

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Análise comparativa de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na confirmação do diagnóstico em cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral canina

por

Shara Regina da Silva

Belo Horizonte

Junho/2009

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Análise comparativa de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na confirmação do diagnóstico em cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral canina

por

Shara Regina da Silva

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título
de Mestre em Ciências, na área de concentração
Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Dr. Edelberto Santos Dias
Co-orientação: Dr. João Carlos França-Silva

Belo Horizonte

Junho/2009

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S586a Silva, Shara Regina da.
2009

Análise comparativa de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na confirmação do diagnóstico em cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral canina / Shara Regina da Silva. - Belo Horizonte, 2009.

xvii, 93 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 91-110.

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose visceral/prevenção e controle 2. Leishmaniose visceral/diagnóstico 3. Leishmaniose visceral/epidemiologia 4. Cães/parasitologia 5. Reservatórios de doenças/parasitologia I. Título. II. Dias, Edelberto Santos (Orientação). III. França-Silva, João Carlos (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Análise comparativa de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na confirmação do diagnóstico em cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral canina

por

Shara Regina da Silva

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Edelberto Santos Dias (presidente)

Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho

Prof. Dr. George Luís Lins Machado Coelho

Suplente: Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo

Dissertação defendida e aprovada em 26/06/2009

Eu prefiro ser...

...essa metamorfose ambulante

...do que ter aquela velha opinião

...formada sobre tudo.

Paulo Coelho e Raul Seixas

Dedicado ao melhor amigo do homem...

**...na infinita esperança que tenho, de um dia, não ter que lhe tirar a vida só
para proteger a nossa.**

Agradecimentos

Agradeço às instituições financiadoras que viabilizaram a execução desse projeto:

Em Paracatu

Edital Universal MCT/CNPq, 15/2007

Edital PPM/Fapemig, 03/2007

Em Montes Claros

Edital CNPq - PIBIC, 2007 a 2009

Edital PPM/Fapemig, 03/2007

Em Janaúba

Edital Universal/CNPq, processo 474543/2004-2008

Edital Jovens Doutores/Fapemig, 005/2004, processo EDT 315/05

Fiocruz - Centro de Pesquisas René Rachou

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Maria Alves e Antônio Gonçalves, por terem me educado com a dose ideal de oportunidades e desafios. Meus méritos são resultados das circunstâncias que vocês me proporcionaram. Agradeço ao meu irmão pelo apoio “logístico” na vida pessoal e pelo exemplo de autonomia; aos meus avós, Maria e José (*in memoriam*) pelo mais perfeito exemplo de vida familiar, conjugal e social que conheço.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Edelberto Santos Dias por ter me recebido de forma tão receptiva, mesmo sabendo da minha inexperiência com pesquisa e por permitir a autonomia que resultou em imenso aprendizado durante esses dois anos;

Agradeço ao meu co-orientador Dr. João Carlos França-Silva pelo apoio imprescindível nesse e em outros trabalhos de campo, pelas idéias enriquecedoras e pela sensibilidade;

Agradeço aos meus colegas do laboratório de Leishmanioses - os egressos e os que permanecem. Sem a contribuição de vocês esse trabalho não se realizaria. Sou profundamente grata por tudo que aprendi e ainda aprendo com vocês. TODOS contribuíram de diversas formas, mas gostaria de agradecer especialmente ao Rafael e à Patrícia, pelo apoio nos experimentos de biologia molecular, à Ana Cristina por ter me ensinado a “arte” da cultura de leishmanias, à Dr^a Célia por ter compartilhado sua experiência e pela boa vontade em colaborar e à Simone, por ter me “carregado no colo”, nos últimos instantes !!

Agradeço à Fernanda Oliveira e Dr^a Raquel Pacheco pela técnica de PCR para complexo *mexicana*; ao Sr. Jair Cecílio de Paula, pelos exames parasitológicos em lâmina; ao Dr. Evaldo Nascimento pelo testes do Kalazar detectTM;

Agradeço aos moradores das cidades de Janaúba, Montes Claros e Paracatu, pela colaboração com o programa de retirada de cães infectados, entendendo que essa é uma ação lamentável, mas que ainda permanece como necessária para o controle da doença. Obrigada por abrir mão dos seus companheiros em função do bem da coletividade;

Agradeço aos funcionários das Secretarias Municipais de Saúde dos municípios trabalhados, pela boa vontade, motivação e comprometimento com os nossos trabalhos e com a saúde pública;

Agradeço ao Centro de Pesquisas René Rachou pela oportunidade de fazer parte dessa instituição. À biblioteca do CPqRR por prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, sendo rol de referências dessa dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Agradeço à minha família, Alves-Rocha e Gonçalves, por sempre ter me recebido com muito carinho;

Agradeço aos veterinários, José Luís, Emírcio e Sandra por minha formação como veterinário clínico. Tudo que aprendi com vocês tem sido surpreendentemente útil na pesquisa com cães;

Agradeço a todos os meus amigos e amigas, que sempre estiveram presentes, mesmo que virtualmente, trazendo palavras de apoio e incentivo. Obrigado Daniela, por abrir mão do conforto de casa e me fazer companhia nos trabalhos de fim de semana;

Agradeço aos cães por essa co-evolução e parceria de milhares de anos.

Sumário

Lista de Figuras.....	XII
Lista de Tabelas.....	XIII
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XIV
Resumo.....	XVI
Abstract.....	XVII
1 Introdução.....	19
2 Justificativa.....	22
3 Objetivos.....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4 Revisão de literatura.....	26
4.1 As leishmanioses.....	26
4.2 A leishmaniose visceral.....	30
4.2.1 <i>O parasito</i>	30
4.2.2 <i>Os vetores</i>	32
4.2.3 <i>Os reservatórios</i>	33
4.2.4 <i>Ciclo biológico</i>	34
4.2.5 <i>A leishmaniose visceral no homem</i>	35
4.2.6 <i>A leishmaniose visceral canina (LVC)</i>	36
4.3 O diagnóstico da LVC.....	38
4.3.1 <i>Diagnóstico clínico</i>	38
4.3.2 <i>Diagnóstico sorológico</i>	39
4.3.3 <i>Diagnóstico parasitológico</i>	40
4.3.4 <i>Diagnóstico por testes imunocromatográficos</i>	41
4.3.5 <i>Diagnóstico molecular</i>	42
4.3.5.1 Reação em cadeia da polimerase - PCR.....	42
4.3.5.1.a PCR RFLP kDNA.....	43
4.3.5.1.b PCR RFLP <i>hsp70</i>	44
5 Métodos.....	46
5.1 Área de estudo.....	46
5.2 Amostras biológicas.....	46
5.3 Caracterização clínica dos animais.....	47
5.4 Coleta de amostras biológicas.....	47
5.5 Realização do teste rápido Kalazar detect™.....	48
5.6 Exames parasitológicos.....	48
5.6.1 <i>Impressão e esfregaço em lâmina</i>	48
5.6.2 <i>Mielocultura</i>	48
5.7 Métodos moleculares.....	49
5.7.1 <i>Extração de DNA para realização de PCR</i>	49
5.7.2 <i>Reação em cadeia da polimerase - PCR</i>	49
5.7.2.1 PCR para o gene da β globina do cão.....	50
5.7.2.2 PCR kDNA para o gênero <i>Leishmania</i>	50
5.7.2.2.a Visualização dos resultados.....	51
5.7.2.3 PCR RFLP kDNA.....	51
5.7.2.3.a Visualização dos resultados.....	52
5.7.2.4 PCR RFLP <i>hsp70</i>	52

5.7.2.5 PCR kDNA para complexo <i>mexicana</i>	52
5.8 Cepas de Referência de <i>Leishmania</i> spp.....	53
5.9 Análise estatística.....	54
6 Resultados	57
6.1 Caracterização clínica dos animais.....	57
6.2 Relação dos animais amostrados.....	58
6.3 Resultados do exame parasitológico em lâmina.....	60
6.3.1 Exame parasitológico total	60
6.3.1.1 Sorologia (RIFI e ELISA) como padrão-ouro.....	61
6.3.2 Exame parasitológico por órgão avaliado.....	61
6.4. Resultados do teste rápido Kalazar detect™.....	61
6.4.1 Sorologia (RIFI e ELISA) como padrão-ouro.....	62
6.5 Resultados da PCR.....	62
6.5.1 Resultados da PCR por órgão avaliado.....	62
6.5.1.1 Sorologia (RIFI e ELISA) como padrão-ouro.....	63
6.5.2 Resultados da PCR por município e órgão avaliado.....	63
6.6 Resultados do isolamento em miocultura.....	64
6.6.1 Sorologia (RIFI e ELISA) como padrão-ouro.....	65
6.7 Concordância entre os métodos utilizados.....	65
6.7.1 Parasitológico e Kalazar detect™.....	65
6.7.2 Parasitológico e PCR.....	66
6.7.3 Kalazar detect™ e PCR.....	66
6.7.4 Parasitológico e isolamento em cultura.....	66
6.7.5 Kalazar detect™ e isolamento em cultura.....	67
6.7.6 PCR e isolamento em cultura.....	67
6.8. Resultados por grupo de cães: Sintomáticos.....	67
6.8.1 Parasitológico e PCR - cães sintomáticos.....	67
6.8.2 Parasitológico e Isolamento em cultura - cães sintomáticos.....	68
6.8.3 PCR e Isolamento em cultura - cães sintomáticos.....	68
6.8.4 Resultado geral dos métodos diagnósticos para cães sintomáticos.....	68
6.9 Resultados por grupo de cães: Assintomáticos.....	69
6.9.1 Parasitológico e Kalazar detect™ - cães assintomáticos.....	69
6.9.2 Parasitológico e PCR - cães assintomáticos.....	69
6.9.3 Parasitológico e Isolamento em cultura - cães assintomáticos.....	69
6.9.4 Kalazar detect™ e PCR - cães assintomáticos.....	69
6.9.5 Kalazar detect™ e Isolamento em cultura - cães assintomáticos.....	70
6.9.6 PCR e Isolamento em cultura - cães assintomáticos.....	70
6.9.7 Resultado geral dos métodos diagnósticos para cães assintomáticos.....	70
6.10 Resultado geral dos métodos entre grupos clínicos.....	71
6.11 Identificação espécie-específica nas amostras de miocultura.....	71
6.12 Identificação espécie-específica para o total de amostras nos municípios.....	72
6.13 Metodologias utilizadas para visualização dos resultados.....	72
7 Discussão	76
7.1 O diagnóstico da LVC: observações relevantes.....	76
7.2 Métodos sorológicos.....	77
7.3 Métodos parasitológicos.....	78
7.4 Testes imunocromatográficos.....	79
7.5 Métodos moleculares - PCR.....	80

7.6 Identificação de espécie(s) de <i>Leishmania</i>	81
7.7 Sensibilidade dos métodos e formas clínicas.....	83
7.8 Considerações finais.....	83
8 Conclusões	86
9 Anexos	88
9.1 Certificado CEUA - Fiocruz.....	88
9.2 Certificado CETEA - UFMG.....	89
10 Referências bibliográficas.....	91

Lista de Figuras

Figura 1: Discriminação espécie-específica de leishmanias que ocorrem no Novo Mundo pela PCR RFLP <i>hsp70</i>	45
Figura 2: Localização geográfica da área de estudo.....	47
Figura 3: Valores de Kappa e nível de concordância.....	55
Figura 4: Sinais clínicos sugestivos de leishmaniose visceral, encontrados nas amostras caninas selecionadas, nos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu.....	58
Figura 5: Resultados do exame parasitológico em lâmina total dos cães amostrados nos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu.....	61
Figura 6: Resultados do exame parasitológico em lâmina, por órgão, dos cães amostrados nos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu.....	62
Figura 7: Resultados do teste rápido Kalazar detect™ TM , segundo município de origem.....	63
Figura 8: Percentual de positividade da PCR, distribuído por órgão avaliado.....	64
Figura 9: Percentual de positividade da PCR, distribuído por município e por órgão avaliados.....	64
Figura 10: Resultados percentuais do isolamento em miocultura, nos municípios estudados.....	66
Figura 11: Porcentagem de resultados positivos, por método diagnóstico, no grupo de cães sintomáticos, dos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu.....	69
Figura 12: Porcentagem de resultados positivos, por método diagnóstico, no grupo de cães assintomáticos, dos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu.....	71
Figura 13: Identificação da espécie de <i>Leishmania</i> , em porcentagem, nas amostras caninas dos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu.....	73
Figura 14: Visualização de produtos da PCR com os iniciadores M1M2 para complexo <i>mexicana</i> , em amostras de miocultura.....	74
Figura 15: Visualização de produtos da PCR RFLP <i>hsp70</i> em amostras de miocultura.....	74
Figura 16: Visualização de produtos da PCR para gene da β globina em amostras de tecido dos cães.....	75

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tamanho dos fragmentos obtidos após digestão do kDNA de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i> pela enzima <i>HaeIII</i>	45
Tabela 2: Relação dos animais amostrados nos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu, segundo sexo, raça e sinais clínicos	60
Tabela 3: Relação percentual de animais amostrados conforme clínica e origem.....	61
Tabela 4: Relação dos resultados positivos do isolamento em mielocultura (número do cão) para os municípios de estudo.....	65
Tabela 5: Concordância entre resultados dos métodos parasitológico e Kalazar detect TM , para a amostra total de animais.....	66
Tabela 6: Concordância entre resultados dos métodos parasitológico e PCR, para a amostra total de animais.....	67
Tabela 7: Concordância entre resultados dos métodos Kalazar detect TM e PCR, para a amostra total de animais.....	67
Tabela 8: Concordância entre resultados dos métodos Parasitológico e Isolamento em cultura, para a amostra total de animais.....	67
Tabela 9: Concordância entre resultados dos métodos Kalazar detect TM e Isolamento em cultura, para a amostra total de animais.....	68
Tabela 10: Concordância entre resultados dos métodos PCR e isolamento em cultura, para a amostra total de animais.....	68
Tabela 11: Concordância entre resultados dos métodos Parasitológico e PCR para cães sintomáticos.....	68
Tabela 12: Concordância entre resultados dos métodos Parasitológico e isolamento em cultura, para cães sintomáticos.....	69
Tabela 13: Concordância entre resultados dos métodos PCR e isolamento em cultura, para cães sintomáticos.....	69
Tabela 14: Concordância entre resultados dos métodos Parasitológico e Kalazar detect TM para cães assintomáticos.....	70
Tabela 15: Concordância entre resultados dos métodos Parasitológico e PCR para cães assintomáticos.....	70
Tabela 16: Concordância entre resultados dos métodos Parasitológico e isolamento em cultura para cães assintomáticos.....	70
Tabela 17: Concordância entre resultados dos métodos Kalazar detect TM e PCR para cães assintomáticos.....	70
Tabela 18: Concordância entre resultados dos métodos Kalazar detect TM e isolamento em cultura para cães assintomáticos.....	71
Tabela 19: Concordância entre resultados dos métodos PCR e isolamento em cultura para cães assintomáticos.....	71
Tabela 20: Identificação da espécie de <i>Leishmania</i> , em amostras de mielocultura, pelos métodos PCR RFLP kDNA, PCR RFLP <i>hsp70</i> e PCR para complexo <i>mexicana</i>	72

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AIDS: Acquired ImunoDeficiencie Syndrome, síndrome da imunodeficiência humana
BOD: Biochemical Oxygen Demand, demanda bioquímica de oxigênio
CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou
DEVEP/SVS/MS: Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
DNA: Ácido desoxirribonucléico
dNTP's: desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid, ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
gp63: glicoproteína 63
HIV: Human Immunodeficiencie Virus, vírus da imunodeficiência humana
HSP: Heat Shock Proteins, proteínas de choque térmico
IFLA: Insecta *flaviscutellata*
KCl: Cloreto de potássio
kDNA: DNA do cinetoplasto
LDPC: Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar
LIT: Liver Infusion Tryptose, infusão de fígado e triptose
LT: Leishmaniose Tegumentar
LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
LV: Leishmaniose Visceral
LVA: Leishmaniose Visceral Americana
LVC: Leishmaniose Visceral Canina
LVH: Leishmaniose Visceral Humana
M: Molar
MgCl₂: Cloreto de magnésio
MHOM: Mamífero Homem
mL: mililitro
MLEE: Multilocus enzyme electrophoresis, eletroforese de enzimas multilocais
mM: mili Molar
NaCl: cloreto de sódio
NaOH: hidróxido de sódio
NNN: meio de cultura Novy McNeal e Nicolle
PAGE: PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, eletroforese em gel de poliacrilamida
pb: pares de bases
PBS: Phosphate Buffered Saline, solução de fosfato tamponada
PCR: Polymerase Chain Reaction, reação em cadeia da polimerase
pH: potencial hidrogeniônico
pmol: picomol
PV: Peso Vivo
RAPD: Randomly Amplified Polimorphic DNA, amplificação aleatória de DNA polimórfico
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism, polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição
RIFI: Reação de Imuno-Fluorescência Indireta
RNA: Ácido ribonucléico
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate, dodecil sulfato de sódio
SES/MG: Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais

SFM: Sistema Fagocítico Mononuclear
SUS: Sistema Único de Saúde
TBE: Tris Borato EDTA
TDR: Tropical Disease Research
TE: Tris-EDTA
TRALd: Teste Rápido Anti *Leishmania donovani*
WHO: World Health Organization, Organização Mundial de Saúde
µg: Micrograma
µL: Microlitro

Resumo

No presente trabalho foram selecionados quarenta e quatro cães soropositivos para leishmaniose visceral canina, provenientes de Janaúba, Montes Claros e Paracatu, municípios endêmicos para a doença, em Minas Gerais. Esses animais foram recolhidos e eutanasiados, tendo como critério o resultado da sorologia para LVC, realizada pelos municípios ou pela Gerência Regional de Saúde, como parte das ações do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral. Os animais foram submetidos à necrópsia para coleta de amostras de tecidos, posteriormente utilizadas para exame parasitológico em lâmina, isolamento em meio de cultura, PCR e teste imunocromatográfico, com o objetivo de confirmar o diagnóstico sorológico inicial e identificar a espécie de *Leishmania*. O valor do percentual de positividade do método parasitológico foi de 67%, quando comparado ao padrão-ouro sorologia (ELISA e RIFI). O isolamento em mielocultura foi positivo em 25 amostras, com percentual de positividade de 58%, quando comparado ao padrão-ouro sorologia. A identificação da espécie de *Leishmania* foi possível em 38 animais (86,4%). Um cão foi encontrado infectado por *L. braziliensis*, em Montes Claros; cinco por *L. amazonensis*, em Paracatu; nos demais animais o parasito identificado foi *L. chagasi*. O teste imunocromatográfico Kalazar detectTM identificou 80% dos animais soropositivos, porém foi capaz de detectar 100% daqueles que eram animais sintomáticos. A técnica da PCR obteve percentual de positividade de 64%, quando comparado ao padrão-ouro sorologia. Em 93,2% da amostra total de cães foi possível a confirmação da sorologia por pelo menos uma das técnicas de diagnóstico utilizadas. Em 43,2% dos animais a sorologia foi confirmada por todos os métodos utilizados. O percentual de positividade foi maior para o grupo dos animais sintomáticos do que para os assintomáticos, em todos os testes. Em três animais (6,8%), um proveniente de Paracatu e dois de Janaúba, não houve confirmação da sorologia (RIFI ou ELISA) por nenhuma das técnicas; todos eles pertenciam ao grupo de cães assintomáticos, admitindo-se então a possibilidade de reações cruzadas com outras patologias. Esses resultados comprovam que *L. chagasi* é a principal espécie envolvida na epidemiologia da LVC na área de estudo e que o diagnóstico diferencial com a infecção por outras espécies de *Leishmania* deve ser considerado, evitando assim, resultados falso positivos.

Abstract

In the present study were selected forty-four visceral leishmaniasis seropositive dogs from Janaúba, Montes Claros and Paracatu, disease endemic counties in Minas Gerais. These animals were collected and euthanized, using as the result LVC serology held by municipalities or by the Regional Health Management, as part of efforts under the Control of Visceral Leishmaniasis. The animals underwent necropsy to collect tissue samples subsequently used for stool examination in a slide, culture isolation, PCR and immunochromatographic test in order to confirm the initial serological diagnosis and identify the species of *Leishmania*. The percentage of positivity of the parasitological method was 67% compared to the gold standard serology (ELISA and IFA). The mielocultura isolation was positive in 25 samples, the percentage of positivity of 58% compared to the gold standard serology. The identification of species of *Leishmania* was performed in 38 animals (86.4%). A dog was found infected by *L. braziliensis*, in Montes Claros, five by *L. amazonensis* in Paracatu; in other animals the parasite was identified as *L. chagasi*. The immunochromatographic test Kalazar detectTM identified 80% of positive animals, but was able to detect 100% of those who were symptomatic animals. The obtained PCR positivity rate of 64% compared to the gold standard serology. In 93.2% of the total sample of dogs was possible to confirm the serology for at least one of the diagnostic techniques used. In 43.2% of the animals serology was confirmed by all methods used. The percentage of positivity was higher for the group of symptomatic animals than for asymptomatic patients, in all tests. In three animals (6.8%), one from Paracatu and two from Janaúba, there was no confirmation of serology (ELISA or IFA) for any of the techniques, all of them belonged to the group of asymptomatic dogs, then admitting the possibility of cross-reactivity with other diseases. These results show that *L. chagasi* is the main species involved in the epidemiology of CVL in the study area and the differential diagnosis of infection with other *Leishmania* species should be considered, thus avoiding false positive results.

Introdução

1 Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença de grande importância médico-veterinária, causada por parasitos pertencentes à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero *Leishmania*, ROSS (1903).

A leishmaniose visceral é uma zoonose que tem como reservatórios acidentais os humanos e os cães, por apresentarem sinais clínicos sugestivos da doença (HOMMEL et al., 1995). Entretanto, nas formas antroponóticas, os humanos são os únicos reservatórios (DESJEUX, 1996).

A cadeia epidemiológica da leishmaniose visceral inclui a presença, concomitante, do vetor, do reservatório, do parasita e do hospedeiro susceptível. Cada elo dessa cadeia tem sido estudado em detalhes, objetivando obter maior compreensão da doença para otimizar o seu controle (ALMEIDA-SILVA, 2002).

Classicamente, são empregadas três frentes de ações conjuntas para controlar a LV: a utilização de inseticidas para diminuir a densidade da população de flebotomíneos, a notificação e o tratamento dos casos humanos além da eliminação de todos os cães soropositivos, que tem sido amplamente utilizada na China e América do Sul sendo, porém, inaceitável na Europa, onde se utiliza protocolos de tratamentos com drogas antimoniais para humanos e cães (Dye, 1996).

No Brasil são sacrificados, anualmente, mais de 25.000 cães soropositivos (Dye, 1996) sendo que, ultimamente, tem sido discutido muito sobre um problema grave, que é a questão do tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC), principalmente, na região metropolitana de Belo Horizonte, capital do Estado de Minas Gerais (Brasil), onde foram instituídos, inadvertidamente, protocolos de tratamentos para cães soropositivos por vários médicos veterinários, que adotaram esta medida na rotina de atendimento a clientes, copiando o modelo europeu.

Há, ainda, um outro problema a ser enfrentado relacionado com a eliminação de cães soropositivos para controlar a leishmaniose visceral no Brasil: alguns autores enfatizam a importância dessa medida associada às medidas clássicas, já citadas, sobre o tratamento dos casos humanos e a utilização de inseticidas para controlar o vetor. O trabalho de Alencar (1991) mostra em um estudo ecológico ou de correlação que a eliminação de cães soropositivos está correlacionada com o decréscimo da prevalência da LV em humanos, comparando áreas onde cães soropositivos não foram sacrificados, não foi confirmado por Dietze et al. (1997) ao avaliarem a importância epidemiológica de cães infectados na

aquisição de leishmaniose visceral americana (LVA) por humanos, através de um estudo controlado em três vales situados em uma área endêmica no Estado do Espírito Santo, Brasil.

Toda essa situação, além do panorama vigente da qualidade dos serviços de saúde no Brasil, tornou a LVA uma das patologias mais extensamente discutida nos meios acadêmicos e pelo Ministério da Saúde, traduzindo-se, ultimamente, em um grave problema de saúde pública e médico-veterinário (FRANÇA-SILVA, 1997).

A retirada de cães soropositivos, uma das ações de controle da LV, depende diretamente da qualidade, confiabilidade, sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos utilizados. Testes com baixa sensibilidade podem implicar em permanência de cães falso-negativos, com a possibilidade de manutenção do ciclo de transmissão. Já testes com baixa especificidade podem resultar na retirada de cães falso-positivos, não infectados; o que descredibiliza as ações de controle junta à população, especialmente para àqueles que possuem vínculo afetivo com o animal.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de quatro diferentes testes de diagnóstico, para confirmar a sorologia convencional realizada pelo serviço de saúde dos municípios. Utilizou-se testes parasitológicos, sorológicos e moleculares, variando de técnicas simples de baixo custo à métodos complexos de custo elevado. Também foi realizada a identificação da espécie de *Leishmania* em partes das amostras estudadas, investigação bastante importante para a melhor compreensão da epidemiologia da doença, uma vez que ainda é desconhecido o possível papel do cão como reservatório de outras espécies de *Leishmania*, que não a *L. chagasi*.

Nossos resultados apontaram para a necessidade de evolução dos métodos de diagnóstico da LVC; para alguns animais não foi possível a confirmação do diagnóstico por nenhuma das técnicas utilizadas; a concordância entre resultados foi baixa; a sensibilidade demonstrou ser sempre inferior para o grupo dos animais assintomáticos, ou seja, a identificação destes pode ser apontada como um dos aspectos críticos das ações de controle. Maiores estudos são necessários para direcionar a evolução da metodologia de controle da LVC.

Justificativa

2 Justificativa

Considerando a importância do cão como reservatório de *L. chagasi*, e seu papel essencial no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral zoonótica; a impossibilidade de diagnóstico clínico da LVC devido às manifestações clínicas diversas e não patognômicas; os diferentes perfis epidemiológicos da doença, em diferentes regiões biogeográficas; o crescente processo de urbanização, expansão e reemergência da LVC e LVH e finalmente, a dificuldade de conciliar métodos de diagnóstico sensíveis e específicos com praticidade, adequação às condições de campo, reprodutibilidade e baixo custo, esse estudo objetivou avaliar o percentual de positividade por diferentes métodos de diagnóstico de LVC, desde métodos tradicionais e de baixo custo, como o exame parasitológico em lâmina, passando por métodos laboriosos como o isolamento em cultura, testes rápidos que utilizam antígenos recombinantes, como o Kalazar detect™, até chegar aos métodos moleculares (PCR), sendo realizado em cães soropositivos de áreas endêmicas. Esse estudo também objetivou identificar a(s) espécie(s) de *Leishmania* encontrada nas amostras caninas, através da técnica de PCR RFLP kDNA, com o propósito de confirmar a espécie *L. chagasi* como o agente etiológico da LVC nas áreas de estudo.

Objetivos

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Realizar análise comparativa de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na confirmação do diagnóstico em cães com sorologia positiva para LVC.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a positividade por método parasitológico em lâmina, em amostras de baço, linfonodo, medula óssea e pele.

Avaliar a positividade em cultura de amostras de medula óssea.

Avaliar a positividade do teste rápido Kalazar detectTM em amostras de soro.

Avaliar a positividade da PCR em amostras de baço, linfonodo e pele.

Identificar a espécie de *Leishmania* nas amostras isoladas em mielocultura e em amostras positivas na PCR.

Avaliar a concordância entre os métodos utilizados.

Revisão de literatura

4 Revisão de literatura

4.1 As leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas causadas por parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ross, 1903), o qual agrupa espécies de protozoários unicelulares, digenéticos (heteroxenos), pertencentes à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae, encontrados nas formas flagelada promastigota, no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e, amastigota, semiflagelo livre, parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados.

Os hospedeiros invertebrados vetores das leishmanioses parecem estar limitados estritamente a insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae); todavia, a possível participação de outros grupos de artrópodes tem sido objeto de investigação nos últimos anos (Coutinho et al., 2005, Coutinho e Linardi, 2007, Paz et al., 2007). Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos e, embora a infecção seja mais comumente encontrada em roedores e canídeos, também é conhecida entre edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos, primatas e, entre estes, o homem (Ashford, 2000). A infecção em aves e anfíbios nunca foi descrita, e os organismos encontrados parasitando os répteis, até bem pouco tempo considerados do gênero *Leishmania*, são atualmente aceitos como pertencentes ao subgênero *Sauroleishmania*, conforme descrito por Lainson e Shaw (1987); estes parecem estar restritos ao Velho Mundo.

A transmissão ocorre através da picada da fêmea de flebotomíneo infectada; outras formas possíveis têm sido questionadas, como a transmissão por transfusão sanguínea (Owens et al., 2001, Freitas et al., 2006), por via transplacentária (Meinecke et al., 1999, Rosypal et al., 2005) e por contato sexual (Symmers, 1960, Riera e Valladares, 1996, Silva et al., 2008).

De acordo com o tropismo apresentado pelo parasito, as leishmanioses podem ser classificadas em leishmaniose tegumentar (LT), quando as leishmanias se direcionam para a pele e mucosas (principalmente nasal e orofaríngea), e leishmaniose visceral (LV), quando os parasitos apresentam acentuado tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides. Espécies distintas de *Leishmania* têm preferências e causam lesões maiores ou menores, produzem ou não metástases e podem ser ou não auto-curáveis; apresentam características clínicas, patológicas e epidemiológicas diversas, em cada área geográfica, sendo então consideradas entidades nosológicas distintas (Ashford, 2000).

Classifica-se a leishmaniose tegumentar de acordo com a manifestação clínica das lesões: formas que produzem lesões cutâneas, ulcerosas ou não, úmidas ou secas, porém

limitadas são denominadas leishmaniose cutânea (LC) (Brasil, 2006); formas que se complicam frequentemente, com o aparecimento de lesões destrutivas e mutilantes nas mucosas do nariz, boca e faringe, oriundas de metástases de lesão inicial cutânea e, associadas à infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911), são designadas por leishmaniose mucosa (LM) ou cutâneo-mucosa (LCM). Estas podem ocorrer meses ou anos após remissão ou cura da lesão inicial cutânea, ou em alguns casos se apresentarem concomitantemente (Boaventura et al., 2006). Por último, existem formas cutâneas disseminadas, que ocorrem em indivíduos anérgicos com deficiente resposta imune celular, conhecidas como leishmaniose cutânea difusa (LCD), (Ashford, 2000; Martinez et al., 2002; Brasil, 2006).

A forma clínica da leishmaniose onde ocorre a visceralização do parasito é conhecida por leishmaniose visceral (LV) ou calazar, uma enfermidade de evolução crônica, caracterizada por febre irregular, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia e estado de debilidade progressivo, que pode levar o paciente à morte se este não for submetido ao tratamento específico (WHO/TDR, 2007). A leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC), uma entidade distinta comum na Índia, se caracteriza por manifestações cutâneas que surgem após o tratamento e cura da leishmaniose visceral clássica (Ashford, 2000).

Atualmente as leishmanioses encontram-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo, afetando populações de 88 países, em quatro continentes, sendo que somente em 32 destes a notificação de casos da doença é compulsória, contribuindo para a deficiência no conhecimento da real magnitude do problema. Espera-se a ocorrência de 2 milhões de novos casos de leishmanioses por ano (cerca de 500.000 novos casos de LV e 1.500.000 casos de LT), com uma prevalência estimada de 12 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo e uma população de 350 milhões de indivíduos expostos ao risco de contrair a doença (Desjeux, 2004).

Detecção recente de lesões de leishmaniose tegumentar em cangurus vermelhos, na região norte da Austrália, deixou a comunidade científica intrigada, uma vez que esse continente era, até então, considerado área livre de quaisquer espécies de *Leishmania* e também de flebotomíneos que as transmitem (Stein e Dyce, 2002; Rose et al., 2004).

Dentre os 88 países onde a doença ocorre, 76 são subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. As mudanças sócio-econômicas decorrentes do fenômeno de globalização dificultam o controle da doença, uma vez que criam ou possibilitam processos como migrações, êxodo rural, ocupação desordenada do ambiente urbano, guerras, nos quais as leishmanioses apresentam novos padrões epidemiológicos (Genaro, 1993).

Mais de 90% dos casos de leishmaniose tegumentar ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil, Peru e Argélia e aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem no Brasil, Índia, Bangladesh, Nepal e Sudão (Desjeux, 2004).

A LT tem sido descrita em quase todos os países americanos, do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile (Lainson, 1983; Shaw et al., 1976). O termo leishmaniose tegumentar americana (LTA) foi criado pelo médico Eduardo Rabello, em 1923, para designar a doença que ocorre nas Américas, a qual envolve agentes etiológicos, reservatórios e perfil epidemiológico distintos da leishmaniose tegumentar no Velho Mundo. No início da década de 80 a LT já havia sido registrada em 19 unidades federadas; em 2003 todos os estados apresentavam autoctonia, dados que comprovam a expansão geográfica da doença (Brasil, 2006). De 2001 a 2008 foram notificados e confirmados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 177.067 casos de LT, distribuídos por todos os estados; destes 161.440 foram da forma cutânea e 11.036 da forma mucosa; 611 evoluíram para óbito e 135.016 tiveram alta por cura (Datasus/MS, 2008).

A LV, dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo HIV (WHO/TDR, 2007).

Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste. Duprey e colaboradores (2006) relataram a ocorrência de cães sorologicamente positivos para LV, predominantemente em animais da raça foxhound, nos Estados Unidos e no Canadá. Ainda não existem registros de casos humanos autóctones nos EUA e a transmissão por flebotomíneos ainda não foi demonstrada.

O registro do primeiro caso da doença no Brasil ocorreu em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu o caso em material de necrópsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso (Alencar et al. 1991). A partir de um estudo realizado para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil, encontraram-se 41 casos positivos para *Leishmania*, sendo identificados em lâminas de viscerotomias praticadas post-mortem, em indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste (Pena et al, 1934).

De 1990 a 2008 foram notificados e confirmados 56.785 casos de LVH em todo o país. Nesse mesmo período o coeficiente de incidência da doença, por 100.000 habitantes variou de 1,0 a 2,9 casos. O índice de letalidade pela LVH variou de 3,2 no ano 2000 a 8,5 no ano de 2003 (período avaliado: 2000 a 2008). De 2001 a 2006 registraram-se 13.463 casos (65,6%) em área urbana. Só no ano de 2006 foram registrados 278 óbitos pela doença.

Atualmente, somente os estados de Rondônia, Amazonas, Amapá, Paraná e Santa Catarina não apresentam autoctonia da doença (DEVEP/SVS/MS, 2009; Datasus/MS, 2009). Casos de LVC foram identificados nos municípios de Santa Maria, Porto Xavier, Uruguaiana e São Borja, no Rio Grande do Sul, na região de divisa com a Argentina. No município de São Borja foram notificados e confirmados três casos autóctones de LVH (SES/RS, 2009).

Na região sudeste notifica-se 6% dos casos de LV do Brasil, sendo Minas Gerais o estado de maior incidência do agravo. A doença tem ocorrência registrada desde a década de 40, quando foram detectados os primeiros casos humanos na região norte de Minas. Nessa época a LV era doença típica de ambientes rurais, mas atualmente 84% dos casos confirmados em Minas Gerais são de pacientes residentes em áreas urbanas (Resende, 2007). Em meados dos anos 80, constatou-se uma transformação drástica na distribuição geográfica da LV. A doença, antes restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, avançou para outras regiões indenes alcançando a periferia de grandes centros urbanos (Gontijo e Melo, 2004). Em 2004 a Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais registrou uma epidemia de LV, com 692 casos humanos confirmados em 81 municípios; destes 75 evoluíram para óbito. No período de 2000 a 2007, foram confirmados 3.201 casos de LVH em Minas Gerais; as regionais com maior registro da doença foram as macrorregiões Centro (54% dos casos), Norte (26,4% dos casos) e Noroeste (10,7% dos casos) (SES/MG, 2008).

Minas Gerais é também o oitavo estado brasileiro em número de casos de LT e o primeiro da região sudeste em volume de casos/ano. Dos 853 municípios do estado, 401 já registraram a ocorrência de transmissão de LT, sendo que a forma clínica predominante em 95% dos casos é a cutânea, seguida pela forma mucosa em 3% dos casos (SES/MG, 2006). De 2001 a 2007 foram notificados e confirmados 12.450 casos de leishmaniose tegumentar em Minas Gerais. Foram registrados também, no período de 2000 a 2006, 110 óbitos de pacientes que estavam em tratamento específico para LTA. A prevenção ao óbito tem sido objeto de atenção da SES, uma vez que a doença é teoricamente não letal, e que os óbitos estão relacionados ao tratamento (SES/MG, 2008).

O Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR/WHO) estabelece a lista das 10 doenças infecciosas prioritárias no mundo; destas, 8 são doenças transmitidas por vetores. Essas doenças são responsáveis por um grande número de DALYs (“Disability Adjusted Life Years”-anos de vida potenciais perdidos), um indicador econômico que mede o número de anos de vida produtiva perdidos devido à morte prematura, incapacidade ou deficiência. Nessa lista as leishmanioses ocupam o terceiro lugar, contabilizando 59.000 mortes anuais, e 2.357.000 anos potenciais de vida perdidos (DALYs), perdendo apenas para a malária e filariose linfática (WHO, 2002). Do ponto de vista

epidemiológico, as mudanças ambientais, o crescimento demográfico e o deslocamento de animais e seres humanos são fatores que contribuem para a modificação da distribuição biogeográfica das leishmanioses, assim como para a incorporação de novos hospedeiros (Solano-Gallego et al., 2007). Essas mudanças confirmam as leishmanioses como sendo zoonoses reemergentes (Ashford, 2000).

4.2 A leishmaniose visceral

4.2.1 *O parasito*

Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral são protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de mamíferos, são eles: *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* (= *L. (L.) chagasi*) todos pertencentes ao complexo *L. (L.) donovani* (Lainson e Shaw, 1987). *L. (L.) donovani* (Laveran e Mesnil, 1903) é agente causador de uma antroponose na Índia, Paquistão e Bangladesh e em algumas regiões da África Oriental, onde o homem é o único hospedeiro mamífero encontrado infectado, sendo, portanto o único reservatório; acomete principalmente indivíduos adultos e é também conhecida por calazar indiano (WHO/TDR, 2007). A *L. (L.) infantum* (Nicole, 1908) encontrada em parte do continente asiático, africano e europeu, é agente etiológico de uma antrozooponose de canídeos silvestres (raposas e chacais), tendo o cão como principal reservatório doméstico do protozoário, atinge acidentalmente o homem, principalmente crianças, por isso é também conhecida por calazar infantil (WHO/TDR, 2007). *L. (L.) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937), é agente causador de uma antrozooponose no novo mundo (Sul do México ao norte da Argentina, exceto Chile), de forma semelhante a *L. (L.) infantum*; é também denominada de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ou calazar neotropical. Existe uma grande polêmica em torno da origem da LV no Novo Mundo – se ela foi introduzida recentemente, na época da colonização européia e causada pela espécie *L. infantum*, ou há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser identificada como *L. chagasi* (Maurício et al., 2000). Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone (Lainson e Shaw, 1987). Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas (Maurício, 2000; Gontijo e Melo, 2004). O termo leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) é também comumente utilizado em referência à leishmaniose visceral com reservatórios animais definidos, em distinção ao calazar antroponótico indiano, africano e asiático (Borja-Cabrera et al., 2008).

A posição taxonômica da espécie *L. (L.) chagasi*, agente causador da LVA, é a seguinte:

Reino: Protista (Haekel, 1887)

Sub-Reino: Protozoa (Goldfuss, 1817)

Filo: Sarcomastigophora (Honiberg e Balamuth, 1963)

Subfilo: Mastigophora (Diesing, 1866)

Classe: Zoomastigophora (Calkins, 1909)

Ordem: Kinetoplastida (Vickkerman, 1976)

Subordem: Trypanosomatina (Kent, 1880)

Família: Trypanosomatidae (Grobber, 1905)

Gênero: *Leishmania* (Ross, 1903)

Subgênero: *Leishmania* (Saf Janova, 1982)

Espécie: *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937) (= *L. infantum*).

Segundo Maurício e colaboradores (2000) as cepas de *L. chagasi* não podem ser distinguidas das cepas de *L. infantum*, o que indica que as mesmas sofreram uma separação geográfica recente. Baseados em estudos usando diferentes métodos, como RAPD combinado com RFLP, sequenciamento de DNA da protease de superfície (gp63) e hibridização com sondas de DNA, esses autores sugerem que os termos *L. chagasi* e *L. infantum* sejam usados como sinonímia. Já outro autor sugere que seja adotada a denominação *Leishmania (L.) infantum chagasi*, considerando que ainda existem muitas questões a serem esclarecidas sobre a origem, identidade e epidemiologia do parasito causador da LVA (Shaw, 1994). Shaw (2006) afirma que uma das grandes falhas na validação da nomenclatura de parasitos é o exame de um número limitado de cepas. Ele cita um exemplo ocorrido na África, quando somente após um grande número de isolados de *Leishmania* terem sido examinados é que se pôde concluir que na região circulava mais de um parasito.

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos que possuem duas formas evolutivas básicas: promastigotas, presentes no trato digestivo dos insetos e em meios de cultura, são alongadas, fusiformes, possuem um flagelo livre, móvel, extracelular e medem em torno de 15 a 20µm; amastigotas, presentes no interior de células do SFM de várias espécies de mamíferos, são arredondadas ou ovais, com flagelo rudimentar, imóvel e intracelular, medem de 2 a 5µm, com cinetoplasto visível em forma de bastão. Ambas as formas se reproduzem por divisão binária, em hospedeiros vertebrados e invertebrados, embora existam algumas evidências da possibilidade de troca de material genético sexual (Bastien et al., 1992; Lawyer et al. 2008).

4.2.2 Os vetores

Os vetores da leishmaniose visceral são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, sub-família Phlebotominae (Young e Duncan, 1994). No Velho Mundo (regiões paleártica, etiópica e oriental) pertencem ao gênero *Phlebotomus* e, no Novo Mundo (Américas), gênero *Lutzomyia*. O vetor do calazar indiano é o *Phlebotomus argentipes*, inseto essencialmente antropofílico que se infecta a partir de lesões cutâneas ricas em parasitos, principalmente em pessoas adultas. O *Phlebotomus perniciosus*, vetor da leishmaniose visceral na Europa, Oriente Médio e Sul da Rússia, pica preferencialmente o cão, atingindo o homem acidentalmente. Na África, onde há presença concomitante de *L. infantum* e *L. donovani*, os vetores de LV são, predominantemente, *Phlebotomus martini* e *Phlebotomus orientalis*, de hábitos ecléticos (Lewis, 1971).

Nas Américas é conhecida a existência de pelo menos 400 espécies de flebotomíneos, das quais cerca de 40 foram relatadas como possíveis vetores de *Leishmania* (Lainson e Rangel, 2005). O principal vetor de leishmaniose visceral americana é a espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912), cuja distribuição espacial se superpõe às áreas endêmicas ou aos focos conhecidos, sendo encontrado em todas as cinco regiões do Brasil. Na região do estado do Mato Grosso do Sul a espécie *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira Filho, 1938) tem sido incriminada como vetor da doença (Santos et al., 1998), tendo importância epidemiológica restrita àquela região (Galati et al., 1997). Na Colômbia, em foco endêmico da doença onde não há presença de *L. longipalpis*, o vetor considerado é o *Lutzomyia evansi* (Travi et al., 1996).

Os flebotomíneos são insetos muito pilosos cor de palha a castanho, facilmente reconhecidos pela atitude que adotam quando pousados, pois as asas permanecem entreabertas e ligeiramente levantadas, em vez de se cruzarem sobre o dorso (Forattini et al., 1973). São conhecidos por “mosquito palha”, “cangalhinha”, “birigui” ou “tatuíra”, em diferentes regiões brasileiras.

A *L. longipalpis*, vetor consagrado da LV no Brasil, possui hábito de vôo crepuscular e abriga-se em locais úmidos e sombrios, desenvolvendo-se em solo úmido com matéria orgânica em decomposição. Apenas as fêmeas são hematófagas, com hábitos alimentares ecléticos, podendo se alimentar em diferentes espécies de mamíferos e aves encontrados no peridomicílio, tais como suínos, cães, galinhas, eqüinos, bovinos, roedores (Barata et al., 2005), podendo ainda picar o homem tanto dentro do domicílio como fora dele (Barata et al., 2005; Michalsky et al., 2005).

O fenômeno do aquecimento global é capaz de possibilitar a expansão geográfica dos flebotomíneos (Cross e Hyams, 1996). Em um modelo para simular os efeitos

do aquecimento do planeta sobre a distribuição geográfica e sazonal do *Phlebotomus papatasi*, no sudoeste da Ásia, Cross e Hyams (1996) demonstraram que “de 115 estações climáticas, 71 (62%) são consideradas endêmicas com as atuais condições de temperatura; 14 (12%) estações adicionais se tornariam endêmicas com o aumento de 1°C; 17 (15%) a mais seriam adicionadas com aumento de 3°C; e 12 (10%) a mais, com aumento de 5°C (todas, exceto uma se tornariam endêmicas)”. Somando-se à expansão geográfica, a sazonalidade de transmissão da doença poderia se estender por 12 meses no ano em 7 (6%) das localidades com aumento de 3°C na temperatura, e em 29 (25%) localidades com um aumento de 5°C.

4.2.3 Os reservatórios

Os hospedeiros primários de *L. chagasi* são mamíferos silvestres das ordens Carnívora e Marsupialia. No Velho Mundo os hospedeiros silvestres descritos são o chacal (*Canis aureus*), o lobo (*Canis lupus*) e a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*); na China foi encontrado infectado o canídeo *Nyctereutes procyonides*; na Geórgia e Arzebaijão foram encontrados também infectados o texugo (*Meles meles*) e a raposa *Vulpes corsak* (Lainson e Shaw, 1987). A infecção por *L. infantum* também foi descrita, utilizando-se métodos moleculares (PCR), em carnívoros selvagens (*Herpestes ichneumon*) no Sudão (Elnaiem et al., 2001), em chacais do Irã, Iraque e Kazaquistão (Baneth et al., 1998; Mohebbali et al., 2005), em genetas - mamíferos carnívoros (*Genetta genetta*), lince (*Lynx pardinus*) e outros felinos (*Mustela putorius*) na Espanha (Sobrino et al., 2008).

Nas Américas, a raposa conhecida como cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766; Lainson, 1976; 1969), encontrada na Amazônia, e a raposa-do-campo (*Dusicyon vetulus*, Lund, 1842), encontrada no Nordeste, Sudeste e Centro-oeste do Brasil, são os hospedeiros canídeos identificados, considerados reservatórios; os mesmos apresentam intenso parasitismo cutâneo, o que permite fácil infecção do flebotomíneo (Deane e Deane, 1962; Lainson e Shaw, 1987, Silva et al., 2000). Na Bahia, Sherlock e colaboradores (1984) encontraram o gambá-da-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) naturalmente infectado; esse foi o primeiro registro de um hospedeiro silvestre marsupial para *L. (L.) chagasi*. Posteriormente foi encontrado na Colômbia o gambá sul-americano, o *Didelphis marsupialis*, também infectado por esse parasito (Corredor et al., 1989).

Silva e colaboradores (2005) enfatizam, oportunamente, que a identificação de DNA do parasito no sangue ou nas vísceras é uma forte evidência de infecção do hospedeiro; contudo não é suficiente para que o mesmo seja considerado reservatório da doença, havendo necessidade de se comprovar, inclusive, se os hospedeiros são realmente infectivos para os flebotomíneos. Seguindo a mesma linha de pensamento, Dantas-Torres (2007) reitera que

definir o que é um reservatório não é uma tarefa fácil; resumidamente, um reservatório seria um hospedeiro que possui vários atributos que favorecem a manutenção e disseminação de determinado agente infeccioso, o que vai muito além da simples identificação de material genético do parasito nesse ou naquele animal.

Devido à sua íntima relação com o homem, o cão doméstico tem sido apontado como principal reservatório de *L. infantum* na China e no Mediterrâneo; e de *L. chagasi* nas Américas (Ashford, 1996; Moreno e Alvar, 2002; Desjeux, 2004; Lainson e Rangel, 2005).

No Brasil, Deane (1955) estudando o calazar em Sobral, no Ceará, já apontava, precocemente, o importante papel do cão, não só como reservatório doméstico da doença, mas como elo essencial na manutenção da cadeia epidemiológica da leishmaniose visceral. Ao longo dos anos, fortes evidências foram se somando aos achados de Deane, o que corrobora para a conclusão dele: cães soropositivos, mesmo assintomáticos, apresentam intenso parasitismo cutâneo por formas amastigotas (Reis et al., 2006); cães assintomáticos, sem nenhum achado de sinal clínico da doença, podem ser fonte de infecção para flebotomíneos (da Costa-Val et al., 2007; Michalsky et al., 2007); em regiões onde a LV é endêmica a prevalência canina supera e precede a prevalência humana da doença (Oliveira et al., 2001); alguns animais podem permanecer por longos períodos sem apresentar nenhuma sintomatologia da doença, mesmo estando infectados, e na ausência de inquéritos sorológicos e programa de retirada de cães tornam-se importante fonte de infecção para flebotomíneos (Michalsky et al., 2007); até mesmo cães tratados podem ser infectivos para os flebotomíneos (Ribeiro et al., 2007); sabidamente em cidades onde houve retirada sistemática de todos os cães sororeativos a incidência do calazar humano diminuiu (Palatnik-de-Souza et al., 2001); apesar de algumas raças aparentemente serem mais resistentes à infecção por leishmania, de um modo geral, todas são vulneráveis (Solano-Gallego et al., 2000; Miranda et al., 2008).

4.2.4 Ciclo biológico

Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, as fêmeas dos flebotomíneos ingerem macrófagos teciduais contendo em seu interior formas amastigotas de *Leishmania*, as quais, após ruptura celular, são liberadas no lúmen do trato digestivo dos insetos, quando o sangue ingerido ainda permanece fresco. Ainda dentro do bolo alimentar (matriz peritrófica) as leishmanias começam a se dividir por fissão binária e se diferenciam em formas promastigotas, alongadas com flagelo livre, colonizando o intestino dos flebotomíneos. Essas formas se transformam, então, em paramastigotas, aderidas ao epitélio por junções chamadas hemidesmossomas. Posteriormente ocorre nova transformação para promastigotas, dessa vez formas extremamente ágeis que nadam livremente – as promastigotas metacíclicas; ao exercer

outro repasto sobre um hospedeiro susceptível o flebotomíneo inocula esses parasitos presentes no trato digestivo anterior, probóscide, faringe e esôfago. No local onde ocorreu a picada do inseto vetor as formas promastigotas são fagocitadas por células do SFM, macrófagos teciduais e granulócitos neutrófilos. As formas promastigotas se transformam em amastigotas, dentro do vacúolo fagocitário, se dividem rapidamente e quando o macrófago está densamente parasitado o vacúolo se rompe liberando as amastigotas, que serão novamente fagocitadas por outros macrófagos (Lainson e Shaw, 1988).

4.2.5 A leishmaniose visceral no homem

A LVH ou calazar clássico é uma doença com período de incubação variável e de difícil definição, em média de 2 a 8 meses, existindo casos com até 4 anos de evolução. Ela acomete, principalmente, crianças mal-nutridas e pessoas imunocomprometidas, embora possa ocorrer em qualquer faixa etária, com discreta predominância em indivíduos do sexo masculino. O primeiro sintoma da visceralização do parasito é febre baixa, irregular e prolongada; posteriormente, ocorrem hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, emagrecimento e, em sua fase terminal, caquexia e morte, se não instituído o tratamento adequado. Antes da introdução dos antimoniais no arsenal terapêutico, por Gaspar Vianna (1912), estimava-se que a taxa de letalidade estava entre 75 a 95% (Deane, 1955; Amato Neto, 1978).

A LVH tem sido associada a transfusões de sangue; o primeiro relato de calazar transmitido por transfusão foi na China, em 1948. Outros episódios têm sido registrados na França, Suécia, Bélgica, Reino Unido, Índia e Brasil (Dey e Singh, 2006; Chomel, 2008). O número de casos de LVH, entre pacientes transplantados, quadruplicou desde o início dos anos 90, com a maioria dos registros vindos de pacientes que vivem em países do Mediterrâneo (Antinori et al., 2008). A leishmaniose é mais comumente associada a transplantes de fígado (77%) e a forma visceral é a entidade clínica mais observada. Mais de 60 casos de LV em transplantes de órgãos sólidos já foram descritos na literatura (Martín-Dávila et al., 2008).

Casos graves de infecções por *Leishmania* spp. têm emergido em pacientes com AIDS. Em algumas regiões da África, o número de co-infecções vêm aumentando drasticamente, devido à fenômenos sociais como migrações em massa e guerras. No noroeste da Etiópia, mais de 30% dos casos de leishmaniose visceral são de pacientes também infectados com HIV. Na Ásia, co-infecções são crescentemente relatadas na Índia, agravadas pelos altos índices de resistência aos antimoniais (Alvar et al., 2008). A ocorrência nas áreas urbanas de infecções subclínicas decorrentes da permanente exposição do homem às picadas

infectantes prenuncia um grave problema associado à circulação do vírus HIV, transformando a LV em parasitose oportunista. No Brasil, estima-se que a proporção de indivíduos assintomáticos para os que apresentam a doença é de 18:1; na Espanha essa proporção chega a ser 50:1 (TDR/WHO, 2007). Realmente, a LV apresenta comportamento diferente na co-infecção com HIV, que se reflete principalmente na resposta irregular ao tratamento e alteração do padrão diagnóstico. Tem sido constatado o crescente número de casos de co-infecção *Leishmania*/HIV em áreas urbanas do Brasil, ganhando destaque novas formas de transmissão pelo compartilhamento de agulhas contaminadas, com risco de instalação do ciclo antroponótico artificial (Gontijo e Melo, 2004) o que é possível que já esteja ocorrendo na Europa (Cruz et al. 2002).

4.2.6 A leishmaniose visceral canina (LVC)

A LVC é uma doença multisistêmica, com sinais clínicos muito variáveis. A maioria dos cães apresenta pobre condição corporal, atrofia muscular generalizada, linfadenomegalia e descamação excessiva da pele. O achado histopatológico típico em seus tecidos é uma reação inflamatória granulomatosa, associada com a presença de formas amastigotas dentro de macrófagos. As mudanças dérmicas na LVC incluem dermatite exfoliativa, nodular, pustular e ulcerativa; ocorre decréscimo na produção de colágeno tipo I e aumento do colágeno tipo III proporcional à gravidade das lesões de pele e destruição dos tecidos (Koutinas et al., 1999; Giunchetti et al., 2006).

O cão representa um importante elo na manutenção do ciclo de transmissão da leishmaniose visceral e seu papel como reservatório tem sido objeto de estudo de muitos autores. Cães infectados por *L. chagasi* podem desenvolver lesões cutâneas e viscerais, ricas em parasitos, muito embora pelas sadias de cães assintomáticos também sejam fonte de amastigotas, possibilitando a infecção de flebotomíneos (Manna et al., 2004, Michalsky et al., 2007). A infecção no cão não significa, necessariamente, doença ativa (Moreno et al., 2002).

A doença é de evolução lenta e insidiosa. A LVC é uma enfermidade sistêmica grave, cujo espectro de manifestações clínicas depende do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado (Barbiéri, 2006). As características clínicas do calazar canino variam muito, devido a numerosos mecanismos patogênicos envolvidos na evolução da doença e à diversidade de resposta imune desenvolvida pelos diferentes indivíduos (Mancianti et al., 1988). Os sinais clínicos e o tempo transcorrido até o aparecimento da doença variam enormemente, de dois meses a sete anos, podendo o cão nunca desenvolver a doença (Slappendel e Greene, 1990; Gaeta et al., 1994). Em um estudo de infecção experimental,

Rodríguez-Cortés e colaboradores (2007) observaram que os sintomas da LVC apareciam entre 4 e 7 meses após a inoculação dos parasitos.

Mancianti e colaboradores (1988), estudando a leishmaniose visceral canina por *L. infantum* na ilha de Elba, na Itália, classificaram a doença de acordo com a sintomatologia clínica: animais sem sinais clínicos foram denominados assintomáticos; os que demonstravam adenopatia, pequena perda de peso e pêlo opaco foram denominados oligosintomáticos; por último aqueles que mostravam todos ou parte dos sinais graves da enfermidade (perda de pêlo, eczema furfuráceo, úlceras, onicogribose, ceratoconjuntivite, entre outros) foram classificados como cães sintomáticos.

Em estudos de infecção experimental, Genaro (1993) verificou que cães inoculados com *L. chagasi* podem evoluir de quatro formas basicamente diferentes:

- 1- Evolução frusta: os animais não apresentam qualquer alteração visível. São detectados parasitos, em algum momento após a inoculação, mas estes desaparecem em seguida.
- 2- Evolução regressiva espontânea: os animais apresentam, durante a fase inicial da doença, parasitismo transitório de medula óssea, coincidente com o período de emagrecimento. Em seguida ocorre retomada do ganho de peso, sem apresentação de qualquer outro tipo de alteração.
- 3- Evolução aguda: os cães apresentam parasitismo de medula óssea e pele, emagrecimento acentuado durante todo o curso da infecção, associado com alopecia, descamações e lesões crostosas por todo o corpo, onicogribose, envolvimento ocular e nasal, e, finalmente, evolução para caquexia, com sobrevida curta.
- 4- Evolução crônica: os animais apresentam parasitismo de medula óssea e pele, emagrecimento leve ou moderado durante todo o curso da infecção, alopecia, lesões crostosas, onicogribose, apatia, edema de membros, adenopatia, todos os sinais com intensidade de leve a moderada; possuem sobrevida longa.

No caso de cães que desenvolvem a doença, ocorre uma depleção da região das células T dos seus órgãos linfóides, enquanto a zona de células B desses órgãos prolifera. A excessiva proliferação de células B e macrófagos resulta em hepatoesplenomegalia, linfadenopatia generalizada e hipergamaglobulinemia (Strauss-Ayali et al., 2000). O aumento de produção de gamaglobulinas não conduz à proteção mas, ao contrário, é potencialmente prejudicial. Um importante dano causado pela hipergamaglobulinemia é a produção de grande quantidade de imunocomplexos circulantes, que, uma vez depositados nas paredes dos vasos sanguíneos, resultam em vasculites, poliartrites, uveítes e glomerulonefrites. Essas manifestações são acompanhadas por alterações hematológicas e bioquímicas, como anemia normocítica

normocrômica, trombocitopenia, leucopenia e aumento das proteínas totais do soro com inversão da relação albumina-globulina. Eletroforese de proteínas revela um decréscimo na concentração de albuminas, com aumento combinado de beta e gama-globulinas (Burillo et al., 1994; Campino, 2003).

A epidemiologia da leishmaniose visceral canina passa por um processo de mudança, desde os anos 80, em íntima associação com o processo de urbanização. Contudo, as medidas de controle dessa zoonose continuam as mesmas: redução da população vetorial por inseticidas residuais e manejo ambiental, diagnóstico da infecção canina com eliminação dos cães positivos e tratamento dos casos humanos (Nunes et al., 2008).

Em estudo realizado no município de Araçatuba/SP, área endêmica para LV, observou-se que, em um período de 2 anos (2002-2004), 60,9% da população canina foi recolhida e eliminada pelo serviço de Controle de Zoonoses do município, sendo que destes, somente 26,7% tinham sorologia positiva para calazar. A reposição dos animais foi realizada em 39% dos casos, em muitos por dois ou mais cães, na maioria filhotes, sabidamente mais susceptíveis a várias doenças infecciosas, incluindo a LVC. Dentre os animais de reposição, ou seja, os que foram introduzidos na residência dos que foram recolhidos, 13% já eram soropositivos no primeiro exame; após um período de observação de 32 meses, 42% se tornaram positivos. É interessante a observação dos autores que, apesar da ocorrência prévia de cães com LVC nas residências acompanhadas, nenhuma medida de prevenção contra a doença foi adotada pelos proprietários (Nunes et al., 2008).

4.3 O diagnóstico da LVC

4.3.1 *Diagnóstico clínico*

De um modo geral o diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública, principalmente devido à inexistência de testes com alta sensibilidade e especificidade, de baixo custo e de fácil implantação e operacionalização na rotina dos serviços.

O diagnóstico clínico da LVC é bastante difícil, principalmente devido à grande ocorrência de animais assintomáticos; segundo Genaro (1993), esses animais podem passar despercebidos, mesmo quando examinados pelo mais experiente especialista. Além disso, pode-se dizer que nenhum dos sinais da LVC é patognomônico, podendo ser confundidos com inúmeras outras patologias caninas, como hemoparasitoses, dermatopatias, desnutrição, entre outras. Brener (1957) observou oportunamente que, sobretudo em zonas rurais, diversos

fatores podem estar associados, especialmente endo-ectoparasitoses e desnutrição, o que pode modificar ou mascarar o quadro clínico da LVC.

Atualmente, o Ministério da Saúde recomenda que o diagnóstico laboratorial da LVC seja baseado nos exames sorológico ou parasitológico (MS/SVS, 2006).

4.3.2 *Diagnóstico sorológico*

Devido à maior rapidez e menor custo, os testes sorológicos são os mais empregados pelos programas de controle sendo seu uso recomendado em inquéritos caninos amostrais ou censitários para avaliar a soroprevalência canina. Os testes utilizados são o ELISA e a RIFI. Animais doentes manifestam uma intensa resposta imune humoral, apresentando altos níveis de IgG anti-*Leishmania* spp.. A soroconversão pode ocorrer, em média, após 3 meses de infecção e os títulos podem permanecer altos por, pelo menos, dois anos. Contudo, os testes sorológicos devem ser interpretados com cuidado, pois não são 100% sensíveis e falham em identificar animais no período pré-patente e antes da soroconversão, em alguns cães que nunca farão a soroconversão e outros que, após a soroconversão, se convertem em soronegativos, ainda que permaneçam infectados (Ferrer et al., 2002; Leontides et al., 2002; Feitosa, 2006). Animais com até 3 meses de idade podem apresentar anticorpos maternos e, portanto, apresentarem resultados falso-positivos (Braga et al., 1998).

O ELISA é utilizado para triagem de cães cujos níveis de anticorpos circulantes são desconhecidos e a RIFI para confirmação de resultados positivos triados pelo ELISA, podendo também ser utilizado sozinho na rotina diagnóstica (MS/SVS, 2006).

Na RIFI, os resultados considerados positivos são aqueles que apresentam títulos iguais ou maiores que a diluição de 1:40 (ponto de corte). Costa e colaboradores (1991) observaram que a RIFI apresenta reação cruzada em amostras de cães com leishmaniose tegumentar em 75% dos casos e com amostras de cães com doença de Chagas em 83,3%. Já para a ocorrência de outras enfermidades, como erliquiose e babesiose, Vercammen et al. (1997) e Zanette (2006), não observaram resultados falso-positivos (reações cruzadas). Além da ocorrência de reações cruzadas a RIFI possui o inconveniente de exigir pessoal altamente treinado para leitura das lâminas, incluindo o fato de a tarefa ser demorada e o critério de interpretação dos resultados muito subjetivo, principalmente em caso de baixos títulos.

O ELISA é uma técnica altamente sensível, quantitativa, automatizada, porém com algumas limitações como níveis de especificidade baixos, principalmente quando se utilizam antígenos brutos (Reed, 1996); costuma apresentar sensibilidade maior e especificidade menor, em comparação com a RIFI. O ELISA é capaz de identificar baixos níveis de

anticorpos, porém é pouco preciso na detecção de casos pré-clínicos ou assintomáticos (El-Amim et al., 1986)

Os antígenos utilizados nesses dois testes diagnósticos são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitos totais, parasitos lisados ou antígenos recombinantes. Dependendo do antígeno empregado, a sensibilidade pode variar de 95 a 99,5% e a especificidade de 97,1 a 100% (Mancianti et al., 1995; Badaró, 1996; Laurenti et al., 2005). Além disso, o tipo de antígeno utilizado (forma evolutiva ou espécie) e possíveis mudanças no protocolo padrão utilizado (tempo de incubação ou tipo de microplacas utilizadas) podem alterar os resultados referentes à sensibilidade e à especificidade desses exames (Reinthinger et al., 2002).

Outros testes sorológicos utilizados no diagnóstico da LVC são a reação de fixação do complemento, o teste de hemaglutinação direta e indireta e o DAT - teste de aglutinação direta (Oskam et al., 1996). Ferreira e colaboradores (2007) demonstraram que a técnica do DAT se compara à técnica de ELISA em índices de sensibilidade e especificidade, sendo superior quando comparada à RIFI; é de fácil execução, mas tem uso limitado devido ao alto custo do antígeno importado.

4.3.3 Diagnóstico parasitológico

O exame parasitológico é o método de eleição, considerado padrão-ouro para diagnóstico da LVC. É baseado na visualização de formas amastigotas do parasito por punção aspirativa de órgãos-alvo (baço, fígado, linfonodos e medula óssea) ou por fragmentos de biópsia dos mesmos (Ferrer et al., 1999). Do material aspirado ou do fragmento é realizado esfregaço ou impressão em lâminas, respectivamente, coradas por derivados de Romanowsky, Giemsa ou Leishman. Segundo Ashford (2000), o diagnóstico microscópico de lâminas coradas pode se tornar difícil se o animal apresentar baixa carga parasitária; além disso, a leitura completa da lâmina exige tempo e treinamento adequados.

Outro método de detecção do parasito é o isolamento de promastigotas em meios de cultura como o NNN (Novy-McNeal-Nicole) e o Schneider (Schneider's Drosophila Medium), a partir dos aspirados ou fragmentos dos órgãos (Reiter et al., 1985; Genaro, 1993). Mesmo sendo uma técnica de certeza, pois a visualização do parasito não deixa dúvida sobre a infecção, ainda assim possui limitações pois é um método laborioso, de alto custo, lento, além de necessitar de pessoal altamente treinado e acompanhamento sistemático (Ferrer, 1997).

Outros métodos parasitológicos são a inoculação experimental em mamíferos susceptíveis, como o hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*) e xenodiagnóstico, ambos

extremamente laboriosos e demorados; estes devem ser realizados com extrema cautela e, portanto, ficam restritos à centros de referência (Alvar et al., 2004).

A análise histopatológica de órgãos infectados também pode ser utilizada para a detecção dos parasitos intracelulares (Keenan et al., 1984; Tafuri et al, 2001). Esses métodos podem apresentar baixa sensibilidade e requerem mão-de-obra altamente especializada (Badaró, 1996).

O diagnóstico por imunohistoquímica, seja pelo método de revelação pela imunoperoxidase ou pela imunofluorescência direta em tecidos, facilita a visualização de formas amastigotas nos tecidos, devido à utilização de anticorpos específicos marcados que se ligam aos antígenos presentes nos cortes histológicos (Tafuri et al., 2004).

4.3.4 *Diagnóstico por testes imunocromatográficos*

Testes imunocromatográficos são baseados na ligação de anticorpos específicos a antígenos que, após interação, migram por uma superfície, possibilitando a visualização dos resultados. O teste comercial Kalazar detect™ é um exemplo de teste rápido, qualitativo, que se tornou disponível recentemente. Ele é baseado em um polipeptídeo recombinante, denominado de rK39, o qual contém 39 aminoácidos repetidos, sendo parte de uma grande proteína da família das kinesinas, as quais se apresentam de forma altamente conservada em espécies de *Leishmania* viscerotrópicas: *L. donovani*, *L. chagasi* (= *L. infantum*) (Burns et al., 1993). A região repetitiva desse antígeno é mais abundante no estágio de amastigota do parasito, a forma responsável pela doença. Esse teste utiliza um formato com proteína A conjugada com ouro coloidal; a ligação antígeno-anticorpo ocorre em segundos e a totalidade do teste pode ser completada em até 10 minutos.

Esses testes têm-se demonstrado sensíveis e específicos no diagnóstico da LVH (Sundar et al., 1998; Jelinek et al., 1999; Bern et al., 2000; Zijlstra et al., 2001; Carvalho et al., 2003), e existem algumas publicações citando seu uso no diagnóstico da LVC (Mohebbali et al., 2004; Otranto et al., 2004; Toz et al., 2004; Mettler et al., 2005).

Badaró e colaboradores (1996), utilizando uma variante desse teste, denominado TRALd, que utiliza o mesmo antígeno e mesmo mecanismo, produzido para utilização em pesquisa somente, observou índices de sensibilidade e especificidade de 100%. França-Silva (1997), trabalhando em condições de laboratório, observou que a sensibilidade do mesmo método foi de 92% e a especificidade de 99,5%, em soro de cães da cidade de Montes Claros/MG. Em estudo recente, Lemos e colaboradores (2008), utilizando a versão comercial do método, demonstraram que o Kalazar detect™ apresentou sensibilidade de 83% e especificidade de 100%, quando comparado à técnica de ELISA com antígenos brutos, a

última com sensibilidade de 95% e especificidade de 100%. Testando o Kalazar detect™ em cães com outras patologias, esses autores identificaram a ocorrência de reação cruzada com erliquiose e doença de Chagas, reduzindo a especificidade para 93%.

4.3.5 Diagnóstico molecular

Parasitas dos gêneros *Leishmania*, *Crithidia* e *Trypanosoma*, entre outros pertencentes à ordem Kinetoplastida (Vickerman, 1976) possuem uma organela única, situada na base do flagelo, denominada cinetoplasto (Simpson, 1987).

O cinetoplasto contém uma rede concatenada de DNA (kDNA) que pode ser dividido em dois grupos: os maxicírculos e os minicírculos. Os maxicírculos são encontrados em número de 20 a 50 unidades e os minicírculos em cerca de 10.000 unidades (Rodgers, 1990).

Os maxicírculos são moléculas de DNA homogêneas, que tem entre 20-35 kb. Possuem muitas das características de DNA mitocondrial convencional, com proteínas envolvidas na produção de energia. Os minicírculos, em contraste, são moléculas heterogêneas, de 0.5-1.5 kb, que podem ser separadas em seqüências distintas, que diferem em número e tipo entre as espécies. Cada minicírculo do gênero *Leishmania* possui uma região denominada conservada, apresenta uma seqüência nucleotídica de 120 a 200 pares de base (pb), nessa região encontram-se 3 pequenos blocos conservados de seqüência (Conserved Sequence Block) numerados de 1 a 3, sendo que um desses blocos (CSB-3) contém a “seqüência universal dos minicírculos” (UMS-universal minicircle sequence: GGGGTTGGTGTA), presente em todos os minicírculos de todas as espécies de *Leishmania* (Ray, 1989).

4.3.5.1 Reação em cadeia da polimerase - PCR

O advento da tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR), em meados da década de 80, representou um importante marco para estudos genético-moleculares envolvendo várias espécies de seres vivos. Diversas técnicas baseadas na PCR foram descritas com a possibilidade de realização automatizada da reação (Saiki et al., 1985, Mullis et al., 1986)

Rodgers e colaboradores (1990) foram os pioneiros na utilização da técnica de PCR para identificação de DNA de *Leishmania*, tendo como alvo as moléculas do minicírculo do kDNA. Esses autores demonstraram a sensibilidade do método, capaz de detectar o kDNA equivalente a um único parasito.

Diversos protocolos já foram descritos para detecção de *Leishmania* em amostras de humanos (Volpini et al., 2004; Ferroglio et al., 2006), cães (Ferroglio et al., 2006; Quaresma

et al., 2007; Teixeira-Neto, 2008; Queiroz et al., 2008; Maia et al., 2009), flebotomíneos (Carvalho, 2006; Michalsky et al., 2007; Saraiva, 2008) e animais silvestres (Sastre et al., 2008) tendo como alvo a região conservada do minicírculo do kDNA. Outros alvos, além do kDNA, também têm sido utilizados na PCR, como o DNA ribossomal e o espaçador interno transcrito 1 (Internal transcribed spacer – ITS 1). Os métodos de PCR que utilizam como alvo regiões do kDNA têm demonstrado ser mais sensíveis do que os que utilizam DNA genômico. Essa maior sensibilidade parece estar relacionada ao número de cópias do alvo, que no caso do DNA dos minicírculos chega a cerca de 10.000 cópias; para o RNA ribossomal (rRNA) o número de cópias é significativamente menor, cerca de 40-200 cópias (Lachaud et al., 2002; Nasereddin et al., 2006).

O DNA de *Leishmania* também pode ser identificado por PCR em outras amostras biológicas que não são usualmente utilizadas na rotina diagnóstica, como pulmão, coração, pênis, vagina, testículos, sêmen, útero, placenta, rim, intestinos, leite, urina e mucosa conjuntival (Andrade et al., 2002; Reithinger et al., 2002; Barrouin-Melo et al., 2005; Diniz et al., 2005; Rosypal et al., 2005; Franceschi et al., 2006; Ferreira et al., 2008).

Embora a PCR seja considerada uma ferramenta muito útil, dada à sua alta sensibilidade e versatilidade de uso, alguns autores relatam suas limitações, como o elevado custo e a baixa adaptabilidade do método às condições de campo (Reed, 1996). A redução dos custos dessa técnica permanece como um dos maiores desafios à sua utilização em países em desenvolvimento (Gomes et al., 2008).

4.3.5.1.a PCR-RFLP kDNA

A técnica de RFLP, associada à PCR, pode ser utilizada para o propósito de identificação de algumas espécies de *Leishmania*. Esse método utiliza uma ou mais enzimas de restrição que cortam o DNA em sítios específicos, possibilitando a diferenciação das espécies, de acordo com o tamanho dos fragmentos gerados. Após a descrição de um protocolo de PCR RFLP em *Trypanosoma cruzi* (Ávila et al., 1990), a técnica começou a ser empregada na identificação de espécies de *Leishmania* (Kapoor et al., 1998; Volpini et al., 2004; Andrade et al., 2006; Ferroglio et al., 2006).

A tabela a seguir descreve os fragmentos gerados após digestão do kDNA de *Leishmania*, pela endonuclease *HaeIII*.

Tabela 1: Tamanho dos fragmentos, obtidos após digestão do kDNA de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* pela enzima *HaeIII*.

Espécie	Fragmentos gerados após digestão por <i>HaeIII</i> (pb)
<i>L. amazonensis</i>	116
<i>L. braziliensis</i>	80,40
<i>L. chagasi</i>	120, 80, 60, 40

4.3.5.1.b PCR RFLP *hsp70*

A PCR RFLP de fragmento do gene *hsp70* é útil para a identificação das espécies de *Leishmania* que ocorrem no Novo Mundo, em amostras clínicas tais como biópsia de pele ou tecidos de insetos. O gene *hsp70* codifica as proteínas de choque térmico (HSP70), um grupo protéico de elevado interesse para estudos de diferentes doenças infecciosas. Elas são as mais abundantes proteínas intracelulares e estão presentes em todos os compartimentos de todos os tipos celulares de procaríotos e eucariotos. Essas proteínas têm suas sínteses aumentadas em situações consideradas estressantes para a célula do parasito (Campos, 2007).

A PCR RFLP do gene *hsp70* pode permitir a sondagem da variabilidade genética das moléculas possivelmente envolvidas na imunopatologia da doença. A sensibilidade da técnica é em torno de 95% e a digestão dos produtos da PCR do *hsp70* com a enzima *HaeIII* discrimina seis espécies ou grupos (figura 1). A PCR RFLP *hsp70* também identifica e distingue infecções por *T. cruzi*, que freqüentemente ocorrem em sobreposição às áreas endêmicas para leishmanioses.

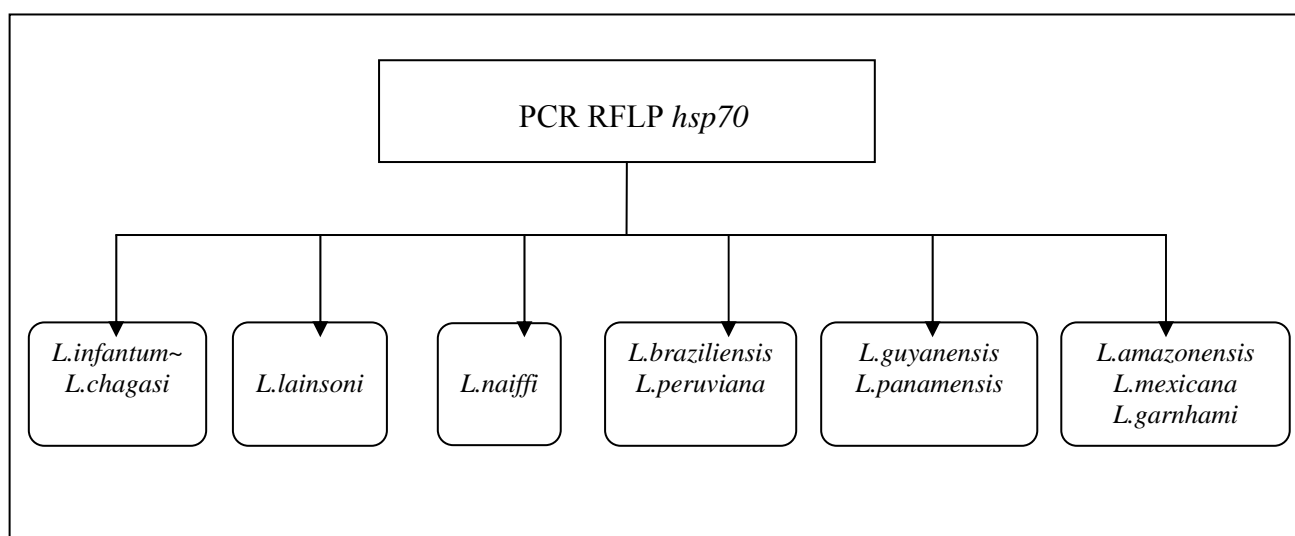


Figura 1: Discriminação espécie-específica de leishmanias que ocorrem no Novo Mundo pela PCR RFLP *hsp70*.

Métodos

5 Métodos

5.1 Área de estudo

Foram escolhidas, para a realização do presente trabalho, amostras caninas provenientes dos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu, estado de Minas Gerais, Brasil. Montes Claros (16°44'02``S, 43°51'23``O) e Janaúba (15°47'50``S, 43°18'31``O) são localizados na mesorregião Norte do estado e possuem população de 358.271 e 67.941 habitantes, respectivamente (IBGE, 2008). Paracatu é localizado na mesorregião Noroeste de Minas Gerais (17°13'01``S, 46°52'17``O), sua população é de 82.850 habitantes (IBGE, 2008).

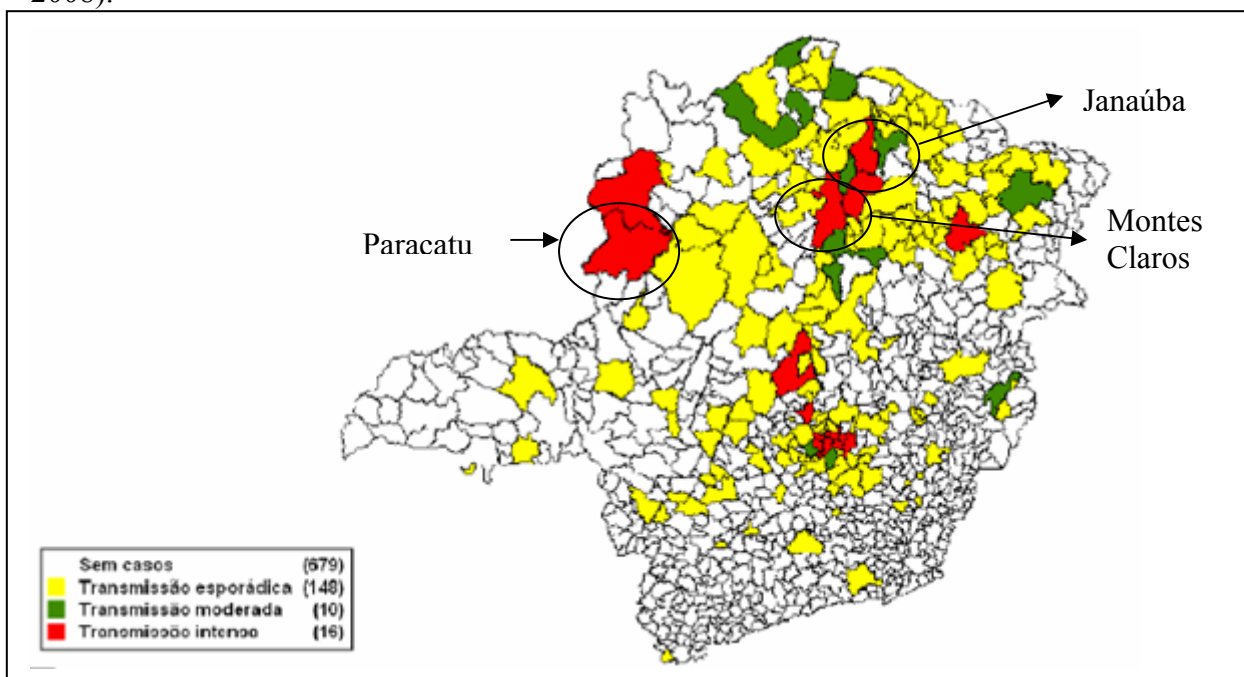


Figura 2: Localização geográfica da área de estudo.

Os três municípios são classificados, segundo o Ministério da Saúde, em áreas de intensa transmissão de leishmaniose visceral (MS/SVS, 2006) e todos possuem programas de controle da doença inseridos na rotina dos serviços das respectivas Secretarias Municipais de Saúde, incluindo retirada de cães soropositivos, identificação e tratamento de casos humanos e controle químico da população vetorial, associado ao manejo ambiental.

5.2 Amostras biológicas

De cada um dos municípios foram selecionados 15 cães (*Canis familiaris*), de ambos os sexos, preferencialmente com idade de 6 meses ou mais, de raças variadas ou sem raça definida (SRD), todos com sorologia positiva para LVC, por ELISA e RIFI, de acordo com os critérios do Ministério da Saúde (Brasil, 2006). O diagnóstico sorológico dos animais foi realizado pelas Secretarias Municipais de Saúde, para os cães provenientes de Montes Claros

e Paracatu; para os animais provenientes de Janaúba, o exame foi realizado pela Gerência Regional de Saúde de Montes Claros.

5.3 Caracterização clínica dos animais

Os animais foram avaliados por dois médicos veterinários e classificados clinicamente conforme as formas polares da doença: assintomáticos, sem nenhum sinal sugestivo, e sintomáticos, presença de pelo menos um sinal.

Os cães provenientes dos municípios de Janaúba e Montes Claros foram avaliados e posteriormente necropsiados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Montes Claros; os animais provenientes do município de Paracatu foram necropsiados em instalações da FUNASA do município de Paracatu.

5.4 Coleta de amostras biológicas

Após a avaliação clínica inicial, que classificou os indivíduos em assintomáticos ou sintomáticos, foi coletada uma amostra de 5ml de sangue periférico, por punção da veias cefálica ou jugular, em tubos para coleta de sangue sem anticoagulante, para separação do soro. Os animais foram então sedados com solução de cloridrato de xilazina (Dopaser® - Lab. Hertape Calier), na dose de 1,1-2,2 mg/kg PV, por via intramuscular, músculo semitendinoso, utilizando-se seringa de 1, 3 ou 5ml e agulha 25 X 8. Após apresentarem estado de relaxamento muscular, os animais foram anestesiados com solução de thionembutal (Thiopentax® - Lab. Cristália), sendo 1grama ressuspendido em 40 ml de soro fisiológico, dose de 5-15 mg/kg PV, por via endovenosa, veia cefálica, usando scalp nº 21, 23 ou 25G, de acordo com o tamanho do animal e seringa de 3, 5 ou 10ml, de acordo com o volume a ser administrado; foram aguardados cerca de 2-5 minutos até que o animal apresentasse plano anestésico profundo, evidenciado pela rotação de globo ocular, ausência de reflexos interdigitais profundos, superficiais e corneal e respiração abdominal. Em plano anestésico, o animal foi submetido à punção de medula óssea, na região da crista tibial, com agulha estéril de metal e seringa estéril de 20 ml; o material aspirado foi imediatamente inoculado em meio de cultura NNN/LIT, em microambiente estéril (bico de bunsen). A eutanásia foi realizada logo após a punção de medula óssea, utilizando-se para isso uma dose extra de thionembutal, via endovenosa e, logo após, injeção de 20ml de solução de cloreto de potássio saturada (20% de cloreto de potássio em água bidestilada), via endovenosa. Uma vez atestado o óbito do animal foi realizada incisão no flanco esquerdo para exposição dos intestinos, para coleta de dois fragmentos de linfonodo mesentérico, e baço, para coleta de dois fragmentos de borda, sendo uma amostra para impressão em lâmina e outra para PCR. Da borda distal da orelha

foram retirados dois fragmentos para as mesmas técnicas. A carcaça do animal foi acondicionada em saco plástico e destinada ao aterro sanitário do respectivo município. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelos comitês de Ética, CEUA - FIOCRUZ e CETEA - UFMG (anexos 1 e 2).

5.5 Realização do teste rápido Kalazar detect™

O sangue em tubos sem anticoagulante foi centrifugado a 3000 rpm, por 10 minutos, para separação do soro. O teste rápido Kalazar detect™ - InBios International Inc. USA foi realizado utilizando-se duas gotas de soro (aproximadamente 20µl), gotejadas na ponta do teste, e duas gotas da solução tampão, conforme instruções do fabricante. As fitas foram mantidas em posição vertical, até a visualização da(s) banda(s). Resultados duvidosos foram repetidos pelo menos uma vez.

5.6 Exames parasitológicos

5.6.1 *Impressão e esfregaço em lâmina*

Foram realizadas impressões em lâmina de fragmentos de linfonodo mesentérico, borda de baço e ponta de pele de orelha e esfregaço em lâmina de amostras de medula óssea de todos os animais amostrados. As lâminas foram coradas pelos métodos Giemsa e Panótico e visualizadas em microscópio ótico, objetiva de imersão (100X), à procura de formas amastigotas.

5.6.2 *Mielocultura*

As amostras de medula óssea dos animais amostrados, inoculadas em meio de cultura imediatamente após a coleta, foram armazenadas em caixa de isopor, à temperatura ambiente por dois dias e posteriormente em estufa tipo B.O.D, à temperatura de 25°C ± 1°C. Após 3 ou 4 dias as amostras foram submetidas à limpeza para retirada de coágulo, em ambiente estéril (capela de fluxo laminar). O exame foi realizado em intervalo de quatro a sete dias, em microscópio ótico, objetiva de 10X ou 40X, colocando-se uma gota sobre lâmina; a cultura foi considerada positiva quando foi observada a presença de pelo menos uma forma promastigota de *Leishmania*. As amostras isoladas foram expandidas em meio NNN/LIT, passando de tubos de ensaio para erlenmeyers de 50 a 150ml até atingir o volume final de 100.000.000 células, em aproximadamente 40ml de meio de cultura, para realização da PCR. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer. Quando a amostra atingiu o volume de células desejado o meio líquido foi centrifugado a 3000 rpm, 4°C, por 15 minutos, para sedimentação das células, lavado e resuspendido em PBS por 2 ou 3 vezes, posteriormente

congelado a -20°C . Amostras negativas foram acompanhadas por pelo menos quatro semanas; se após esse período permaneciam negativas eram descartadas.

5.7 Métodos moleculares

5.7.1 *Extração de DNA para realização de PCR*

Para extração de DNA das amostras de pele, baço, linfonodo e massa de cultura de *Leishmania* foi utilizada a técnica de extração pelo método do fenol-clorofórmio descrita por Sambrook e Maniatis (1989). Uma pequena amostra (2 mm) do tecido (pele, baço, linfonodo) ou um pequeno volume de massa de cultura congelada ($2,5 \times 10^6$ células/ml) foram macerados em tubos tipo eppendorf de 1,5 ml, com auxílio de pistilo. Após formação de uma massa homogênea foi adicionada solução de lise (100mM de Tris-HCl, 100mM de NaCl, 25mM de EDTA, 0,5% de SDS, pH 8,0) seguido de agitação suave. Foram acrescentados 10 μ l de solução de proteinase K (10mg/ml) ao conteúdo, posteriormente incubado a 37°C , por 24 horas. Após a incubação, foram adicionados aos tubos 500 a 700 μ l de solução de fenol ultrapuro (USB®). Os tubos foram agitados manualmente até formar uma emulsão, por 10 minutos e, posteriormente, centrifugados a 14.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo, onde foi acrescentada solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) (USB®), numa proporção de 1:1. O conteúdo foi novamente homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente retirado e transferido para novo tubo, adicionado de solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (USB®), repetida a centrifugação e nova retirada do sobrenadante nas mesmas condições. O DNA foi precipitado utilizando-se 1/10 de volume de solução de acetato de sódio 3M, pH 5.2 e um volume de 1/50 de etanol absoluto gelado, armazenado a -20°C , por 24 horas, ou a -70°C , por uma hora. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm, por 30 minutos, a 4°C , para sedimentação do DNA e descarte do sobrenadante. A amostra foi lavada com 500 μ l de álcool 70% gelado e centrifugada a 14.000 rpm, por 15 minutos, por duas vezes, e o sobrenadante descartado. O DNA foi mantido à temperatura ambiente, por 24h, resuspendido em TE 1X ou água Milli Q e submetido a leitura em espectrofotômetro (Nanodrop - Thermo Fisher Scientific Inc.), na faixa de 260 a 280nm, para avaliar grau de pureza da amostra e quantidade de DNA extraído; o DNA foi posteriormente armazenado a -20°C .

5.7.2 *Reação em cadeia da polimerase - PCR*

As amostras de DNA extraído de pele de orelha, linfonodo mesentérico e baço foram utilizadas primeiramente em reações de PCR para identificação do gene constitutivo da β

globina do cão (PCR da β globina), para confirmar o sucesso da extração e, uma vez positivas, para detecção de DNA de *Leishmania* spp. (PCR para kDNA).

As amostras de DNA obtidas a partir de massa de promastigotas isoladas em mielocultura foram utilizadas somente em PCR para kDNA. A extração de DNA foi repetida em amostras onde não houve amplificação na PCR para o gene da β globina.

5.7.2.1 PCR para o gene da β globina do cão

Com objetivo de verificar o sucesso na extração de DNA das amostras clínicas utilizadas foi efetuada a amplificação de um fragmento do gene constitutivo do cão que codifica a subunidade protéica β globina da proteína transportadora de oxigênio em mamíferos, a hemoglobina, a qual é composta de duas cadeias α (alfa) globina e duas cadeias β (beta) globina. Os iniciadores utilizados foram os seguintes: 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3' e 5' ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3' (Greer et al., 2001; Quaresma et al., 2009).

As reações foram preparadas para um volume final de 20 μ l por amostra contendo 2 μ l de DNA (de 50 a 1000ng), 0,95 μ l (10 pmol) de cada iniciador (Bioneer), 13,38 μ l de água ultra-pura (GibcoTM), 0,32 μ l (12,5mM) de dNTP (InvitrogenTM), 2 μ l de tampão 10X (com 1,5mM MgCl₂ -InvitrogenTM) e 0,4 μ l (2U) de DNA polimerase (InvitrogenTM).

A reação foi realizada no termociclador automático (Perkin-Elmer Geneamp PCR Sistem 2400) e as condições de amplificação foram as seguintes: 94°C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 45°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 45 segundos para extensão; a extensão final foi realizada a 72°C por cinco minutos.

5.7.2.2 PCR kDNA para o gênero *Leishmania*

O par de iniciadores utilizado foi previamente desenhado para o gênero *Leishmania*, a partir da região conservada do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) do parasito. Os iniciadores A: 5' (C/G) (C/G) (G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' e iniciador B: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3' (Degrave et al., 1994) amplificam um segmento de 120 pb.

As reações foram preparadas para um volume final de 50 μ l contendo 1,0 μ l de DNA (de 10 a 20 ng, para amostras de DNA de cultura e de 30 a 300 ng, para amostras de DNA de tecidos), 1,0 μ l (10 pmol) de cada iniciador (Bioneer), 46 μ l de água ultra-pura (GibcoTM) e uma "bead" (Ready-to-go PCR beads - GE Healthcare) contendo, após reconstituição para 50 μ l, uma concentração de 100 μ M de cada dNTP em 5 mM de Tris-HCl (pH 9.0 em

temperatura ambiente), 25mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, BSA, aproximadamente 2,5 unidades de DNA polimerase e tampão de reação.

A amplificação foi feita em equipamento termociclador automático (Perkin-Elmer-Geneamp PCR Sistem 2400) utilizando-se o seguinte programa: 94°C por 4 minutos seguidos de 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 60°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 30 segundos para extensão; extensão final a 72°C por dez minutos.

5.7.2.2.a Visualização dos resultados

Os produtos amplificados resultantes da PCR kDNA e PCR β globina foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (10ml de solução de bisacrilamida 6%, 125µl de PSA, 12,5µl de TEMED) submetido a corrente de 60V e 110V (Fonte BioRad), antes e após separação das bandas, respectivamente, imerso em tampão TBE. O gel foi incubado em com solução fixadora (10% de álcool p.a., 0,5% de ácido acético) por 10 minutos, solução de nitrato de prata 0,2% por 10 minutos, lavagem com água tipo I por 2 minutos e solução reveladora (NaOH a 3%) até visualização das bandas. Todas as soluções foram preparadas com água tipo I - bidestilada.

Foram aplicados no gel 5 µl do produto amplificado misturados a 5 µl de tampão de corrida (azul de bromofenol). O marcador de peso molecular utilizado foi o ØX 174 (InvitrogenTM) que, digerido pela enzima *HaeIII*, apresenta 11 fragmentos variando de 72 a 1357 pb.

5.7.2.3 PCR RFLP kDNA

A técnica de RFLP utiliza enzimas que cortam a dupla fita de DNA pelo reconhecimento de uma pequena seqüência de nucleotídeos, usualmente de quatro a seis pares de bases de tamanho. O kDNA das espécies *L. L. amazonensis*, *L. V. braziliensis* e *L. L. chagasi* (= *L. infantum*) apresenta seqüências suficientemente distintas para ser utilizado na diferenciação destas espécies. Segundo Volpini (2004), a digestão com a endonuclease *HaeIII* (*Haemophilus aegyptius*) possibilita a distinção das três espécies; já a enzima *ApaI* (*Acetobacter pasteurianus*) diferencia apenas os complexos *Leishmania* e *Viannia*. Para a identificação das espécies de *Leishmania* nas amostras de cães “PCR positivos” para o gênero *Leishmania* foi utilizada a enzima *HaeIII*, que digere *L. (L.) amazonensis* em um fragmento de 116 pb; *L. (V.) braziliensis* em dois fragmentos, de 80 e 40 pb; *L. (L.) chagasi* em fragmentos de 120, 80, 60 e 40 pb (Tabela 1).

A técnica foi realizada conforme descrito por Andrade e colaboradores (2006). Uma mistura prévia contendo 2U (0,2µl) da enzima de restrição *HaeIII* (InvitrogenTM), 2,0µl do

tampão da enzima (Invitrogen™), 7,8µl de água ultra-pura (Gibco™) foi posteriormente adicionada de 10µl de produto amplificado, homogeneizada e incubada a 37°C, por 3 horas, em banho-maria.

5.7.2.3.a Visualização dos resultados

A visualização das bandas foi por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (10ml de solução de bisacrilamida 10%, 125µl de PSA, 12,5µl de TEMED), seguindo o procedimento descrito no item 7.2.2.a.. Foram aplicados no gel 5 a 7µl da amostra do produto amplificado digerido pela enzima, misturados a 5 µl de tampão de corrida (azul de bromofenol). O marcador de peso molecular utilizado foi o 25 pb (Invitrogen™) que gera 19 bandas de 25 a 450 pb, mais uma banda de 500 pb.

5.7.2.4 PCR RFLP *hsp70*

A técnica de PCR RFLP do gene *hsp70* foi utilizada com o objetivo de confirmar as amostras de *Leishmania* isoladas em cultura que, na PCR RFLP do kDNA, apresentaram perfil de *L. amazonensis*. A PCR do gene *hsp70* amplifica uma região de 1.300 pb do DNA genômico e a respectiva RFLP é realizada com a enzima *HaeIII* (Garcia et al., 2004; Garcia et al., 2006; Garcia et al., 2007).

Os iniciadores utilizados foram os seguintes: *hsp70* senso 5`GACGGTGCCTGCCTACTTCAA3` e *hsp70* anti-senso 5`CCGCCCATGCTCTGGTACATC3` (Garcia et al., 2004; Garcia et al., 2006). As reações foram preparadas para um volume final de 25µl por amostra contendo 2µl de DNA (de 20 a 200ng), 1,0µl (10 pmoles) de cada iniciador, 18,48µl de água ultra-pura (Gibco™), 0,4µl de dNTP (12,5mM - Invitrogen™), 0,375µl de MgCl₂ (50mM - Invitrogen™), 2,5µl de tampão 10X (sem MgCl₂ - Invitrogen™) e 0,25µl de Taq polimerase Platinum®(5U/µl- Invitrogen™).

Utilizou-se o termociclador automático (Perkin-Elmer Geneamp PCR Sistem 2400) e as condições de amplificação foram: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 61°C por 1 minuto para anelamento, 72°C por 3 minutos para extensão; extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 2%, corado pelo brometo de etídio, sob luz ultravioleta.

5.7.2.5 PCR kDNA para complexo *mexicana*

A técnica de PCR kDNA para complexo *L. mexicana* foi utilizada como metodologia extra, para confirmação das amostras identificadas como *L. amazonensis*; foi realizada em outro laboratório, com objetivo de confirmar imparcialmente os achados dessa espécie. Os

iniciadores M1 5' CCAGTTTCGAGCCCCGGAG 3' e M2 5'GGTGTAATAGGGGCGGATGCTCTG 3' amplificam uma região variável das moléculas do minicírculo do kDNA (Eresh et al., 1994).

As condições de amplificação foram as seguintes: 95°C por 3 minutos, seguidos de 33 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 45°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão; a extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos. Os resultados da PCR foram visualizados em gel de agarose 2%, corado pelo brometo de etídio. Essa técnica foi realizada no Laboratório de Sistemática Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz, sob responsabilidade da Dr^a Raquel Pacheco.

5.8 Cepas de Referência de *Leishmania* spp.

As cepas de referência utilizadas como controle positivo das reações de PCR e como perfil padrão de digestão nas RFLP's foram:

- *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8)
- *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903)
- *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75)
- *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147)

5.9 Análise estatística

Nas análises foram realizados testes para comparação dos resultados obtidos utilizando-se diferentes técnicas. Foi adotado o método de sorologia como “padrão ouro”, ou atributo conhecido.

As análises estatísticas utilizadas foram: Análise de Concordância de Kappa (1), o teste do qui-quadrado e teste exato de Fisher (2) e o teste para duas proporções binomiais (3).

1) Para descrevermos a intensidade da concordância entre dois ou mais juízes, ou entre dois métodos de classificação (por exemplo: dois testes de diagnóstico), utiliza-se a medida de concordância Kappa que é baseada no número de respostas concordantes, ou seja, no número de casos cujo resultado é o mesmo entre os juízes. O Kappa é uma medida de concordância inter-observador e mede o grau de concordância além do que seria esperado tão somente pelo acaso. Esta medida de concordância tem como valor máximo o 1, onde este valor 1 representa total concordância e os valores próximos e até abaixo de 0, indicam nenhuma concordância, ou a concordância foi exatamente a esperada pelo acaso. Para avaliar se a concordância é razoável, fazemos um teste estatístico para avaliar a significância do Kappa. Neste caso a hipótese testada é se o Kappa é igual a 0, o que indicaria concordância nula, ou se ele é maior do que zero, concordância maior do que o acaso (teste monocaudal: $H_0: K = 0$; $H_1: K > 0$). Se o p-valor do teste de Kappa for maior que o nível de significância tem-se evidências de que o valor da estatística é igual a zero, ou seja, os juízes são não concordantes. As diretrizes para a interpretação (sempre subjetiva) de Kappa, segundo Fleiss (1981) são dadas na seguinte tabela:

Valor de Kappa	Concordância
-1 _____ 0,4	Pobre
0,4 _____ 0,75	Razoável ou Boa
0,75 _____ 1,0	Excelente

Figura 3: Valores de Kappa e nível de concordância.

2) Naturalmente, os valores específicos obtidos para os indicadores acima numa determinada situação de pesquisa podem surgir aleatoriamente, por pura coincidência, sendo necessário aplicar um teste estatístico, mais comumente o Teste Qui-Quadrado ou o Teste Exato de Fisher, aceitando os resultados da análise quando a probabilidade do acaso for menor ou igual a 5%. Se os testes forem estatisticamente significativos, (p-valor menor que 0,05) têm-se evidências de que as variáveis são correlacionadas ou não independentes. O p-

valor do teste exato de Fisher é exato para todos os tamanhos de amostra, enquanto resultados de testes Qui-Quadrado que examinam as mesmas hipóteses podem ser inexatos quando as contagens das células são pequenas.

3) Realizou-se também um teste de hipóteses para a diferença entre duas proporções binomiais. Para tal diferença calculou-se um intervalo de confiança (IC 95%). O resultado oferece dois testes de hipóteses para a diferença entre duas proporções: Teste Exato de Fisher, e um teste baseado em uma Aproximação Normal. O teste da Aproximação Normal pode ser inexato para amostras nas quais o número de eventos em qualquer amostra é menor que cinco, ou se a diferença entre o número de ensaios e eventos em qualquer amostra é menor que cinco. O Teste Exato de Fisher é exato para todos os tamanhos de amostra, mas só é indicado como forma de decisão quando a hipótese nula declara que as proporções populacionais são iguais. Assim, para os demais casos, utiliza-se a Aproximação Normal.

Resultados

6 Resultados

6.1 Caracterização clínica dos animais

Os animais amostrados foram agrupados conforme classificação descrita por Mancianti e colaboradores (1988) com modificações. Em nossa abordagem, utilizou-se somente as formas polares da doença (cães sintomáticos e cães assintomáticos).



A



B



C



D



E

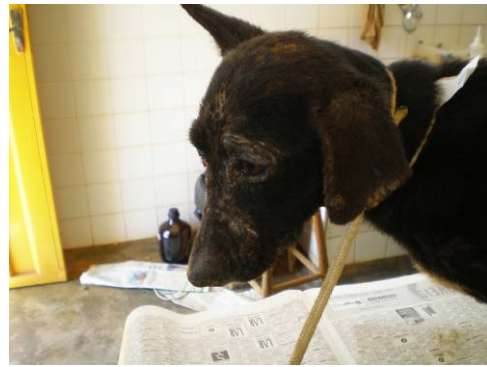


F

Figura 4: Sinais clínicos sugestivos de leishmaniose visceral, encontrados nas amostras caninas selecionadas, nos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu, MG. A, B, C, D - Lesões de baço; E - Dermatite e emaciação; F - ceratoconjuntivite e opacificação de córnea.



G



H



I



J

Figura 2: Sinais clínicos sugestivos de leishmaniose visceral, encontrados nas amostras caninas selecionadas, nos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu, MG. G - Onicogrifose; H - Dermatite periocular e de ponta de orelha, hiperqueratose de focinho; I - Ceratoconjuntivite purulenta, onicogrifose, hiperqueratose de focinho; J - Ceratoconjuntivite purulenta, onicogrifose, hiperqueratose de focinho, tumefação óssea na região do focinho.

Observou-se que os aspectos clínicos dos animais variaram em um amplo espectro, desde casos totalmente assintomáticos, com animais hígidos, ativos, com bom escore corporal, pêlos e olhos brilhantes, até indivíduos totalmente debilitados, caquéticos, com dermatopatias generalizadas, emaciação, expressão triste e outros sinais e sintomas sugestivos de doença em estágio terminal. Constatou-se também a presença de intensas lesões em órgãos internos, principalmente no baço, em animais totalmente assintomáticos. Dos 44 animais amostrados, 29 (66%) eram cães sem raça definida (SRD); 72,7% eram machos e 27,3% eram fêmeas.

6.2 Relação dos animais amostrados

A tabela 2 descreve os animais amostrados nos respectivos municípios. Em Janaúba foram selecionados, inicialmente, 15 animais, como nos demais municípios, mas dois deles morreram, um durante a anestesia, impossibilitando somente a punção de medula óssea, outro durante o transporte para o CCZ de Montes Claros; este último foi descartado da amostra.

Tabela 2. Relação dos animais amostrados nos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu, segundo sexo, raça e sinais clínicos.

<i>Município</i>	<i>Número</i>	<i>Sexo</i>	<i>Raça</i>	<i>Sinais clínicos</i>
Janaúba	1	M	SRD	Sintomático
	2	M	SRD	Sintomático
	3	M	SRD	Sintomático
	4	M	Pinscher	Sintomático
	5	M	Pinscher	Sintomático
	6	M	Pinscher	Assintomático
	7	F	SRD	Sintomático
	8	M	SRD	Assintomático
	9	M	SRD	Assintomático
	10	M	SRD	Assintomático
	11	M	SRD	Sintomático
	12	M	SRD	Assintomático
	13	M	SRD	Sintomático
	14	M	SRD	Assintomático
Montes Claros	1	F	SRD	Sintomático
	2	M	SRD	Assintomático
	3	M	SRD	Sintomático
	4	M	SRD	Assintomático
	5	F	SRD	Assintomático
	6	F	SRD	Sintomático
	7	M	SRD	Sintomático
	8	M	Husky Siberiano	Assintomático
	9	F	Pastor Alemão	Assintomático
	10	F	Pastor Alemão	Sintomático
	11	F	Rottweiler	Assintomático
	12	M	Pastor Alemão	Assintomático
	13	F	A. Pit Bull Terrier	Sintomático
	14	M	A. Pit Bull Terrier	Sintomático
	15	M	SRD	Sintomático
Paracatu	1	M	pit bull	Assintomático
	2	M	SRD	Assintomático
	3	M	SRD	Assintomático
	4	M	pit bull	Assintomático
	5	M	SRD	Assintomático
	6	M	SRD	Assintomático
	7	M	SRD	Assintomático
	8	F	SRD	Assintomático
	9	F	SRD	Sintomático
	10	M	pinscher	Assintomático
	11	M	SRD	Assintomático
	12	M	pinscher	Assintomático
	13	F	SRD	Assintomático
	14	F	poodle	Sintomático
	15	M	SRD	Sintomático

Legenda: (F) fêmea; (M) macho; (SRD) cão sem raça definida.

A tabela 3 mostra a relação percentual de animais amostrados, segundo caracterização clínica e município de origem.

Tabela 3: Relação percentual de animais amostrados conforme clínica e origem.

<i>Município</i>	<i>Clínica</i>	<i>Número de cães</i>	<i>Percentual de cães</i>
Janaúba	Sintomáticos	8	57,1%
	Assintomáticos	6	42,9%
Montes Claros	Sintomáticos	8	53,3%
	Assintomáticos	7	46,7%
Paracatu	Sintomáticos	3	20%
	Assintomáticos	12	80%
TOTAL	Sintomáticos	19	43,2%
	Assintomáticos	25	56,8%

6.3 Resultados do exame parasitológico em lâmina.

6.3.1 Exame parasitológico total.

A figura 3 mostra os resultados do exame parasitológico total em lâmina dos animais amostrados nos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu. Foram considerados animais positivos aqueles que apresentaram pelo menos um resultado positivo (visualização de amastigota) em uma das lâminas de tecidos. Em lâminas de dois, dos quatorze cães selecionados em Janaúba não foi possível a leitura (cães número 8 e 9)¹.

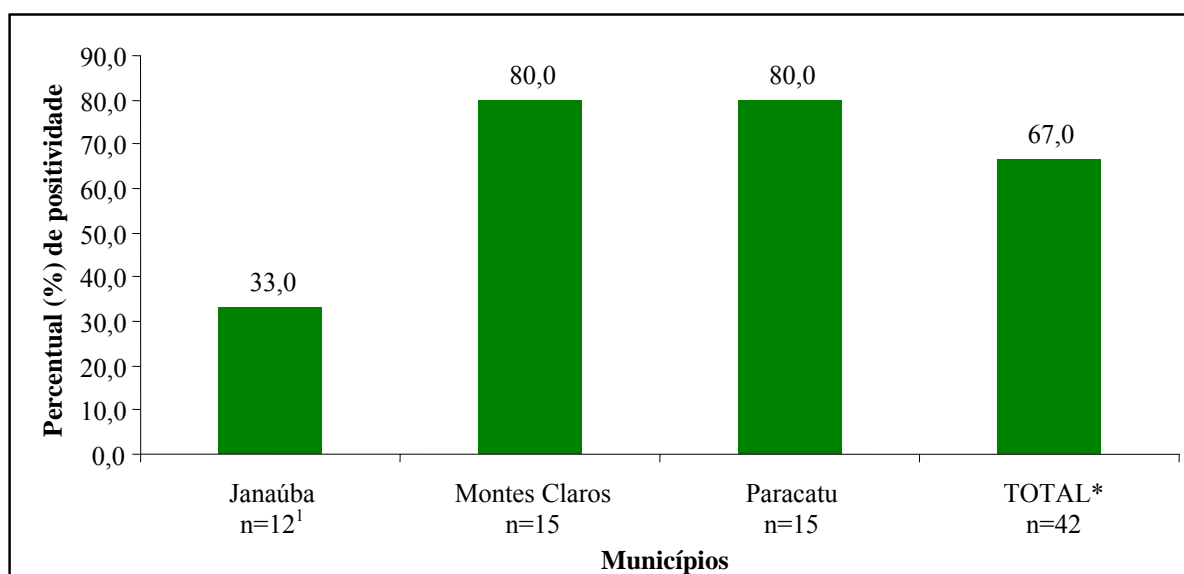


Figura 5: Resultados do exame parasitológico em lâmina total dos cães amostrados nos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu.

* TOTAL: para os três municípios.

6.3.1.1 Sorologia (RIFI e ELISA) como padrão-ouro:

O percentual de positividade do exame parasitológico em lâmina, considerando-se a sorologia (RIFI e ELISA) como padrão-ouro, para os 3 municípios em conjunto, foi de 67%; quando a amostra total de cães foi subdividida entre grupo de cães assintomáticos e sintomáticos, o percentual de positividade foi de 61% e 74%, respectivamente.

6.3.2 Exame parasitológico por órgão avaliado.

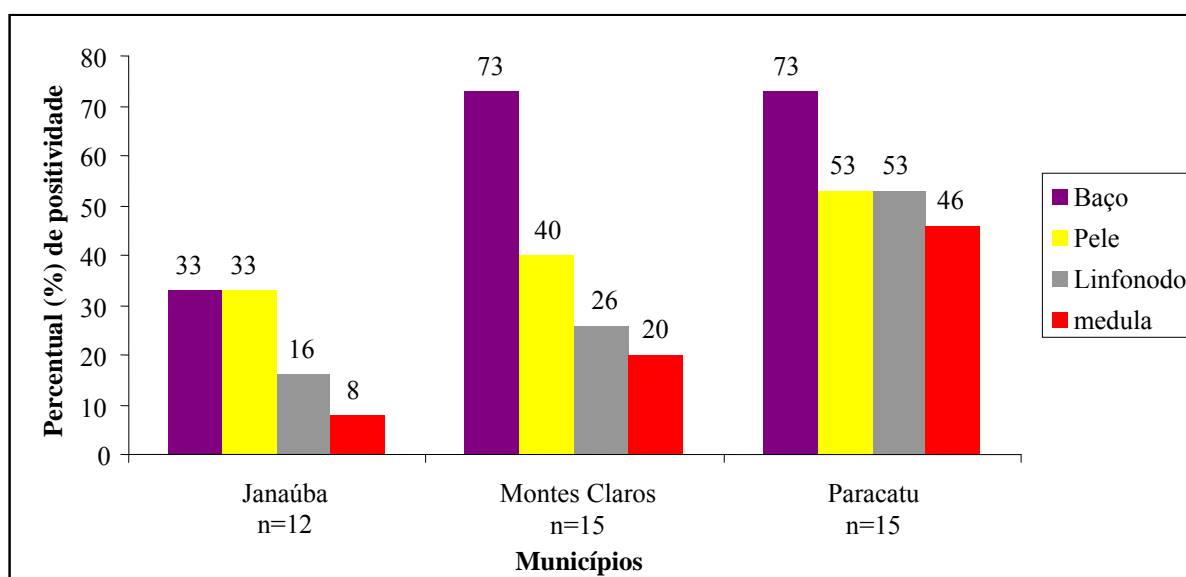


Figura 6: Resultados do exame parasitológico em lâmina, por órgão, dos cães amostrados nos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu.

Quando avaliou-se o desempenho de cada tecido separadamente, concluiu-se que não existem diferenças estatísticas entre os exames parasitológicos de pele, baço, linfonodo e medula óssea, ou seja, os testes indicaram que eles são concordantes ($Kappa = 0,451$, concordância razoável ou boa) nas amostras estudadas ($p\text{-valor} = 0,000$).

6.4 Resultados do teste rápido Kalazar detect™

Os resultados da figura 3 referem-se ao teste rápido Kalazar detect™, realizado em soro dos animais amostrados em Janaúba, Montes Claros e Paracatu.

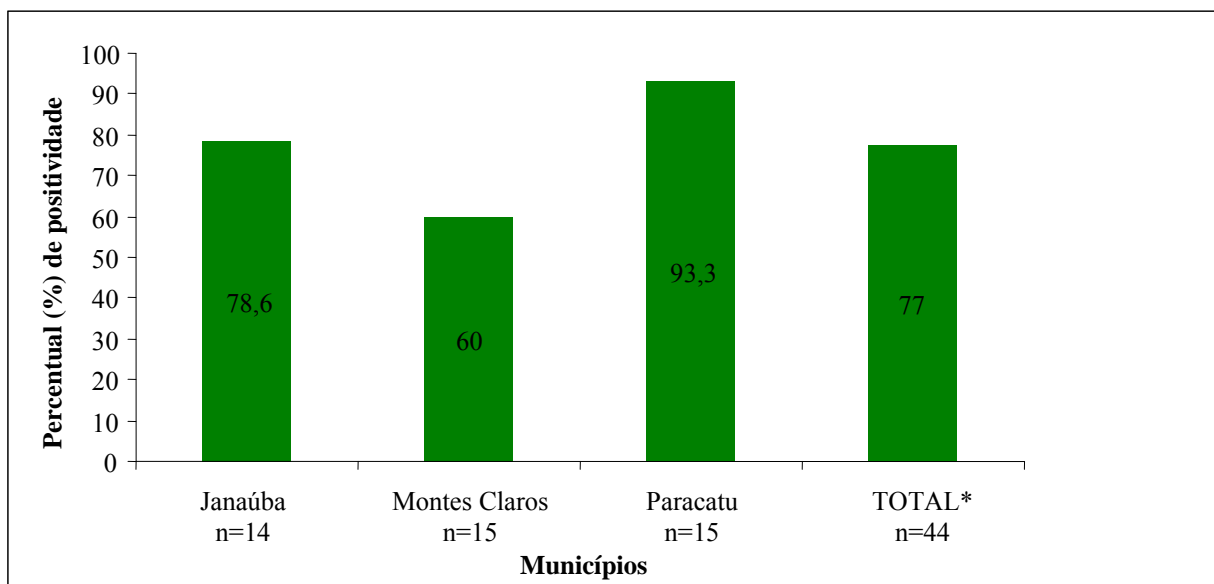


Figura 7: Resultados do teste rápido Kalazar detect™, segundo município de origem.

*TOTAL: para os três municípios.

6.4.1 Sorologia (RIFI e ELISA) como padrão-ouro:

O percentual de positividade pelo teste rápido Kalazar detect™ foi de 77% considerando-se o grupo total de animais. Avaliando-se o desempenho do teste por subgrupo de animais, o percentual de positividade foi de 61% e 100%, para animais assintomáticos e sintomáticos, respectivamente.

6.5 Resultados da PCR.

6.5.1 Resultados da PCR por órgão avaliado.

A figura 6 mostra o desempenho do método da PCR, nos três tecidos avaliados: baço, linfonodo e pele, para a amostra total de cães estudados dos três municípios.

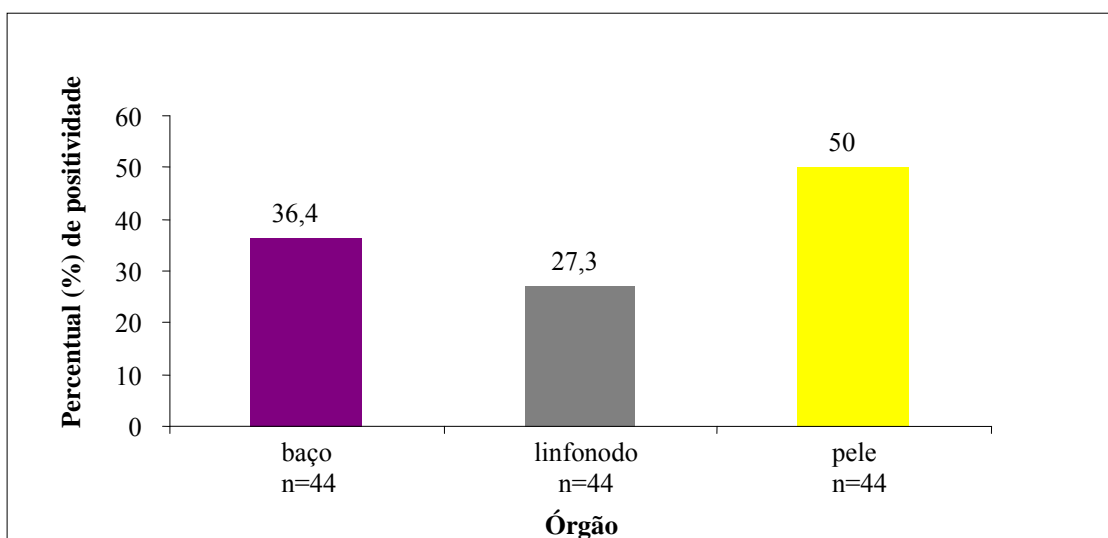


Figura 8: Percentual de positividade da PCR, distribuído por órgão avaliado.

6.5.1.1 Sorologia (RIFI e ELISA) como padrão-ouro:

O percentual de positividade da PCR foi de 64% (para os três órgãos em conjunto), considerando-se a amostra total de animais dos três municípios. Avaliando-se o desempenho do teste por subgrupo de animais, o percentual de positividade foi de 57% e 74%, para animais assintomáticos e sintomáticos, respectivamente.

6.5.2 Resultados da PCR por município e órgão avaliado.

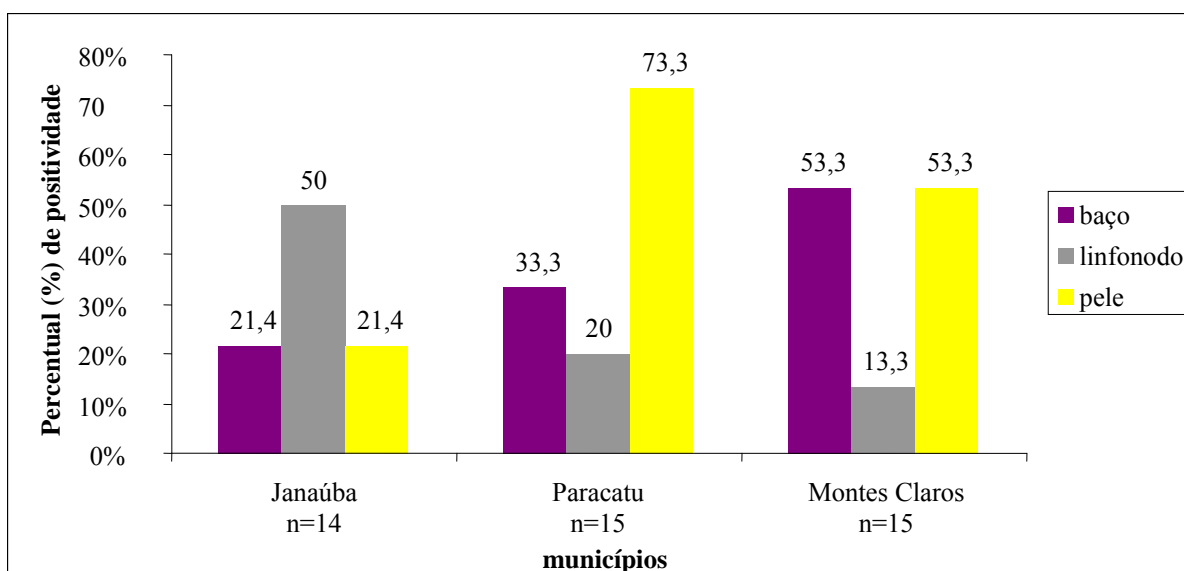


Figura 9: Percentual de positividade da PCR, distribuído por município e por órgão avaliado.

Avaliando-se o desempenho da técnica de PCR por órgão analisado, observou-se que não há concordância entre os resultados do teste para os três tecidos selecionados (baço linfonodo e pele). Essa diferença refere-se ao tecido linfonodo, pois o teste estatístico de Kappa apresentou diferença ou não concordância entre linfonodo e baço (Kappa = 0,170; p-valor = 0,303, concordância pobre), e linfonodo e pele (Kappa = 0,182; p-valor = 0,310 concordância pobre). O resultado do teste para pele e baço foi considerado concordante (Kappa = 0,455; p-valor = 0,004, concordância razoável ou boa).

6.6 Resultados do isolamento em mielocultura.

Tabela 4: Relação dos resultados positivos do isolamento em mielocultura (número do cão) para os municípios de estudo.

<i>Origem</i>	<i>Número do cão com isolamento em cultura positivo</i>
Janaúba	1
	3
	4
	10
	11
Montes Claros	1
	3
	5
	6
	7
Paracatu	13
	1
	2
	3
	4
	5
	6
	9
	10
	11
12	
13	
14	
15	

A figura 8 mostra os resultados percentuais do isolamento em mielocultura nos três municípios. Em Janaúba, ocorreu a perda da amostra de medula óssea de um animal, que morreu durante a anestesia.

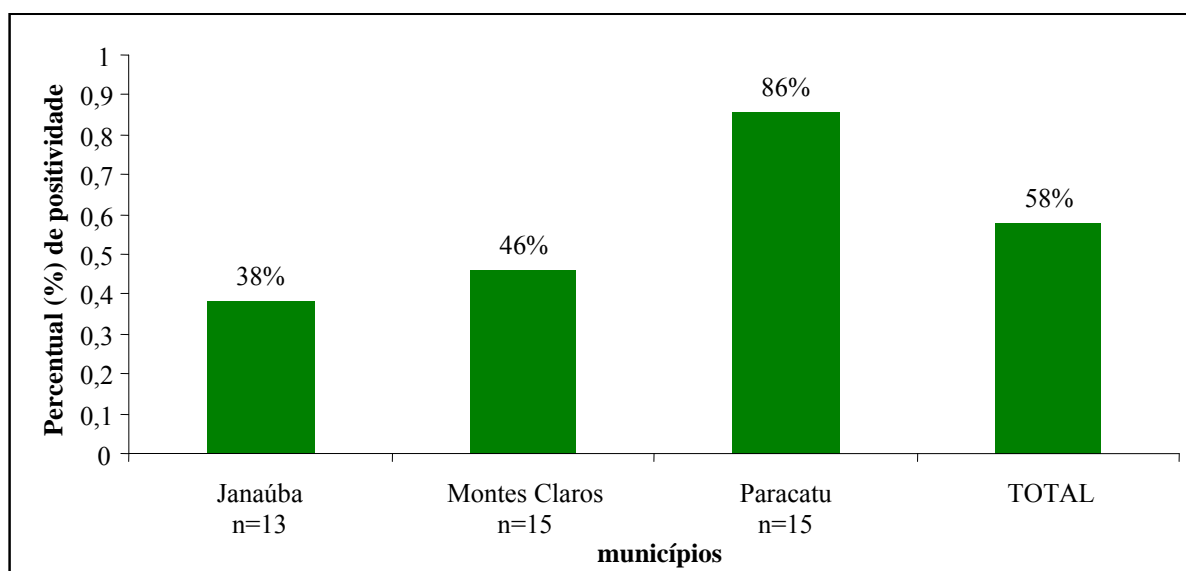


Figura 10: Resultados percentuais do isolamento em miolocultura, nos municípios estudados.

6.6.1. Sorologia (RIFI e ELISA) como padrão-ouro:

O percentual de positividade do isolamento em miolocultura foi de 58% considerando-se a amostra total de animais dos três municípios. Avaliando-se o desempenho do teste por subgrupo de animais, o percentual de positividade foi de 52% e 68%, para animais assintomáticos e sintomáticos, respectivamente.

6.7 Concordância entre os métodos utilizados.

O índice de concordância de Kappa foi calculado para comparar o desempenho dos métodos diagnósticos utilizados, aos pares, para o grupo total de animais, conforme tabelas abaixo.

6.7.1 Parasitológico e Kalazar detect™

Tabela 5: Concordância entre resultados dos métodos parasitológico e Kalazar detect™, para a amostra total de animais.

		Kalazar detect™		
		N	P	Total
Parasitológico	N	6	8	14
	P	3	25	28
Total		9	33	42
Kappa geral		0.353 (concordância pobre)		
P-valor geral		0.017		

6.7.2 Parasitológico e PCR

Tabela 6: Concordância entre resultados dos métodos parasitológico e PCR, para a amostra total de animais.

		PCR		
		N	P	Total
Parasitológico	N	9	5	14
	P	6	22	28
Total		15	27	42
Kappa geral		0.421(concordância razoável ou boa)		
P-valor geral		0.0060		

6.7.3 Kalazar detectTM e PCR.

Tabela 7: Concordância entre resultados dos métodos Kalazar detectTM e PCR, para a amostra total de animais.

		PCR		
		N	P	Total
Kalazar detect TM ®	N	6	4	10
	P	8	26	34
Total		14	30	44
Kappa geral		0.32(concordância pobre)		
P-valor geral		0.03		

6.7.4 Parasitológico e isolamento em cultura.

Tabela 8: Concordância entre resultados dos métodos Parasitológico e Isolamento em cultura, para a amostra total de animais.

		Isolamento em cultura		
		N	P	Total
Parasitológico	N	10	4	14
	P	7	21	28
Total		17	25	42
Kappa geral		0.441(concordância razoável ou boa)		
P-valor geral		0.004		

6.7.5 Kalazar detectTM e isolamento em cultura

Tabela 9: Concordância entre resultados dos métodos Kalazar detectTM e Isolamento em cultura, para a amostra total de animais.

		Isolamento em cultura		Total
		P	N	
Kalazar detect TM	P	24	9	10
	N	1	9	33
Total		25	18	43
Kappa geral		0,491(concordância razoável ou boa)		
P-valor geral		0,001		

7.6. PCR e isolamento em cultura.

Tabela 10: Concordância entre resultados dos métodos PCR e isolamento em cultura, para a amostra total de animais.

		Isolamento em cultura		Total
		P	N	
PCR	P	21	6	27
	N	4	12	16
Total		25	18	43
Kappa geral		0,496(concordância razoável ou boa)		
P-valor geral		0,003		

6.8 Resultados por grupo de cães: Sintomáticos.

No grupo de cães sintomáticos (n = 19) foi possível a confirmação da sorologia por pelo menos um dos testes realizados em 100% dos animais.

O índice de concordância de Kappa foi calculado para comparar o desempenho dos métodos diagnósticos utilizados, aos pares, conforme tabelas abaixo.

6.8.1 Parasitológico e PCR - cães sintomáticos.

Tabela 11: Concordância entre resultados dos métodos Parasitológico e PCR, para cães sintomáticos.

		PCR		Total
		N	P	
Parasitológico	P	2	12	14
	N	3	2	5
Total		5	14	19
Kappa		0,457 (concordância razoável ou boa)		
P-valor		0,084		

6.8.2 Parasitológico e Isolamento em cultura - cães sintomáticos.

Tabela 12: Concordância entre resultados dos métodos Parasitológico e isolamento em cultura, para cães sintomáticos.

		Isolamento em cultura		Total
		N	P	
Parasitológico	P	3	11	14
	N	3	2	5
Total		6	13	19
Kappa		0,362 (concordância fraca)		
P-valor		0,262		

6.8.3 PCR e Isolamento em cultura - cães sintomáticos.

Tabela 13: Concordância entre resultados dos métodos PCR e isolamento em cultura, para cães sintomáticos.

		Isolamento em cultura		Total
		N	P	
PCR	P	1	12	13
	N	4	2	6
Total		5	14	19
Kappa		0,617 (concordância razoável ou boa)		
P-valor		0,017		

6.8.4 Resultado geral dos métodos diagnósticos para cães sintomáticos.

A figura 9 refere-se ao resultado geral dos métodos diagnósticos utilizados, separando a amostra de cães de acordo com a forma clínica: somente cães sintomáticos.

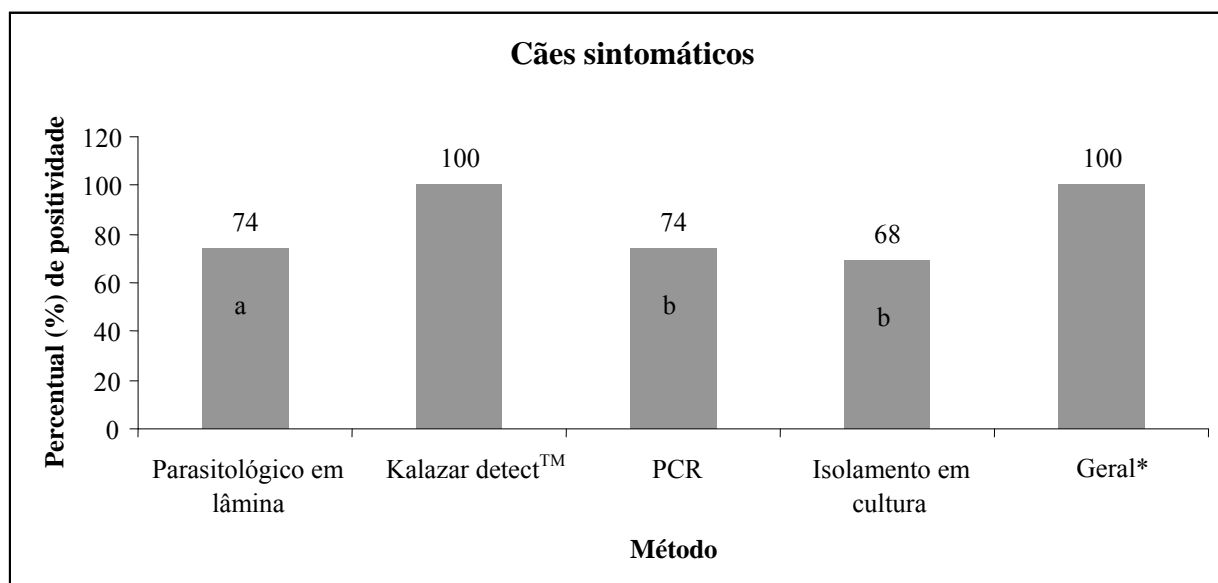


Figura 11: Porcentagem de resultados positivos, por método diagnóstico, no grupo de cães sintomáticos, dos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu.

* Geral: percentagem de animais positivos em pelo menos um dos métodos utilizados.

6.9 Resultados por grupo de cães: **Assintomáticos**.

Para o grupo de cães assintomáticos (n = 25), a confirmação da sorologia por pelo menos um método utilizado ocorreu em 88% dos animais.

6.9.1 Parasitológico e Kalazar detectTM - cães assintomáticos.

Tabela 14: Concordância entre resultados dos métodos Parasitológico e Kalazar detect, para cães assintomáticos.

		Kalazar detectTM		
		N	P	Total
Parasitológico	N	6	3	9
	P	2	11	13
Total		8	14	22
Kappa	0,522			
P-valor	0,026			

6.9.2 Parasitológico e PCR - cães assintomáticos.

Tabela 15: Concordância entre resultados dos métodos Parasitológico e PCR, para cães assintomáticos.

		PCR		
		N	P	Total
Parasitológico	N	6	3	9
	P	4	9	13
Total		10	12	22
Kappa	0,353			
P-valor	0,192			

6.9.3 Parasitológico e Isolamento em cultura - cães assintomáticos.

Tabela 16: Concordância entre resultados dos métodos Parasitológico e isolamento em cultura, para cães assintomáticos.

		Isolamento em cultura		
		N	P	Total
Parasitológico	N	7	2	9
	P	3	10	13
Total		10	12	22
Kappa	0,538			
P-valor	0,027			

6.9.4 Kalazar detectTM e PCR - cães assintomáticos.

Tabela 17: Concordância entre resultados dos métodos Kalazar detectTM e PCR, para cães assintomáticos.

		PCR		
		N	P	Total
Kalazar detectTM	N	6	2	8
	P	4	10	14
Total		10	12	22
Kappa	0,441			
P-valor	0,074			

6.9.5 Kalazar detectTM e Isolamento em cultura - cães assintomáticos.

Tabela 18: Concordância entre resultados dos métodos Kalazar detectTM e isolamento em cultura, para cães assintomáticos.

		Isolamento em cultura		Total
		N	P	
Kalazar detect TM	N	7	1	8
	P	3	11	14
Total		10	12	22
Kappa	0,627			
P-valor	0,006			

6.9.6 PCR e Isolamento em cultura - cães assintomáticos.

Tabela 19: Concordância entre resultados dos métodos PCR e isolamento em cultura, para cães assintomáticos.

		Isolamento em cultura		Total
		N	P	
PCR	N	7	3	10
	P	3	9	12
Total		10	12	22
Kappa	0,450			
P-valor	0,084			

6.9.7 Resultado geral dos métodos diagnósticos para cães assintomáticos.

A figura 10 refere-se ao resultado geral dos métodos diagnósticos utilizados, separando a amostra de cães de acordo com a forma clínica: somente cães assintomáticos.

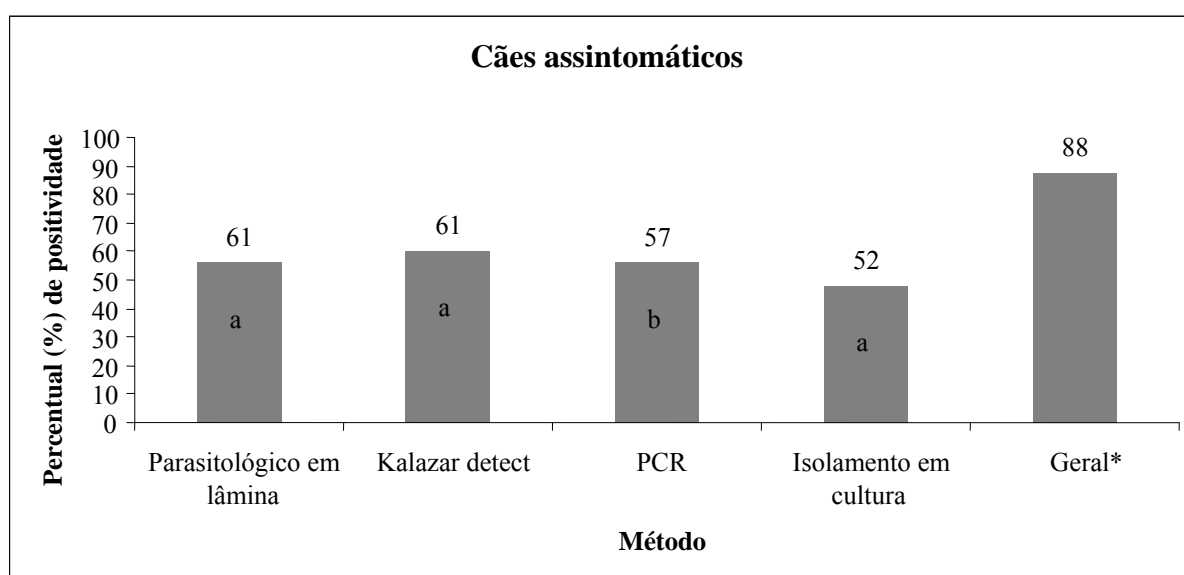


Figura 12: Porcentagem de resultados positivos, por método diagnóstico, no grupo de cães assintomáticos, dos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu.

* Geral: porcentagem de animais positivos em pelo menos um dos métodos utilizados.

6.10 Resultado geral dos métodos entre grupos clínicos

O desempenho dos métodos de diagnóstico utilizados, entre os grupos clínicos - sintomáticos e assintomáticos, quando avaliado pelo teste de hipóteses entre duas proporções binomiais demonstrou haver diferença estatística somente para o teste Kalazar detect™ ou seja, o teste apresenta resultados diferentes entre o grupo de animais sintomáticos e assintomáticos (p-valor = 0,004). Os demais testes foram considerados estatisticamente iguais entre grupos de animais sintomáticos e assintomáticos.

Dos 44 animais amostrados, 19 (43,2%) obtiveram resultados positivos em todos os testes utilizados. Destes, 11 (57,9%) eram cães sintomáticos e 8 (42,1%) eram cães assintomáticos.

6.11 Identificação espécie-específica nas amostras de mielocultura.

A tabela 20 refere-se aos resultados da identificação da espécie de *Leishmania* em amostras isoladas em mielocultura, nos três municípios estudados.

Tabela 20: Identificação da espécie de *Leishmania*, em amostras de mielocultura pelos métodos PCR RFLP kDNA, PCR RFLP *hsp70* e PCR para complexo *mexicana*, em amostras de medula óssea

Origem	Isolamento em cultura n° do cão	Espécie de <i>Leishmania</i> RFLP kDNA	Espécie de <i>Leishmania</i> RFLP <i>hsp 70</i>	Espécie de <i>Leishmania</i> complexo <i>mexicana</i>
Janaúba	1	<i>L.chagasi</i>	NR	NR
	3	<i>L.chagasi</i>	NR	NR
	4	<i>L.chagasi</i>	NR	NR
	10	<i>L.chagasi</i>	NR	NR
	11	<i>L.chagasi</i>	NR	NR
Montes Claros	1	<i>L.chagasi</i>	NR	NR
	3	<i>L.chagasi</i>	NR	NR
	5	<i>L.chagasi</i>	NR	NR
	6	<i>L.chagasi</i>	NR	NR
	7	<i>L.chagasi</i>	NR	NR
	13	<i>L.chagasi</i>	NR	NR
	14	<i>L.chagasi</i>	NR	NR
Paracatu	1	<i>L.chagasi</i>	<i>L.chagasi</i>	NA
	2	<i>L.amazonensis</i>	<i>L.amazonensis</i>	<i>L.amazonensis</i>
	3	NI	NI	<i>L.amazonensis</i>
	4	<i>L.amazonensis</i>	<i>L.amazonensis</i>	<i>L.amazonensis</i>
	5	<i>L.chagasi</i>	<i>L.chagasi</i>	NA
	6	NI	NI	<i>L.amazonensis</i>
	9	NI	NI	NA
	10	NI	NI	NA
	11	NI	NI	NA
	12	<i>L.amazonensis</i>	<i>L.amazonensis</i>	<i>L.amazonensis</i>
	14	NI	NI	NA
	15	NI	NI	NA

Legenda: (NI) não identificada, (NA) não se aplica a esse método, (NR.) não realizada.

6.12 Identificação espécie-específica para o total de amostras nos municípios.

A figura 13 refere-se à identificação das espécies de *Leishmania* para o total de amostras de tecidos dos cães (medula óssea, linfonodo, pele e baço) nos municípios estudados. Utilizou-se primeiramente a técnica de PCR RFLP kDNA. Nas amostras com perfil semelhante ao de *L. amazonensis* realizou-se uma segunda confirmação pelas técnicas de PCR RFLP *hsp70* e PCR para complexo *mexicana*.

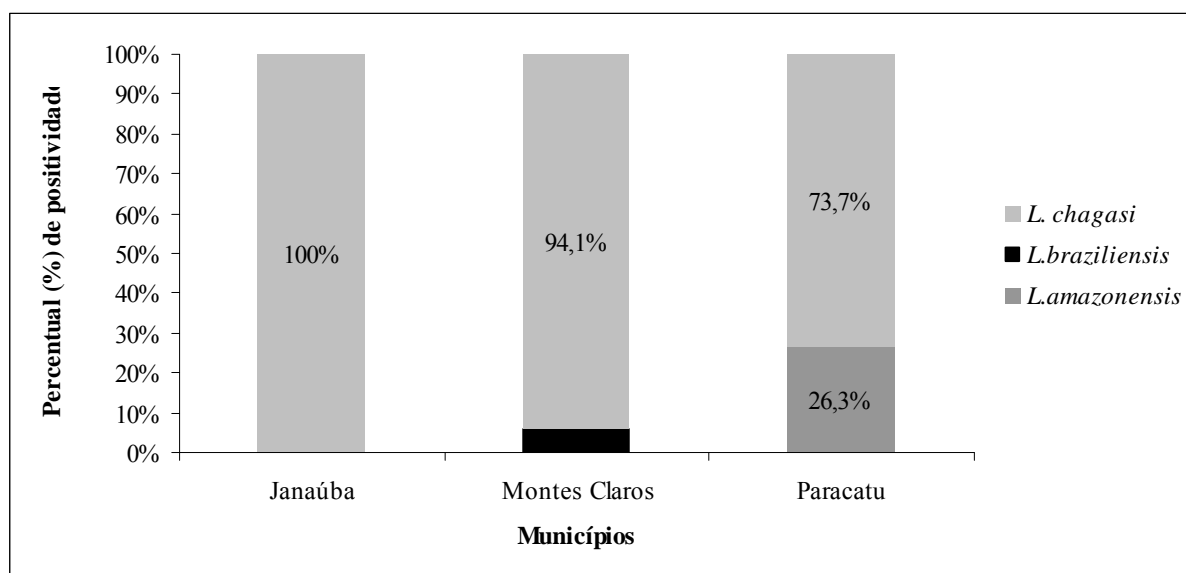


Figura 13: Identificação da espécie de *Leishmania*, em porcentagem, nas amostras caninas dos municípios de Janaúba, Montes Claros e Paracatu.

6.13 Metodologias utilizadas para visualização dos resultados

As figuras 14, 15 e 16 referem-se à visualização dos produtos da PCR kDNA para complexo *mexicana*, PCR RFLP *hsp70* e PCR β globina.

A figura 14 mostra os resultados da visualização dos produtos de PCR para o complexo *mexicana*, em gel de agarose 2%. Observa-se que todas as amostras testadas (Amostra 1: cão 2; amostra 2: cão 3; amostra 3: cão 4; amostras 4 e 5: cão 6; amostras 6, 7 e 8: cão 12 - todos os cães provenientes de Paracatu) possuem perfil semelhante ao da cepa de referência para *L. amazonensis*.

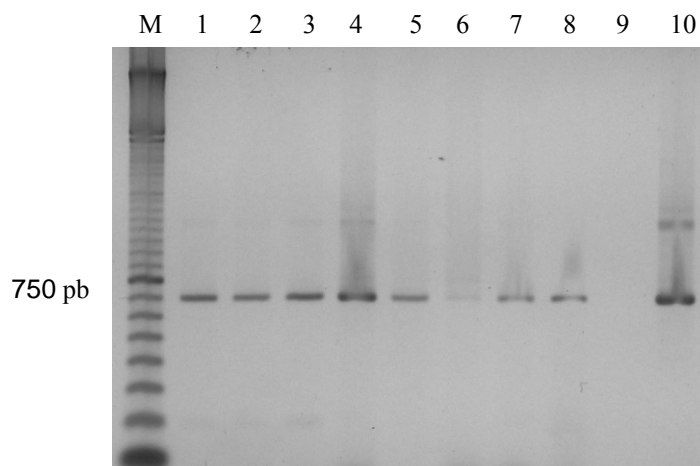


Figura 14: Visualização de produtos da PCR com os iniciadores M1 e M2 para complexo *mexicana*, em amostras de mielocultura. Canaletas: 1 a 8 - amostras teste. 9 - Controle Negativo (sem DNA) 10 - Controle Positivo: *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8).

A figura 15 mostra os resultados da visualização dos produtos de PCR RFLP *hsp70* em gel de agarose 2%. Observa-se que duas amostras (Amostra 5: cão 1; amostra 8: cão 5, ambos provenientes de Paracatu) possuem perfil semelhante ao da cepa de referência para *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) e 5 amostras (cães 2, 3, 4, 6 e 12 - em seqüência no gel) possuem perfil semelhante ao da cepa de referência para *L. amazonensis*

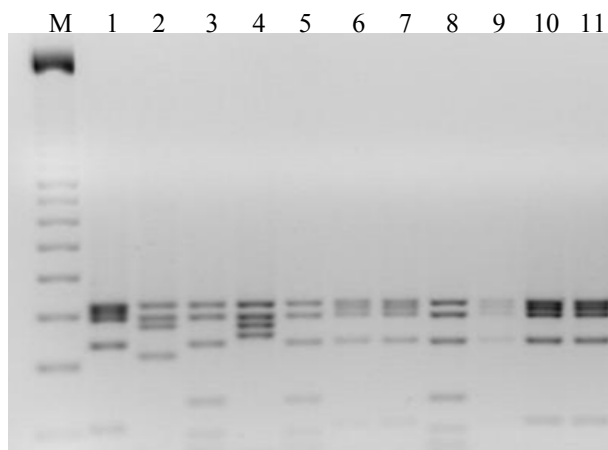


Figura 15: Visualização de produto da PCR RFLP *hsp70* em amostras de mielocultura. Canaletas: M - Marcador de peso molecular. 1 - *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), 2 - *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) 3 - *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75), 4 - *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). 5 a 11 - amostras teste.

A figura 16 mostra os resultados da visualização dos produtos da PCR para gene da β globina do cão em gel de poliacrilamida 6%. Todas as amostras de DNA extraído de tecido dos animais (baço, linfonodo e pele) tiveram resultados positivos para a amplificação de fragmento do gene da β globina, o que confirmou a presença de DNA de cão. Amostras 1 a 7: cães 1 a 7, amostras de baço, cães provenientes de Janaúba.

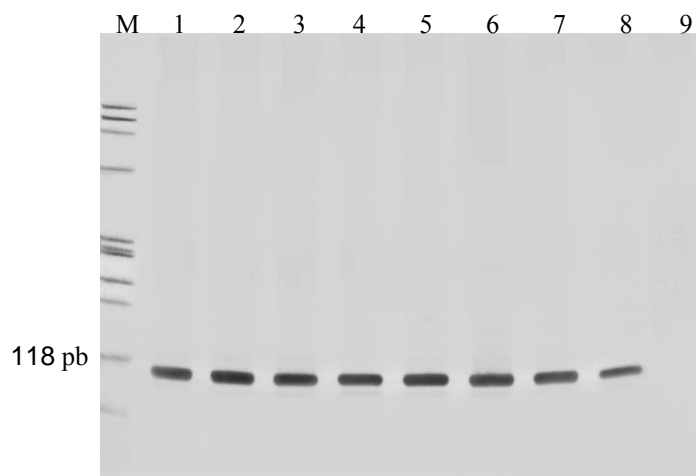


Figura 16: Visualização de produto da PCR para gene da β globina em amostras de tecido dos cães. Canaletas: M - Marcador de peso molecular. 1 a 7 - Amostras positivas para gene da β globina. 8 - Controle positivo da reação. 9 - Controle negativo da reação (sem DNA).

Discussão

7 Discussão.

7.1 O diagnóstico da LVC: observações relevantes

Os métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) têm sido exaustivamente explorados desde que a doença foi pela primeira vez identificada nesses animais. Em uma busca rápida pelos termos “diagnóstico da leishmaniose visceral canina”, em site de periódicos, pode-se encontrar cerca de 520 trabalhos publicados, da década de 60, até os dias atuais, o que evidencia a magnitude com que o tema tem sido objeto de estudos. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas apesar do grande número de testes disponíveis para o diagnóstico da LVC, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (Gontijo e Melo, 2004).

No Brasil, grandes foram as contribuições de pesquisadores como Leônidas Deane e Maria Deane que, estudando o calazar canino em Sobral, no Ceará, esclareceram os aspectos mais importantes da epidemiologia da doença, e delineararam a tríade de controle da leishmaniose visceral, a qual permanece com os mesmos fundamentos básicos até os dias de hoje (Deane e Deane, 1955b; Deane, 1956).

Baneth e colaboradores (2008) discorrem sobre os dois principais conceitos sobre a leishmaniose visceral canina, introduzidos graças à associação de estudos epidemiológicos com técnicas de diagnóstico molecular. O primeiro deles: “A infecção por *L. chagasi* está muito difundida em áreas endêmicas, mas nem todos os cães infectados desenvolvem a doença”. Em um modelo de infecção experimental demonstrou-se que os cães apresentam um padrão bastante variado de resposta imune; alguns evoluem para a doença, enquanto que outros permanecem assintomáticos por um período de observação de até cinco anos ou mais (Killick-Kendrick et al., 1994). Estudos usando a PCR em áreas endêmicas têm confirmado que a prevalência da infecção nos cães é muito maior do que a proporção daqueles que desenvolvem a forma sintomática da doença (Solano-Gallego et al., 2001; Alvar et al., 2004). Estudos longitudinais em áreas endêmicas indicam que a história natural da LVC pode evoluir de diferentes formas. Em alguns casos, graves sinais clínicos da doença aparecem logo após a infecção. Já é conhecido o fato que animais com a doença na forma grave são incapazes de desenvolver uma resposta imune celular efetiva, muito embora eles apresentem uma forte, mas ineficaz, resposta imune humoral (Pinelli et al., 1994; Barbieri et al., 2006). Em outros casos, os animais permanecem infectados por longos períodos de tempo (por anos, ou até pela vida toda), mas são capazes de evitar o aparecimento de sinais ou doença clínica. Contudo, a mudança no status imune desses cães, ou a administração de drogas imunossupressoras, ou

ainda uma grave doença imunodepressora poderão ativar a infecção latente e então surgirem os sinais clínicos.

O segundo conceito, segundo Baneth e colaboradores (2008), afirma que: “uma vez que existam as condições favoráveis para a transmissão da doença (alta densidade vetorial e alta concentração de cães), a infecção irá se espalhar de forma rápida e extensiva entre a população canina”. Em um estudo de coorte realizado em Nápoles, na Itália, cães não infectados foram submetidos a 3 estações consecutivas de transmissão da doença e, no final do estudo, 97,3% dos animais apresentavam resultados positivos para Nested-PCR de medula óssea e 75,7% eram positivos na sorologia (Quinnell et al., 1997; Oliva et al., 2006).

Esses dois conceitos enfatizam que a doença clínica é apenas o “topo do iceberg” em áreas endêmicas, e que a maior parte da população canina exposta se torna infectada sem demonstrar evidências ou sinais clínicos, nem anticorpos anti-*Leishmania*.

O diagnóstico preciso da LVC pode ser considerado bastante complexo, uma vez que nem todos os animais infectados por promastigotas metacíclicas a partir da picada de um flebotomíneo irão desenvolver a doença; alguns podem evoluir para cura espontânea, tendo ou não passado por período de soroconversão (Genaro, 1993; Alvar, 2004).

Um teste diagnóstico efetivo, quer seja para confirmar um suspeita clínica em um único paciente, quer seja para identificar infecção em cães assintomáticos em inquéritos, deve ter alta sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade; deve ser simples, de custo viável, disponível em laboratórios regionais ou adaptável às condições de campo; deve preferencialmente utilizar métodos não-invasivos para a coleta das amostras biológicas (Maia e Campino, 2008).

7.2 Métodos sorológicos

As técnicas sorológicas convencionais são limitadas pela possibilidade de ocorrência de reações-cruzadas com outras doenças parasitárias, como relatado no trabalho de Ferreira e colaboradores (2007); nesse estudo os autores observaram a ocorrência de reação cruzada tanto na RIFI quanto no ELISA em amostras de soro de cães infectados com *Trypanossoma cruzi*, *L. braziliensis* e *Erliquia canis*. Além disso, com a liberação da comercialização da vacina Leishimune®, composta por antígeno fucose-manose-ligante (ou glicoproteína gp63), tornou-se necessário considerar com cautela resultados soropositivos, uma vez que o perfil sorológico de cães vacinados e infectados é semelhante. O único método disponível atualmente para a distinção entre cães vacinados com Leishimune® e infectados é a técnica de citometria de fluxo, disponível apenas no âmbito da pesquisa (Andrade et al., 2007).

7.3 Métodos parasitológicos

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina pode ser obtido a partir de métodos simples e de baixo custo, como o parasitológico direto, até os mais avançados e de custo elevado, como os moleculares. Classicamente, o diagnóstico da LVC é confirmado pela demonstração direta do parasito. Formas intracelulares de *Leishmania spp.* podem ser identificadas em diferentes preparações, como as impressões de pele, baço, fígado, linfonodo e esfregaços de sangue e medula óssea, muito embora seja grande a possibilidade de resultados falso-negativos, uma vez que o número de parasitos pode ser muito baixo, principalmente em animais assintomáticos (Chulay e Bryceson, 1983), além da técnica não permitir a identificação em nível de espécie (Gomes et al., 2007).

Segundo Gomes e colaboradores (2008) o método parasitológico direto pode fornecer resultados falso-negativos pela possibilidade de baixo número de parasitos em amostras clínicas ou pela dificuldade na identificação morfológica; além disso, esse método é realizado a partir de procedimentos invasivos, tornando-se inviável sua utilização em inquéritos censitários dos programas de vigilância e controle da doença.

De acordo com Ferrer (1999) e Alvar e colaboradores (2004), a microscopia de impressões de baço e linfonodo apresenta sensibilidade de 60-75% e 30-50%, respectivamente. Contudo, em um estudo conduzido por Rosypal e colaboradores (2005), amastigotas foram observadas em 93% das amostras em lâmina de baço e linfonodo de cães naturalmente infectados. Em nossos resultados o valor da sensibilidade do exame parasitológico direto foi de 67%, quando comparado ao padrão-ouro sorologia (ELISA ou RIFI); quando comparado ao padrão-ouro isolamento em cultura o valor da sensibilidade do teste subiu para 84%.

Outro método convencional é a cultura *in vitro* de fragmentos ou aspirados de órgãos, em meio bifásico (Palma e Gutierrez, 1991), ou a inoculação em animais de laboratório, principalmente hamsters (Herwaldt, 1999). O isolamento em meio de cultura é um método bastante válido, embora laborioso, porque permite a produção de massa de promastigotas de parasitos, possibilitando a identificação dos isolados através da técnica de isoenzimas, metodologia considerada pela Organização Mundial de Saúde como padrão-ouro para identificação específica de amostras de *Leishmania* (WHO, 1990).

A cultura *in vitro* de diferentes tecidos pode aumentar a sensibilidade de detecção do parasito; contudo, nem todas as cepas de *Leishmania* crescem com a mesma facilidade e nem todos os tecidos ou órgãos do mesmo animal têm a mesma carga parasitária (Evans, 1989).

Em estudo conduzido por Maia e colaboradores (2007), 77% das amostras de cultura de baço, linfonodo, pele e medula óssea se tornaram positivas na primeira semana após o

inóculo, 23% positivaram após a segunda ou terceira semana. No presente trabalho, as culturas de *Leishmania* se tornaram positivas em média na segunda semana, variando no período entre a primeira e a quarta semana de cultivo. De acordo com Madeira e colaboradores (2006) e Maia e colaboradores (2007) amostras de baço, linfonodo e medula óssea são os tecidos/órgãos com maiores índices de positividade em cultura. Em nosso trabalho optamos por utilizar unicamente amostras de medula óssea, uma vez que, sendo a coleta desse material asséptica, diminui a possibilidade de contaminações e aumenta as chances de isolamento. Apesar das limitações desse método, como a demora em se obter resultados (de 1 a 4 semanas), a susceptibilidade às contaminações microbiológicas-principalmente quando a coleta não é estéril, a dependência da carga parasitária e, às vezes, a baixa adaptação do isolado ao meio de cultura, ele ainda permanece como pré-requisito essencial para a obtenção de número suficiente de parasitos para identificação isoenzimática, para a produção de antígenos usados em diagnósticos imunológicos, para modelos de infecção experimental, testes *in vitro* de drogas e ainda em algumas metodologias moleculares (Maia e Campino, 2008). Em nosso trabalho foram produzidas massas de promastigotas das amostras isoladas em miocultura para futura caracterização isoenzimática das cepas. O valor da sensibilidade do isolamento em cultura foi de 52% para o grupo de cães assintomáticos e 68% para os sintomáticos, tendo como padrão-ouro a sorologia. A sensibilidade do método de isolamento em cultura no município de Paracatu atingiu o elevado índice de 86%, achado que talvez esteja relacionado à ocorrência de *L. amazonensis*, uma espécie que sabidamente tem bom crescimento em meio artificial.

7.4 Testes imunocromatográficos

Testes imunocromatográficos baseados na ligação de anticorpos específicos a antígenos, que após interação, migram por uma superfície, possibilitando a visualização dos resultados têm sido utilizados, no âmbito da pesquisa, para diagnóstico da LVC (Mohebalí et al., 2004; Otranto et al., 2004; Toz et al., 2004; Mettler et al., 2005; Lemos et al., 2008). O interesse nesses testes deve se principalmente a rapidez com que se obtém o resultado - cerca de 10 minutos. Para alguns autores, um teste rápido como o Kalazar detectTM tem formato ideal para uso em campo, porque além de rápido e simples ele não requer um treinamento extensivo do operador. Mohebalí e colaboradores (2004) utilizando um teste rápido imunocromatográfico com o antígeno recombinante rK39 (Cypress Diagnostic Company, Bélgica) para diagnóstico da LVC encontraram sensibilidade de 70,9% e especificidade de 84,9%, em amostras de soro de cães provenientes de área endêmica no noroeste do Irã. Nesse estudo o padrão ouro utilizado foi o DAT (direct agglutination test – teste de aglutinação

direta), com ponto de corte de 1:320. Um mesmo teste rápido utilizando o rK39 para diagnóstico da leishmaniose visceral humana demonstrou sensibilidade de 87,8% e especificidade de 100% (Delgado et al., 2001). Mettler e colaboradores (2005) concluíram que o teste rápido pode ser útil para confirmar casos clinicamente suspeitos devido à sua alta especificidade em animais sintomáticos.

Em nossos estudos, o valor da sensibilidade do teste rápido imunocromatográfico Kalazar detectTM foi considerado bastante elevado - 96%, quando comparado ao padrão-ouro isolamento em meio de cultura. O valor da sensibilidade do teste reduziu para 80%, quando o padrão-ouro adotado foi a sorologia; ainda assim o teste permaneceu com sensibilidade elevada - foi capaz de detectar 100% dos animais sintomáticos, em relação ao grupo dos animais assintomáticos, cujo valor de sensibilidade foi de 61%. Esta maior sensibilidade do teste em animais sintomáticos provavelmente esteja relacionada à maior concentração de anticorpos, uma vez que nesses indivíduos predomina uma resposta imune padrão TH 2. Lemos e colaboradores (2008), utilizando a mesma versão comercial desse método, demonstraram que o Kalazar detectTM apresentou sensibilidade de 83%; nesse trabalho foi utilizado como padrão-ouro o exame parasitológico direto. Reithinger e colaboradores (2002) encontraram baixa especificidade (61-75%) no desempenho do teste rápido, o que leva a crer que uma grande proporção de cães poderiam ser erroneamente diagnosticados como positivos; em nossos estudos a especificidade do Kalazar detectTM não foi calculada, uma vez que não trabalhamos com animais sabidamente negativos para LVC.

Em todos os animais cuja infecção foi identificada como sendo por *L. amazonensis* o resultado do teste rápido Kalazar detectTM foi positivo, o que deixa dúvida sobre a especificidade do mesmo para o complexo *donovani*. Ainda assim não pode-se excluir a possibilidade de infecções mistas, mesmo quando não são identificados duas espécies de *Leishmania* distintas.

7.5 Métodos moleculares - PCR

A eficácia da PCR é influenciada pelo tipo de iniciadores, número de cópias do alvo, método de extração do DNA, qualidade do material biológico e protocolo de PCR (Alvar et al., 2004; Cortes et al., 2004; Baneth e Aroch, 2008). Em nossos estudos a PCR obteve um valor de sensibilidade de 64%, variando de 57% para os assintomáticos a 74% para os sintomáticos, quando a sorologia foi considerada o padrão-ouro. Quando avaliou-se o desempenho da PCR, tomando-se como padrão-ouro as amostras positivas na mielocultura, o valor da sensibilidade elevou-se para 84%. Um único resultado PCR negativo, em um cão clinicamente suspeito, não é suficiente para excluir a possibilidade de infecção. Estudos que

avaliaram o desempenho da PCR em diferentes tecidos de cães infectados têm demonstrado resultados variáveis e às vezes conflitantes (Baneth e Aroch, 2008). Parte da ampla variação da sensibilidade observada entre os diferentes estudos pode ser explicada pela distribuição heterogênea dos parasitos em cada tecido ou pela carga parasitária por órgão associada ao tropismo das diferentes cepas de *Leishmania*, além da resposta imune local (Maia et al., 2007).

Gomes e colaboradores (2007), trabalhando com cães provenientes do estado de São Paulo, encontraram uma concordância de 95% entre os métodos parasitológico (isolamento em cultura e exame de lâmina) e molecular (PCR), no grupo de cães sintomáticos; para o grupo de cães assintomáticos a concordância entre esses métodos foi de 90%. Em nossos resultados, o exame parasitológico foi não concordante com a PCR.

7.6 Identificação de espécie(s) de *Leishmania*

A identificação da(s) espécie(s) de *Leishmania* em áreas sabidamente endêmicas para o calazar contribui para uma melhor compreensão da epidemiologia da doença, e conseqüentemente para a elaboração de estratégias de controle da mesma. Oliveira e colaboradores (2005), trabalhando na cidade de Araçuaí, Vale do Jequitinhonha/MG, encontraram DNA de *Leishmania* dos complexos *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. donovani* em roedores silvestres (*Thrichomys apereoides*) e sinantrópicos (*Rattus rattus*) em amostras de sangue e pele. A região é endêmica para LV e LT e o achado corrobora para a conclusão de que *L. amazonensis* também circula em Minas Gerais. Barral e colaboradores (1986), trabalhando na região Nordeste do Brasil, isolaram *Leishmania* da medula óssea de um paciente humano com a forma clássica da leishmaniose visceral; após a caracterização por isoenzimas e anticorpos monoclonais, concluíram que tratava-se de *Leishmania Mexicana amazonensis*. Esse foi o primeiro relato de caso de leishmaniose visceral causada por essa espécie. Madeira e colaboradores (2006) descreveram o primeiro caso de infecção mista com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* em um cão naturalmente infectado na cidade do Rio de Janeiro. Os parasitos isolados das lesões cutâneas foram caracterizados como *L. braziliensis* e os isolados de sangue e linfonodos como *L. chagasi*, utilizando-se a técnica de isoenzimas. A análise por PCR, seguida de hibridização para identificação específica, também demonstrou a presença de DNA de *Leishmania (V.) braziliensis* na amostra de lesão cutânea e DNA de *L. (L.) chagasi*, nas amostras de baço e linfonodo poplíteo. Na região metropolitana de Belo Horizonte/MG, área endêmica para LV e LT, Quaresma e colaboradores (2007) encontraram DNA de *L. braziliensis* em amostra de sangue de um cão, e amostra de medula, de outro cão; Teixeira-Neto e colaboradores (2008) encontraram DNA de *L. chagasi* e *L. braziliensis*

concomitantemente em amostras de pele de 4 cães, também em Belo Horizonte; ambos utilizaram a técnica de PCR-RFLP descrita por Volpini e colaboradores (2004) para caracterizar o parasito. Em Araçatuba/SP, foram identificados dois cães com infecção por *Leishmania (L.) amazonensis*, em área endêmica para LV, ambos com diagnóstico clínico de leishmaniose visceral (Tolezano et al., 2007). Nesse caso a infecção por *L. amazonensis* foi identificada por SSU rDNA-PCR (Small Subunit Ribossomal - pequena subunidade do DNA ribossomal) associada à hibridização com sondas (Uliana et al., 1994), em amostras de linfonodo dos 2 animais.

Na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Souza e colaboradores (2005) encontraram um gato doméstico (*Felis catus*) infectado com *L. L. amazonensis* em região onde a LV é endêmica. Na Bolívia, Martinez e colaboradores (2002) publicaram um relato de caso de uma criança de 5 anos de idade com diagnóstico de leishmaniose cutânea difusa (LCD) com infecção mista. A análise isoenzimática dos parasitos isolados a partir da amostra de lesão de pele demonstrou a presença de *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Esse foi o primeiro relato de infecção mista onde foram encontradas duas espécies distintas de *Leishmania* na mesma lesão. Gomes e colaboradores (2007) encontraram cães positivos para leishmaniose visceral, em regiões até então consideradas endêmicas somente para leishmaniose tegumentar. Da amostra de 114 animais trabalhados, 58 foram positivos na PCR para o gênero *Leishmania* e por métodos parasitológicos; destes, 53 foram positivos em PCR para *L. chagasi* e os 5 restantes foram positivos em PCR para *L. braziliensis*. Gontijo (2000), estudando isolados de *Leishmania* provenientes de casos humanos de LTA do estado de Minas Gerais encontrou uma amostra com perfil isoenzimático de *L. amazonensis*, proveniente de paciente com forma clínica cutânea, residente em Lagoa Santa/MG.

Em todos esses estudos, assim como no nosso, o diagnóstico molecular teve grande contribuição para a identificação de espécie de *Leishmania* em locais onde sua ocorrência não era esperada, o que não seria possível utilizando-se somente métodos imunológicos ou parasitológico direto.

Pacheco e colaboradores (1987) observaram que, quando se conduzem culturas mistas, com a presença de mais de uma espécie de parasito, pode ocorrer uma melhor adaptação de uma das espécies ao meio utilizado; essa leishmania irá se destacar em crescimento, enquanto que a outra poderá desaparecer. Esse relato pode explicar o fato dos nossos estudos não terem sido capazes de identificar infecções mistas nas amostras isoladas em meio de cultura, a partir da punção de medula óssea dos cães.

Todos esses achados reforçam a necessidade de se identificar as espécies de *Leishmania* que infectam cães soropositivos em áreas endêmicas, com conseqüente

reavaliação das medidas de controle e vigilância epidemiológica das leishmanioses. O fenômeno de expansão geográfica das leishmanioses possibilita a sobreposição de áreas endêmicas e a ocorrência de casos de infecção mista, em humanos e cães, como demonstrado em vários trabalhos (Madeira et al., 2006; Martinez et al., 2002; Oliveira-Neto et al., 1986; Silveira et al., 1984).

7.7 Sensibilidade dos métodos e formas clínicas

Segundo Saridomichelakis e colaboradores (2005), os esfregaços de medula óssea e de aspirado de linfonodo são métodos sensíveis e específicos para o diagnóstico da LVC, contudo sua sensibilidade é significativamente menor (< 30%) em animais assintomáticos. As amastigotas de *Leishmania* são mais frequentemente encontradas nos cães sintomáticos, o que sugere que o status clínico e o número de parasitos nos órgãos-alvo possam estar correlacionados (Quinnel et al., 2001; Solano-Gallego et al., 2001a; Travi et al., 2001). Um estudo longitudinal conduzido em cães naturalmente infectados demonstrou que a infectividade está positivamente correlacionada com as concentrações de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, a presença de DNA do parasito na medula óssea e o escore clínico (Courtenay et al., 2002). Esses resultados sugerem que, embora seja possível a detecção de *Leishmania* em animais assintomáticos, com baixos níveis de anticorpos e resposta imune celular específica, provavelmente o número de parasitos em diferentes órgãos será inferior ao detectado em cães sintomáticos (Killick-Kendrick et al., 1994). Reis e colaboradores (2005) também encontraram uma associação positiva entre a intensidade do parasitismo em impressões em lâmina de baço, fígado, medula óssea e pele, e o estado clínico dos animais. Em nossos estudos a sensibilidade de todas as metodologias empregadas foi maior para o grupo de animais sintomáticos, do que para os assintomáticos, em concordância com os achados desses autores.

7.8 Considerações finais

Como obstáculos às ações de controle da LV podem ser citados: o deslocamento de animais infectados para áreas indenes, o tratamento de cães, a reposição canina muito rápida, sem a adoção das medidas preventivas, a grande capacidade adaptativa do vetor, a falta de cumprimento à legislação sanitária, o grande intervalo de tempo entre a coleta de amostras caninas e o diagnóstico laboratorial, a resistência da população ao controle do reservatório canino e à borrifação intradomiciliar, a crescente urbanização do agravo, a co-infecção com o HIV e outras morbidades imunodepressoras, a falta de controle de qualidade dos exames e kits utilizados por serviços de saúde privados (SES/MG, 2006). Somam-se a esses fatores o

fenômeno do aquecimento global, que sabidamente está mudando o perfil epidemiológico das doenças e a postura passiva da população, que não se percebe como agente promotor de sua própria saúde, integrado em um sistema de saúde que só funciona plenamente com a sua participação, esperando sempre que venham do poder público as ações de controle das endemias e de outras doenças.

As evidências de cães infectados com outras espécies de *Leishmania*, que não *L. chagasi*, demonstradas nesse trabalho apontam para mais um aspecto vulnerável do controle da LVC: a eliminação desses cães ocorre sem que existam estudos que comprovem o papel epidemiológico do cão na manutenção do ciclo de LTA. A simples identificação do parasito no animal não é o suficiente para que se conclua que o mesmo se comporta como reservatório da doença. São necessários novos estudos, acerca das espécies de flebotomíneos encontrados nesses locais, estudos de infecção natural nas espécies vetoras e permissivas, experimentos de xenodiagnóstico com cães infectados com *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, entre outros.

Um dos objetivos do presente trabalho - a confirmação da infecção por *Leishmania* spp., por pelo menos um método diagnóstico utilizado, não foi possível em três (6,8%) dos quarenta e quatro animais. Como um deles tratava-se de um filhote, ainda com dentes de “leite”, especula-se a possibilidade de identificação de anticorpos maternos pela sorologia. Com relação aos outros dois animais, uma possibilidade seria a ocorrência de reações cruzadas com outras hemoparasitoses, principalmente as transmitidas por ectoparasitos, uma vez que a prevalência de ectoparasitoses nessas regiões é elevada.

A identificação da espécie *L. amazonensis*, em cães provenientes do município de Paracatu, sugere a necessidade de estudos posteriores de fauna flebotomínica, contemplando investigação de infecção natural por *Leishmania amazonensis* e estudos de infectividade de cães para as espécies de flebotomíneos do complexo *flaviscutellata* ou outras.

Conclusões

8 Conclusões

Dos quarenta e quatro cães avaliados, quarenta e um (93,2%) tiveram a sorologia, RIFI e ELISA, confirmada por pelo menos um dos métodos diagnósticos utilizados. Não foi possível a confirmação da infecção por *Leishmania* spp., por métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares, em três animais soropositivos (6,8%).

Todas as metodologias utilizadas apresentaram maior sensibilidade na análise do grupo de cães sintomáticos.

O percentual de positividade pelo método parasitológico em lâmina, em amostras de baço, linfonodo, medula óssea e pele foi de 67%.

O percentual de positividade por cultura de amostras de medula óssea foi de 58%.

O percentual de positividade pelo teste rápido Kalazar detect™, em amostras de soro, foi de 80%.

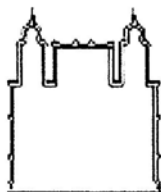
O percentual de positividade pela PCR em amostras de baço, linfonodo e pele foi de 64%.

Os métodos de PCR RFLP kDNA e PCR RFLP *hsp70* e PCR M1M2 possibilitaram a identificação das espécies *L. chagasi* em cães provenientes de Janaúba, *L. chagasi* e *L. braziliensis*, em cães provenientes de Montes Claros e *L. chagasi* e *L. amazonensis* em cães provenientes de Paracatu. O achado de cão infectado com *Leishmania amazonensis*, apresentando sinais clássicos de LVC, sugere que essa espécie possa demonstrar comportamento viscerotrópico nesses animais.

As amostras de tecido dos cães soropositivos, submetidas à PCR kDNA, demonstraram que o tecido linfonodo foi não concordante com os tecidos baço e pele, nas amostras estudadas.

Somente o teste rápido Kalazar detect™ demonstrou ter desempenho diferente entre grupos de animais sintomáticos e assintomáticos. Este teste foi capaz de identificar 100% dos animais sintomáticos, contra apenas 61% dos animais assintomáticos.

Anexos



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" Controle da leishmaniose visceral em municípios do estado de Minas Gerais, Brasil.. "

número P-514/08, proposto por Edelberto Santos Dias, foi licenciado pelo N° L-013/09.

Sua licença de N° L-013/09 autoriza o uso anual de :

- 30 *Canis familiares*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 21 de janeiro de 2013.

Rio de Janeiro, 21/01/2009


Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ

9.2 Certificado CETEA – UFMG.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 35/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no município de Janaúba (MG), área endêmica de intensa transmissão**", que tem como responsável **João Carlos França da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **16/ 05/2007**.

Este certificado expira-se em **16/ 05 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 35/2007**, related to the project entitled "**Epidemiology of visceral Leishmaniasis of Janaúba municipality (MG) in the endemic area of high transmission**", under the supervision of **João Carlos França da Silva**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 16, 2007**.

This certificate expires in **May 16, 2012**.

Belo Horizonte, 21 de Maio de 2007.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

Referências bibliográficas

10 Referências bibliográficas

Alencar JE, Dietze R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: Veronesi R. Doenças infecciosas e parasitárias. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1991.p.706-17.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clin Microbiol Rev. 2008;21(2):334-59.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. Adv Parasitol. 2004;57:1-88.

Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques JM, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally infected dogs. Vet Parasitol. 2006;140:231-38

Andrade HM, de Toledo VP, Marques MJ, França-Silva JC, Tafuri WL, Mayrink W, Genaro O. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. Vet Parasitol. 2002;103(1-2):71-81.

Andrade RA, Reis AB, Gontijo CM, Braga LB, Rocha RD, Araújo MS, Vianna LR, Martins-Filho OA. Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. Vet Immunol Immunopathol. 2007;116(1-2):85-97.

Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. Lancet Infect Dis. 2008;8(3):191-9.

Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin Dermatol. 1996; 14(5):523-32.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol. 2000;30:1269-81.

Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR, Reed SG. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. J Infect Dis. 1996;173(3):758-61.

Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. Vet J. 2008 Jan;175(1):14-5.

- Baneth G, Dank G, Keren-Kornblatt E, Sekeles E, Adini I, Eisenberger CL, Schnur LF, King R, Jaffe CL. Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(5):722-5.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008;24(7):324-30.
- Barata RA, França-Silva JC, da Costa RT, Fortes-Dias CL, Silva JC, de Paula EV, Prata A, Michalsky EM, Dias ES. Phlebotomine Sand Flies in Porteirinha, an Area of American Visceral Leishmaniasis Transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(5):481-7.
- Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, Fiúza JA, Gonçalves CM, Paula KM, Dias ES. Aspects of the ecology and behaviour of phlebotomines in endemic area for visceral leishmaniasis in State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(5):421-5.
- Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2006;28(7):329-37.
- Barral A, Badaró R, Barral-Netto M, Grimaldi G Jr, Momem H, Carvalho EM. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1986;35(4):732-4.
- Barrouin-Melo S, Laranjeira D, Filho F, Trigo J, Julião F, Franke C, Aguiar P, Santos W, Pontes-de-Carvalho L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet J.* 2005;171:331-39.
- Bastien P, Killick-Kendrick R. *Leishmania tropica* infection in hamsters and a review of the animal pathogenicity of this species. *Exp Parasitol.* 1992;75(4):433-41.
- Bern C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD, Bista MB. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63:153-57.
- Boaventura VS, Café V, Costa J, Oliveira F, Báfica A, Rosato A, de Freitas LAR, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(2):267-9.
- Borja-Cabrera GP, Santos FN, Bauer FS, Parra LE, Menz I, Morgado AA, Soares IS, Batista LMM, Palatnik-de-Sousa CB. Immunogenicity assay of the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine.* 2008;26(39):4991-97.

Braga MD, Coêlho IC, Pompeu MM, Evans TG, MacAullife IT, Teixeira MJ, Lima JW. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998;31(5):419-24.

Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativas das populações residentes, em 1º de julho de 2008, segundo os municípios. Brasília: MPOG/IBGE, 2008. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2008/POP_2008_TCU.pdf. Acesso em: 08 maio 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. DataSUS. Tecnologia da informação a serviço do SUS: Leishmaniose Visceral - casos confirmados notificados no Sistema de Agravos de Notificação-SINAN. Brasília:MS/SVS, s.d. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinan/leishvi/bases/leishvbr.def>. Acesso em 05 fevereiro 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. - Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. 136 p. ilus, graf.(A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas_lta.pdf. Acesso em 05 fevereiro 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf. Acesso em: 08 maio 2009.

Brener Z. Calazar canino em Minas Gerais [Tese]. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais; 1957.

Burns Jr JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaró R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90(2):775-79.

Camargo ME, Rebonato C. Cross-reactivity in fluorescence tests for Trypanosoma and Leishmania antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* 1969;18:500-505.

Campos RM. Caracterização molecular de antígenos de *Leishmania (Leishmania) chagasi* potencialmente úteis no controle da leishmaniose visceral [Dissertação]. Recife, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. 2007.

Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(3):321-24.

Chagas E, Cunha AM, Castro GO, Ferreira LC, Romana C. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1937;32:321-385.

Chomel BB. Control and prevention of emerging parasitic zoonoses. *Int J Parasitol.* 2008;38(11):1211-7.

Chulay J D, Bryceson AD. Quantification of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32:475-79.

CMF. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology.* 1994;109:423-33.

Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Morales A, Carrasquilla CF, Young DG, Kreutzer R D, Boshell J, Palau MT, Caceres E, Palaez D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;40(5)480-486.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, Genaro O, Linardi P M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2005;128(1-2):149-55.

Coutinho MTZ, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet Parasitol.* 2007;147:320-325.

Cross ER, Hyams KC. The potencial effect of global warming on the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. *Environ Health Perspect.* 1996;104:724-727.

Cruz I, Morales MA, Nogueira I, Rodriguez A, Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet.* 2002. 359;9312:1124-1125.

Cunha AM, Chagas E. Estudos sobre o parasito. In: Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1937;32:329-337.

da Costa CA, Genaro O, de Lana M, Magalhães PA, Dias M, Michalick MS, Melo MN, da Costa RT, Magalhães-Rocha NM, Mayrink W. Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1991;24(1):21-5.

da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, Gontijo NF, Michalick MSM, Alexander B, Williams P, Melo MN. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *The Vet Journal*. 2007 174:636–643.

Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:117-8.

Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol*. 2007;149(3-4):139-46.

de Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MS. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potencial for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol*. 2006;137(1-2):159-67.

Deane LM, Deane MP. Encontro de Leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. *O Hospital*. 1954;45:419-421.

Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital*. 1955;47:75-87.

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. *O Hospital*. 1955a;48:61-76.

Deane LM, Deane MP. Sobre a biologia do *Phlebotomus longipalpis* transmissor de leishmaniose visceral, em área endêmica do Ceará. I. Distribuição, predominância e variação estacional. *Rev Bras Biol*. 1955b;15:83-95.

Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 1956.

Deane MP, Deane LM. Observações sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Ceará. *O Hospital*. 1955;48(3):347-364.

Dedet JP, Pratlong F. *Leishmania*, Trypanosoma and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. J Eukaryot Microbiol 2000;47:37-X.

Delgado O, Feliciangeli D, Coraspe V, Silva S, Perez A, Arias J. Value of a dipstick based on recombinant rK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. Parasite. 2001;8: 335-57.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004;27:305-18.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001;95:239-43.

Dey A, Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. Indian J Med Microbiol. 2006;24(3):165-70.

Diniz S, Melo M, Borges A, Bueno R, Reis A, Tafuri W, Nascimento E, Santos R. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in semen of naturally infected dogs. Vet Pathol. 2006;42:650-58.

Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM. Canine visceral leishmaniasis: United States and Canada, 2000–2003. Emerg Infect Dis. 2006;12:440–6.

el Amin ER, Wright EP, Abdel Rahman AM, Kolk A, Laarman JJ, Pondman KW. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA, immunofluorescence and indirect haemagglutination. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986;80(2):271-4.

Elnaiem DA, Hassan MM, Maingon R, Nureldin GH, Mekawi AM, Miles M, Ward RD. The Egyptian mongoose, *Herpestes ichneumon*, is a possible reservoir host of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. Parasitology. 2001;122(5):531-6.

Eresh S, McCallum SM, Barker DC. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. Parasitology. 1994;109(4):423-33.

Ferreira A, Ituassu L, Melo M, Andrade A. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais state, Brazil. Vet Parasitol. 2008;152:257-63.

Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schallig H, Gontijo. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol.* 2007;146,(3-4)235-241.

Ferroglio E, Romano A, Trisciuglio A, Poggi M, Ghiggi E, Sacchi P, Biglino A. Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(7):636-41.

Fondevila D, Vilafranca M, Ferrer L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 1997;56(3-4)319-327.

Forattini OP. Entomologia médica: Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. Editora Edgard Blücher Ltda; São Paulo. 1973;658p. V 4.

França-Silva JC, Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Da-Costa JC, Genaro O, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais state, Brazil. *Vet Parasitol.* 2003;(111):161-173.

França-Silva JC. Distribuição espacial e temporal da leishmaniose visceral canina em relação a densidade vetorial e ao controle de cães infectados em Porteirinha, Minas Gerais (1998-2002) [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária; 2003.

França-Silva JC. Leishmaniose visceral canina no município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas; 1997.

Franceschi A, Merildi V, Guidi G, Mancianti, F. Occurrence of *Leishmania* DNA in urines of dogs naturally infected with leishmaniasis. *Vet Res Commun.* 2006;31:335-41.

Galati EA, Nunes VL, Rego Júnior FA, Oshiro ET, Chang MR. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Saude Pública.* 1997 Aug;31(4):378-90

Garcia AL, Parrado R, De Donker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;101:368-71.

Garcia AL, Telles T, Parrado R, Rojas E, Bermudez H, Dujardin JC. Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101:1208-13.

Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Donker S, Arevalo J, Quispe Tintaya KW, Dujardin JC. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2294-7.

Genaro O. Leishmaniose visceral canina experimental [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas;1993.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol*. 2006;135(2-3):100-7.

Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MF, Pereira-Chioccola VL. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2007;144(3-4):234-41. Erratum in: *Vet Parasitol*. 2007;149(3-4):298.

Gomes SP. Pequeno guia para a elaboração de referências bibliográficas segundo o estilo Vancouver. Biblioteca da Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo[Internet]. Jan 2008[Citado em 2009 mai 7]. Disponível em: <http://www.imtsp.fm.usp.br/biblioteca.htm>. Acesso em: 08 maio 2009.

Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J*. 2008;175(1):45-52.

Gontijo, CMF. Leishmaniose tegumentar em Minas Gerais: estudos moleculares de amostras de *Leishmania* isoladas de casos humanos[Tese]. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2000.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7:338-49.

Herwaldt B. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999;354:1191-99.

Jelinek T, Eichenlaub S, Löscher T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999;18:669-70.

Kapoor GS, Arora SK, Sehgal S. Genetic polymorphism of *Leishmania* species using kinetoplast DNA restriction fragment length polymorphism and cDNA probe of *Leishmania donovani*. *Med Microbiol Immunol*. 1998;86(4):209-214.

Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK, Johnson AJ.. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet Pathol* 1984;21(1):74-9.

Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Johnson AJ. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. *Vet Pathol*. 1984;21(1):80-6.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Pinelli E, Del Real G, Molina R, Vitutia MM, Cañavate MC, Nieto J. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite*. 1994;1(4):311-8.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc*. 1999;35(5):376-83.

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, Bastien P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology*. 2002;125(Pt 3):197-207.

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamothe J, Bastien P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J Clin Microbiol*. 2001;39:613-617.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(8):811-27.

Lainson R, Shaw JJ, Lins ZC. Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox, *Cerdocyon thous* (Linneaus) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1969;63:741-45.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*; London, Academic Press. 1987; 1-20.

Lainson R, Shaw JJ. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* (Cunha and Chagas) in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). *Ann Parasitol Hum Comp*. 1988;63(2):134-45.

Lainson R, Ward RD, Shaw JJ. Cutaneous leishmaniasis in North Brazil: *Lutzomyia anduzei* as a major vector. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1976;70:171-2.

Lainson R. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In M.V. Service(ed.), Demography and vector-borne diseases. CRC, Boca-Raton, Fl. 1989;85-106.

Lainson R. The american leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983;77:169-96.

Laveran A, Mesnil F. Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Laveran e Mesnil). Parasite d'une fièvre de l'Inde. Comp R Hébd Séanc Acad Sci. 1903;137:957-61.

Lawyer P, Akopyants N, Kimblin N, Patrick R, Secundino N, Berveley S, Sacks D. Demonstration of a *Leishmania* sexual cycle in the sand fly vector. 6TH International Symposium on Phlebotomine Sand Flies. Lima. Proceedings of the 6th Internacional Symposium on Phlebotomine Sandflies, 2008.

Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MAB, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S, Dietze R. Canine visceral leishmaniasis: Performance of a rapid diagnostic test (Kalazar detectTM TM) in dogs with and without signs of the disease. Acta Trop. 2008;107:205-207.

Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, Mylonakis ME. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically health dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. Vet Parasitol. 2002;109: 19-27.

Lewis DJ. Phlebotomid Sandflies. Bull World Health Organization. 1971.44(4):535:551.

Lutz A, Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1912;4:84-95.

Madeira MF, Schubach A, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Marzochi MC. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006;100(5)442-445.

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Vet Parasitol. 2008;158(4):274-87.

Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. Vet J. 2009;179(1):142-4.

Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 1995;59(1):13-21.

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. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(4):566-7.

Mangabeira Filho O. Sobre duas novas espécies de Phlebotomus (Diptera:Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1938;33(3):349-356.

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Della Morte R, Gringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2004;125:251-62.

Martín-Dávila P, Fortún J, López-Vélez R, Norman F, Montes de Oca M, Zamarrón P, González MI, Moreno A, Pumarola T, Garrido G, Candela A, Moreno S. Transmission of tropical and geographically restricted infections during solid-organ transplantation. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(1):60-96.

Martinez E, Mollinedo S, Torrez M, Muñoz M, Bañuls AL, Le Pont F. Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum/L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96(5):529-32.

Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today.* 2000;16:188-9.

Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L, Fleischer B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics.* 1999;104(5):65.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:5515-19.

Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias CL, Dias ES. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol.* 2007;147(1-2):67-76.

Minas Gerais, Secretaria de Estado da Saúde. Análise da situação de saúde Minas Gerais. Belo Horizonte. 2008. Disponível em: http://www.saude.mg.gov.br/publicacoes/estatistica-e-informacao-em-saude/analise%20da%20saude_020309_Tales.pdf
Acesso em 09 maio 2009.

Moraes SZ et al. O Perfil das Doenças Transmissíveis. In: Minas Gerais. Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Epidemiologia. Análise da situação da saúde em Minas Gerais. Belo Horizonte: SES/MG, 2006; p. 53-58. Disponível em:
<http://www.saude.mg.gov.br/publicacoes/estatistica-e-informacao-em-saude/analises/Analise%20da%20Situacao%20de%20Saude%20-%20Minas%20Gerais%202006.pdf>
Acesso em: 08 maio 2009.

Miranda S, Roura X, Picado A, Ferrer L, Ramis A. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Res Vet Sci.* 2008;85(1):35-8.

Mohebbali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, Akhoundi B, Naeini KM, Avizeh R, Fakhar M. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol.* 2005;129(3-4):243-51.

Mohebbali M, Taran M, Zarei Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rK39 test and direct agglutination. *Vet Parasitol.* 2004;121:239-45.

Monteiro EM, da Silva JC, da Costa RT, Costa DC, Barata RA, de Paula EV, Machado-Coelho GL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Visceral leishmaniasis: a study on phlebotomine sand flies and canine infection in Montes Claros, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(2):147-52.

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology.* 2002;18(9):399-405

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.

Nasereddin A, Ereqat S, Azmi K, Baneth G, Jaffe CL, Abdeen Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. *J Parasitol.* 2006;92(1):178-83.

Nasereddin A, Regata S, Azmi K, Baneth G, Jaffe C, Abdeen Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. *J Parasitol.* 2006; 92:178-83.

Nicolle C. Nouvelles acquisitions sur le kala-azar: Cultures inoculations au chien, étiologi. C R Hebd Séances et l'Acad Sci, Paris. 1908a;146:498- 499.

Nicolle C. Reproduction expérimentale du Kala-azar chez le chien. Origine canine probable de cette affection. Bull Soc Path Exot. 1908b;1:188-190.

Nunes CM, Lima VM, Paula HB, Perri SH, Andrade AM, Dias FE, Burattini MN. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol. 2008;153(1-2):19-23.

Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. J Clin Microbiol. 2006;44(4):1318-22.

Oliveira CL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil, 1994-1997. Cad Saúde Pública 2001;17(5):1231-39.

Oliveira F, Lawyer PG, Kamhawi S, Valenzuela JG. Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(4):226.

Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol. 2005;129(3-4):219-27.

Oliveira Neto MP, Grimaldi G Jr, Momen H, Pacheco RS, Marzochi MC, McMahon Pratt D. Active cutaneous leishmaniasis in Brazil, induced by *Leishmania donovani chagasi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986;81(3):303-9.

Oliveira Neto MP, Marzochi MC, Grimaldi Júnior G, Pacheco RS, Toledo LM, Momen H. Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. Ann Trop Med Parasitol. 1986;80(6):587-92.

Oskam L, Slappendel RJ, Beijer EG, Kroon NC, van Ingen CW, Ozensoy S, Ozbel Y, Terpstra WJ. Dog-DAT: a direct agglutination test using stabilized, freeze-dried antigen for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996;16(3-4):235-9.

Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Spinelli R, Brandonisio O. Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2769-70.

Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;219(8):1076-83.

Pacheco RS, Grimaldi Júnior G, Morel CM. Inhibition of growth of *Leishmania mexicana mexicana* by *Leishmania mexicana amazonensis* during "in vitro" co-cultivation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1987;82(4):537-42.

Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(5):510-7.

Palma G, Gutierrez Y. Laboratory diagnosis of *Leishmania*. *Clin Lab Med.* 1991;11: 909-922.

Paz GF, Lima ACVMR, Monteiro EM, Guedes KS, Barata RA, França-Silva JCF, Ribeiro MFB, Dias ES. *Leishmania chagasi*: estudo da infecção em *Rhipicephalus sanguineus* infestado experimentalmente em cão com leishmaniose visceral. Resultados preliminares. In: Anais da XXIII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmanioses. 25 a 27 de outubro de 2007. Uberaba, MG, Brasil.

PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004 Jan;98(1):12-7.

Penna HA. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil-Médico.* 1934;48:949-50.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenber J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994;62(1):229-35.

Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, Mancianti F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol.* 2002;106(3):181-91.

Quaresma PF, Murta SMF, Ferreira EC, Rocha-Lima ACVM, Xavier AAP, Gontijo CMF. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica*, In Press, Uncorrected Proof, Available online 23 May 2009.

Queiroz PV, Monteiro GR, Macedo VP, Rocha MA, Batista LM, Queiroz JW, Jerônimo SM, Ximenes MF. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Res Vet Sci.* 2009;86(2):267-73.

Queiroz PVS, Monteiro GRG, Macedo VPS, Rocha MAC, Batista LMM, Queiroz JW, Jerônimo SMB, Ximenes MFFM. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Res Vet Sci.* 2009;86(2):267-73.

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, Shaw JJ, Shaw MA, Dye C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology.* 2001;122(3):253-61.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology.* 1997;115(2):143-56.

Reed SG. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 1996;14(5):471-8.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2006;81(1):68-75.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2006;81(1):68-75.

Reithinger R, Davies CR. American cutaneous leishmaniasis in domestic dogs: an example of the use of the polymerase chain reaction for mass screening in epidemiological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96(Suppl 1):S123-S126.

Reithinger R, Davies CR. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends Parasitol.* 2002;18(7):289-90.

Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Counihan H, Espinoza CJ, González JS, Davies CR. *Leishmania (Viannia)* spp. dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96(1):76-8.

Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. *J Clin Microbiol.* 2000;38:748-51.

Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(7):2352-6.

Resende SM. Leishmaniose visceral em Minas Gerais. Bol. Epidemiol. v. X, n.1, jan.-jun. 2007n. 3, p. 1-6. Disponível em:

<http://www.saude.mg.gov.br/publicacoes/estatistica-e-informacao-em-saude/boletim-epidemiologico/2007/boletimXn1.pdf>

Acesso em 08 maio 2009.

Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini DA, Alves CF, Melo FA, Tafuri WL, Demicheli C, Melo MN, Frézard F, Michalick MS. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(7):2564-72.

Riera C, Valladares JE. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. Parasitol Today. 1996;12(10)412.

Rio Grande do Sul, Secretaria de Estado da Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Situação da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul. 2009.

Disponível em:

<http://www.saude.rs.gov.br/dados/1239825304511ORIENTA%C7%D5ES%20E%20PROCE DIMENTOS%20INICIAIS.pdf>

Acesso em: 7 junho 2009.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Exp Parasitol. 1990;71:267-75.

Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón M, Altet L, Solano-Gallego L, Sánchez-Robert E, Francino O, Alberola J. Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. Vaccine. 2007;25(46):7962-71.

Rose K. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos. Australian Vet Journal. 2004;82(7)440.

Ross R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. (2) Further notes on Leishman's bodies. Brit Med J. 1903;2:1261,1401.

Rosypal A, Troy G, Duncan R, Zajac A, Lindsay D. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum infantum*. J Vet Intern Med. 2005;19:802-809.

Roura X, Fondevila D, Sánchez A, Ferrer L. Detection of *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*. 1999;11(4):385-7.

Roura X, Sánchez A, Ferrer L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec*. 1999;144(10):262-4.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230(4732):1350-4.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989;(3)253p.

Santos-Gomes GM, Capela MJ, Ramada J, Campino L. Experimental canine leishmaniasis: evolution of infection following re-challenge with *Leishmania infantum*. *Acta Trop*. 2003;87(2):235-44.

Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(1):82-6.

Sastre N, Francine O, Ramírez O, Enseñat C, Sánchez A, Altet L. Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. *Vet Parasitol*. 2008;158:117-20.

Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;47:349-58.

Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:577-9.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994;89(3):471-8.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984;79(4):511.

Silva ES, Gontijo CM, Melo MN. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends Parasitol*. 2005;21(12):550-2.

Silva ES, Pirmez C, Gontijo CM, Fernandes O, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. *Vet Rec.* 2000;147(15):421-2.

Silva ES, Schoone GJ, Gontijo CMF, Brazil RP, Pacheco RS, Schallig HD. Application of direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST) for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2005;4:4.

Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;60(1-2):55-59.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Ribeiro RS. Cutaneous leishmaniasis in Amazonia. Report of the 1st human case of mixed infection, determined by 2 different *Leishmania* species: *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana amazonensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1984;26(5):272-5.

Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Ann Rev Microbiol* 1987;41:363-82.

Slappendel RR, Greene CE. Leishmaniasis. In: *Infectious diseases of the dog and cat*, ed. Greene CE, 769-777. WB Saunders Co., Philadelphia, PA. 1990.

Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, Arnal MC, Trisciuglio A, Gortázar C. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol.* 2008;155(3-4):198-203.

Solano-Gallego L, Fernández-Bellón H, Serra R, Gállego M, Ramis A, Fondevila D, Ferrer L. Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. *Equine Vet J.* 2003;35(3):320-3.

Solano-Gallego L, Lull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol.* 2000;90(1-2):37-45.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):560-3.

Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portús M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol.* 2001;96(4):265-76.

- Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Iniesta L, Quintana J, Pastor J, Espada Y, Portús M, Alberola J. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(4):676-80.
- Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2007;147(3-4):315-9.
- Souza AI, Barros EM, Ishikawa E, Ilha IM, Marin GR, Nunes VL. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2005;128(1-2):41-5.
- Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis.* 2004;189(9):1729-33.
- Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PC, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet.* 1998;351:563-65.
- Symmers WSC. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection: in Britain. *Lancet.* 1960;16:127-132.
- Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol.* 2001;96(3):203-12.
- Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, de Melo MN, Michalick MS, Tafuri WL. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods.* 2004;292(1-2):17-23.
- Teixeira-Neto, RG. Estudo das relações entre imunidade humoral e carga parasitária em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. [Dissertação]. Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. 2008. 120p.
- Tolezano JE, Uliana, SRB, Taniguchi HH, Araújo MFL, Barbosa JAR, Barbosa JER, Floeter-Winter LM, Shaw JJ. 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. *Vet Parasitol.* 2007;149(3-4):280-84.

Toz SO, Chang KP, Ozbel Y, Alkan MZ. Diagnostic value of rK39 dipstick in zoonotic visceral leishmaniasis in Turkey. *J Parasitol.* 2004;90:1484-1486.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Mar-Apr;64(3-4):119-24.

Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J Eukaryot Microbiol.* 1994;41(4):324-30.

Vercammen F, Berkvens D, Le Ray D, Jacquet D, Vervoort T. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. *Vet Rec.* 1997;27;141(13):328-30.

Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 2004;90(1):31-37.

World Health Organization (WHO)/TDR. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Natures Reviews Microbiology.* 2007;5:S7-S16.
Disponível em: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n11_supp/pdf/nrmicro1748.pdf
Acesso em 08 junho 2009.

World Health Organization (WHO). The world health report 2002 - Reducing risks, promoting healthy life. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2002;192-197.
Disponível em: <http://www.who.int/whr/2002/en/>
Acesso em 08 junho 2009.

Young GG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia longipalpis* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Am Entomol Inst n° 54. Associates Publishers, American Entomological Institute, Gainesville, Fl. 1994.

Zanette MF. Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina [Dissertação]. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Curso de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. 2006. 89p.

Zijlstra E, Nur Y, Desjeux P, Khalil E, El-Hassan A, Groen J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from Sudan. *Trop Med Int Health.* 2001;6(2):108-113.