados positivos, obtidos pelas técnicas exame parasitológico direto, cultivo *in vitro*, RIFI, ELISA e DPPTM, corresponderam a: 37,21% (16/43), 44,44% (8/18), 84,44% (38/45), 42,22% (19/45) e 46,67% (21/45), respectivamente.
- O cultivo *in vitro* apresentou sensibilidade de 42,86% (3/7), especificidade de 40% (4/10), valores preditivos positivo e negativo, respectivamente, iguais a 33,33% (3/9) e 50% (4/8), e concordância de 41,18% com o padrão ouro (k= - 0,16).
- A RIFI apresentou sensibilidade de 44,44% (16/36), especificidade de 100% (7/7), valores preditivos positivo e negativo, respectivamente, iguais a 100% (16/16) e 25,93% (7/27), e concordância de 53,49% com o padrão ouro (k=0,21).
- A técnica ELISA apresentou sensibilidade de 58,82% (10/17), especificidade de 76,92% (20/26), valores preditivos positivo e negativo, respectivamente, iguais a 62,5% (10/16) e 74,07% (20/27), e concordância de 69,77% com o padrão ouro (k=0,36).
- O teste rápido imunocromatográfico DPPTM apresentou sensibilidade de 68,42% (13/19), especificidade de 87,5%, valores preditivos positivo e negativo, respectivamente, iguais a 81,25% (13/16) e 77,78% (21/27), e concordância de 0,57.

- A concordância de 57,78% ($k=0,24$) foi detectada entre as técnicas ELISA e RIFI. Entre ELISA e o teste rápido imunocromatográfico DPPTM, a concordância foi de 86,67% ($k=0,73$) e, finalmente, entre a RIFI e o teste rápido imunocromatográfico DPPTM, houve concordância de 62,22% ($k=0,28$).
- O teste rápido imunocromatográfico DPPTM mostrou-se mais sensível e específico que os testes RIFI e ELISA, e apresentou a maior confiabilidade dentre os três.
- O teste rápido imunocromatográfico DPPTM foi, nesta pesquisa, um bom preditor de infecção/doença ativa nos cães amostrados.
- O protocolo empregado para a realização da PCR multiplex, a partir do papel de filtro FTA® Card, impregnado com aspirado de tecido subcutâneo de nove cães amostrados nesta pesquisa, não obteve resultados positivos, necessitando de ajustes.
- A espécie de *Leishmania* circulante entre os cães amostrados, provenientes de área urbana de Cuiabá, é a *Leishmania infantum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEDO-SÁNCHEZ, C.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F.; SANHÍZ-MARIN, M.C.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J. Changes in antibody titers against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. *Veterinary Parasitology*, v.75, p.1-8, 1998.
- ALENCAR, J.E. *Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil*. 1959. 342 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza: Imprensa Oficial.
- 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 soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.42, n.2, p.156-159, mar-abr 2009.
- 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. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, n.20, v.1, p.259-265, jan-fev 2004. Disponível em: <<http://scielosp.org/csp.htm>>. Acesso em: 15 out 2008.
- AMÓRA, S.S.A., SANTOS, M.J.P., ALVES, N.D., GONÇALVES DA COSTA, S.C., CALABRESE, K.S., MONTEIRO, A.J, ROCHA, M.F.G. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.6, p.1854-1859, nov-dez 2006.
- ANDRADE, H.M.; REIS, A.B.; SANTOS, S.L.; VOLPINI, A.C.; MARQUES, M.J.; ROMANHA, A.J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Veterinary Parasitology*, n. 140, p.231-238, mar 2006.
- ANTINORI, S.; CALATTINI, S.; LONGHI, E.; BESTETTI, G.; PIOLINI, R.; MAGNI, C.; ORLANDO, G.; GRAMICCIA, M.; ACQUAVIVA, V.; FOSCHI, A.; CORVASCE, S.; COLOMBA, C.; TITONE, L.; PARRAVICINI, C.; CASCIO, A.; CORBELLINO, M. Clinical use of polimerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV- uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, v. 44, p. 1602-1610, 2007.
- ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDE, J.C.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JR, R.H.; BADARÓ, R.; DAVID, J.R. Comparison of the Polimerase Chain Reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 53, p. 251-255, set 1995.
- ASSIS, T.S.M., BRAGA, A.S.C., PEDRAS, M.J., BARRAL, A.M., SIQUEIRA, I.C., COSTA, C.H.N., COSTA, D.L., HOLANDA, T.A., SOARES, V.Y.R., BIÁ, M., CALDAS, A.J.M., ROMERO, G.A.S. RABELLO, A. Validação do teste

imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v.17, n.2, abr-jun 2008.

- BADARÓ, R. *Desenvolvimento e utilização de um antígeno recombinante específico de Leishmania chagasi rK39 no diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral*.1996. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias)- Universidade de São Paulo, São Paulo *apud* DOURADO, Z.F., SILVA, H.D., SILVEIRA-LACERDA, E.P., GARCÍA-ZAPATA, M.T.A. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). *Revista de Patologia Tropical*, v.36, n.3, set-dez 2007, p.208.
- BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M.C.; FREIRE, M.; 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. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 173, p. 758-761, 1996.
- BARROS, C.L.S. Sistema Hemopoético. In:____. *Patologia Veterinária Especial de Thomson*. 2ª Edição. Porto Alegre: ArtMed, p.345, 1998.
- BARROSO-FREITAS, A.P.T.; PASSOS, S.R.L.; MOUTA-CONFORT, E.; MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; SANTOS, G.P.L.; NASCIMENTO, L.D.; MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, p.383-389, 2009.
- BISUGO, M.C., ARAÚJO, M.F.L., TANIGUCHI, H.H., CUNHA, E.A., SANTOS, A.A., SPESSOTO JUNIOR, M., KANETO,N.C., CAMARGO,V.O.C., POLIZEL, M.A., VIGILATO, M.A.N., NEGREIROS, M.S.C., OKAGIMA, M., GONÇALVES, N.M., LUNDSTEDT, L.P., ANDRADE, A.M., LIMA, V.M.F., TOLEZANO, J.E. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.66, n.2, p. 185-193, 2007.
- BOELAERT, M.; EL-SAFI, S.; HAILU, A.; MUKHTAR, M.; RIJAL, S.; SUNDAR, S.; WASUNNA, M.; ASEFFA, A.; MBUI, J.; MENTEN, J.; DESJEUX, P.; PEELING, R.W. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, p. 32 – 40, 2008.
- BOTELHO, A.C.A; NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 5, p.503 – 508, 2009.
- BRAGA, M.D.M.; COELHO, I.C.B.; POMPEU, M.M.L.; EVANS, T.G.; MACAULLIFE, I.T.; TEIXEIRA, M.J.; LIMA, J.W.O. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de

imunofluorescência indireta de eluato de papel de filtro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [S.l.], v.31, n.5, p.419-424, set-out 1998.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução Nº 714, de 20 de junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Leishmaniose Visceral Grave: normas e condutas*. 1.ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 60p., 2006a .

Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lv_grave_nc.pdf>.

Acesso em: 25 jun 2008.

_____. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. 1.ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 120 p., 2006b.

Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf>.

Acesso em: 18 jun 2008.

_____. *Informações técnicas*.

Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27082>.

Acesso em 31 out 2008a.

_____. *Informações gerais – o que todos devem saber*.

Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27081>.

Acesso em 31 out 2008b.

_____. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 120 p., 2003.

BURNS JR, J.M.; SHREFFLER, W.G.; BENSON, D.R.; GHALIB, H.W.; BADARÓ, R.; REED, S.G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, p. 775-779, jan 1993.

CÂMARA MUNICIPAL DE CUIABÁ – ESTADO DE MATO GROSSO

Disponível em: <http://www.camaracba.mt.gov.br/index.php?pag=news_ler&id=203>

Acesso em 17 mar 2010.

CAMARGO-NEVES, V.L.F. de; SANTUCCI, S.G. *Leishmaniose Visceral Americana – Informações para Profissionais da Saúde*. SUCEN, São Paulo, 2001.

Disponível em:

<http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish_visc/texto_leish_visc_pro.htm>

Acesso em: 20 jun 2008.

- CAMARGO-NEVES, V.L.F. *Leishmaniose visceral americana: doença emergente no Estado de São Paulo*. Comciência – Revista Eletrônica de Jornalismo Científico. Disponível em: < <http://www.comciencia.br/reportagens/2005/06/17.shtml>>. Acesso em: 20 jun 2008.
- CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G.; RIÇA CAPELA, M.J.; CORTES, S.; ABRANCHES, P. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v.92, p.269-275, 2000.
- COSTA, C.H.N.; GOMES, R.B.B.; SILVA, M.R.B.; GARCEZ, L.M.; RAMOS, P.K.S.; SANTOS, R.S.; SHAW, J.J.; DAVID, J.R.; MAGUIRE, J.H. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *The Journal of Infectious Diseases*, v.182, p. 997-1000, set 2000.
- CUNHA, A.M. Infecções experimentaes na Leishmaniose visceral americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 33, n. 4, p.581-598, 1938.
- CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JÚNIOR, G.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.50, n.3, p.296-311, 1994.
- D`ANDREA, L.A.Z.; CAMARGO-NEVES, V.L.F.; SAMPAIO, S.M.P.; KRONKA, S.N.; SARTOR, I.F. American visceral leishmaniasis: disease control strategies in Dracena microregion in Alta Paulista, SP, Brazil. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, v.15, n. 2, p.305-324, 2009.
- DANTAS-TORRES,F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, n.1, p.117-118, fev 2006.
- DANTAS-TORRES,F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 4, p.352-356, jul-ago 2006.
- DANTAS-TORRES,F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors*, v.2, [s. 1], mar 2009. Disponível em < <http://www.parasitesandvectors.com/content/2/s1/s1> >. Acessado em 08 jul 2009.
- DEANE, L.M. *Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará*. 1956. 162p. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DELGADO, O.; CASTES, M.; WHITE JUNIOR, A.C.; KREUTZER, R.D. *Leishmania colombiensis* in Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.48, p.145-147, 1993.
- DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, v. 25, n.5, p.1240 -1242, nov 1997.

- DIRO, E.; TECHANE, Y.; TEFERA, T.; ASSEFA, Y.; KEBEDE, T.; GENETU, A.; KEBEDE, Y.; TESFAYE, A.; ERGICHO, B.; GEBRE-YOHANNES, A.; MENGISTU, G.; ENGERS, H.; ASEFFA, A.; DESJEUX, P.; BOELAERT, M.; HAILU, A. Field evaluation of FD-DAT, rK39 dipstick and KATEX (urine latex agglutination) for diagnosis of visceral leishmaniasis in northwest Ethiopia. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 101, p.908 e 914, 2007.
- DOURADO, Z.F., SILVA, H.D., SILVEIRA-LACERDA, E.P., GARCÍA-ZAPATA, M.T.A. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). *Revista de Patologia Tropical*, v.36, n.3, p.205-214, set-dez 2007.
- DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiological Infection*, n. 103, p.647-656, 1993.
- FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L. Reservatórios extra-humanos do Complexo Leishmânia e dinâmica de transmissão da infecção ao homem. (Org) José Rodrigues Coura. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.1, cap.55, p.739-752, 2005.
- FERNANDES, C.G.N.; RODRIGUES-SILVA, R.; MOURA, S.T.; OLIVEIRA, R.M.F. Aspectos epidemiológicos da dirofilariose canina no perímetro urbano de Cuiabá, Mato Grosso: emprego do "Immunoblot" e do teste de Knott modificado. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 37, n. 6, dez 2000. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962000000600009&lng=pt&nrm=iso. Acesso em 18 mar 2010.
- FIGUEIREDO, F.B.; BONNA, I.C.F.; NASCIMENTO, L.D.; COSTA, T.; BAPTISTA, C.; PACHECO, T.M.V.; AMENDOEIRA, M.R.R.; MADEIRA, M.F. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.42, n.2., p.141-145, mar-abr 2009.
- FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.
- FREITAS, E.; MELO, M.N.; COSTA-VAL, A.P.; MICHALICK, M.S.M. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, v. 137, p. 159 – 167, 2006.
- GALATI, E.A.B., NUNES, V.L.B., REGO, F.A., OSHIRO, E.T., CHANG, M.R. Estudo de flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.31, n.4, p.378-390, 1997.
- GOMES, A.H.S.; FERREIRA, I.M.R.; LIMA, M.L.S.R.; CUNHA, E.A.; GRACIA, A.S.; ARAÚJO, M.F.L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v.144, p. 234 – 241, 2007.

- GOMES, Y.M.; CAVALCANTI, M.P.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, v.175, p.45-52, 2008. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 23 set 2008.
- 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 – 349, 2004.
- GRADONI, L.; SCALONE, A.; GRAMICCIA, M. HIV-*Leishmania* co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 87, p. 94-96, 1993.
- HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AGABIAN, N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 7, p. 1989 – 1995, jul 1998.
- IATA. International Air Transport Association, 2010. Dangerous goods regulations. 51st Edition.
- INMETRO. Princípios das Boas Práticas de Laboratório – BPL. Norma NIT-DICLA-035, aprovada em julho de 2009. Revisão nº 1, p. 1- 19. Estabelece os requisitos a serem utilizados pelas instalações de teste e adaptados pela Cgcre/ Inmetro para o reconhecimento da conformidade destas instalações aos Princípios das Boas Práticas de Laboratório – BPL.
- LANDIS, J.R., KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v.33 , p.159-174, 1977.
- LEMO, E.M., CARVALHO, S.F.G., COREY, R., DIETZE, R. Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante k39 no diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.36, supl.2, 2003.
- LIRA, R.A.; CAVALCANTI, M.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-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Veterinary Parasitology*, v. 137, n. 1-2, p.11-16, abr 2006.
- MADEIRA, M.F. ; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T.M.P.; LEAL, C.A.; MARZOCHI, M.C.A. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.8, n.6, p.440-444, dez 2004.
- MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T.M.P.; PACHECO, R.S.; OLIVEIRA, F.S.; PEREIRA, S.A.; FIGUEIREDO, F.B.; BAPTISTA, C.; MARZOCHI, M.C.A. 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, Rio de Janeiro, v.100, p.442-445, 2006.

- MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Itália, v. 82, n. 4, p. 566-567, 1988.
- MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L.M.; MORTE, R.D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A.E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis *Veterinary Parasitology*, Itália, vol.125, p.251-262, jul 2004.
- MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Leishmanioses em áreas urbanas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [S.l.], v.30, p. 162-164, 1997.
- MAURÍCIO, I.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, v. 119, p.237 – 246, 1999.
- MAURÍCIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, v. 16, p. 188 – 189, 2000.
- MESTRE, G.L.C.; FONTES, C.J.F. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005 *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, São Paulo, v.40, n.1, p.42-48, jan-fev 2007.
- MISSAWA, N.A.; BORBA, J.F. Leishmaniose visceral no município de Várzea Grande, Estado do Mato Grosso, no período de 1998 a 2007. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 5, p. 496 – 502, 2009.
- MISSAWA, N.A.; LIMA, G.B.M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 4, p.337-340, jul-ago 2006.
- MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*, Araçatuba, v. 145, p.245-252, 2007.
- 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*, São Paulo, v. 36, n.2, p. 101-102, 1999.
- MÜLLER, D.C.M.; PIPPI, N.L.; BASSO, P.C.; OLSSON, D.C.; JUNIOR, E.B.S.; GUERRA, A.C.O. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2243 – 2251, 2009.

- NASCIMENTO, M.D.S.B.; SOUZA, E.C.; SILVA, L.M.; LEAL, P.C.; CANTANHEDE, K.L.; BEZERRA, G.F.B.; VIANA, G.M.C. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermorreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 21, n. 6, p.1801 – 1807, 2005.
- NUNES, C.M.; DIAS, A.K.K.; GOTTARDI, F.P.; PAULA, H.B.DE; AZEVEDO, M.A.A. DE; LIMA, V.M.F. DE; GARCIA, J.F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para o diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Araçatuba, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.
- OLIVEIRA, C.L.; COSENZA, G.W.; GESTEIRA, S.M. A epidemia de leishmaniose visceral em Belo Horizonte, de 1993 a 1996. *XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Resumo 81, 1997.
- OLIVEIRA, F.S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M.Q.; BRAZIL, R.P.; PACHECO, R.S. PCR-diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology*. V. 129, p. 219-227, 2005.
- OLIVEIRA, S.S.; ARAÚJO, T.M. Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em uma área endêmica do Estado da Bahia, Brasil (1995-2000). *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.19, n.6, p.1681-1690, nov-dez 2003. Disponível em: <<http://scielosp.org/csp.htm>>. Acesso em: 23 set 2008.
- OLSSON, D.C.; PIPPI, N.L.; MARTINS, D.B.; TOGNOLI, G.K.; JR, E.B.S.; MÜLLER, D.C.; LOPES, S.T.A.; MARCONATO, F.; MÖRCHBÄCHER, P.D.; TEIXEIRA, L.V. Colheita de medulla óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células mononucleares. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, p. 56 – 59, 2008.
- OSMAN, O.F.; OSKAM, L.; ZIJLSTRA, E.E.; KROON, N.C.M.; SCHOONE, G.J.; KHALIL, E.A.G.; EL-HASSAN, A.M.; KAGER, P.A. Evaluation of PCR for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 10, p.2454 – 2457, out 1997.
- OTRANTO, D.; PARADIES, P.; SASANELLI, M.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. Rapid Immunochromatographic Test for Serodiagnosis of Canine Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 6, p. 2769-2770, jun 2004.
- OTRANTO, D.; PARADIES, P.; SASANELLI, M.; LEONE, N.; CAPRARIIS, D.; CHIRICO, J.; SPINELLI, R.; CAPELLI, G.; BRANDONISIO, O.; Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.17, p. 32-37, 2005.
- OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B.; Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitology Today*, v. 9, p.150 – 153, 1993.
- PACHECO, R.S.; MARZOCHI, M.C.A.; PIRES, M.Q.; BRITO, C.M.M.; MADEIRA, M.F.; BARBOSA-SANTOS, E.G.O. Parasite Genotypically related to a monoxenous trypanosomatid of dog's flea causing opportunistic infection in an HIV positive patient.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.93, n.4, p.531-537, jul-ago 1998.

PACHECO, R.S.; BARBOSA-SANTOS, E.G.O.; BRITO, C.M.M.; PIRES, M.Q.; MARZOCHI, M.C.A. Epidemiological and genotypical mapping of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraguay, *Journal of Protozoology Research*, [S.l.], v.9, p.76-87, 1999.

PALMEIRA, G. Epidemiologia. In: Rozenfeld, S. (Org.). Fundamentos da Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. p.135-194.

PENNA, H.A. Leishmaniose Visceral no Brasil. *Brasil-Médico*, n.46, p.949-950, nov 1934.

PEDRAS, M.J.; VIANA, L.G.; OLIVEIRA, E.J.; RABELLO, A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, p.172-178, 2008.

PINTO, I.S.; SANTOS, C.B.; GRIMALDI JR, G.; FERREIRA, A.L.; FALQUETO, A. American visceral leishmaniasis dissociated from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 26, n. 2, p. 365-372, fev 2010.

PORROZZI, R.; COSTA, M.V.S.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.D.; FERNANDES, A.P.; GAZZINELLI, R.T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI JR, G. Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Based on Crude and Recombinant Leishmanial Antigens for Serodiagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania infantum* Visceral Infections in Dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*, v.14, n.5, p.544-548, mai 2007.

PRATA, A.; SILVA, L.A. Calazar. (org) José Rodrigues Coura. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.1, cap.53., p.713-732, 2005.

PREFEITURA DE CUIABÁ. Disponível em: <www.mt.gov.br>. Acesso em 20 jan 2010.

QUARESMA, P.F.; MURTA, S.M.F.; FERREIRA, E.C.; ROCHA-LIMA, A.C.V.M.; XAVIER, A.A.P.; GONTIJO, C.M.F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica*, doi:10.1016/j.actatropica.2009.05.008, 2009.

QUEIROZ, P.V.S.; MONTEIRO, G.R.G.; MACEDO, V.P.S.; ROCHA, M.A.C.; BATISTA, L.M.M.; QUEIROZ, J.W.; JERÔNIMO, S.M.B.; XIMENES, M.F.F.M. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Research in Veterinary Science*, v. 86, p.267-273, 2009.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J.J.; SHAW, M.-A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum*

by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*, [S.l.], v.122, n.3, p.253-261, mar 2001.

- RAB, A.M.; EVANS, D.A. Detection of anti-*Leishmania* antibodies in blood collected on filter paper by the direct agglutination test. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 91, p. 713-715, 1997.
- REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N.S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *Journal of Clinical Microbiology*, Palermo, v.37, n.9, p.2931-2935, set 1999.
- REITHINGER, R.; QUINELL, R.J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C.R. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2352-2356, jul 2002.
- ROMERO, G.A.S.; NORONHA, E.F.; PIRMEZ, C.; PIRES, F.E.S.S.; FERNANDES, O.; NEHME, S.N.; CUPOLILLO, E.; FIROOZMAND, L.; GRAÇA, G.C.; VOLPINI, A.; SANTOS, S.L.; ROMANHA, A.J. Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. *Acta Tropica*, v.109, p.74-77, 2009.
- ROSYPAL, A.C.; ZAJAC, A.M.; LINDSAY, D.S. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *Veterinary Clinics of North America: small animal practice*, v. 33, p. 921 – 937, 2003.
- ROTUREAU, B.; RAVEL, C.; AZNAR, C.; CARME, B.; DEDET, J.P. First report of *Leishmania infantum* in French Guiana: canine visceral leishmaniasis imported from the Old World. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, p.1120-1122, mar 2006.
- SANTOS, S.O.; ARIAS, J.R.; HOFFMANN, M.P.; FURLAN, M.B.G.; FERREIRA, W.F.; PEREIRA, C.; FERREIRA, L. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v.36, n.5, p.633-634, set-out 2003.
Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v36n5/a17v36n5.pdf>>. Acessado em: 20 junho 2008.
- SANTOS, S.O.; ARIAS, J.R.; 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*, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.
- SARIDOMICHELAKIS, M.N.; MYLONAKIS, M.E.; LEONTIDES, L.S.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.I. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, n. 1, p. 82-86, 2005.
- SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R.R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE,

- A.R.; FRANK, G.R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*, n. 104, p.275-285, 2002.
- SHAW, J.; GRIMALDI, G.; CUPOLILLO, E. Identificação de *Leishmania*. José Rodrigues Coura (org) *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.1, n. 54, p.733-737, 2005.
- SILVA, E.S. da. *Leishmaniose Visceral Canina na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil. Diagnóstico, aspectos clínicos e caracterização de amostras de Leishmania*. 1997. 153 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Departamento de Biologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou Fiocruz, Belo Horizonte.
- SILVA, E.S. da.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; FIÚZA, V.O.P.; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 96, n.3, p.285-291, abr 2001a.
- SILVA, E.S. da.; GONTIJO, C.M.F.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R.P. Short Report: Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, [S.l.], v. 65, n. 6. p.896-898, 2001b.
- SILVA, E.S. da.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; BRAZIL, R.P. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genetics and Molecular Research*, [S.l.], v. 3, n. 2, p.251-257, 2004.
- SILVA, E.S.da.; GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 12, p. 550-552, dez 2005.
- SILVA, E.S. da.; MEIDE, W.F.; SCHOONE, G.J.; GONTIJO, C.M.F.; SCHALLIG, H.D.F.H.; BRAZIL, R.P. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Veterinary Research Communications*, [S.l.], v. 30, n. 6, p. 637-643, 2006.
- SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in na área of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 2, p.560-563, fev 2001.
- SOUZA, M.B.; MARZOCHI, M.C.A.; CARVALHO, R.W.; RIBEIRO, P.C.; PONTES, C.S.; CAETANO, J.M.; MEIRA, A.M. AUSÊNCIA DA *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no Município do Rio de Janeiro. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.19, n.6, p.1881-1885, nov-dez 2003.
- SUNDAR, S.; SINGH, R.K.; BHARTI, K.; MAURYA, R.S.; DELAFOSSE, I.; JACQUIER, P. Evaluation of a new rapid immunochromatographic diagnostic test (Diamed-it Leish)

for Indian visceral leishmaniasis and PKDL. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene: ASTMH 52nd Annual Meeting*, p.3-7, 2003

TÁVORA, M.P.F.; PEREIRA, M.A.V.C.; LAURENTINO-SILVA, V.; VITA, G.F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas ELISA e RIFI para diagnosticar *Leishmania* sp em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 4, p. 482-483, jul-ago 2007.

TDR. *Strategic Direction for Research – Leishmaniasis*. WHO (World Health Organization), 2004. Disponível em: < <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>>. Acessado em: 20 jun 2008.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 52, n. 3, p. 287 - 292, 1995.

TOLEZANO, J.E.; ULIANA, S.R.B.; TANIGUCHI, H.H.; ARAÚJO, M.F.L.; BARBOSA, J.A.R., BARBOSA, J.E.R., FLOETER-WINTER, L.M., SHAW, J.J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.149, p.280-284, jul 2007.

TRIBUNA-MT, A. Alerta sobre ocorrências de leishmaniose visceral. *A Tribuna-MT* site, 7 dez 2007.
Disponível em: < <http://www.atribunamt.com.br/geral/alerta-sobre-ocorrencias-de-leishmaniose-visceral/>>.
Acesso em: 25 de jun 2008.

WERNECK, L.G. et al. Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial – 2004. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, v.17, n.2, p.87-96, abr-jun 2008.

WHO, World Health Organization. *Zoonoses and Veterinary Public Health – Leishmaniasis*. WHO-Programmes and Projects, 2008.
Disponível em: < <http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 20 jun 2008.

ANEXO 1



Departamento de Ciências Biológicas – DCB
Escola Nacional de Saúde Pública - ENSP
Ministério da Saúde – Fundação Oswaldo Cruz
Rua Leopoldo Bulhões, 1480 – Manguinhos – Rio de Janeiro – RJ
CEP 21041-210 Tel: (21) 2598-2592

Setor de Zoonoses

FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA E LABORATORIAL CANINA

Nº ____ Cód ____

DATA ___/___/___

NOME DO CÃO: _____

RAÇA: _____ SEXO: (M) (F) IDADE: _____ PELAGEM: _____

PROPRIETÁRIO: _____

ENDEREÇO: _____

TIPO DE RESIDÊNCIA: _____

OUTRAS LOCALIDADES ONDE O CÃO RESIDIU:

LOCAL: _____ TEMPO: _____

LOCAL: _____ TEMPO: _____

CÃO VIAJOU NOS ÚLTIMOS SEIS MESES (SÍTIO, ...)? _____

ORIGEM DO CÃO: _____

ASPECTOS CLÍNICOS:

(+)(-) ATIVO

(+)(-) APÁTICO

(+)(-) MUCOSAS HIPOCORADAS (ANEMIA)

(+)(-) DESCAMAÇÃO

(+)(-) CERATOCONJUTIVITE

(+)(-) PARESIA DOS MEMBROS PÉLVICOS

(+)(-) LESÕES Nº: _____ REGIÃO DO CORPO: _____

(+)(-) ONICOGRIFOSE

(+)(-) PERDA DE PÉLO

(+)(-) CAQUEXIA

(+)(-) ESPLENOMEGALIA

(+)(-) EDEMA DO FOCINHO

SINTOMÁTICO () OLIGOSSINTOMÁTICO () ASSINTOMÁTICO ()

EXAMES / DATA:

ASPIRADO DE TECIDO SUBCUTÂNEO: (+) (-) _____

CULTURA DO ASPIRADO DE TECIDO SUBCUTÂNEO: (+) (-) _____

FTA® Card/ PCR: (+) (-) _____

CULTURA DE MEDULA ÓSSEA: (+) (-) _____

ISOENZIMA: (+) (-) _____

RIFI: Título _____ (-) ELISA: (+) (-) _____ DPP™: (+) (-)

Obs.: _____

ANEXO 2

➤ **Meio de Cultura de Fase Sólida NNN**

Para o preparo do meio de cultura de fase sólida NNN foi necessário obter sangue desfibrinado e estéril de coelho (Centro de Criação de Animais de Laboratório – IOC). Já com o material requisitado em mãos, 0,75 ml de Penicilina – estreptomicina foram adicionados a cada 40 ml de sangue, permanecendo, em seguida, sob agitação durante 30 minutos.

Enquanto isso, 52 g de BHI-Ágar (SIGMA B-7278) foram pesados e, junto com 1000 ml de água Tipo II (q.s.p.), foram adicionados em um balão de fundo chato. A solução foi autoclavada durante 15 minutos a 121°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Em cabine de segurança biológica, após resfriar em banho-maria a 40°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), 100 ml (ou 10%) do sangue desfibrinado e estéril de coelho foram adicionados à solução, sendo o meio, então, mantido a 40°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) em banho-maria controlado. Em seguida, o meio foi transferido para tubos de ensaio com tampa de rosca com o auxílio de seringa repetidora graduada. Importante acrescentar que, tanto os tubos de ensaio com tampa rosqueável quanto a seringa repetidora, foram previamente esterilizados por meio de autoclavação durante 29 minutos (± 1 minuto) a 121°C ($\pm 1^\circ\text{C}$); os tubos passaram dois dias no forno Pasteur a 36°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) para secar. Foram empregadas pipetas sorológicas descartáveis e estéreis.

Os tubos, que acabaram de receber o meio, permaneceram inclinados (45°) enquanto o meio solidificava dentro deles nesta posição. Uma vez solidificado, o meio contido nos tubos foi mantido em teste de esterilidade, sendo observado durante 24 horas (± 2 horas). Uma vez que não foi observado crescimento de microrganismos no meio, provando o meio estar estéril, os tubos foram armazenados em geladeira a 4°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) até serem utilizados (menos de 90 dias, que é o prazo considerado máximo para a validade do meio).

➤ **Meio de Cultura de Fase Líquida Schneider**

Para o preparo de 1000 ml do meio de cultura de fase líquida Schneider foram pesados 24,49g do Meio Schneider (SIGMA 9895), adicionados, em seguida, a um béquer juntamente com 800 ml de água Tipo II a 18°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), permanecendo no agitador magnético até a completa dissolução do meio. Foram pesados 0,4 g de NaHCO₃ (Isifar 302), adicionados ao

béquer com o meio, até dissolver. O pH foi aferido e estava em torno de 5,0, sendo necessário, então, ajustá-lo para 9,2 ($\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) por meio da adição de NaOH a 5M (20g de NaOH homogeneizados com 100 ml de água Tipo II até a completa dissolução). O meio ficou em agitação durante 10 minutos, aproximadamente. Em seguida, o pH foi ajustado para 6,7 ($\pm 0,2$) por meio da adição de HCl puro, permanecendo em agitação, novamente, durante 10 minutos. Cautelosamente, de modo a evitar precipitação, a solução de CaCl_2 (6 g de CaCl_2 homogeneizados com 50 ml de água Tipo II até a completa dissolução) foi adicionada e o pH ajustado para 7,1 ($\pm 0,1$).

Para que o meio tivesse uma concentração de 1 U/ml de penicilina e 200 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, 10 ml da solução de penicilina-estreptomicina (SIGMA P0781) foram adicionados e transferidos para uma proveta graduada, sendo completada até atingir 1000 ml com água Tipo II. O volume final foi filtrado em membrana 0,22 μm com auxílio da bomba de vácuo, permanecendo em teste de esterilidade por quatro horas a 21°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). Uma vez que não houve crescimento de microrganismos no meio, ou seja, estando o meio estéril, foi armazenado na geladeira na faixa de 4°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$).

➤ Solução de Tampão Salina-Fosfato - PBS 0,018M pH 7,2

Após pesar os reagentes (Tabela 19), a solução foi homogeneizada em um misturador, em velocidade 7,0, até que todos os reagentes estivessem dissolvidos. Em seguida, a solução foi armazenada em um frasco autoclavado, que foi identificado, e acondicionado em geladeira na temperatura de 4°C para uso nas diluições de soro e conjugado e lavagem das lâminas.

Tabela 19: Reagentes e medidas para o preparo da solução de tampão salina-fosfato (PBS) 0,018M pH7,2

PBS 0.018M pH 7,2	
NaCl	8,18 g
Na_2HPO_4	1,98 g
NaH_2PO_4	0,310 g
$\text{H}_2\text{O MilliQ}$ qsp	1000 ml

➤ **Corante Giemsa (concentrado) para 100 ml**

Para o preparo de 100 ml do corante Giemsa, concentrado, foram necessários os seguintes reagentes:

- 01 g de corante em pó VETEC (eosina azul de metileno segundo Giemsa, 25g, cód 000598.04, lote 0902851);
- 60 ml de glicerol;
- 56 ml de metanol.

Os insumos foram adicionados e homogeneizados, por duas horas, em um agitador mecânico agregado a uma placa aquecedora a 60°C. A temperatura foi aferida de instantes em instantes, sofrendo pequena oscilação: de 56°C a 64°C. Completadas duas horas, o corante foi filtrado duas vezes em filtro de papel Melitta® nº 100 e armazenado em recipiente adequado, de utilização exclusiva, vedado e em temperatura ambiente.

➤ **Tampão de Sorensen pH 7,2**

Para o preparo do tampão de Sorensen, foram necessários os seguintes reagentes e suas respectivas medidas (Tabela 20):

Tabela 20: Reagentes e medidas para o preparo do tampão de Sorensen pH 7,2

Tampão de Sorensen pH 7,2	
Solução A	
Na ₂ HPO ₄ . 7 H ₂ O a 0,067 M	17,96 g
H ₂ O MilliQ qsp	1000 ml
Solução B	
KH ₂ PO ₄ a 0,067 M	9,11 g
OU	
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O a 0,067 M	9,24 g
H ₂ O MilliQ qsp	1000 ml

As soluções A e B foram preparadas segundo as proporções: 13 ml da solução B para 37 ml da Solução A, de modo a obter pH 7,2.

ANEXO 3

O material fornecido pelo Kit IFI – Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos/FIOCRUZ consiste em:

- 4 frascos, de 6 ml cada um, com antígeno de *Leishmania*;
- 1 frasco de 1 ml com conjugado anti-cão/ FITC;
- 1 frasco de 25 ml com glicerina tamponada pH $9,0 \pm 0,5$;
- 1 frasco de 2,5 ml com azul de Evans 0,1%;
- 1 frasco de 0,5 ml com controle negativo;
- 1 frasco de 0,5 ml com controle positivo;
- 4 caixas com 50 lâminas;
- manual de instruções de uso.

Foram necessários também os seguintes insumos e equipamentos (não fornecidos pelo kit):

- água destilada;
- vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc.);
- pipetador monoclonal ajustável e ponteiras;
- luvas descartáveis;
- hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- estufa a 37°C;
- tampão fosfato/salina (PBS) – pH 7,2;
- lamínulas;
- microplacas;
- câmara úmida e cubas de lavagem;
- microscópio para fluorescência.

ANEXO 4

O material fornecido pelo Kit EIE – Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ para LVC consistiu em:

- 02 frascos de 45 ml do diluente de amostra/conjugado [5X];
- 01 saco de 10g de lecitina de leite;
- 02 frascos de 60 ml de tampão de lavagem [20X];
- 01 frasco de 60 ml de diluente do substrato;
- 01 frasco de 0,7 ml de cromógeno (TMB);
- 01 frasco de 0,2 ml de substrato (H₂O₂);
- 01 frasco de 30 ml de ácido sulfúrico 2M;
- 01 frasco de 0,25 ml do controle positivo;
- 01 frasco de 0,25 ml do controle negativo;
- 01 frasco de 0,4 ml do conjugado;
- 04 molduras
- 06 dispositivos contendo, cada um deles, 16 poços (distribuídos em duas fileiras de oito poços) sensibilizados;
- 08 folhas adesivas;
- manual de instruções de uso.

De acordo com orientações provenientes do fabricante foi necessário providenciar o seguinte material, que não constava no kit EIE – Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ:

- água destilada;
- vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc);
- micropipetadores multicanal e monoclonal ajustáveis e ponteiras;
- luvas descartáveis;
- estufa a 37° C;
- lavador automático de microplacas (BIO-RAD IMMUNOWASH modelo 1575);
- hipoclorito de sódio a 2,5%;
- espectrofotômetro para leitura de microplacas equipado com filtro de 450nm (BIO-RAD Benchmark);
- balança semi-analítica.

ANEXO 5

Quanto à Eletroforese de Isoenzimas:

➤ Cultivo de *Leishmania* para o preparo de massa parasitária

A eletroforese de isoenzimas é uma técnica que requer massa parasitária de *Leishmania* para sua realização. Portanto, o cultivo das leishmanias, presentes nas amostras de medula óssea e de aspirados de baço e de fígado dos cães estudados, foi necessário objetivando o preparo da massa parasitária.

Sendo assim, o material proveniente da cultura celular foi transferido para garrafas plásticas, próprias para cultivo de células, de 25 cm³. Foi utilizado um pipetador automático e pipetas volumétricas plásticas descartáveis. Em seguida, o conteúdo das garrafas de cultivo de meio de cultura Schneider (Anexo 2) foi adicionado, na proporção de uma parte de material em cultura para três partes de meio frasco. O material foi acondicionado por 48h em estufa BOD/ 25° C. Após as 48h de incubação, foi preparada uma lâmina com uma gota de material para avaliação de possíveis contaminantes biológicos, por microscopia ótica. O conteúdo das garrafas de cultura foi, então, transferido, com o auxílio de um pipetador automático, para um tubo cônico de centrifuga, devidamente identificado. O material foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento, ressuspendido em 5 ml de solução de lavagem.

Para o preparo da solução de lavagem, os reagentes (Tabela 21) foram pesados e colocados em um béquer, no qual se adicionou água suficiente para atingir 1 litro de volume. Em seguida, a solução foi homogeneizada, com a ajuda de um agitador magnético, até sua completa dissolução. A solução de lavagem foi estocada na geladeira à temperatura que variou entre 4°C e 8°C.

Tabela 21: Reagentes e medidas para o preparo da solução de lavagem

Reagentes	Medidas
NaCl	8,5 g
EDTA	3,7224 g
H ₂ O Tipo I	qsp 1000 ml

O sedimento foi acondicionado em tubo de criogenia. Os tubos foram rotulados com a identificação da amostra, data e responsável pelo preparo. Novamente, então, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado como anteriormente, e o material foi mantido em recipiente de isopor contendo gelo seco. As amostras, em seguida, foram transferidas para o container de nitrogênio líquido, com o auxílio de EPIs (máscara de proteção para criogenia, luvas para manipulação de material de criogenia, EPIs para manipulação em risco NB2).

➤ **Preparo do tampão de corrida**

O tampão de corrida foi preparado seguindo as quantidades pré-estabelecidas de acordo com as tabelas 22, 23 e 24. As soluções tampão foram preparadas em função das enzimas que foram ensaiadas.

Tabela 22: Solução tampão Tris-Maleico pH 7.4

H₂O	Trisma® Base P.M 121.11	Na₂EDTA P.M 372.2	MgCl₂ anidro P.M 95.21	Ácido maleico P.M 116.1
2L	24.22g	0,74g	0.19g	10g
6L	72.66g	2.22g	0.57g	30g
8L	96.88g	2.96g	0.76g	40g

Tabela 23: Solução tampão Tris-Fosfato pH 8.0

H₂O	Trisma® Base P.M 121.11	NaH₂PO₄·H₂O P.M 137.99
2L	22.22g	27.82g
4L	48.44g	55.64g
8L	96.88g	11.29g

Tabela 24: Solução tampão Tris-Cítrico pH 8.1

H₂O	Trisma® Base P.M 121.11	Ácido Cítrico P.M 192.1
2L	83.2g	33g
4L	166.4g	66g
8L	332.8g	132g

➤ **Preparo do gel de corrida**

Em um frasco de erlenmeyer de vidro, de 200 ml de volume, foram misturados 50 ml de solução tampão com 50 ml de água Tipo II. A solução foi então reservada. Em seguida, 1,0g de agarose grau biologia molecular foi pesado e adicionado à mistura de líquidos para levar ao forno de microondas em potência por 5 ou 10 minutos (até que a mistura estivesse transparente e sem grumos).

➤ **Preparo da base de corrida**

Uma placa de vidro de dimensões 3 mm x 125 mm x 260 mm foi apoiada sobre um suporte nivelador. Sobre o suporte com o vidro, foi posicionado um nível de modo a nivelar este suporte. Em seguida, uma folha de GelBond®, com a superfície hidrofílica voltada para cima, foi colocada sobre o suporte com o vidro. Em uma proveta de vidro de 100 ml, verteu-se 60 ml de gel. O gel, então, foi despejado sobre a folha de GelBond®, posicionado na base nivelada, sem permitir formação de bolhas ou imperfeições. Uma vez solidificado, colou-se o gel em câmara úmida empilhável, de dimensões 290 mm x 140 mm x 8 mm, levando-o, em seguida, para a geladeira (4°C). As folhas de gel utilizadas neste estudo permaneceram o tempo mínimo de 08 horas na geladeira antes de serem empregadas, e foram estocadas por até sete dias.

➤ **Preparo da agarose a 1%**

Colocou-se 1,0g de Agarose (Sigma A9539) em um frasco de erlenmeyer de volume igual a 500ml e adicionaram-se 100ml de água Tipo II. A solução foi levada ao forno de microondas por 5 minutos (até que a mistura estivesse transparente e sem grumos).

Quando a agarose não era utilizada na hora, a boca do balão de vidro era coberta com papel alumínio e estocada em geladeira, sem prazo de validade definido.

➤ **Preparo do ácido acético a 5%**

Em um balão volumétrico de vidro, fundo chato e pescoço longo, estéril e com tampa de volume igual a 2000ml, colocaram-se 1990ml de água Tipo II e 10ml de ácido acético. O ácido acético a 5% foi mantido em temperatura ambiente.

ANEXO 6

Conteúdo das 45 fichas Clínico-Laboratoriais e Epidemiológicas preenchidas:

O cão de nº 1 estava ativo, apresentava apenas uma lesão na orelha e descamação. Apesar de apresentar sorologia positiva para LV (titulação $\geq 1:40$), era assintomático. A sorologia foi realizada pelo Lacen-MT.

O cão de nº 2 estava ativo e apresentava apenas descamação. Assim como o cão anterior, apresentava sorologia positiva para LV (titulação $\geq 1:40$), apesar de ser assintomático. A sorologia foi realizada pelo Lacen-MT.

O cão de nº 3 era sintomático: estava apático, apresentava alopecia ao longo do corpo, ceratoconjuntivite, lesões ulceradas nas duas orelhas, onicogribose, descamação e caquexia. Apresentava sorologia positiva para LV (titulação $\geq 1:40$). A sorologia foi realizada pelo Lacen-MT.

Os cães de nº 4, 5 e 6 não eram suspeitos de LV, não apresentavam sorologia positiva para LV nem sinais clínicos.

O cão de nº 7 não apresentava sorologia positiva para LV. No entanto, estava apático, apresentava alopecia, mucosas hipocoradas, ceratoconjuntivite, lesões ulceradas nas orelhas e ao longo do corpo, onicogribose, descamação e caquexia.

O cão de nº 8 era suspeito de LV, segundo dados do CCZ-Cuiabá, apesar de não ter sorologia positiva para a infecção, mas apresentava alopecia e descamação.

O cão de nº 9, da mesma forma, era suspeito de LV apesar de não ter sorologia positiva para a infecção. Este cão estava apático, com alopecia, ceratoconjuntivite, lesões ulceradas pelo corpo, descamação e edema de focinho.

O cão de nº 10 não era suspeito de LV. Estava apático sim, porém em decorrência de sua condição: atropelamento. Não apresentava sinais clínicos da doença. Foi encontrado nódulo no baço.

O cão de nº 11 também não era suspeito para LV, apesar de apresentar mucosas hipocoradas e lesões ulceradas nas orelhas, provavelmente adquiridas em uma das suas tentativas de fuga da baía do canil.

O cão de nº 12 era suspeito de LV, uma vez que dois outros cães da mesma moradia apresentavam sorologia positiva para LV além de sinais clínicos. No entanto, o cão estava ativo e sem sinais clínicos.

O cão de nº 13 não era suspeito de LV, nem foi feita a sorologia para a infecção. Apesar de ter o membro pélvico direito lesionado em função de atropelamento, estava ativo e sem sinais clínicos para LV.

O cão de nº 14 não era suspeito de LV, a sorologia para a infecção não foi feita, mas o animal apresentava alopecia, lesões ulceradas no dorso, descamação e caquexia.

O cão de nº 15 apresentava sorologia positiva para LV, além de alopecia e mucosas hipocoradas. A sorologia foi realizada pelo Lacen-MT.

O cão de nº 16 estava ativo, apresentava necrose na ponta das duas orelhas, focinho seco e edemaciado. Não era suspeito de LV nem foi feita a sorologia para a infecção.

O cão de nº 17 não era suspeito para LV. Estava ativo, apresentava focinho seco e cegueira de um olho.

O cão de nº 18 também não era suspeito de LV, estava ativo e sem sinais clínicos da doença.

O cão de nº 19 era suspeito de LV, embora não apresentasse sorologia positiva para a infecção. O animal estava ativo, apresentava alopecia pelo corpo todo, lesões em necrose no dorso, descamação e a pele estava demasiadamente espessa (semelhante a couro).

Os cães de nº 20, 21, 22, 23, 24 e 25 não eram suspeitos de LV e estavam ativos. Todos os cães, com exceção do nº 21, não apresentavam sinais clínicos da doença. O cão de nº 21 apresentava apenas onicogribose. O cão de nº 22 apresentava-se em avançado estado de caquexia.

O cão de nº 26 apresentava sorologia positiva para LV. O animal adoecera há dois anos e meio, aproximadamente. Estava ativo, apresentava alopecia, ceratoconjuntivite, e lesões ulceradas na ponta das orelhas e no focinho. A sorologia foi realizada pelo Lacen-MT.

O cão de nº 27 apresentava ELISA positivo para LV e titulação 1:80 pela RIFI, mucosas hipocoradas, lesões ulceradas na virilha e descamação. A sorologia foi realizada por laboratório particular.

O cão de nº 28 apresentava titulação $\geq 1:40$ para LV pela RIFI, ceratoconjuntivite, lesões ulceradas no dorso, descamação. De acordo com a ficha clínico-epidemiológica do CCZ-Cuiabá, foi informado que o cão adoecera há dois meses da data de preenchimento da ficha. Foi encontrado granuloma no fígado. A sorologia foi realizada pelo Lacen-MT.

O cão de nº 29 apresentava titulação $\geq 1:40$ para LV pela RIFI, alopecia intensa pelo corpo todo, mucosas hipocoradas, descamação e caquexia. A sorologia foi realizada pelo Lacen-MT.

O cão de nº 30, da mesma forma, apresentava titulação 1:40 para LV, ELISA positivo, apesar de estar ativo e não apresentar sinais clínicos da doença. A sorologia foi realizada por laboratório particular.

O cão de nº 31 apresentava ELISA positivo, RIFI com titulação 1:40 para LV e, dentre os sinais clínicos, apenas onicogribose. A sorologia foi realizada por laboratório particular.

O cão de nº 32 apresentava titulação \geq 1:40 para LV na RIFI, além de alopecia, mucosas hipocoradas, ceratoconjuntivite, lesões no membro torácico esquerdo (miíase), onicogribose, descamação e caquexia. A sorologia foi realizada pelo Lacen-MT.

O cão de nº 33 apresentava titulação \geq 1:40 para LV na RIFI, alopecia intensa pelo corpo todo, mucosas hipocoradas, ceratoconjuntivite, onicogribose, descamação e intensa caquexia. A sorologia foi realizada pelo Lacen-MT.

O cão de nº 34 apresentava sorologia positiva pelo ELISA, titulação 1:40 para LV pela RIFI, lesões ulceradas no ventre e no focinho, descamação, caquexia e edema de focinho. A sorologia foi realizada por laboratório particular. Na ficha clínico-epidemiológica do CCZ-Cuiabá constava que a mãe deste cão era LV positiva.

O cão de nº 35 também apresentava sorologia positiva pelo ELISA, titulação 1:40 para LV pela RIFI, mucosas hipocoradas, ceratoconjuntivite intensa, onicogribose, descamação e caquexia. A sorologia foi realizada por laboratório particular.

O cão de nº 36 apresentava sorologia positiva pelo ELISA, titulação 1:80 para LV pela RIFI, alopecia nas duas orelhas, ceratoconjuntivite, lesões ulceradas no membro torácico direito, descamação (focinho e dorso) e caquexia. O fígado apresentava-se com bordas espessas, porém liso e de boa coloração. A sorologia foi realizada por laboratório particular.

O cão de nº 37 apresentava sorologia positiva pelo ELISA, titulação 1:40 para LV pela RIFI, alopecia, mucosas hipocoradas, lesões ulceradas no membro pélvico esquerdo e descamação. A sorologia foi realizada por laboratório particular.

Não foi realizada a sorologia do cão de nº 38. No entanto, o animal apresentava alopecia intensa (dorso, ventre e membros sem pelo), lesões ulceradas e crostosas no focinho, nos membros, no dorso e ventre, onicogribose, descamação, caquexia e edema de focinho. O baço estava fibrosado e aumentado de tamanho. O fígado também estava aumentado de tamanho.

O cão de nº 39 apresentava titulação \geq 1:40 para LV pela RIFI, alopecia (focinho), lesões ulceradas (orelha esquerda) e descamação discreta. A sorologia foi realizada pelo Lacen-MT.

O cão de nº 40 apresentava titulação $\geq 1:40$ para LV pela RIFI, alopecia (focinho), mucosas hipocoradas, ceratoconjuntivite, lesões nas orelhas (miíase), descamação e caquexia. O animal não caminhou, foi arrastado, mas parecia não sofrer de paresia dos membros pélvicos. O cão estava com o coxim do membro torácico esquerdo edemaciado. Foi encontrado granuloma no baço. A sorologia foi realizada pelo Lacen-MT.

O cão de nº 41 apresentava sorologia positiva pelo ELISA, titulação 1:40 para LV pela RIFI, alopecia, onicogribose e descamação. Foi encontrado granuloma no fígado. A sorologia foi realizada por laboratório particular.

O cão de nº 42 apresentava sorologia positiva pelo ELISA e titulação 1:40 para LV pela RIFI. A sorologia foi realizada por laboratório particular. O animal estava apático e apresentava alopecia (orelhas), mucosas hipocoradas e ceratoconjuntivite. O baço apresentava borda espessada. Foram encontradas rugosidades e granulomas.

O cão de nº 43 apresentava titulação $\geq 1:40$ para LV pela RIFI, alopecia intensa e disseminada (animal estava quase totalmente sem pelo), mucosas hipocoradas, necrose na ponta das duas orelhas, onicogribose, descamação intensa e caquexia. A sorologia foi realizada pelo Lacen-MT.

O cão de nº 44 também apresentava titulação $\geq 1:40$ para LV pela RIFI, onicogribose e descamação. A sorologia foi realizada pelo Lacen-MT. Na ficha clínico-epidemiológica do CCZ-Cuiabá constava que o cão residia há sete meses no local, sendo que antes deste período, residia em uma chácara.

O cão de nº 45, de modo semelhante, apresentava titulação $\geq 1:40$ para LV pela RIFI, onicogribose e caquexia. A sorologia foi realizada pelo Lacen-MT. Em sua ficha clínico-epidemiológica do CCZ-Cuiabá constava que o cão estava somente há dois dias no bairro Estrada da Guia, procedendo anteriormente do bairro Pico do Amor.