



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**TESE DE DOUTORADO**

**USO DE MÉTODO DE BIOLOGIA MOLECULAR  
QUANTITATIVO (PCR *real time*) NA AVALIAÇÃO DA  
CARGA PARASITÁRIA EM CÃES NATURALMENTE  
INFECTADOS POR *Leishmania sp.***

**CRISTIANE SANTOS NASCIMENTO**

Salvador – Bahia - Brasil  
2011

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**USO DE MÉTODO DE BIOLOGIA MOLECULAR  
QUANTITATIVO (PCR *real time*) NA AVALIAÇÃO DA  
CARGA PARASITÁRIA EM CÃES NATURALMENTE  
INFECTADOS POR *Leishmania sp.***

**CRISTIANE SANTOS NASCIMENTO**

**Orientador:** Prof. Dr. Edson Duarte Moreira Jr.

Tese apresentada ao Curso de Pós  
Graduação em Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa para a obtenção do  
grau de Doutor.

**Salvador – Bahia - Brasil  
2011**

***“O maior dever do homem para consigo próprio, é o de pesquisar e analisar para compreender e praticar para evoluir sentindo todo conhecimento teórico/prático acerca da vida em suas manifestações fenomênicas, que importe para a sua evolução, a do seu semelhante, bem como a do orbe em que habita, bem como ao Universo em sua expansão.”***

O Imutabilismo.  
O.C.I.D.E.M.NT.E. – 7º C.D.E.

## DEDICATÓRIA

*A Jackson, Matheus e Carolina com muito amor.*

*A Melquíades, companheiro e amigo com muito amor.*

*Aos meus Pais, Hulda e Adalberto com gratidão e afeto.*

*Ao amigo, pai e mentor espiritual, Jair Tércio com amor e carinho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor e Pesquisador Dr Edson Moreira, meu orientador, pelos ensinamentos, paciência e estímulo, e, sobretudo, pelo privilégio da convivência profissional e de ser um exemplo da ciência, minha admiração.

A Dr<sup>a</sup> Verena Souza pela excelente colaboração na avaliação clínica dos cães que participaram deste estudo.

Ao Dr Fred Julião, colega e amigo pelo auxílio nos procedimentos de campo e na discussão científica.

A André, Zaíra, Márcia, Carolina Rosa, pelo auxílio nos procedimentos laboratoriais.

Aos colegas Dr. Raimundo, a Dr<sup>a</sup> Conceição, Débora e Leonardo pela amizade e auxílio nas avaliações estatísticas sempre que solicitado por mim.

A Dr<sup>a</sup> Tania Corrêa e a Luciene da Cruz Oliveira pela contribuição na realização da Técnica de Imunohistoquímica.

Ao pessoal da Biblioteca do CPqGM pelo auxílio e orientações recebidas durante a obtenção de artigos científicos e correção bibliográfica.

Aos professores que mais se tornaram amigos durante este tempo.

Aos colegas e amigos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pelos auxílios prestados com muito carinho e atenção.

A Prefeitura de Irecê bem como a Secretaria de Saúde deste município, que ajudaram no trabalho de campo sem nunca deixar de incentivar a continuidade do estudo;

A Prefeitura de Salinas da Margarida ,bem como a Secretaria de Saúde deste município, representados por Sr.Francisco e pelas Sr<sup>a</sup> Janice Amado e Sr<sup>a</sup> Maricélia Campos, que ajudaram no trabalho de campo sem nunca deixar de incentivar a continuidade do estudo;

Aos profissionais do Programa de Saúde da Família de Salinas da Margarida, que colaboraram nos inquéritos e captura de animais;

À Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB) pelo auxílio financeiro através do Apoio a Projeto de Pesquisa (nº 2124/2005) e por bolsa de Apoio Técnico 1 (BOL 1047/2006);

Ao CNPq pelo auxílio a Projeto de Pesquisa nº 476792/2006-1;

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (Fundação Oswaldo Cruz - BA), onde foram realizados os experimentos aqui descritos.

À Coordenação da Pós graduação em Biotecnologia e Medicina Investigativa, pelo suporte administrativo ágil, e pronto apoio para a viabilização da apresentação deste trabalho em congressos, bem como da minha participação em eventos científicos relevantes.

À Banca da Defesa de Tese composta pelos professores, Dr.Jackson Costa, Dr<sup>a</sup> Márcia Cristina Aquino e Dr<sup>a</sup> Olívia Bacellar, meus sinceros agradecimentos.

Aos pacientes, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

À Fundação O.C.I.D.E.M.N.T.E. e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e que não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

NASCIMENTO. C. S. **Uso de método de biologia molecular quantitativo (PCR *real-time*) na avaliação da carga parasitária em cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.*** Salvador, 2011. 80p. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A leishmaniose visceral humana (LVH) é uma importante causa de morbidade e mortalidade no Brasil. Apesar dos avanços no conhecimento da epidemiologia da LVH, ainda existem lacunas importantes nas informações sobre os principais reservatórios desta zoonose. A técnica validada para avaliação da infectividade de reservatórios, xenodiagnóstico, é um método laborioso, demorado e difícil de executar, portanto, inapropriado para a triagem de grande número de animais. A padronização de método capaz de quantificar a carga parasitária presente em diferentes tecidos pode oferecer respostas importantes sobre a epidemiologia e a prevenção da LVH. **OBJETIVO:** Avaliar a carga parasitária em diferentes amostras biológicas de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, utilizando método de biologia molecular quantitativo, PCR *real-time* (qPCR). **MÉTODOS:** Entre nov/2004 e abr/2007, foram realizados seis inquéritos soropidemiológicos em duas áreas endêmicas para LVH. Os cães soropositivos foram eutanasiados e submetidos a: exame de cultura, parasitológico direto e exame histológico para confirmação da infecção. Amostras de sangue periférico e fragmento de pele foram coletadas em todos os animais para determinação da carga parasitária. Adicionalmente, coletou-se também *swab* da conjuntiva, aspirado de medula óssea e linfonodo para realização do teste de qPCR nos cães incluídos no último inquérito (abr/2007). A técnica de qPCR foi padronizada utilizando um par de primers LEIF e LEIR e sonda LEIP selecionados no gene SSu rRNA. A seleção dos primers e sonda foi realizada utilizando o programa *Primer Express* (Perkin-Elmer-Applied Biosystems). A sonda fluorogênica foi sintetizada utilizando uma molécula FAM ligada na extremidade 5' e TAMRA ligada à extremidade 3' (Perkin-Elmer - Applied Biosystems). Para determinar a carga parasitária foi realizada curva padrão com o DNA obtido da cultura de *L. chagasi* em concentrações variando de  $10^1$  a  $10^7$  parasitas/ml. Cada ponto da curva foi testado em triplicata. **RESULTADOS:** Dos 98 cães soropositivos identificados, foi detectado DNA de *Leishmania* em 57% das amostras de sangue total, em 56% das amostras de pele e em 100% das amostras de medula óssea, linfonodos e *swab* da conjuntiva. A carga parasitária em sangue periférico e *swab* da conjuntiva não ultrapassou  $10^3$  parasitas/ml sendo mais comumente detectado 1 a 10 parasitas/ml. Por outro lado, em pele, medula óssea e linfonodos a carga parasitária passou de  $10^4$  parasitas/ml, além disso, as quantidades de DNA detectadas se distribuíram com maior frequência na categoria acima de  $10^4$  parasitas/ml, notadamente em amostras de linfonodos. **CONCLUSÕES:** O qPCR apresentou alta sensibilidade nas amostras biológicas estudadas, particularmente em linfonodos, medula óssea e pele. Nossos resultados indicam que o qPCR pode ser utilizado numa variedade de amostras biológicas para a quantificação da carga parasitária de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* Estudos de validação do qPCR para avaliar a capacidade de reservatórios da LV, em lugar do xenodiagnóstico, e para investigar o papel do qPCR na triagem de cães em programas de controle/prevenção da LV devem ser conduzidos.

Fonte financiadora: CNPq e FAPESB

**Palavras-Chave:** Leishmaniose Visceral, PCR *real-time*, Epidemiologia.



NASCIMENTO, C.S. **Use of molecular biology quantitative method (*real-time PCR*) in the evaluation of parasite burden in dogs naturally infected by *Leishmania sp.*** Salvador, 2011. 80p. (Doctoral thesis in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Human visceral leishmaniasis (LVH) is an important cause of morbidity and mortality in Brazil. Despite advances in knowledge of the epidemiology of LVH, there are still important gaps in information on the main reservoirs of this zoonotic disease. The validated technique for assessing the infectivity of reservoirs, xenodiagnosis, is laborious, time consuming and difficult to implement, therefore, inappropriate for screening large numbers of animals. A standardized method to quantify the parasite load present in different tissues may provide important answers on the epidemiology and prevention of LVH. **OBJECTIVE:** To assess the parasite load in different biological samples from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi* using a molecular biology quantitative method, real-time PCR (qPCR). **METHODS:** From nov/2004 to apr/2007, six seroepidemiological surveys were conducted in two endemic areas for LVH. The seropositive dogs were euthanized and submitted to: culture, direct parasitological and histological examination to confirm infection. Blood samples and skin fragments were collected in all animals to determine the parasite load. Additionally, conjunctival swabs, bone marrow and lymph node aspirates were also collected to do qPCR in dogs included in the last survey (apr/2007). The qPCR technique was standardized using a pair of primers and probe and LEIF /LEIR and LEIP selected in the SSU rRNA gene. The selection of primers and probe was performed using the program Primer Express (Perkin-Elmer-Applied Biosystems). The fluorogenic probe was synthesized using a FAM molecule attached at the 5' end and TAMRA linked to the 3' end (Perkin-Elmer-Applied Biosystems). In order to determine the parasite load a DNA standard curve was plotted with DNA obtained from *L. chagasi* culture in concentrations ranging from  $10^1$  to  $10^7$  parasites/ml. Each point on the curve was tested in triplicate. **RESULTS:** Of the 98 seropositive dogs identified *Leishmania* DNA was detected in 57% of the whole blood samples, 56% of the skin samples and 100% of bone marrow, lymph nodes and conjunctival swabs samples. The parasite load in peripheral blood and conjunctival swab did not exceed  $10^3$  parasites/ml, and was more commonly in the range of 1-10 parasites /ml. On the other hand, skin, bone marrow and lymphnode parasite burden exceeded  $10^4$  parasites / ml, in addition, the quantities of DNA detected were distributed more frequently in the category above  $10^4$  parasites/ml, especially in lymphnodes samples. **CONCLUSIONS:** qPCR showed high sensitivity in biological samples studied, particularly in lymphnodes, bone marrow and skin. Our results indicate that qPCR could be used in a variety of biological samples to quantify the parasite load in dogs naturally infected by *Leishmania sp.* qPCR validation studies to assess potential reservoirs for VL (replacing xenodiagnosis), and to investigate the role of qPCR in dog screening programs for the control/prevention of LV should be conducted.

**Key words:** Visceral Leishmaniasis, qPCR – *PCR real time*; Epidemiology

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Características dos 98 cães provenientes das áreas endêmicas de Leishmaniose Visceral estudadas, nos anos de 2004 – 2007, Bahia- Brasil.
- TABELA 2.** Resultados dos exames convencionais para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral de 98 cães provenientes de áreas endêmicas, 2004-2007.
- TABELA 3.** Carga parasitária em diferentes amostras biológicas de cães com Leishmaniose Visceral, Bahia, 2004-2007.
- TABELA 4.** Resultados do PCR *real time* (qPCR) para *Leishmania* sp em amostras biológicas de cães , de acordo com diagnóstico de infecção por *Leishmania*, Bahia, 2004-2007.
- TABELA 5.** Distribuição da carga parasitária de *Leishmania* em sangue periférico de 98 cães de acordo com o diagnóstico de infecção por *Leishmania* e com a presença de sintomas de Leishmaniose Visceral, Bahia, 2004-2007.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Casos de LV por município/ residência, Brasil (1983-2008).
- FIGURA 2.** Ciclo biológico de *Leishmania*.
- FIGURA 3.** Localização do município de Salinas da Margarida-Bahia.
- FIGURA 4.** Localização do município de Irecê – Bahia.
- FIGURA 5.** Coleta das amostras e exames realizados nos cães soropositivos de todos os Inquéritos (n=98) e do 6º Inquérito (n=29).
- FIGURA 6.** Coleta das amostras biológicas dos cães, Salinas da Margarida, Bahia, 2004 – 2007).
- FIGURA 7.** Coleta de *swab* da conjuntiva dos cães, Salinas da Margarida, Bahia, 2007.
- FIGURA 8.** Esquema da seqüência da técnica PCR *real-time*.
- FIGURA 9.** Determinação da curva padrão com os valores de fluorescência (Ct).
- FIGURA 10.** Cronograma dos inquéritos soro – epidemiológicos caninos realizados.
- FIGURA 11.** Distribuição da carga parasitária (parasito/ml) em diferentes amostras biológicas dos cães com qPCR positivo, Bahia,2004-2007.
- FIGURA 12.** Distribuição da carga parasitária (parasito/ml) em amostras de medula óssea, linfonodo,pele,sangue e *swab* da conjuntiva de cães com qPCR positivo, de acordo com o diagnóstico da infecção por *Leishmania*,Bahia,2004-2007

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CPqGM – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

Ct - Ciclo *threshold*

DAT – Teste de Aglutinação Direta

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

LVH – Leishmaniose Visceral Humana

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

qPCR – *PCR real time*

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

SESAB - Secretaria de Saúde do Estado da Bahia

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

TRALd – Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	EPIDEMIOLOGIA.....	15
1.2	BIOLOGIA E CICLO DE TRANSMISSÃO.....	18
1.2.1	<b>Agente etiológico</b> .....	18
1.2.2	<b>Vetor</b> .....	19
1.2.3	<b>Reservatórios</b> .....	22
1.2.4	<b>Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i></b> .....	26
1.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LVC.....	27
1.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	29
1.4.1	<b>Parasitológico</b> .....	29
1.4.2	<b>Imunológico</b> .....	30
1.3.3	<b>Molecular</b> .....	32
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
4.1	LOCAL DO ESTUDO.....	38
4.2	DESENHO DO ESTUDO.....	40
4.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	40
4.4	AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	40
4.5	COLETA DAS AMOSTRAS E EXAMES REALIZADOS.....	41
<b>4.6</b>	<b>DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INFECÇÃO POR LEISHMANIA..</b>	<b>44</b>
4.6.1	Parasitológicos.....	44
a)	<b>Exame direto</b> .....	44
b)	<b>Cultura da punção aspirativa de Baço</b> .....	45
c)	<b>Histológico convencional - Hematoxilina-Eosina</b> .....	45
d)	<b>Imunohistoquímica - Técnica da Estreptavidina-peroxidase</b> .....	45
4.6.2	Sorológico.....	46
a)	<b>Ensaio Imunoenzimático (ELISA)</b> .....	46
4.6.3	Molecular.....	47
a)	<b>PCR em <i>real time</i> (qPCR)</b> .....	47

Extração de DNA - Amostras Diversas.....	47
Extração de DNA - Amostra de Pele.....	49
Primers e Sondas.....	50
Amplificação.....	50
Determinação da Curva Padrão.....	51
Cálculo da concentração do DNA das amostras.....	52
<b>4.7 COLETA DE DADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>4.7.1 Variáveis de Predição.....</b>	<b>53</b>
<b>4.7.2 Variáveis Dependentes (ou Eventos de Interesse).....</b>	<b>53</b>
<b>4.8 ENTRADA E EDIÇÃO DE DADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>4.9 PLANO DE ANÁLISE DOS DADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>4.9.1 Estatística Descritiva e Analítica.....</b>	<b>54</b>
<b>4.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....</b>	<b>55</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>7 CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES.....</b>	<b>76</b>
<b>8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV), ou Calazar, é uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% mesmo quando se institui o tratamento adequado. Nas Américas, a LV é mais comumente causada pela *Leishmania chagasi*, constituindo-se numa importante causa de morbidade e mortalidade principalmente entre crianças no Nordeste brasileiro (BADARÓ, 1988; BEER et al., 1991; CALDAS et al., 2002). É transmitida através da picada da fêmea do vetor *Lutzomyia longipalpis* e embora estes vetores se alimentem em distintos animais, raposas e cães domésticos são considerados os reservatórios mais importantes do parasito (DEANE & DEANE, 1955; LAINSON et al., 1969; AZAB et al., 1984; LAINSON et al., 1990; ABRANCHES et al., 1991; DEREURE et al., 2003).

### 1.1. EPIDEMIOLOGIA

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo as espécies *Leishmania infantum* causa primária da doença no Mediterrâneo e a *Leishmania chagasi* na América Latina (LAINSON et al., 1987<sup>a</sup>; MAURICIO et al., 2000; GONTIJO & MELO, 2004; LUKES et al., 2007).

A LV apresenta ampla distribuição no Velho e no Novo Mundo, situando-se entre as sete endemias prioritárias de atenção da Organização Mundial da Saúde; afeta 500 mil pessoas por ano e, aproximadamente, 90% de todos os casos notificados no mundo provêm de Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (OMS, 2006).

Na América do Sul, principalmente em países como Brasil, Venezuela e Colômbia o êxodo rural e a urbanização crescentes têm contribuído para a expansão

desta enfermidade (PROFETA DA LUZ et al., 2001; CORREDOR et al., 1989; SILVA et al. 2001).

No Brasil, o primeiro surto da LV ocorreu em Sobral, no Ceará, vinte anos após o primeiro relato da doença (DEANE, 1956). Em meados dos anos 80, constatou-se uma transformação drástica na distribuição geográfica da LV. Inicialmente a doença mantinha um perfil rural, com transmissão peridomiciliar. Entretanto, degradações ambientais, migrações de populações carentes para a periferia dos grandes centros, fixando-se em locais sem infra-estrutura e em contato direto com animais, contribuíram para o processo de urbanização da doença (DESJEUX, 1996; TESH, 1995; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001). Estas condições proporcionaram o aumento das populações de insetos vetores e dos reservatórios do parasita (CORREDOR et al., 1989; LAINSON, 1989; ARIAS et al., 1996).

Devido à mudanças no perfil epidemiológico, a LV vem sendo apontada como uma doença emergente, atingindo com maior frequência, áreas urbanas e peri urbanas de várias capitais (GONTIJO& MELO, 2004). A transmissão autóctone de LV é registrada em 21 dos 27 estados brasileiros em aproximadamente 1.600 municípios. Até meados da década de 1990 cerca de 90% dos casos humanos ocorriam na região nordeste e até o ano de 2008 apenas a região sul do país não tinha registrado nenhum caso de LV humana. Contudo, em 2009, Sirena et al., reportaram casos autóctones nesta região. Ainda assim, a maior parte dos casos continuam ocorrendo na região sudoeste e nordeste brasileiro (FIGURA 1).



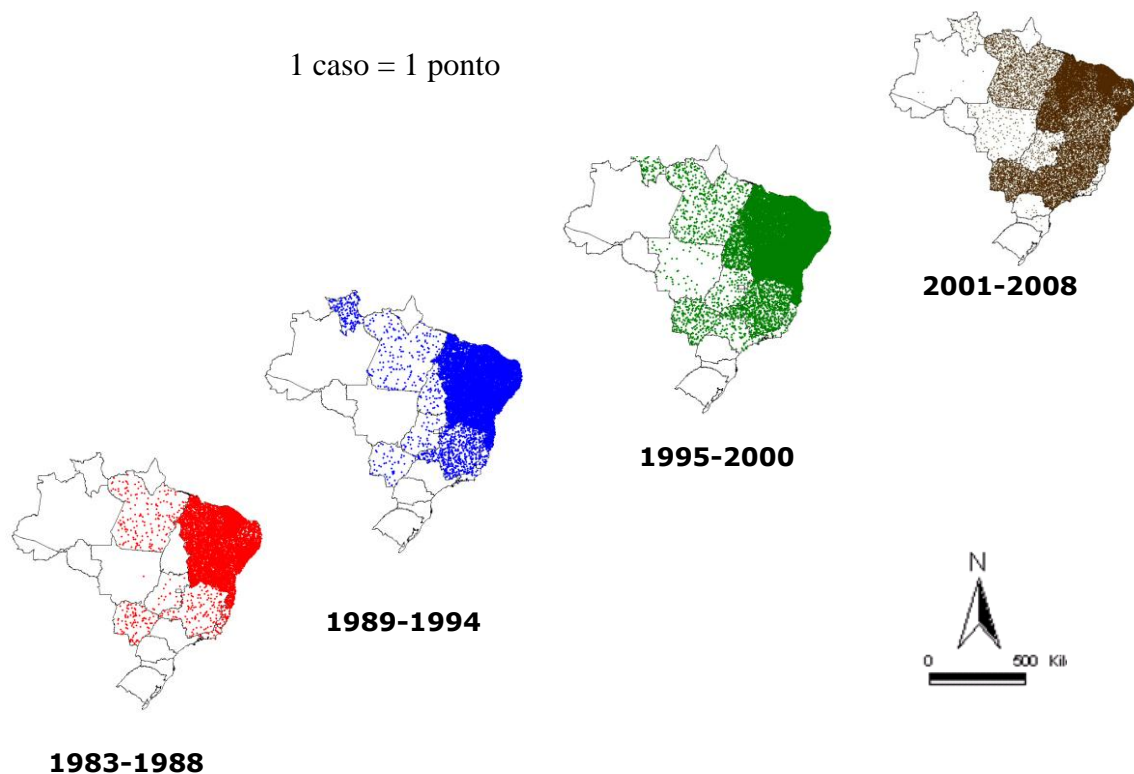


FIGURA 1. Casos de LV por município /residência, Brasil 1983-2008 (Fonte: Sinan-SVS/MS)

Este padrão de distribuição espacial tem apresentado uma crescente complexidade com acentuada frequência de casos humanos e/ou caninos de LV em áreas urbanas passando a contribuir de maneira significativa nas estatísticas desta antropozoonose no Brasil. Grandes capitais brasileiras têm sido acometidas como Aracaju-SE (TAVARES & TAVARES, 1999), Belém-PA (LAINSON et al., 1969), Belo Horizonte-MG (BEVILACQUA et al., 2001; MARGONARI et al., 2006), Boa Vista-RR (EVANGELISTA et al., 2009), Brasília-DF (CARRANZA-TAMAYO et al., 2010), Campo Grande-MS (OLIVEIRA et al., 2006; BOTELHO & NATAL, 2009), Cuiabá-MT (MESTRE & FONTES, 2007, ALMEIDA et al., 2009), Florianópolis-SC (SANTA CATARINA, 2010), Fortaleza-CE, (ALVES et al., 1998); Goiânia-GO (LINHARES et al., 2005), João Pessoa-PB (LIMA et al., 2004), Maceió-AL (PEDROSA & ROCHA, 2004), Natal-RN (JERONIMO et al., 2004), Recife-PE (DANTAS-TORRES et al., 2005), Rio de Janeiro-RJ (MARZOCHI et al., 1985); Salvador-BA (BARBOZA et al., 2009), São Luís-MA (NASCIMENTO et al., 1996; CALDAS et al., 2001; MENDES et al., 2002); São Paulo-SP, (IVERSON et al., 1983) e Teresina-PI (COSTA et al., 1999).

Populações nas áreas litorâneas têm sido constantemente acometidas pela doença, a exemplo de Camaçari na Bahia (CUNHA et al., 1995; JULIÃO et al., 2007), Ilha de Guaratiba no Rio de Janeiro (SILVA et al., 2005), e mais recentemente Salinas da Margarida também na Bahia, que desde 2002 tem notificado casos de leishmaniose visceral, incluindo alguns óbitos (SOUZA et al., 2006).

O aumento do número de casos de Leishmaniose Visceral Humana (LVH) nas áreas endêmicas, a re-emergência de casos em áreas onde a doença havia sido erradicada e a expansão da doença a áreas previamente indenes, como a periferia de grandes centros urbanos, revela a crescente importância desta zoonose como problema de saúde pública no Brasil.

## 1.2 BIOLOGIA E CICLO DE TRANSMISSÃO

### 1.2.1 Agente etiológico

A Leishmaniose Visceral é causada por um protozoário pertencente à Ordem *Kinetoplastidae*, Família *Trypanosomatidae* do gênero *Leishmania*. No complexo *Leishmania donovani*, são reconhecidas três espécies envolvidas na etiologia da doença: *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, no Velho Mundo, e *Leishmania chagasi* (LAINSON e SHAW, 1987) no Novo Mundo. Maurício et al. (2000) consideram que a *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum* sejam a mesma espécie, pela semelhança de características bioquímicas e moleculares.

### 1.2.2 Vetor

O principal vetor da *Leishmania chagasi* no Brasil é o *Lutzomyia longipalpis*, inseto da classe Díptera pertencente à família Psychodidae, popularmente conhecido como mosquito palha, asa branca, cangalhinha (MORRISON et al., 1993).

Existem diferentes espécies de vetores em diversas regiões geográficas (GUERIN et al., 2002). As espécies da América Latina são descritas como silvestres,

contudo, o *Lutzomyia longipalpis* adaptou-se ao habitat doméstico e peridoméstico onde as condições climáticas e a abundância de alimento, favorecem o aumento de sua densidade populacional (MORRISON et al., 1993; PALATNIK-DE-SOUZA et al. 2001). A ocorrência de outros possíveis vetores tem sido relatada em diversos estados do Brasil; *Lutzomyia migonei* e o *Lutzomyia complexa* em Pernambuco (CARVALHO et al., 2007), *Lutzomyia cruzi* em áreas do Mato Grosso do Sul e Corumbá (SANTOS et al.,2003; DESJEUX, 2004) e *Lutzomyia firmatoi* no Estado do Rio de Janeiro (SOUZA et al., 2003).

O ciclo biológico do *L. longipalpis* ocorre parcialmente no solo (REY, 2001). Após a cópula, as fêmeas depositam seus ovos, preferencialmente, em solo úmido e rico em matéria orgânica, onde permanecem de 07 a 10 dias até a eclosão. Os quatro estágios larvais se sucedem, perfazendo um período de 20 a 30 dias, transformando-se então em pupa, condição em que permanecem por cerca de duas semanas, originando o inseto adulto. A longevidade das fêmeas adultas é aproximadamente de 20 dias (BRASIL, 2006).

Os flebotomos tendem a se desenvolver em micro-ambientes terrestres ricos em matéria orgânica, como em torno de troncos e cavidades de árvores, gruta de pedra, tocas e currais de animais, além disso, estes locais apresentam características comuns de obscuridade ou semi-obscuridade, umidade elevada, temperatura baixa e ausência de correntes de ar (DEANE & DEANE, 1957; FERRO et al.,1997). Estudo realizado por Macedo et al.,(2008) relataram que os flebotomíneos apresentaram distribuição sazonal associada à índices pluviométricos e umidade, e que o aumento da densidade populacional aconteceu no período chuvoso.

A atividade dos flebotomíneos ocorre principalmente no período compreendido entre o crepúsculo e o anoitecer, quando há queda de temperatura e aumento da umidade com maior intensidade principalmente entre as 21h e 23h (SHERLOCK,1996). São capazes de se movimentarem por distâncias relativamente longas de 500 a 700 metros em curto período de tempo, porém, se não houver fatores que estimulem ou promovam o deslocamento para outros locais, a média de deslocamento é inferior a 100 metros (CHANIOTIS et al., 1974; ALEXANDER, 1987; DYE et al., 1991; MORRISON et al., 1993).

O aumento da densidade populacional do vetor nas áreas com LV, bem como o risco aumentado de transmissão do parasito parecem também estar associado à criação de cães, galinhas e cavalos no peridomicílio, bem como a presença de animais silvestres nestes ambientes (SHERLOCK et al., 1988; ARIAS et al., 1996; XIMENES et al., 1999; BUCHETON et al., 2002; SINGH et al., 2010). Em estudo realizado na Amazônia, os autores demonstraram que o flebotomo possui hábitos alimentares bastante variáveis, sem caracterizar uma preferência por um hospedeiro específico (QUINNELL et al., 1992).

Na Colômbia em 1993, Morrison et al. relataram que vacas e porcos foram os hospedeiros preferidos do *Lutzomyia longipalpis*. Já Missawa et al. (2008), no município de Várzea Grande, Estado de Mato Grosso realizaram estudo de preferência alimentar de *L. longipalpis* intra e peridomicilar e de 2.376 fêmeas capturadas, onde 104 estavam ingurgitadas e tiveram seu conteúdo alimentar triturado e centrifugado individualmente. O sobrenadante deste material foi testado com anticorpos contra antígenos de boi, cão, cavalo, porco, roedor, ave e ser humano, para identificação da fonte alimentar. Foi constatado que estes insetos alimentaram-se preferencialmente em aves (30,8%), roedores (21,2%) e humanos (13,5%), mas também foram encontradas fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas do sangue de gambás, bois, cavalos e cães, demonstrando o caráter antropofílico e oportunista deste inseto.

A transmissão clássica de LV ocorre pela picada de fêmeas de *L. longipalpis*. No momento do repasto sanguíneo, ao picarem um animal infectado, estes insetos sugam juntamente com o sangue formas amastigotas que após atingirem o tubo digestivo se transformam em promastigotas e se multiplicam intensamente. Em seguida, migram para as partes anteriores do tubo digestivo do flebotomíneo e durante o repasto sanguíneo do vetor em um novo hospedeiro, as promastigotas são inoculadas e assumem a forma amastigota ao serem fagocitadas pelos macrófagos (DESJEUX, 1992; ARIAS et al., 1996; ASHFORD, 2000; BRASIL, 2006).

Embora classicamente no Brasil a *L. chagasi* seja transmitida através da picada da fêmea de *L. longipalpis* e *L. cruzi*, em algumas áreas endêmicas não foram encontrados estes vetores, a exemplo do município de São Vicente Férrer, Zona da Mata em Pernambuco. Neste local, entre dezembro de 2002 e novembro de 2003, um total de 23.156 insetos do gênero *Lutzomyia* foram coletados em

diferentes áreas não sendo encontrada entre eles nenhuma espécie com conhecida capacidade vetorial (CARVALHO et al., 2007).

Além da transmissão clássica de LV, há relatos que a transmissão dos parasitos do gênero *Leishmania* pode ocorrer por outros meios que não o vetorial, como a transfusão de sangue; o transplante de órgãos; o uso comum de seringa contaminada, em especial nos usuários de drogas injetáveis; a mordedura; a transmissão venérea, a ingestão de pulgas e/ou carrapatos infectados e a transmissão transplacentária (COHEN et al., 1991; RAJASEKARIAH, 2001; PAREDES et al., 2003; MATHUR & SAMANTARAY, 2004; COUTINHO et al., 2005; FREITAS et al., 2006; CARDO, 2006; COUTINHO & LINARDI, 2007; SILVA et al., 2009<sup>a</sup>; SILVA et al., 2009<sup>b</sup>)

### 1.2.3 Reservatório

Os cães domésticos representam o principal reservatório da *L. chagasi* no ambiente urbano por possuir grande atratividade ao flebótomo, sendo considerados como uma importante fonte de infecção para os vetores (DEANE e DEANE, 1954<sup>a</sup>; DEANE, 1958).

Nas epidemias urbanas da LV, a presença de cães infectados tem sido constantemente relatada (CABRERA et al., 2003; SILVA et al., 2005). Estes estudos confirmam a grande importância do cão como reservatório da *L. chagasi* por serem altamente susceptíveis à infecção, apresentando intenso parasitismo cutâneo e por possuírem uma estreita relação com o homem, tanto em áreas rurais como urbanas (DANTAS-TORRES et al., 2006). Apresentam características de um bom reservatório, ou seja, são abundantes, são espécies que vivem em grupo, sobrevivem por longo tempo e possuem uma resposta eficiente à infecção (muitos não adoecem) (DEANE & DEANE, 1955; DEANE, 1958; SHERLOCK, 1996, ASHFORD ;1996; ASHFORD, 2003).

A taxa de cães infectados encontrada em regiões endêmicas para LVH foi em torno de 40%. A confirmação dos casos deu-se por pesquisa de anticorpos específicos ou por análise microscópica da presença do parasito em culturas (EVANS et al., 1992; VIEIRA; COELHO, 1998; DANTAS-TORRES, 2007).

No ambiente silvestre, os principais reservatórios são também canídeos, destacando-se as raposas *Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus* (SHAW, 1988), bem como Gambás (*Didelphis marsupialis*) e ratos (*Rattus rattus*) encontrados naturalmente infectados por *L. chagasi*, no Novo Mundo (CORREDOR et al., 1989;).

A ocorrência de raposas *Cerdocyon thous* naturalmente infectadas por *L. chagasi*, porém assintomáticas, no Estado do Pará, reforça a suposição desta espécie ser um reservatório primário do parasito, envolvido na manutenção do ciclo silvestre (SILVEIRA et al., 1982). Na região Amazônica, Lainson et al. (1990) encontraram infecções assintomáticas em espécimes de *C. thous*, e demonstraram seu potencial em infectar os vetores, sugerindo o envolvimento desta espécie, também, na manutenção do endemismo da doença em regiões desabitadas ou esparsamente habitadas pelo homem.

Assim como no Brasil, na Colômbia e na Venezuela também foram encontrados marsupiais principalmente sariguês (*Didelphis marsupialis*) naturalmente infectados pela *Leishmania infantum/chagasi* (SHERLOCK et al., 1984; SHERLOCK, 1996 ;CORREDOR et al., 1989; ZULUETA et al.,1999; TRAVI et al., 1994).

Cabrera et al. (2003) em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, encontrou uma prevalência de infecção por *Leishmania* em 29% dos sariguês capturados, porém, em nenhum deles foi observado sinal clínico da doença nem cultura ou esfregaço positivo. No entanto, formas amastigotas foram encontradas no baço, fígado e medula óssea de hamster, 90 dias após inoculação. Resultados similares foram referidos por um estudo realizado na Colômbia por Corredor et al. (1989), onde 32,4% dos *Didelphis marsupialis* capturados encontravam-se infectados, apresentando cultura e esfregaço densamente parasitados, após a inoculação em hamster.

Em relação aos outros possíveis reservatórios, como eqüinos, suínos, bovinos e caprinos, existem alguns relatos a respeito. Mukhtar et al., (2000) em estudo de soroprevalência para LV na região do Sudão, utilizando o teste de aglutinação direta, encontraram reação positiva de 68,7% dos equídeos (66/96), 21,4% (9/42) dos bovinos e 8,5%(5/59) dos caprinos analisados. Entretanto, ao empregar o teste ELISA em bovinos e caprinos, a soroprevalência foi de 47,6% (20/42) e 13,6% (8/59), respectivamente. Estudos realizados na área endêmica de Jequié e

Jacobina, por Cerqueira et al.,(2001),demonstraram que eqüídeos apresentaram alta prevalência de soropositividade aos testes ELISA, TRALd e PCR, indicando a presença de anticorpos específicos contra leishmania e a existência de infecção nestes animais. Moraes-Silva et al (2006) também na região de Jequié, Bahia, demonstraram alta soroprevalência dos suínos examinados. No entanto, não houve êxito no isolamento de leishmania.

Existem alguns registros de infecção natural em roedores domésticos e silvestres. Alencar et al, (1960), identificaram ratos naturalmente infectados, provavelmente com *Leishmania brasiliensis*, em uma zona endêmica para Leishmaniose Tegumentar no Ceará.

Gradoni et al. (1983) sugerem que o *Rattus rattus* (rato preto), apesar de serem animais bastante resistentes ao parasito, podem ser reservatórios da infecção. Na Itália, há uma forte suspeita de que o rato doméstico (*Rattus rattus*) é reservatório secundário da *Leishmania infantum* e importante reservatório no Oriente Médio.

Apesar de ter sido relatada a evidência de um gato doméstico parasitado na Argélia, outros investigadores não conseguiram infectar experimentalmente esse animal (SERGENT et al., 1912). Kirkpatrick et al. (1984), ao inocularem experimentalmente felinos com *Leishmania infantum/chagasi* e *Leishmania donovani*, não detectaram nenhum sinal clínico da doença ou presença do parasito nas vísceras dos animais após necropsia, contudo estes desenvolveram elevados títulos de anticorpos contra leishmania. Entretanto, a comprovação de transmissibilidade de *L. infantum* de gato para um vetor ocorreu em 2005, na Ilha de Lipari (Sicília, Itália) quando xenodiagnóstico com *Phlebotomus perniciosus* foi realizado neste animal naturalmente infectado pelo protozoário (MAROLI et al., 2007). No Brasil, o primeiro caso de infecção de *L. Longipalpis* por *L. Infantum*, de um gato naturalmente infectado foi publicado por Silva et al., em 2010. Neste trabalho, destacou-se a necessidade de mais estudos para determinar a taxa de ocorrência de LV entre gatos domésticos, a relação de infectividade de *L. longipalpis* em áreas endêmicas e qual o papel destes animais na epidemiologia da doença.

O homem parece não representar um reservatório significativo para a doença, exceto quando ocorrem surtos epidêmicos, sendo, portanto considerado um hospedeiro acidental (ASHFORD et al., 1996; SHERLOCK ,1996). Em estudos

realizados na Costa Rica, Amazônia e Maranhão, os seres humanos foram os mais escolhidos para a alimentação das fêmeas dos flebotomos, demonstrando o grau de antropofilia do *Lutzomyia longipalpis* (ZELEDON et al., 1984; QUINNELL et al., 1992; PASSOS DIAS et al., 2003).

Estudos realizados por DIETZE et al. (1997) e por DEREURE et al. (2003) apontaram para a participação do homem como reservatório, contribuindo inclusive para a transmissão da doença à população canina.

#### **1.2.4 Ciclo Biológico de *Leishmania***

O ciclo biológico da *Leishmania chagasi* é do tipo heteroxênico envolvendo como transmissor as fêmeas da espécie *Lutzomyia longipalpis*. O parasito possui duas formas distintas: amastigota e promastigota e o ciclo se inicia quando o inseto vetor durante o repasto sanguíneo em hospedeiro infectado, realiza a ingestão de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), macrófagos e leucócitos, parasitados pelas formas amastigotas. Estas se diferenciam em formas promastigotas no tubo digestivo do inseto vetor. Durante o período de quatro a vinte e cinco dias, o parasito continua o seu desenvolvimento no intestino do vetor, onde se diferencia em promastigota- metacíclica forma infectante para os mamíferos. (PESSOA, 1972).

Ao exercer novo repasto sanguíneo sobre um hospedeiro vertebrado, o vetor libera as formas promastigotas presentes na glândula salivar, as quais serão fagocitadas por células do SFM, macrófagos teciduais e granulócitos neutrófilos. No interior dos macrófagos, o parasito sofre a transformação para a forma amastigota, intracelular obrigatória, capaz de desenvolver-se e multiplicar-se por divisão binária como ilustrado na figura 2 (FERRER et al.1999<sup>a</sup>; NEVES et al.1997; REY, 2001).

A multiplicação, por divisão binária simples, é iniciada pela duplicação do cinetoplasto no interior do vacúolo fagocitário dos macrófagos. Após sucessivas multiplicações, na ausência do controle parasitário pela célula hospedeira, esta se rompe e as amastigotas liberadas serão fagocitadas por outros macrófagos (NEVES et al. 1997; REY, 2001). A partir daí, ocorre a visceralização das amastigotas, principalmente nos órgãos linfóides, tais como medula óssea, baço, fígado e



linfonodos, embora macrófagos infectados ocasionais possam ser encontrados em todos os tecidos, incluindo sangue, pele, pulmões, rins, testículos, meninges e outros (NEVES et al., 1997; FERRER et al., 1999<sup>b</sup>; REY, 2001).

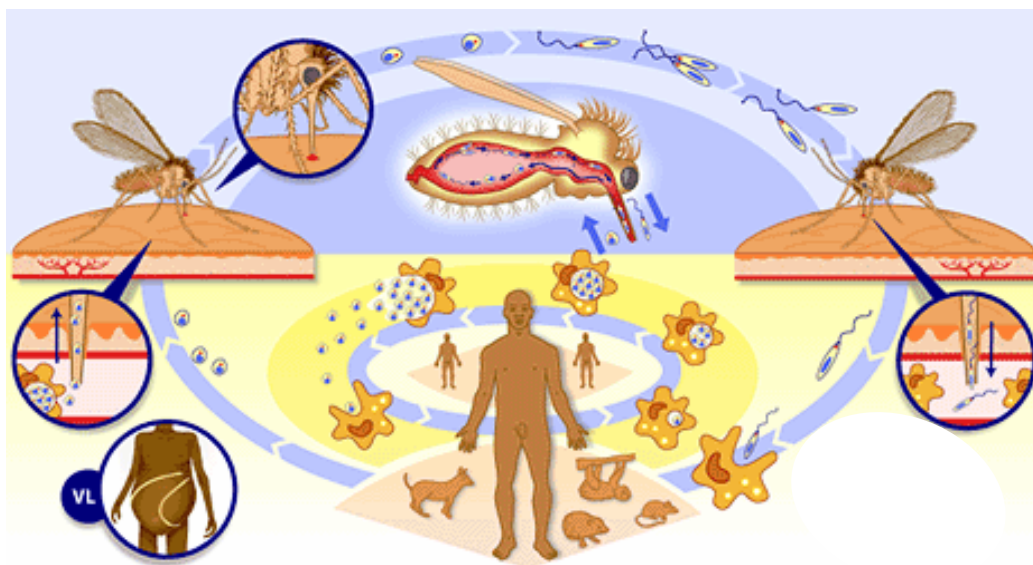


FIGURA 2: Ciclo biológico de *Leishmania*. Fonte: www.who.int.

### 1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LVC

Dentre as formas clínicas das leishmanioses, a LV é a forma mais grave da doença, pois, quando não tratada adequadamente, apresenta elevada letalidade. Acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas, 80% dos casos reportados, ocorrem em crianças menores de 10 anos (SILVA et al., 1997; CALDAS et al., 2001; BRASIL, 2006; GONTIJO & MELO, 2004).

Nos cães, os principais reservatórios domésticos da LV, a doença é sistêmica crônica e pode levar o animal à morte. As características clínicas variam muito, devido a numerosos mecanismos patogênicos envolvidos na evolução da doença, e da diversidade da resposta imune desenvolvida pelos diferentes indivíduos (MANCIANTI et al., 1988). Os sinais clínicos mais comumente encontrados são: lesão de pele, perda de peso ou apetite reduzido, linfadenopatia generalizada, esplenomegalia, onicogribose, lesão ocular, alopecia periorbital, claudicação, palidez de mucosa, úlceras de pele; emaciação, falência renal e diarreia (ABRANCHES et al., 1991; CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999<sup>a</sup>; SILVA et al., 2001; AGUIAR et al., 2007).

A presença dos 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 (GAETA et al. 1994). Dessa maneira, o quadro clínico no cão infectado pode variar desde animais aparentemente saudáveis (assintomáticos) até estágios severos da doença (oligossintomáticos á sintomáticos) (MANCIANTI et al., 1988). Entretanto, já foi demonstrado que cães infectados, mesmo assintomáticos, são fontes de infecção para os flebotomíneos e, conseqüentemente, têm papel ativo na transmissão de *Leishmania* (PALATNIK et.al.2001).

Estudos realizados por Manna et al, (2009) determinaram em amostras de aspirados de linfonodos de cães classificados como sintomáticos, uma grande quantidade de DNA de *Leishmania*, determinados pela técnica de PCR *real time* (qPCR), indicando uma possível correlação entre carga parasitária de *leishmania* e a presença das manifestações clínicas da LV .

Os sinais clínicos característicos da LV, também podem surgir em inúmeras outras doenças infecciosas, dificultando o diagnóstico clínico de Leishmaniose Visceral em cães, tornando as técnicas laboratoriais indispensáveis para a obtenção de um diagnóstico preciso. (BRASIL, 2006)

## 1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da LV pode ser efetuado através de técnicas parasitológicas que realiza a demonstração do parasito, técnicas imunológicas que objetivam a identificação de anticorpos específicos contra o parasito e testes que empregam recursos de biologia molecular, amplificando fragmentos específicos do DNA do parasito (FERRER, 1999).

### 1.4.1 Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico parasitológico é realizado pela demonstração e isolamento do parasito. A detecção de formas amastigotas do parasito pode ser feita pelo material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. Este material é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas,

histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório (GLEISER, 1957; ABRANCHES et al., 1982). Estes métodos mostram 100% de especificidade, mas sua sensibilidade poder ser alterada porque os parasitas não são distribuídos de forma homogênea nos tecidos (DEANE & DEANE, 1954; TRAVI et al., 1998; MOREIRA et al., 2002).

O xenodiagnóstico com *L. longipalpis* constitui-se em uma técnica pouco invasiva, possibilitando o isolamento de formas promastigotas do parasito, após o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado. Apesar de apresentar alta especificidade, é excessivamente trabalhosa e pouca prática para examinar grande número de indivíduos (SHERLOCK, 1996; TRAVI et al., 2001; RUIZ-PIÑA & CRUZ-REYES, 2002; MICHALSKY et al., 2007).

#### **1.4.2 Diagnóstico Imunológico**

No diagnóstico sorológico da LV são empregadas várias técnicas comumente citadas na literatura, a RIFI, hemaglutinação passiva, ensaio imunoenzimático (ELISA), *immunoblotting*, fixação de complemento, aglutinação direta, dipstick, teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH<sup>®</sup> (DiaMed IT-LEISH<sup>®</sup>) e Teste Rápido com Anticorpo *Leishmania donovani* – TRALd (RASSAM & AL-MUDHAFFAR, 1980; YAMAMOTO et al., 1988; RACHAMIM et al., 1991; SCOTT et al., 1991; ARIAS et al., 1996; REITHINGER & DAVIES, 2002; ASSIS et al., 2008).

Os métodos mais usados no Brasil são a imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) (RYAN et al., 2002; BRASIL, 2006; TÁVORA et al., 2007). A RIFI é o teste mais utilizado para realização de inquéritos sorológicos, podendo, no entanto, apresentar reações cruzadas com outras enfermidades, como a leishmaniose tegumentar americana e a doença de Chagas (BRASIL 2006; SAVANI et al., 2003). Já a técnica de ELISA, devido a sua alta sensibilidade e especificidade, tem sido empregada com mais frequência nas pesquisas epidemiológicas (REITHINGER & DAVIES, 2002). Quanto à eficácia destes testes, a RIFI possui maior grau de especificidade e a ELISA apresenta maior sensibilidade (TÁVORA et al., 2007).

Estudos comparativos feitos por Mikaeili et al. (2007) entre a RIFI e o ELISA demonstraram que a sensibilidade diagnóstica para leishmaniose foi 80,3% para

RIFI e de 83,6% para ELISA e a especificidade foi de 90,5% para ambos os testes. Embora a RIFI seja o teste recomendado para inquéritos caninos, nas atividades de controle, quando realizado em eluato de sangue em papel filtro, apresenta uma sensibilidade muito baixa, quando comparada com ELISA realizada com amostras de soro sanguíneo (ASHFORD et al., 1993). Evans et al. (1990) encontrou 4,6 vezes mais cães infectados utilizando ELISA com amostras de soro do que com RIFI utilizando eluato de sangue em papel de filtro.

O teste de aglutinação direta (DAT) foi descrito pela primeira vez em 1975 e adaptado para o diagnóstico da infecção humana e canina no final da década de 80. Em trabalhos comparativos entre ELISA, RIFI e DAT, este último demonstrou ser igualmente sensível e específico como ELISA, contudo, pode apresentar problemas na padronização e controle da qualidade do antígeno (EVANS et al., 1990).

Um teste imunocromatográfico simples e rápido, baseado na reação do soro ou sangue do paciente, foi desenvolvido utilizando-se o rK39 fixado em papel (Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani* – TRALd). O teste mostrou 100% de sensibilidade quando aplicado na Índia e 67% no Sudão (SUNDAR, PAI et al., 2002; ZIJLSTRA et al., 2001). No Brasil, quando aplicado em cães de área endêmica, a sensibilidade foi de 92% e a especificidade de 99,5% (GENARO et al., 1997). Entretanto, o mesmo não foi capaz de detectar infecção nos animais com títulos de RIFI baixos (1:40 até 1:320). Recentemente, o teste foi modificado sendo acrescido do antígeno recombinante rK26 do complexo *Leishmania donovani*, que também reconhece anticorpos específicos para espécie deste complexo. Na avaliação do novo TRALd foi observado que indivíduos assintomáticos negativos ao rK39 mostraram-se positivos com o rK26, concluindo-se que o novo TRALd amplia a sensibilidade do teste (NAKATANI et al., 2001).

### **1.4.3 Diagnóstico Molecular**

Técnicas de diagnóstico molecular utilizando o DNA têm sido exaustivamente exploradas visando superar as inúmeras limitações que os métodos diagnósticos de rotina apresentam (MANNA et al, 2004; MANNA et al, 2006; MOREIRA et al., 2007)

Nas últimas décadas, o uso da reação de polimerização em cadeia (PCR) para a demonstração do DNA da *Leishmania* tem sido mostrado como um método

sensível e específico. Uma variedade de tecidos do reservatório canino tem sido utilizada no diagnóstico molecular da leishmaniose visceral tais como sangue, medula óssea, baço, linfonodos, pele, *swab* conjuntival e urina (REALE et al.,1999 ; AYALI et al.,2004; ROLÃO et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; QUARESMA et al.,2009).

Recentemente uma técnica molecular com elevada sensibilidade tem sido aplicada para o monitoramento contínuo dos produtos amplificados denominada de PCR *real time* (qPCR) Esta técnica minimiza os riscos de contaminação do material a ser amplificado, presentes na técnica de PCR convencional, por não apresentar os vários passos de manipulação pós amplificação. Além de permitir de forma simultânea a detecção e quantificação do número de parasitos em diferentes amostras biológicas (NICOLAS et al,2002; VITALE et al,2004).

PCR *real time* (qPCR) é um método molecular quantitativo, que permite a detecção e quantificação em “tempo real” da fluorescência emitida proporcionalmente a síntese dos produtos do PCR, podendo utilizar sondas fluorogênicas que se ligam de forma específica aos produtos de PCR amplificados (HIGUCHI et al., 1993; GINZIGER ,2002, MARY et al,2004, MANNA et al., 2006).

Para a detecção dos sinais de fluorescência dos produtos amplificados é necessário a marcação dos “*amplicons*” com corante fluorescente. Esta marcação pode ser feita utilizando uma sonda que se liga à seqüência alvo (sistema *Taq-Man*®). Neste sistema, à medida que ocorre a amplificação, a enzima *Taq* DNA polimerase por meio da sua atividade exonucleásica desloca a extremidade 5' da sonda *TaqMan*® (contendo o fluorocromo e *repórter*) e realiza a sua clivagem liberando o fluorocromo, gerando fluorescência, que é proporcional à síntese de DNA (MORTARINO et al., 2004; YANG & ROTHMAN,2004).

A análise da emissão da fluorescência é feita por um detector e amplificador de sinal luminoso que traçam um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da qPCR, refletindo a quantidade do produto formado (KUBISTA et al., 2006). O ciclo em que o sinal da amplificação exponencial atinge um intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção é denominado de *Ciclo Threshold* ou *Ct*, e esta diretamente relacionado à quantidade de DNA amplificado (MORTARINO et al., 2004) Este sistema esta acoplado a um termociclador, que permite o monitoramento contínuo do acúmulo de produto amplificado gerado.

Muitos autores têm demonstrado que a reação de PCR *real time* (qPCR) simultaneamente detecta, mensura e diferencia as espécies de *Leishmania* (VITALE et al., 2004; SCHULZ et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2009; QUARESMA et al., 2009). Esta técnica oferece muitas vantagens no diagnóstico e acompanhamento da leishmaniose canina, especialmente, em áreas endêmicas, onde uma grande parte da população canina é exposta, mas somente uma pequena parte destes cães desenvolvem a forma clínica da doença (FRANCINO et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2001)

MANNA et al. (2008) utilizaram a reação de PCR *real time* (qPCR) para monitorar o DNA da *leishmania* em diferentes amostras biológicas de 18 cães naturalmente infectados, antes e após tratamento. Os resultados revelaram que antes do tratamento 83,0% dos cães, apresentaram uma alta parasitemia (DNA de *Leishmania*) variando de 1000 a 10.000 parasitas/ $\mu$ l em aspirados de linfonodos, seguido por em 61,0% em amostras biópsias de pele. Na amostra de sangue periférico 94,45% dos cães revelaram uma baixa carga parasitária variando entre 1 a 1000 parasitas/ $\mu$ l.

Apesar do grande número de estudos realizados para investigar novas técnicas de diagnóstico molecular nos reservatórios de LV, ainda existem lacunas e dúvidas a serem respondidas. O número crescente de casos de leishmaniose visceral e a ocorrência desta doença em áreas não endêmicas no Brasil apontam para a necessidade urgente de estratégias mais eficazes de controle desta endemia.

## 2 OBJETIVOS

### ***Objetivo geral***

Avaliar a carga parasitária em diferentes amostras biológicas de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.*, através de método de biologia molecular quantitativo.

### ***Objetivos específicos***

1. Determinar a carga parasitária em amostras de: sangue periférico, fragmentos de biópsias de pele, punção aspirativa de medula óssea e linfonodo, e *swab* da conjuntiva, de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.*, através da técnica de PCR *real-Time*;

2. Caracterizar a distribuição da carga parasitária nestas amostras, identificando os potenciais fatores associados à quantidade de *Leishmania sp.*;

3. Comparar a distribuição da carga parasitária nas diferentes amostras dos cães naturalmente infectados, de acordo com os exames convencionais para o diagnóstico da infecção por *Leishmania*.

### 3 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços no conhecimento da epidemiologia da Leishmaniose Visceral, ainda existem lacunas importantes nas informações sobre os principais reservatórios desta zoonose. Existem evidências em diversos estudos sobre a importância dos cães como reservatório da LVH (ABRANCHES et al., 1982, AZAB et al., 1984; ABRANCHES et al., 1991; ASHFORD et al., 1998; DEREURE et al., 2003). Entretanto, ensaios controlados avaliando a eliminação de cães soropositivos não têm demonstrado impacto significativo desta medida sobre as taxas de incidência da LV (DIETZE *et al.*, 1997; ASHFORD *et al.*, 1998; ALENCAR *et al.*, 1999; PALATINIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001). Entre as possíveis explicações para o insucesso destas intervenções citamos: as limitações na sensibilidade e especificidade dos testes de triagem utilizados, bem como a falta de padronização de testes diagnósticos que determinem a carga parasitária, e conseqüentemente possibilitem revelar o potencial de infectividade destes reservatórios animais (GONTIJO & MELO, 2004).

As técnicas convencionais de avaliação da infectividade de reservatórios através de xenodiagnóstico implicam na manutenção de colônias de flebotomíneos e dependem da capacidade técnica de dissecar as glândulas salivares destes vetores para interpretação final do resultado, sendo, portanto, extremamente trabalhosas e difíceis de aplicar na triagem de grande número de animais.

A padronização de método capaz de quantificar a carga parasitária presente em diferentes tecidos pode oferecer respostas importantes sobre a epidemiologia e a prevenção da LVH, oferecendo subsídios para a revisão dos atuais programas de controle da LV. O uso de método de biologia molecular quantitativo (PCR *real-time*) é sensível e pode ser aplicado em grande número de amostras. Portanto, esta ferramenta representa uma alternativa viável para responder estas questões de grande relevância científica.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado nos municípios de Salinas da Margarida e de Irecê na Bahia. Salinas da Margarida está situada na região do Recôncavo Sul da Bahia e pertencente à microrregião de Santo Antônio de Jesus. Esta cidade, a  $12^{\circ}55'S$  de latitude e  $38^{\circ}45'W$  de longitude, possui uma população de 13.465 habitantes segundo o último censo populacional (IBGE, 2011). A área do município é de  $150 \text{ Km}^2$ , com distância até a capital de 229 Km por percurso rodoviário ou 56 Km por percurso marítimo (FIGURA 3). O município está localizado em região litorânea. Possui clima úmido e salubre, com temperatura média anual de  $25,4^{\circ}\text{C}$  e vegetação típica de manguezal.

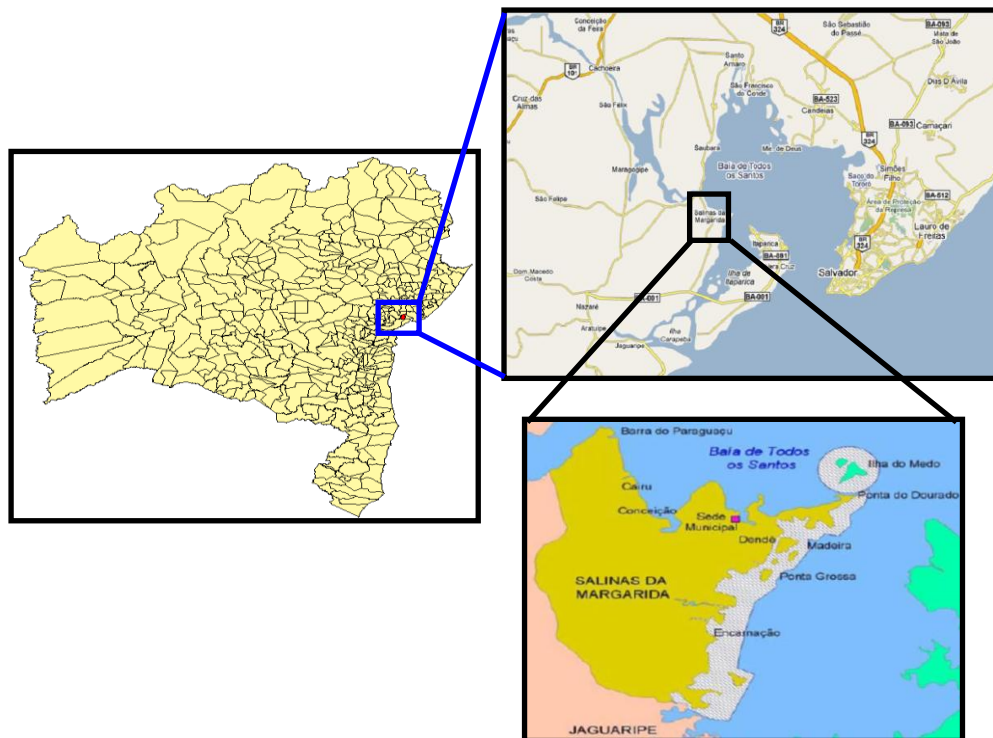


FIGURA 3. Localização do município de Salinas da Margarida-Bahia  
Fonte: adaptado do Google Maps e [www.terramar.org.br](http://www.terramar.org.br).

Já o município de Irecê está situado na região da Chapada Diamantina pertencente à bacia do São Francisco, a 11°18'S de latitude e 41°52'W de longitude. A área do município é de 319 Km<sup>2</sup>, com distância até a capital de 478 Km por percurso rodoviário, com uma população de 66.404 habitantes segundo o último censo populacional (IBGE, 2011). Possui clima semi-árido, com temperatura média anual de 22°C e vegetação típica de caatinga (FIGURA 4).

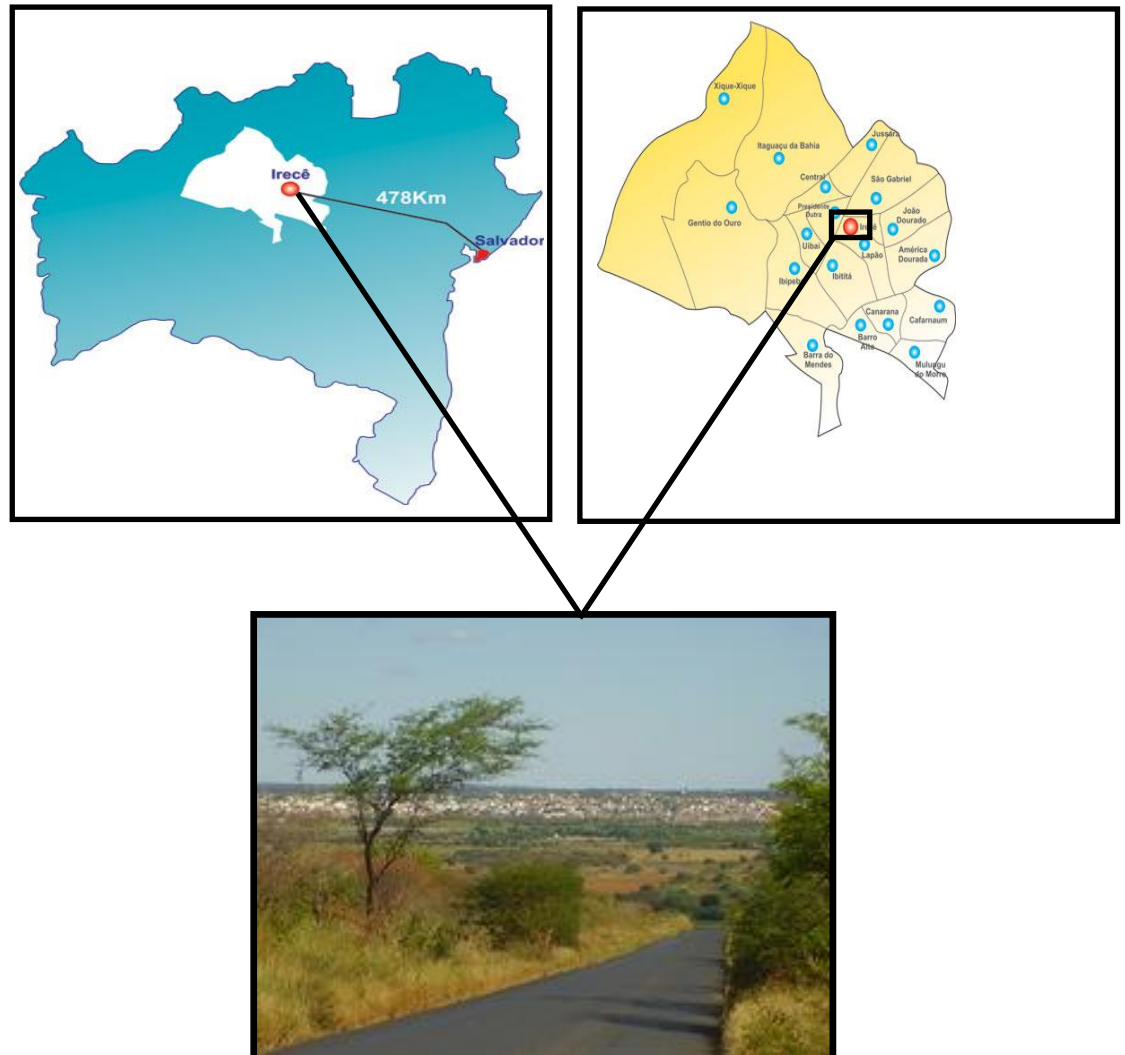


FIGURA 4. Localização do município de Irecê – Bahia  
Fonte: adaptado do Google Maps e [www.irece.ba.gov.br](http://www.irece.ba.gov.br).

## 4.2 DESENHO DO ESTUDO

Foram realizados estudos de corte transversal sucessivos nas áreas endêmicas dos municípios de Salinas da Margarida e em Irecê, em virtude do aparecimento de casos de Leishmaniose Visceral Humana na região, para identificar cães infectados por *Leishmania sp.* Todos os domicílios foram visitados para garantir a inclusão do universo de cães residindo na área de estudo.

## 4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Os cães que participaram do estudo foram previamente triados através de inquéritos soro-epidemiológicos realizados nos anos de 2004, 2005 e 2007. Foram selecionados aqueles com sorologia positiva para *Leishmania* pela técnica de ELISA.

## 4.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os cães foram classificados clinicamente em assintomáticos (ausência de sintomas) e sintomáticos (presença de sintomas) de acordo com sinais clínicos compatíveis com leishmaniose visceral, tais como: onicogribose, alopecia, caquexia, úlceras muco cutâneas, esplenomegalia, linfadenopatia, hepatomegalia e alterações oculares.

Os dados referentes às características clínicas do animal bem como outras informações sobre, local de residência, idade, sexo e raça, foram registrados em questionários.

#### 4.5 COLETA DAS AMOSTRAS E EXAMES REALIZADOS

Todos os cães com sorologia positiva para *Leishmania* foram encaminhados, para a coleta das amostras.

A confirmação da infecção natural por *L.chagasi* foi realizada pela repetição do teste sorológico, através da técnica de ELISA e por testes parasitológicos (exame direto, cultura e histologia /Imunohistoquímica).

Os cães foram anestesiados e de cada animal foi colhido sangue total para realização do exame sorológico e para o teste de PCR *real-time*. As amostras de sangue total foram coletadas por via endovenosa, especificamente na veia radial. As amostras de soro foram estocadas em freezer a -20°C até realização da sorologia. Em seguida foram realizadas biópsias de pele de orelha e/a focinho (exames histológicos e PCR *real-time*), punção aspirativa de baço (cultura), aspirado de medula óssea (cultura e PCR *real-time*) e linfonodos poplíteos (exame direto e PCR *real-time*) e coleta de *swab* da conjuntiva (PCR *real-time*). A distribuição da coleta das amostras nos inquéritos e os exames realizados estão representados na FIGURA 5.

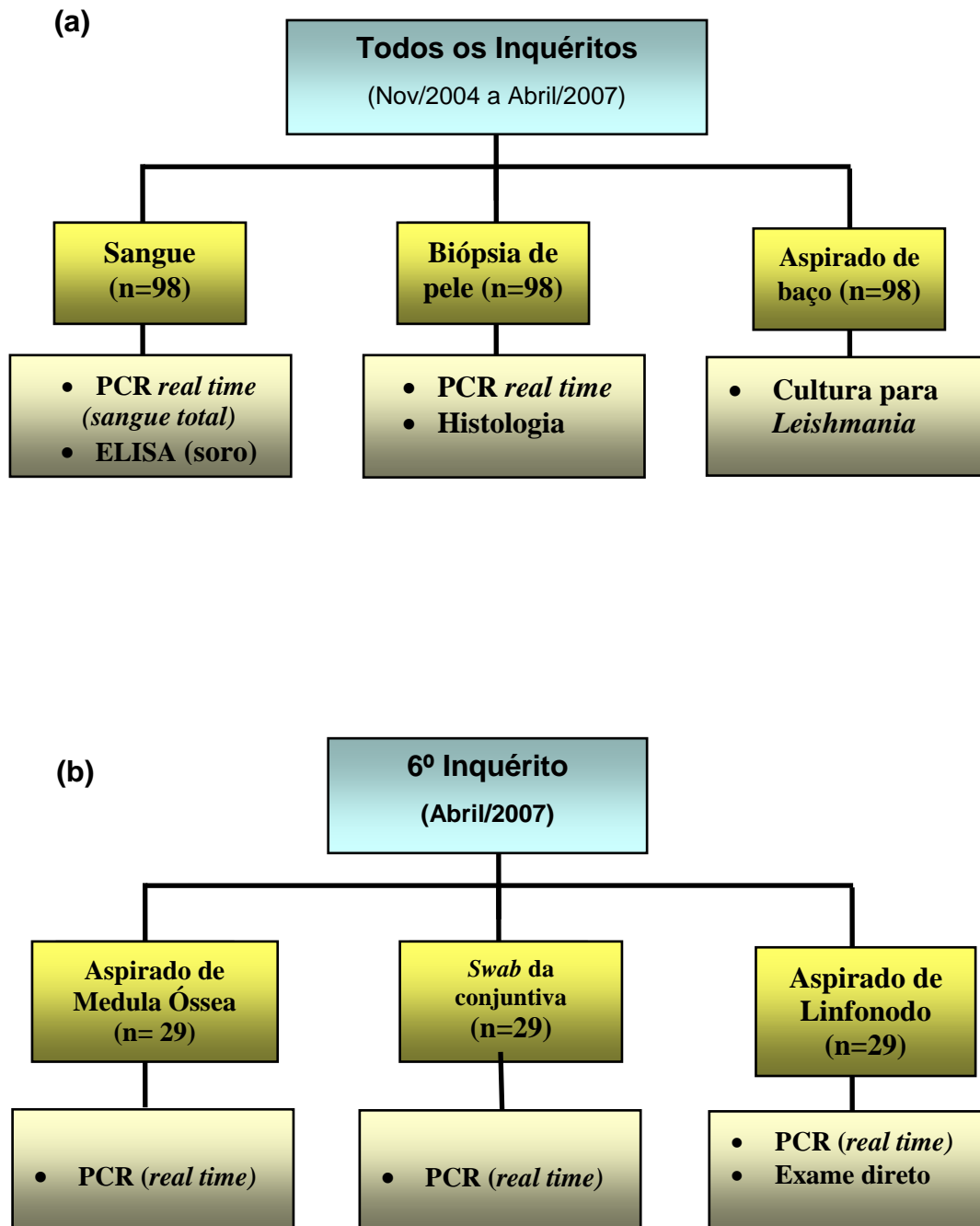


FIGURA 5. Coleta das amostras e exames realizados nos cães soropositivos de todos os Inquéritos (n=98) (a) e do 6º Inquérito (n=29) (b).

Após a coleta das amostras, os cães foram eutanasiados como recomenda o Ministério da saúde levando-se em consideração a Resolução nº 714/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. A eutanásia foi realizada de forma indolor, por métodos químicos, utilizando-se anestésicos dissociativos, e em seguida, aplicou-se cloreto de potássio intracardíaco ou intravenoso, resultando em parada cardio-respiratória e óbito imediato. Os restos mortais foram descartados em local apropriado.

Todos estes procedimentos foram realizados por médicos veterinários autorizados e capacitados, assistidos por pessoal previamente treinado para esta tarefa (FIGURA 6 e 7).



FIGURA 6. Coleta das amostras biológicas dos cães, Salinas da Margarida, Bahia, 2004 - 2007. Fonte: Arquivo pessoal.



FIGURA 7. Coleta do *swab* da conjuntiva dos cães, Salinas da Margarida, Bahia, 2007. Fonte: Arquivo pessoal

#### 4.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INFECÇÃO POR LEISHMANIA

##### 4.6.1 Parasitológico

###### a) Exame Direto

Foram confeccionadas lâminas à partir de aspirado de linfonodo. Estas lâminas foram fixadas com metanol e coradas por Giemsa, para a identificação de formas amastigotas de *Leishmania*. As leituras foram realizadas, e o resultado considerado positivo, naquelas em que se encontrou a presença de formas amastigotas. As lâminas que não apresentaram amastigotas em nenhum dos campos foram consideradas negativas.

### *b) Cultura da punção de Baço*

As amostras obtidas por punção de baço foram semeadas em duplicata em meio de cultura bifásico NNN (Novy, McNeal e Nicolle) enriquecido com meio LIT (Liver Infusion Tryptose) e mantidos a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  em estufa biológica (FANEM, Brasil). O exame das culturas foi realizado semanalmente e quando foi observada a presença de formas promastigotas de *Leishmania*, as culturas eram consideradas positivas. Se após quatro semanas não fosse observada a presença de promastigotas, o resultado era considerado negativo.

### *c) Histologia convencional (Hematoxilina /Eosina)*

Amostras de fragmentos de pele foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% e pH 7,4 e posteriormente submetidos às preparações rotineiras para análise histológica com coloração pela hematoxilina-eosina (HE). Os cortes foram hidratados e submetidos aos corantes hematoxilina-eosina e em seguida montados em bálsamo e as lâminas examinadas em microscópio de luz. As amostras foram consideradas positivas quando, ao exame microscópio, se observaram macrófagos com formas amastigotas de *Leishmania*.

### *d) Imunohistoquímica - Técnica da estreptavidina-peroxidase*

Fragmentos de biópsia de pele foram submetidos à técnica de Imunohistoquímica, para a visualização e contagem das formas amastigotas.

Resumidamente, as lâminas com corte dos fragmentos de pele em parafina foram desparafinadas e hidratadas por passagens sucessivas em xilol e álcool, respectivamente de acordo com a técnica histológica padrão. O anticorpo primário foi o  $\alpha$ -LSH policlonal de coelho na diluição de 1:1000 em diluente (BSA -soro albumina). O anticorpo secundário foi anti-IgG de coelho. O complexo enzimático foi uma solução de estreptoavidina - peroxidase e o substrato foi o cromógeno Diaminobenzina (DAB). Os tecidos foram finalmente contra - corados com



hematoxilina de Harris e montados entre lâmina e lamínula. As formas amastigotas presentes nos tecidos coraram-se especificamente na cor vermelho tijolo. Para cada bateria de 20 lâminas, utilizou-se controle negativo e positivo. Após a avaliação microscópica, os resultados foram apresentados como negativo e positivo, sendo o número de amastigotas encontradas em cada lâmina anotado em fichas individuais.

#### **4.6.2 Sorológico**

##### *a)Ensaio imunoenzimático (ELISA)*

Para determinar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* utilizou-se o teste de ELISA conforme descrito por Paranhos-Silva et al. (1996). Resumidamente, as placas foram sensibilizadas com extrato solúvel de promastigotas de *Leishmania infantum /chagasi* ((MHOM/ BR 2000/ Cepa Merivaldo 2) e os soros dos cães diluídos a 1:400. Foi utilizado imunoglobulina anti IgG de cão conjugada a peroxidase a uma diluição de 1:5000 (Sigma Cia. Chemical, St., Louis Mo.). Foram incluídos soros de controle positivo (confirmados através de cultura) e negativo (cães provenientes de áreas isentas de LV e clinicamente saudáveis). O Ponto de corte (“cut off”) foi determinado a partir da média dos resultados obtidos com o soro de 25 cães saudáveis, de área não endêmica. Foram considerados positivos os cães com valores maiores que a média, mais três desvios padrões do ponto de corte (“cut off”) estabelecido. Todos os soros foram testados em duplicata e os resultados positivos re-testados pelo menos uma vez.

Após a realização dos exames sorológicos e parasitológicos convencionais para o diagnóstico da LV classificamos os cães de acordo com os resultados encontrados em:

- ✓ Grupo de avaliação parasitológica positiva (APP) - cães que apresentaram pelo menos um dos exames parasitológicos positivo;
- ✓ Grupo de avaliação sorológica positiva (apenas) - cães que apresentaram exame sorológico positivo e exames parasitológicos negativo;
- ✓ Grupo com avaliação negativa - cães que apresentaram exames parasitológicos e sorológico negativos.

#### 4.6.3 Método *Molecular*:

a) *PCR real-time (qPCR)*

##### **Extração de DNA - Amostras Diversas**

Para extração de DNA das amostras de sangue, aspirado de linfonodo e medula óssea, *swab* da conjuntiva bem como da cepa de *Leishmania chagasi* (MHOM/ BR 2000/ Cepa Merivaldo 2), foi utilizado o Kit de extração “*Qlamp Blood&Tissue*”(Quiagen, CA, EUA) segundo as recomendações do fabricante.

De cada amostra, em tubo de microcentrífuga foram homogeneizados 200µl da amostra em 200 µl de reagente *AL*. Ao homogeneizado foi adicionado 20 µl de proteinase-K para a completa lise da amostra, que foi incubado á 56°C por 10 min. Em seguida foram adicionados 200 µl de Etanol a 100% e vigorosamente homogeneizados para posterior centrifugação á 8000 rpm por 1 min. Após a centrifugação a coluna era transferida para um novo tubo (2 ml) e o filtrado, descartado. Com essas etapas, todo o DNA do tecido ficava retido na coluna.

Para proceder às etapas de lavagem do DNA, por duas vezes eram adicionados na coluna 500 µl do tampão de lavagem *AW1 (Wash Buffer)* e posterior centrifugação à 8.000 rpm por 1 min. Após a centrifugação, a coluna era transferida para um novo tubo e o filtrado, descartado. Na segunda etapa de lavagem, foi adicionado 500 µl do tampão de lavagem *AW2 (Wash Buffer)* e centrifugado por 3 min a 14.000 rpm. Após as etapas de lavagens, para a completa eluição do DNA da coluna, foi adicionado 200µl de tampão *AE* com incubação por 1min á temperatura ambiente e posterior centrifugação à 8.000 rpm por 1 min. As amostras de DNA eram estocadas a -20°C. A concentração, a pureza e a integridade do DNA extraído foi avaliado utilizando espectrofotômetro através da absorvância de 260 e 280nm, bem como a amplificação de iniciadores do gene constitutivo de cães, desidrogenase gliceraldeido 3 fosfato (GAPDH).

### **Extração de DNA – Amostra de Pele**

As amostras de pele, aproximadamente 25 mg de tecido (fragmentos) foram colocadas em de tubo de microcentrífuga onde foram adicionados 180 µl de tampão *ATL (Tissue Lysis Buffer)* e 20 µl de proteinase-K para a lise completa do tecido, sendo incubado á 56°C por 12h horas Após a incubação, e homogeneizados por 15s foram adicionados á solução 200 µl de reagente *AL*.Em seguida foram adicionados 200 µl de Etanol a 100% e vigorosamente homogeneizados para posterior centrifugação á 8000 rpm por 1 min. Após a centrifugação a coluna era transferida para um novo tubo (2 ml) e o filtrado, descartado. Com essas etapas, todo o DNA do tecido ficava retido na coluna.

Para proceder às etapas de lavagem do DNA, por duas vezes eram adicionados na coluna 500 µl do tampão de lavagem *AW1 (Wash Buffer)* e posterior centrifugação à 8.000 rpm por 1 min. Após a centrifugação, a coluna era transferida para um novo tubo e o filtrado, descartado. Na segunda etapa de lavagem, foi adicionado 500 µl do tampão de lavagem *AW2 (Wash Buffer)* e centrifugado por 3 min a 14.000rpm. Após as etapas de lavagens, para a completa eluição do DNA da coluna, foi adicionado 200µl de tampão *AE* com incubação por 1mim á temperatura ambiente e posterior centrifugação à 8.000 rpm por 1 min. As amostras de DNA eram estocadas a -20°C. A concentração, a pureza e a integridade do DNA extraído foi avaliado utilizando espectofotômetro através da absorvância de 260 e 280nm,bem como a amplificação de iniciadores do gene constitutivo de cães, desidrogenase gliceraldeido 3 fosfato (GAPDH).

### **Primers e Sondas**

Os primers e sondas foram selecionados no gene *SSu rRNA*, que aparece 160 vezes no genoma de *Leishmania* spp.e é altamente conservado entre as espécies de *Leishmania* (VAN EYS, SCHOONE et al., 1992). A seleção dos primers e sonda foi realizada previamente (BOSSOLASCO, GAIERA et al., 2003;

BOSSOLASCO, 2004) utilizando o programa Primer Express (*Perkin-Elmer -Applied Biosystems, Cheshire, United Kingdom*) e são os seguintes:

5'-TAGACCGCACCAAGACGAACTA-3' (primer direto)

5'-CTAATCATCTTCGATCTCCACACTTT-3' (primer reverso)

5'-AGCGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCC-3' (sonda)

A sonda fluorogênica foi sintetizada utilizando uma molécula FAM ligada na extremidade 5' e TAMRA ligada à extremidade 3' (*Perkin-Elmer -Applied Biosystems*).

### **Amplificação**

A amplificação e detecção foram realizadas utilizando um termociclador apropriado para a técnica, ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (*Perkin-Elmer -Applied Biosystems*). Foram utilizados 5 µl das amostras e 20 µl da mistura (12,5 µl de TaqMan® Universal PCR Mastermix, *Perkin-Elmer -Applied Biosystems*, 900nM do Primer direto, 300nM do primer reverso e 200nM da sonda) para a reação de PCR. Os parâmetros utilizados no termociclador para amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 50 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Um valor de “threshold cycle” ( $C_t$ ) foi calculado para cada amostra pela determinação do ponto onde a fluorescência ultrapassou o limiar de detecção (FIGURA 8).

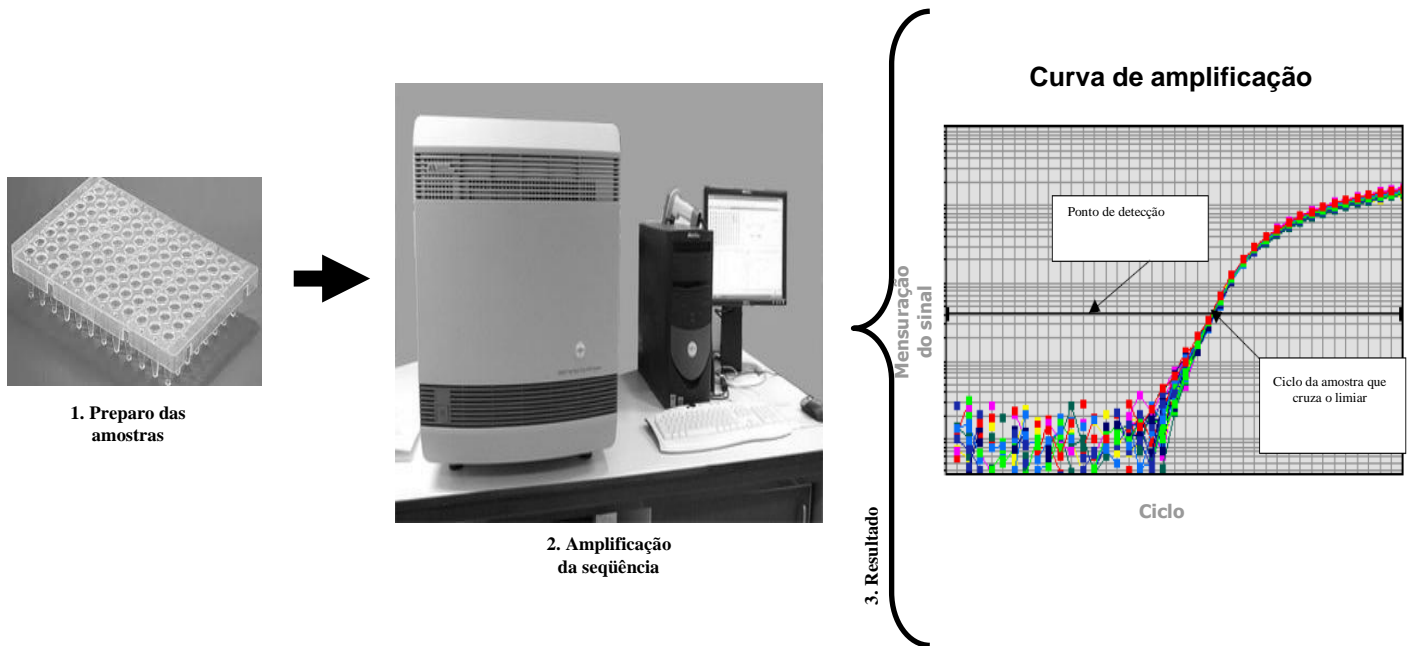


FIGURA 8. Esquema da seqüência da técnica PCR *real-time*. Fonte: Adaptado da internet

### Determinação da Curva Padrão

Para construção da curva padrão, foi realizada cultura de *Leishmania chagasi* (MHOM/ BR 2000/ Cepa Merivaldo 2), e em seguida foi feita a extração do DNA das formas promastigotas nas concentrações variando de  $10^7$  a  $10^1$  parasitas/ml. Cada ponto da curva foi testado em triplicata. A curva padrão apresentou Slope, -3.45 ; R square, 0.995 (FIGURA 9).

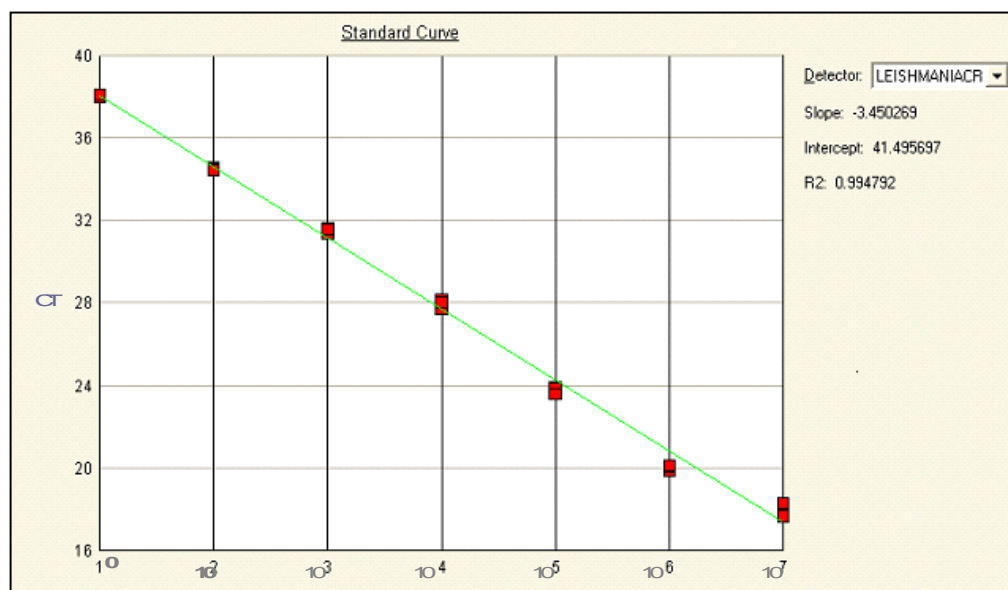


FIGURA 9. Determinação da curva padrão com os valores de fluorescência (Ct).

### **Cálculo da concentração de DNA das amostras**

As amostras para teste, os controles positivos e os negativos foram analisados em triplicata. O número de cópias de DNA por poço foi calculado através da média das três repetições de cada amostra. A partir da quantidade de DNA fornecida no experimento, os valores foram divididos por um fator de concentração da extração do DNA e em seguida divididos pelo volume colocado no PCR (5µl) e multiplicado por  $10^3$  para obtenção do resultado em cópias de DNA/ml. Assumindo que cada parasito possui 160 cópias do gene SSU rRNA (LEON, FOUTS et al., 1978), o resultado foi dividido por 160 e expresso em parasitos/ml. A sensibilidade deste método foi estimada em 0.625 parasitas/ml (BOSSOLASCO, GAIERA et al., 2003). Todas as etapas foram realizadas de acordo com os protocolos, previamente publicados (BOSSOLASCO, GAIERA et al., 2003).

## 4.7 COLETA DE DADOS

Os dados epidemiológicos e clínicos dos cães foram obtidos por Médico Veterinário e registrados em questionários, juntamente com os resultados dos testes diagnósticos.

### **4.7.1 Variáveis de Predição**

Informações como: idade, sexo, raça, peso, sinais e sintomas clínicos foram analisados como variáveis preditoras de carga parasitária nos cães.

### **4.7.2 Variáveis Dependentes (ou Eventos de Interesse)**

O evento de interesse avaliado foi a carga parasitária determinada através do PCR *real-time* (variável contínua) nas amostras biológicas coletadas dos cães incluídos no estudo.

## 4.8 ENTRADA E EDIÇÃO DE DADOS

As informações coletadas através dos questionários pré-codificados e os resultados dos testes de laboratório foram compilados em banco de dados informatizado para posterior análise estatística. A entrada dos dados foi feita através de uma tela de entrada criada no programa EPI-Info versão 6.03, com sistema de checagem automática de erros.

Em seguida, o banco de informações foi editado. Esta etapa compreendeu a aferição da qualidade do processo de entrada de dados e a correção dos erros detectados. Isto foi feito através do exame da distribuição de frequência de cada variável para identificação de: 1. Valores fora de limites; 2. Checagem de valores inválidos; 3. Identificação de entradas em duplicata; e 4. Checagem de dados incompatíveis ou contraditórios.

## 4.9 PLANO DE ANÁLISE DOS DADOS

### 4.9.1 Estatística Descritiva e Analítica

As frequências das variáveis principais e das covariáveis foram apresentadas com as respectivas distribuições. As medidas de tendência central, média e mediana foram calculadas com intervalo de confiança de 95% e percentil de 25% e 75%, respectivamente.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico Statistical Package for Social Sciences – SPSS versão 13 (SPSS, Chicago, Illinois). Os gráficos foram confeccionados utilizando o programa Graph Pad Prism versão 4.0 para Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA).

Os resultados da carga parasitária (DNA de *Leishmania*) através do qPCR foram analisados por testes não paramétricos de acordo com a natureza das variáveis estudadas. Foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann & Whitney realizados através do Graph Pad Prism versão 4.0 para Windows (Graph Pad

Software, San Diego, CA). Os testes foram considerados estatisticamente significantes quando o nível de significância fosse menor que 0,05 ou 5%.

#### 4.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi elaborado e executado segundo as diretrizes e normas que regem as pesquisas e aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ- Bahia com parecer de aprovação Nº 09/2001.

Todo o trabalho de captura, coleta das amostras e dados dos cães foi realizado mediante autorização dos proprietários dos animais, os quais eram informados que uma vez o cão soropositivo, segundo as recomendações do ministério da saúde, seria realizada a eutanásia dos cães.

Todos estes procedimentos foram realizados por médicos veterinários que levaram em conta os princípios éticos e humanitários nos procedimentos necessários a biossegurança na captura e no manejo com animais, bem como nos momentos de eutanásia.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 INQUÉRITOS SORO EPIDEMIOLÓGICOS:

No total, 1451 cães foram triados em seis inquéritos soro-epidemiológicos de Nov/2004 a Abr/2007. A Figura 10 apresenta o cronograma dos inquéritos nas áreas endêmicas estudadas. No município de Salinas da Margarida foram realizados inquéritos soro epidemiológicos nos anos de 2004 (novembro), 2005 (maio, julho e agosto) e 2007(abril) e no município de Irecê, em maio de 2005.

Dos cães avaliados nos inquéritos soro epidemiológicos, foram encontrados 128 (8,8%) animais com sorologia positiva para *Leishmania sp.* Destes, 98 (76,6%) foram recolhidos pelas secretarias municipais e incluídos no nosso estudo. Trinta cães não foram encontrados, possivelmente pela morte, fuga ou mudança de endereço dos proprietários, por isso não foram incluídos no nosso estudo.

Data	1º Inquérito Nov /2004	2º Inquérito Maio/ 2005	3º Inquérito Julho/2005	4º Inquérito Agosto/2005	5º Inquérito Maio/2005	6º Inquérito Abril/ 2007	Total de cães
Local ( nº)	Salinas (n=399)	Salinas (n=226)	Salinas (n=271)	Salinas (n=100)	Irecê (n=229)	Salinas (n=226)	1451
Nº de soropositivo (%)	52 (13,0%)	17 (7,5%)	7 (3,0%)	8 (8,0%)	7 (3,0%)	37 (16,0%)	128 (8,8%)
Nº de Cães Eutanasia dos (%)	38 (73%)	12 (71%)	6 (86%)	8 (100%)	5 (71%)	29 (78%)	98 (76,5%)

FIGURA 10. Cronograma dos inquéritos soro – epidemiológicos caninos realizados.

## 5.2 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS DOS CÃES DAS ÁREAS ENDÊMICAS DE LEISHMANIOSE VISCERAL ESTUDADAS.

Na Tabela 1 estão descritas as características epidemiológicas e clínicas dos 98 cães estudados. Cerca de 62% dos cães eram machos e 38% fêmeas, a maior parte dos cães não tinha raça definida, era de porte médio e do município de Salinas da Margarida (95%), sendo Encarnação (51,1%) e a sede do município (37,7%) as localidades com maior número de cães.

De acordo com a avaliação clínica, 66,7% (62/93) dos cães eram sintomáticos. Os sinais e sintomas clínicos mais frequentes foram úlceras mucocutâneas (69%), onicogribose (58%) esplenomegalia (56%) e alopecia (47%). Outros sintomas incluíam: caquexia (37%), linfadenopatia (24 %), hepatomegalia (8%) e alterações oculares (6%). Não foi possível realizar avaliação clínica dos cinco animais no município de Irecê.

Tabela 1 - Características dos 98 cães provenientes de uma área endêmica de Leishmaniose Visceral estudadas nos anos de 2004 - 2007, Bahia- Brasil.

	n	(%)
<b>Sexo</b>		
Macho	61	(62,2)
Fêmea	37	(37,8)
<b>Raça</b>		
Mestiço	75	(76,5)
SRD*	11	(11,2)
Pura	12	(12,2)
<b>Porte</b>		
Pequeno	20	(20,4)
Médio	58	(59,2)
Grande	20	(20,4)
<b>Peso</b>		
Até 5 kg	24	(24,5)
De 5 a 20kg	50	(51,0)
Acima de 20kg	24	(24,5)
<b>Local</b>		
<b>Salinas das Margaridas</b>		
Encarnação	50	(51,1)
Mutá	7	(6,1)
Salinas(Sede)	37	(37,7)
<b>Irecê*</b>	5	(5,1)
<b>Características Clínicas (n=93)*</b>		
Assintomáticos	31	(33,3)
<b>Sintomáticos</b>	<b>62</b>	<b>(66,7)</b>
Úlceras muco cutâneas	43	(69,0)
Onicogribose	36	(58,0)
Esplenomegalia	35	(56,0)
Alopecia	29	(47,0)
Caquexia	23	(37,0)
Linfadenopatia	15	(24,0)
Hepatomegalia	8	(13,0)
Alterações oculares	6	(10,0)

\* Não foi realizada avaliação clínica dos cinco cães de Irecê.

\* Sem raça definida

### 5.3 EXAMES CONVENCIONAIS PARA O DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL NOS CÃES.

Os resultados dos exames convencionais, parasitológicos e sorológicos, realizados para o diagnóstico da LV dos cães que participaram do estudo estão sumarizados na Tabela 2. No total, 94% dos cães tinham confirmação de infecção por *Leishmania*, pelo exame parasitológico (81%) ou por sorologia (13%). Entretanto em 6% dos cães não foi confirmado à infecção para *Leishmania* por métodos de diagnóstico convencional. Quanto ao diagnóstico sorológico, de todos os cães avaliados, 81% (79/81) apresentaram anticorpo para *Leishmania*.

A cultura de aspirado de baço foi positiva para *Leishmania* em 27% (19/69) dos cães examinados. Já a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* em amostras de pele, através do exame histológico convencional (Hematoxilina - Eosina), revelou 71% (48/69) das amostras positivas, enquanto a imunohistoquímica (IH) apresentou 76% (52/69) das amostras positivas. O exame direto de aspirado de linfonodo apresentou a maior taxa de positividade: 81% (22/27).

Tabela 2 - Resultados dos exames convencionais para diagnóstico de Leishmaniose Visceral de 98 cães provenientes de áreas endêmicas, Bahia, 2004-2007.

	n	(%)	(% válido)
<b>Diagnóstico Sorológico</b>			
ELISA			
Positivo	79	(81)	
Negativo	13	(13)	
Indeterminado	6	(6)	
Total	98	(100)	
<b>Diagnóstico Parasitológico</b>			
Cultura para <i>Leishmania</i> (Punção aspirativa de baço)			
Positiva	19	(19)	(27) <sup>a</sup>
Negativa	50	(51)	(73)
Inconclusivo (Contaminação)	29	(30)	
Total	98	(100)	(100)
Exame Histológico (Biópsia de pele) (N=69) <sup>b</sup>			
Hematoxilina -Eosina (HE)			
Positivo	48	(49)	
Negativo	21	(20)	
Total	69	(100)	
Imunohistoquímica (IH) (N=69) <sup>b</sup>			
Positivo	52	(53)	
Negativo	17	(16)	
Total	69	(100)	
Exame Direto ( <i>Imprint</i> de Linfonodo) (N=27) <sup>c</sup>			
Positivo	22	(22)	
Negativo	5	(6)	
Total	27	(100)	
<b>Diagnóstico de Infecção por <i>Leishmania</i></b>			
Parasitológico (pelo menos 1 exame parasitológico positivo)	79	(81)	
Sorológico (sorologia positiva e exames parasitológicos negativos)	13	(13)	
Negativo (sorologia negativa e exames parasitológicos negativos)	6	(6)	
<b>TOTAL</b>	<b>98</b>	<b>(100)</b>	

<sup>a</sup> Percentual referente ao total das amostras de biópsia de baço que apresentaram resultado conclusivo na cultura de *Leishmania* (n=98).

<sup>b</sup> Não foi coletado amostra para HE e IH em 29 cães do último inquérito (Abril/2007).

<sup>c</sup> Dos cães incluídos no inquérito de abril/2007(n=29), foram coletadas amostras em 27.

#### 5.4. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA (DNA) DE *LEISHMANIA* ATRAVÉS DO PCR *real time* (qPCR).

A distribuição da carga parasitária nas diferentes amostras biológicas dos cães estudados é apresentada na Tabela 3. Pouco mais da metade das amostras de sangue periférico (57%) e de biópsias de pele (56%) testaram positivas para DNA de *Leishmania* por qPCR. Enquanto, nos cães incluídos no último inquérito em abril/2007, 100% das amostras de *swab* da conjuntiva e de aspirado de linfonodo e 95,5% dos aspirados de medula óssea examinados foram positivos no teste de qPCR.

A carga parasitária no sangue periférico não ultrapassou  $10^3$  parasitos/ml, sendo mais comumente detectado 1 a 10 parasitos/ml. A distribuição da carga parasitária em *swab* da conjuntiva foi semelhante à examinada em sangue periférico. Por outro lado, em pele, medula óssea e linfonodos a carga parasitária passou de  $10^4$  parasitos/ml, além disso, as quantidades de DNA detectadas se distribuíram com maior freqüência nas categorias mais elevadas do nº parasitos por ml, notadamente, no material de aspirado de linfonodo.

Tabela 3 - Carga parasitária em diferentes amostras biológicas de cães com Leishmaniose Visceral, Bahia, 2004-2007.

Carga parasitária (Parasito/mL)	Todos os inquéritos (n=98)				Inquérito de Abril/2007 (n=29)					
	Sangue Periférico		Biópsia de Pele		Swab da Conjuntival		Aspirado de Médula Osséa		Aspirado de Linfonodo	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Negativo	42	(42,9)	26	(44,1)	0	(0,0)	1	(4,5)	0	(0,0)
≤1	7	(7,1)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)
1 a 10	30	(30,0)	5	(8,5)	3	(10,3)	3	(13,6)	0	(0,0)
11 a 100	12	(12,2)	6	(10,2)	20	(69,0)	6	(27,3)	6	(22,2)
101 a 1000	7	(7,1)	7	(11,9)	6	(20,7)	3	(13,6)	0	(0,0)
1001 a 10.000	0	(0,0)	3	(5,1)	0	(0,0)	3	(13,6)	3	(0,0)
>10.000	0	(0,0)	12	(20,3)	0	(0,0)	6	(27,3)	18	(66,7)
Total	98	(100,0)	59 <sup>a</sup>	(100,0)	29	(100,0)	22 <sup>b</sup>	(100,0)	27 <sup>c</sup>	(100,0)

<sup>a</sup> 29 amostras de biópsia de pele estavam em condições inadequadas para realização qPCR.

<sup>b</sup> Não foi possível realizar a coleta da medula óssea em 7 cães.

<sup>c</sup> Não foi possível realizar a coleta de linfonodo em 2 cães.

A Tabela 4 mostra os resultados do qPCR para *Leishmania sp* em diferentes amostras biológicas dos 98 cães que participaram do estudo, agrupados de acordo com o diagnóstico de infecção por *Leishmania*. A positividade do qPCR em sangue periférico foi maior entre cães com diagnóstico parasitológico (65%) , diminuindo naqueles com diagnóstico sorológico (31%) e nos cães com sorologia e exame parasitológico negativos (16%). Nas biópsias de pele o qPCR só foi positivo nos cães com diagnóstico parasitológico ou sorológico, nenhum cão sem confirmação diagnóstica testou positivo no qPCR.

Todas as amostras de *swab* conjuntival e de aspirado de linfonodo foram positivas no qPCR, tanto em cães com confirmação parasitológica quanto naqueles com confirmação sorológica apenas. Nas amostras de aspirado de medula óssea, a positividade foi de 94,5% e 100% em cães com diagnóstico parasitológico e sorológico apenas, respectivamente.

Tabela 4. Resultados do PCR *realtime* (qPCR) para *Leishmania sp* em amostras biológicas de cães, de acordo com diagnóstico de infecção por *Leishmania*, Bahia, 2004-2007.

	<b>Diagnóstico de Infecção por <i>Leishmania</i></b>							
	Parasitológico <sup>a</sup>		Sorológico <sup>b</sup>		Negativo <sup>c</sup>		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<b>Todos Inquéritos (n=98)</b>								
<b>qPCR Sangue</b>								
Positivo	51	(65)	4	(31)	1	(16)	56	(57)
Negativo	28	(35)	9	(69)	5	(84)	42	(43)
Total	79	(100)	13	(100)	6	(100)	98	(100)
<b>qPCR Pele</b>								
Positivo	26	(54)	7	(87)	0	(0)	33	(56)
Negativo	22	(46)	1	(13)	3	(100)	26	(44)
Total	48	(100)	8	(100)	3	(100)	59 <sup>d</sup>	(100)
<b>Inquérito de Abril/ 2007 (n=29)</b>								
<b>qPCR Celula da Conjuntiva</b>								
Positivo	22	(100)	7	(100)	-		29	(100)
Negativo	0	(0)	0	(0)	-		0	(0)
Total	22	(100)	7	(100)	-		29	(100)
<b>qPCR Linfonodos</b>								
Positivo	22	(100)	5	(100)	-		27	(100)
Negativo	0	(0)	0	(0)	-		0	(0)
Total	22	(100)	5	(100)	-		27 <sup>e</sup>	(100)
<b>qPCR Medula Ossea</b>								
Positivo	17	(94,5)	4	(100)	-		21	(95,5)
Negativo	1	(5,5)	0	(0)	-		1	(4,5)
Total	18	(100,0)	4	(100)	-		22	(100,0) <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Cães com pelo menos 1 exame parasitológico positivo ;

<sup>b</sup> Cães com exames sorológico positivo e parasitológicos negativos;

<sup>c</sup> Cães com exames sorológico e parasitológicos negativos;

<sup>d</sup> 29 amostras de biópsia de pele estavam em condições inadequadas para realização do qPCR) ;

<sup>e</sup> Não foi possível realizar a coleta de linfonodo em 02 cães;

<sup>f</sup> Não foi possível realizar a coleta de medula óssea em 07 cães.

A Tabela 5 apresenta a distribuição de carga parasitária de *Leishmania* em sangue periférico de 58 cães estudados, estratificada de acordo com os resultados dos exames convencionais realizados para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* e a presença de sintomas de LV. O percentual de testes qPCR negativo foi maior entre os cães assintomáticos comparado aos sintomáticos, independente de confirmação diagnóstica, mas estas diferenças não foram significativas



estatisticamente. De maneira semelhante, a distribuição de carga parasitária alcançou faixas mais altas nos cães sintomáticos comparados aos assintomáticos, mais uma vez, estas diferenças não atingiram significância estatística.

Tabela 5. Distribuição da carga parasitária de *Leishmania* em sangue periférico de 98 cães de acordo com o diagnóstico de infecção por *Leishmania* e com a presença de sintomas de leishmaniose visceral, Bahia, 2004-2007.

	Parasitológico <sup>a</sup> (n=74)			Sorológico <sup>b</sup> (n=13)			Negativo <sup>c</sup> (n=6)		
	Assint.	Sint.	Total	Assint.	Sint.	Total	Assint.	Sint.	Total
<b>Carga parasitária(Paras/ml)</b>									
0	9 (36,0)	15 (30,6)	24 (32,4)	3 (75,0)	6 (66,7)	9 (69,2)	2 (100,0)	3 (75,0)	5 (83,3)
≤1	2 (8,0)	2 (4,1)	4 (5,4)	1 (25,0)	1 (11,1)	2 (15,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
1 a 10	9 (36,0)	19 (38,8)	28 (37,8)	0 (0,0)	2 (22,2)	2 (15,4)	0 (0,0)	1 (25,0)	1 (16,7)
10 a 100	5 (20,0)	6 (12,2)	11 (14,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
100 a 1000	0 (0,0)	7 (14,3)	7 (9,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>Total</b>	<b>25 (100,0)</b>	<b>49 (100,0)</b>	<b>74 (100,0)</b>	<b>4 (100,0)</b>	<b>9 (100,0)</b>	<b>13 (100,0)</b>	<b>2 (100,0)</b>	<b>4 (100,0)</b>	<b>6 (100,0)</b>

<sup>a</sup> Cães com pelo menos 1 exame parasitológico positivo ;

<sup>b</sup> Cães com exames sorológico positivo e exames parasitológicos negativos;

<sup>c</sup> Cães com exames sorológico e exames parasitológicos negativos.

## 5.5 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM DIFERENTES TECIDOS

A distribuição da carga parasitária, em amostras de sangue total, *swab* da conjuntiva, medula óssea, pele e linfonodos dos cães com qPCR positivo estão representados na figura 11. As amostras de aspirado de linfonodo e as biópsias de pele exibiram os maiores valores de carga parasitária, enquanto, sangue periférico e *swab* da conjuntiva apresentaram valores similares de carga parasitária. Os aspirados de medula óssea mostraram valores intermediários. A diferença entre as medidas de carga parasitária foi significativa ( $p < 0.0001$ ).

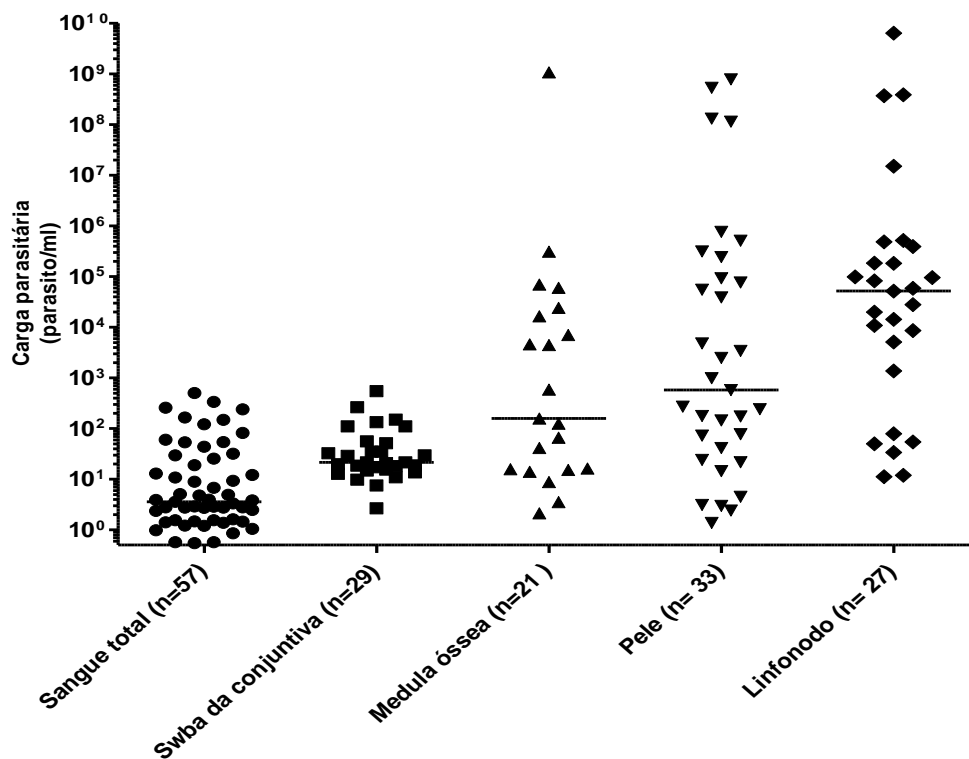


FIGURA 11. Distribuição da carga parasitária (parasito/ml) em diferentes amostras biológicas dos cães com qPCR positivo, Bahia, 2004-2007. (\* Mediana)

A figura 12 apresenta a distribuição da carga parasitária (parasito/ml) em amostras de medula óssea, sangue, linfonodo, pele e *swab* da conjuntiva de cães com qPCR positivo, de acordo com o diagnóstico da infecção por *Leishmania*. Embora nossos resultados sugiram uma maior carga parasitária em medula óssea, sangue e pele de cães com diagnóstico parasitológico quando comparados aqueles com diagnóstico sorológico apenas, essas diferenças não foram significativas estatisticamente.

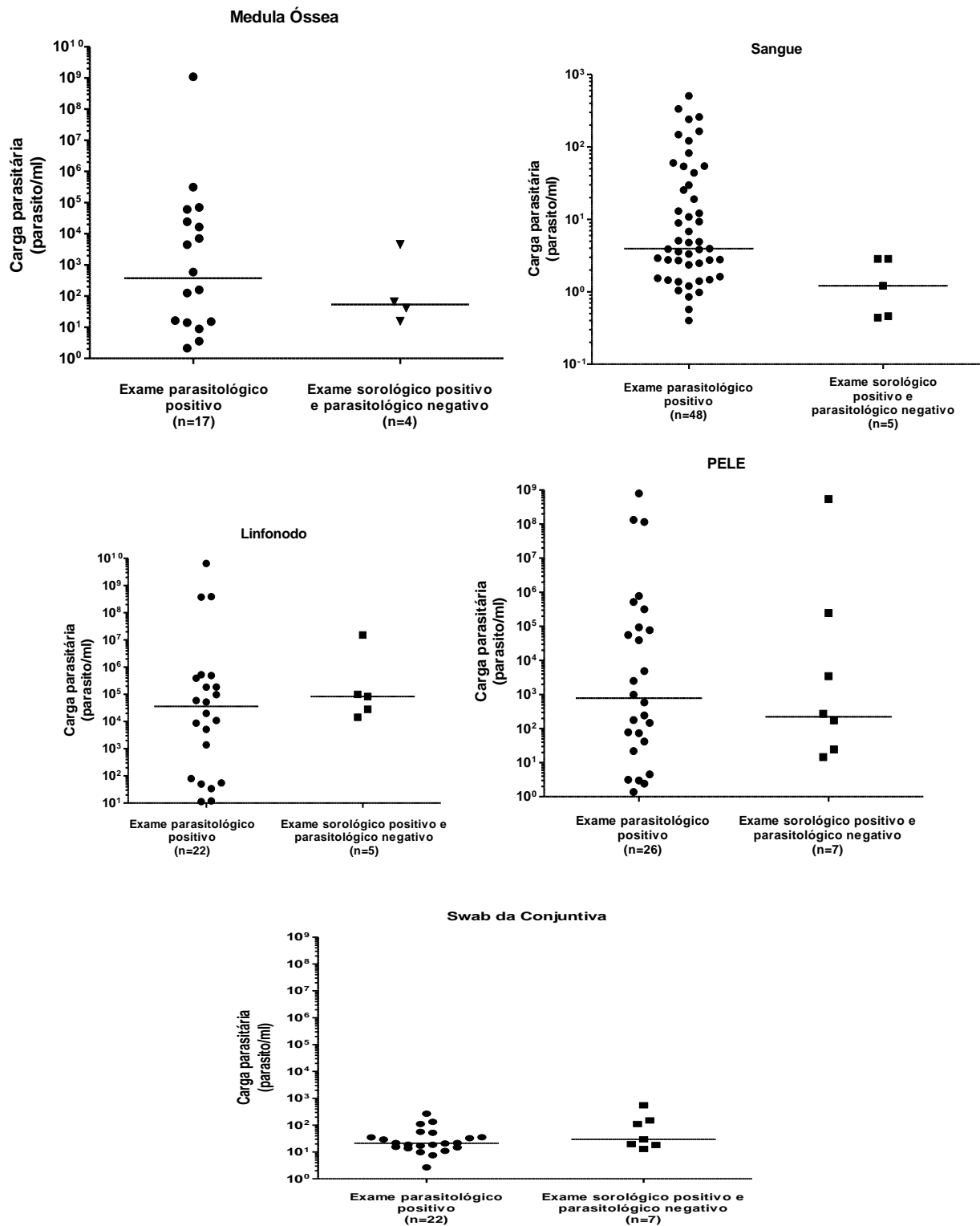


FIGURA 12. Distribuição da carga parasitária (parasito/ml) em amostras de medula óssea, sangue, linfonodo, pele e swab da conjuntiva de cães com qPCR positivo, de acordo com o diagnóstico de infecção por *Leishmania*, Bahia, 2004-2007. (\*Mediana).

## 6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, realizamos avaliação da carga parasitária em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.*, utilizando método de biologia molecular quantitativo (qPCR). A maioria dos cães incluídos no estudo era sintomática e, graças à utilização de testes parasitológicos em diferentes amostras, a confirmação do diagnóstico foi obtida em 81% dos animais. Adicionalmente, 13% tinham evidência indireta de infecção (sorologia) e somente 6% não tinham indícios de infecção nos testes convencionais. As possíveis explicações para que estes cães, inicialmente, com sorologia positiva, tenham testado negativo quando da eutanásia incluem: ocorreu sororeversão entre a coleta do primeiro exame e a do segundo (DYE et al. 1992; DYE et al. 1993; QUINELL et al. 1997); ou houve troca do cão, intencionalmente ou inadvertidamente (ou seja, o animal recolhido dos proprietários pelos agentes da secretaria de saúde, não era o mesmo testado na triagem). Ainda assim, um dos seis cães negativos nos exames convencionais foi positivo no qPCR. Preferimos tomar uma decisão conservadora e manter todos os animais sem confirmação de infecção na população do estudo, mesmo reconhecendo que isto poderia subestimar o desempenho do teste de qPCR.

A sensibilidade do qPCR foi alta, variando de 95 a 100% nas amostras de *swab* conjuntival, aspirado de linfonodo e de medula óssea, mas foi pouco maior que 50% nas amostras de sangue e biópsia de pele. Nossos resultados mostram que a carga parasitária foi menor em sangue ( $<10^3$  parasitos/ml) do que nos demais sítios, talvez isto seja responsável pela taxa relativamente alta de testes falsos negativos das amostras de sangue.

QUARESMA et al. (2009), utilizando qPCR em 217 cães com leishmaniose visceral, também encontraram maior número de cópias de DNA de *Leishmania* em amostras de medula óssea comparado a amostras de sangue periférico. Em outro estudo, utilizando qPCR em 44 cães com sinais clínicos de leishmaniose visceral, comparou-se a carga parasitária em amostras coletadas num mesmo momento de sangue periférico e de aspirado de medula óssea. A quantidade de DNA de *Leishmania* foi de 4 a 5000 vezes maior na medula óssea do que no sangue (FRANCINO et al., 2006). Em termos biológicos, é possível que a presença da *Leishmania* no sangue seja transitória, enquanto o parasita migra para os tecidos

que exercem maior tropismo, daí a menor carga parasitária no sangue e, conseqüentemente, a menor sensibilidade do qPCR nestas amostras. Além disso, LACHAUD et al (2001) ressaltam que o sangue apresenta inibidores de PCR que podem diminuir a sensibilidade desta técnica nestas amostras.

Apesar da menor sensibilidade do qPCR em amostras de sangue periférico, a coleta desta amostra é menos invasiva e mais fácil do que a coleta de aspirado de linfonodo e de medula óssea (MANNA et.al., 2008; FRANCINO et. al. 2006; QUARESMA et al., 2009; CAVALCANTI et al., 2009). Isto pode ser particularmente importante na condução de inquéritos soropidemiológicos ou na triagem de cães em áreas endêmicas. Considerando-se o sangue como a fonte de acesso do flebótomo à *Leishmania*, a demonstração que mais da metade dos cães identificados como infectados no nosso estudo tinham quantidade detectável de DNA do parasita em sangue periférico tem implicações no papel destes animais como reservatório da doença. Nossos resultados sugerem que programas de triagem e eliminação de cães baseados no uso de qPCR em sangue periférico devam ser avaliados, já que este teste poderia identificar cães com maior potencial de infectar o vetor.

Outra implicação importante dos nossos achados é que a detecção de carga parasitária em sangue periférico de cães sugere que o qPCR pode ser utilizado para investigar o papel de outros animais domésticos ou silvestres como reservatório da leishmaniose visceral, através da comparação da quantidade de parasitas encontrados no sangue periférico destes animais com aquelas detectadas nos cães de áreas endêmicas. Recentemente, JULIÃO et al. (2011) reportaram carga parasitária detectável em sangue periférico de 25% dos bovinos e de 1% dos *Didelphis albiventri* avaliados na mesma área do nosso estudo. É plausível que, depois de validado apropriadamente, o qPCR possa ser utilizado como teste quantitativo na triagem durante a investigação de reservatórios de LV, reduzindo o número de exames de xenodiagnóstico, muito mais laboriosos, custosos e difíceis de executar.

A sensibilidade do qPCR em biópsias de pele também foi menor do que nas amostras de medula óssea e linfonodo. Embora a carga parasitária em pele tenha sido mais alta ( $>10^4$  parasitos/ml), semelhante àquela observada nas amostras onde o qPCR teve alta sensibilidade. É possível que o parasitismo em pele seja mais

heterogêneo, resultando em maior variabilidade na presença de *Leishmania* em biópsias realizadas aleatoriamente em pele sem lesões. Na ilha de Maiorca na Espanha, um estudo em 100 cães identificou uma prevalência de DNA de *Leishmania* através de PCR em medula óssea, conjuntiva e pele igual a 18, 32 e 51%, respectivamente (SOLANO-GALLEGO et al., 2001). Diante das diferenças na detecção de *Leishmania* nestes tecidos, os autores concluíram que a disseminação hematogênica para medula óssea acontece apenas numa parte dos cães infectados e que a pele é o principal tecido onde o parasita se concentra. Em outro estudo na Itália (MANNA et al., 2008), 18 cães infectados naturalmente foram avaliados com qPCR, a maior carga parasitária foi detectada em linfonodos (83% dos cães com  $>10^3$  DNA do parasitos/ml), seguido de pele (61% dos cães com a mesma carga). As amostras de sangue apresentaram cargas muito menores (94% dos cães tinham  $<10^3$  DNA dos parasitos/ml).

A alta sensibilidade do qPCR em aspirado de linfonodo e medula óssea encontrada no nosso estudo também é observada nos exames parasitológicos convencionais destas amostras (REALE et al, 1999; REIS et. al, 2006). Portanto, não haveria vantagem em utilizar-se um teste molecular mais caro e complexo nestas situações. Na verdade, a maior limitação em realizar exames diagnósticos nestes tecidos reside na dificuldade da coleta. Para obter estas amostras é necessário realizar procedimento invasivo, que requer pessoal técnico com treinamento apropriado. O emprego do teste de qPCR em material de medula óssea, linfonodo e pele, semelhantemente ao observado em relação às amostras de sangue periférico, poderia ser útil em estudos da cinética do parasita na história natural da LVC e para avaliar o tropismo da *Leishmania* em relação a diferentes tecidos. Adicionalmente, o teste de qPCR poderia ser útil em inquéritos epidemiológicos e, depois de validado adequadamente, poderia também ser empregado como teste de triagem em programas de prevenção e controle da LV, pela capacidade de identificar animais com maior carga parasitária e, conseqüentemente, maior potencial de infectividade para os vetores.

A alta sensibilidade do qPCR em *swab* de conjuntiva (95,5%) encontrada no nosso estudo tem implicações práticas, uma vez que a coleta deste material é mais fácil de realizar e menos invasiva do que a coleta dos aspirados de linfonodo e medula óssea. Numa avaliação de 98 cães em Israel, Ayali-Strauss et al. (2004)

reportaram sensibilidade de 92%, utilizando técnica de PCR convencional na identificação de *Leishmania* em amostra de *swab* da conjuntiva. Neste estudo, o PCR foi positivo 45 dias após a infecção experimental dos cães e antes da soroconversão. Em dois outros estudos em Minas Gerais, a sensibilidade do teste de PCR em material de *swab* de conjuntiva foi de 90% (LEITE et al. 2010) e de 91,3% (FERREIRA et al. 2008). Entretanto, outros autores reportam taxas menores de sensibilidade (32%)(SOLANO-GALLEGO et al., 2001). Portanto, nossos achados sugerem que o teste de qPCR em *swab* de conjuntiva pode ser utilizado para diagnóstico de infecção por *Leishmania* em cães. Ademais, pela simplicidade e rapidez na coleta, o teste de qPCR em *swab* de conjuntiva pode ser especialmente útil na condução de inquéritos epidemiológicos, reduzindo o tempo e o custo da realização destes estudos no campo.

A carga parasitária detectada em cães assintomáticos foi semelhante àquela encontrada nos animais sintomáticos. QUARESMA et .al. (2009) também reportaram que a carga parasitária não se correlacionava com as manifestações clínicas em cães infectados. MANNA et.al. (2006) encontraram alta densidade de parasitos em amostras de pele e linfonodos de cães assintomáticos, mas somente naqueles que posteriormente apresentaram doença manifesta, concluindo que o aumento da carga parasitária pode predizer desenvolvimento de doença. COSTA-VAL et. al. (2007), ao avaliar a o potencial de infectividade de cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos verificaram que em todos os grupos foi possível detectar o parasita em pele e sangue. Entretanto, no grupo dos animais sintomáticos o parasita era encontrado em maior quantidade.

A distribuição da carga parasitária nos diferentes tecidos de cães infectados no nosso estudo mostrou que linfonodos e pele têm a maior carga de leishmania detectada pelo qPCR. Sangue periférico e *swab* conjuntival têm menor quantidade de parasita/ml e medula óssea tem quantidade intermediária. Estes resultados são consistentes com as descrições de parasitismo em pele e linfonodos utilizando-se testes convencionais (XAVIER et.al. 2006; QUEIROZ et al, 2010) e, provavelmente, representam a diferença de tropismo do parasito em relação aos diferentes tecidos, bem como as diferenças na imunidade específica nestes tecidos (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; SANCHEZ et al., 2004).



Não foi observada diferença na quantidade de parasitos de acordo com a positividade dos cães nos testes convencionais. Entretanto, o número de animais com exames parasitológicos convencionais negativos foi pequeno, reduzindo o poder do nosso estudo para fazer estas comparações. QUARESMA et al. (2009) reportaram cargas parasitárias elevadas utilizando qPCR em amostras de medula óssea de cães com exames parasitológicos positivos, sugerindo uma associação entre a quantidade de parasitas e a sensibilidade dos testes diagnósticos convencionais.

## 7 CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES

1. O qPCR apresentou sensibilidade alta nas amostras biológicas estudadas, particularmente em linfonodo, conjuntiva e medula óssea;

a. Pela facilidade de coleta e por ser menos invasivo, o exame de qPCR em *swab* conjuntival pode ser empregado em inquéritos epidemiológicos avaliando grande número de cães;

b. Mais da metade dos cães apresentaram quantidade detectável de parasitas em sangue periférico, sugerindo a avaliação do qPCR neste tipo de amostra para identificar cães com maior infectividade nos programas de controle/prevenção de LV;

c. A sensibilidade do qPCR em sangue periférico e em pele também sugere o emprego desta técnica como ferramenta na investigação de potenciais reservatórios para LV entre animais silvestres ou domésticos;

2. Os sítios com maior quantidade detectável de DNA de *Leishmania* no qPCR (linfonodos, medula óssea e pele) são consistentes com a distribuição da carga parasitária conhecida previamente através dos resultados dos exames parasitológicos convencionais;

3. A positividade do qPCR, assim como a distribuição da carga parasitária, não foram associadas à presença de sintomas de LV ou à positividade dos exames parasitológicos convencionais;

4. Nossos resultados indicam que o qPCR pode ser utilizado numa variedade de amostras biológicas para a quantificação da carga parasitária de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.*

a. Estudos de validação do qPCR para avaliar a capacidade de reservatórios da LV, em lugar do xenodiagnóstico, devem ser conduzidos;

b. Estudos sobre o papel do qPCR na triagem de cães em programas de controle/prevenção da LV necessitam ser realizados.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P., et al. Kala-azar in Portugal. I. Attempts to find a wild reservoir. **Journal of Tropical Medicine Hygiene**, n. 85, p. 123-126, 1982.

ABRANCHES, P., et al. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **Journal of Parasitology**, n.77,v 4, p.557-561, 1991.

AGUIAR, P. H. P., et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.4, p. 283-294, 2007.

ALENCAR JE. et al. Infecção natural de *Rattus alexandrinus* por *Leishmania* (provavelmente *L. braziliensis*) em zona endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado do Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n 2, p.347-348, 1960.

ALEXANDER B. Dispersal of Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **Journal of Medical Entomology**. n 24, p.552-558,1987.

ALMEIDA, A. B. P. F., et al. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 156-159, 2009.

ALVES, A. L., et al. Levantamento epidemiológico da leishmaniose em cães vadios da cidade de Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**, v. 8, n. 2, p. 63-68, 1998.

ARIAS, J. R., et al. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. V. 2, n. 2, p. 145-146, 1996.

ASSIS, T. S. M., et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, n. 17, v. 2, p. 107-116, 2008.

AYALI-STRAUSS, D. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, v 189,p 1729-1733, 2004.

ASHFORD, D. A. et al. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 48, n.1, p. 1-8, 1993.

ASHFORD RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinical in. Dermatology**. v 14, p.523-532,1996.

ASHFORD RW. When is a reservoir not a reservoir? **Emerging Infectious Diseases**. n 9, p.1495-1496, 2003.

AZAB, M. E., et al. Canine and rodent leishmanial isolates from Egypt. **Transactions of**

the **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 263-264, 1984.

BADARÓ, R. Progressos nas pesquisas de leishmaniose visceral na área endêmica de Jacobina-Bahia 1934-1989. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 4, p. 159-164, 1988.

BARBOZA, D. C. P. M., et al. Inquérito epidemiológico da leishmaniose visceral canina em três distritos sanitários do Município de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 2, p. 434-447, 2009.

BEER, P. D., et al. A killing disease epidemic among displaced Sudanese population identified as visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 3, p. 283-289, 1991.

BEVILACQUA, P. D., et al. Urbanização da Leishmaniose visceral em Belo Horizonte. Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 53, n. 1, 2001. Disponível em: <mer://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0102-09352001000100001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 24 Jan. 2011.

BOSSOLASCO, S., G. GAIERA. *Real-time* PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.11, p.5080-5084, 2003.

BOSSOLASCO, S., et al. ERRATUM: Real-Time PCR Assay for clinical Management of human immunodeficiency virus-Infected Patients with Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1858, 2004.

BOTELHO, A. C. A. & NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 503-508, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília-DF, 2006: 122 p.

BUCHETON, B. et al. The interplay between environmental and host factors during an outbreak of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1449–1457, 2002.

CABRERA, M. A. A., et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CALDAS A.J.M et al. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral na Ilha de São Luis-MA, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n 34: p.445-451, 2001.

CALDAS, A. J. M., et al. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in North-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p.21-28, 2002.

CARRANZA-TAMAYO, C. O., et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 396-399, 2010.

CARVALHO M.R et al. Phlebotomine sandfly species from na American visceral leishmaniasis área in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de. Saúde Pública**; n 23, p.1227-1232, 2007.

CARDO, L. J. *Leishmania*: risk to the blood supply. **Transfusion**, v. 46, p. 1641-1645, 2006.

CAVALCANTI, et al. The development of a *real-time* PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **The Veterinary Journal**, v.182, p.356-358, 2009.

CERQUEIRA E.J.L et al. Resultados de testes de ELISA, TRALd e PCR em eqüídeos de áreas endêmicas de leishmaniose visceral no Estado da Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n 34, p.242, 2001.

CHANIOTIS B.N et al. Horizontal and vertical movements of phlebotomine sandflies in a Panamanian rain forest. **Journal of Medical. Entomology**. n 11, p.369-375, 1974.

CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.

COHEN, C. Leishmaniasis acquired in Belgium. **The Lancet**, v. 338, n. 13, p.128, 1991.

COSTA-VAL.et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal** v, 174 p, 636–643, 2007.

COSTA, C. H. N., et al. Is the household dog a risk factor for merican visceral leishmaniasis in Brazil? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and hygiene**, v. 93, p. 464, 1999.

CORREDOR, A., et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40. n. 5, p. 480-486, 1989.

COUTINHO, M. T. Z. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149–155, 2005.

COUTINHO, M. T. Z. & LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 320–325, 2007.

CUNHA, S., et al. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan mer of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and hygiene**, v. 89, p. 155-158, 1995.

DANTAS-TORRES, F., et al. Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 444-445, 2005.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.3, p.151-156, 2006.

DANTAS-TORRES F. The role of dogs as reservoir of Leishmanias parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. **Veterinary Parasitology**; n 149, p.139-146, 2007.

DEANE, L. M. & DEANE, M. P. Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani*, no Ceará. **O Hospital**, v. 45, n. 6, p. 437, 1954<sup>a</sup>.

DEANE, L. M. & DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas merican e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **O Hospital**, v. 45, n. 4, p. 45-47, 1954<sup>b</sup>.

DEANE LM & DEANE MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. **O Hospital**. n 48, p.60-76, 1955.

DEANE LM. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no Ceará. [tese livre docência], Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP, 143, p1956.

DEANE, L. M. & DEANE, M. P. Observações meri abrigos e criadouros de flebotomos no nordeste do Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 2, n. 9, p. 225-46, 1957.

DEANE, L.M. Epidemiologia e profilaxia do calazar americano. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 4, n. 10, p. 431-449, 1958.

DYE C, DAVIES CR, LAINSON R. Communication among phlebotomine sandflies: A field study of domesticated *Lutzomyia longipalpis* population in Amazonian Brazil. **Animal. Bah.** n 42, p.183-192,1991.

DYE C, et al. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. **Parasitology**,v 105,p 35-41,1992.

DYE C, et al. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology.Infect.** v 103,p 647-656 ,1993.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Statistics Quart**, v. 45, p. 267-75, 1992.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Dermatology Clinic**

**Journal articles**, v. 4, p. 417-423, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v.27, p.305-318, 2004.

DEREURE, J., et al. Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1103-1108, 2003.

DIETZE R et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**. n 25, p.1240, 1997.

EVANS TG, et al. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnosis methods. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, 42: 118-23, 1990.

EVANS, T. G., et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, p. 1124-1132, 1992.

EVANGELISTA, L. S. M., et al. Leishmaniose visceral canina no Estado de Roraima. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 3, n. 2, Ed. 63, Art 93, 2009. Disponível em: [mer://www.pubvet.com.br/artigos\\_det.asp?artigo=93](http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=93). Acesso em: 27 jan. 2011.

FERREIRA, S. A., et al. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 257-263, 2008.

FERRER L., et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **The Veterinary Record**, v. 136, p. 514-516, 1999<sup>a</sup>.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain. P. 6-10, 1999<sup>b</sup>.

FERRO C, PARDO R, TORRES M. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal Medicine Entomology**; n 34, p.719-728, 1997.

FRANCINO, O. et al. Advantages of *real-time* PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.214-221, 2006.

FREITAS, E., et al. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, n. 137, p,159-167, 2006.

GAETA, E. B. et al. Visceral leishmaniasis in Italy. **Recent. Prog. Medicine** v. 85, n<sup>o</sup> 6, p. 340-7, junho 1994.

GENARO O, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis for dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi* in Brazil. **Acta**

**Parasitology** Turcica; 21 Supplement 1: 93, 1997.

GINZINGER G.D. Gene quantification using *real time* quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**; v 30,p 503-512,2002.

GUERIN, P. T., et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet**, v. 2, p. 494-501, 2002.

GLEISER, C. A., et al. Visceral leishmaniasis in a dog imported into the United States. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, p. 227-231, 1957.

GRADONI L et al. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VII. Studies on the role of the black rat, *Rattus rattus*, in the epidemiology of visceral leishmaniasis. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene** .v 77, p.427-431, 1983.

GONTIJO CMF & MELO MN. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira Epidemiologia**. n 7, p.338,2004.

HIGUCHI, R.; et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (NY)**, v.11, n.9, 1026-30, 1993.

IVERSON, L. B., et. al. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana no município de São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, p. 310-317, 1983.

JERONIMO, S. M. B. et al. An Emerging Peri-Urban Pattern of Infection with *Leishmania chagasi*, the Protozoan Causing Visceral Leishmaniasis in Northeast Brazil. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 36, p. 443-449, 2004.

JULIÃO, F. S. et al. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 319-324, 2007.

JULIÃO, F. S. **Uso de método de Biologia Molecular quantitativo (PCR *real-time*) na avaliação de reservatórios para a Leishmaniose Visceral** 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina investigativa). Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia. 2011.

KIRKPATRICK, C. E. et al. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: Experimental infections in domestic cats. **Experimental Parasitology**, v. 58, p. 125-131, 1984.

KUBISTA M et al. The *Real time* Polymerase Chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**. V, 27,p 95 -125,2006.

LACHAUD L. et al. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Journal Clinical**, v 2, p 613-617, 2001.

LAINSON, R.et al. Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para state, Brazil. **Transactions Royal Society Tropical**



**Medicine** Hygiene, v. 63, p. 741-745, 1969.

LAINSON R, SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In W Peters, R Killick-Kendrick (eds), **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, Vol. 1, Academic Press, London, p. 1-120, 1987.

LAINSON, R. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: Demography and Vector-borne Disease. M.W. Service, ed. **Boca raton: CRC Press**, p.85-106, 1989

LAINSON, R., et al. Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 135-137, 1990.

LEITE, R S et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, v.170, p.201-206, 2010.

LEON, W., D. L. FOUTS, et al. Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. **Nucleic Acids Research**, v.5, n.2, Feb, p.491-504. 1978.

LIMA, W. G. et al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, v. 92, p. 43–53, 2004.

LINHARES, G. F. C. et al. Relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 69-72, 2005.

LUKES J, MAURICIO IL, SCHONIAN G. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. n 22, p. 9375-9380, 2007.

MACEDO,I et al. Sazonalidade de Flebotomíneos em Área Endêmica de Leishmaniose Visceral No Município De Sobral, Ceará, Brasil. V, 2 p,67-74,2008.

MANNA, L. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.125, p.251-262, 2004.

MANNA, L. et al. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.142, p.271-280, 2006.

MANNA, L. et al. *Real –Time* PCR assay in *Leishmania* - infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **The Veterinary Journal**, v.177, p.279-282, 2008.

MANNA, L. et al Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Research Veterinary Science**., v 87, p 76-8, 2009.

MANCIATI F, et al. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical form of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Transactions

Royal society. **Tropical Medicine Hygiene** 82,p 566-567,1988.

MARGONARI C; F. C. R. et. al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 31-38, 2006.

MAROLI M, P. M. G., et al. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, 145, p. 357–360, 2007.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977 – 1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 349-57, 1985.

MARY, C. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR assay with high sensitivity. **Journal Clinical Microbiology**, v.42, n.11, p.5249-5255, 2004.

MAURICIO, I.L. et al.The stranger case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v.16, p.188-189, 2000.

MATHUR, P. & SAMANTARAY, J. C. The first probable case of platelet transfusion-transmitted visceral leishmaniasis. **Transfusion Medicine**, v. 14, p. 319–321, 2004.

MENDES, W. S., et al. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 227-231, 2002.

MESTRE, G. L. C. & FONTES, C. J. F. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 42-48, 2007.

MICHALSKY, E. M. et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 67–76, 2007.

MIKAEILI F et al. Comparison of serological methods (ELISA, DAT and IFA) for diagnosis of visceral leishmaniasis utilizing an endemic strain. **Iran Jounal Immunology**. n 4, p.116-121, 2007.

MISSAWA, N. A., et al. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365-368, 2008.

MORAES-SILVA, E. et al. Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. Infantum* infection. **Acta Tropica**, v. 98, p. 176–182, 2006.

MOREIRA, M. A. B., et al. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 2, p. 103-106, 2002.

MOREIRA, M.A.B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v 145, p 245-252, 2007.

MORRISON, A. C., et al. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colômbia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 68-75, 1993.

MORTARINO M, et al. Quantitative PCR in diagnosis of *Leishmania*. **Parassitologia**, v 46, p 163-167, 2004.

MUKHTAR, M. M., et al. Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminary report. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 33-36, 2000.

NASCIMENTO, M. D. S. B., et al. Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da leishmaniose visceral no estado do Maranhão – Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 3, p. 233-240, 1996.

NAKATANI M. et al. Avaliação da sensibilidade do teste rápido (TRALd) para detecção de anticorpos anti- *Leishmania* com o novo antígeno k26 adicionado ao k39. **Revista Brasileira Medicina Tropical**; Suplemento: 10 2001.

NEVES, D. P., et al. Parasitologia Humana. 9<sup>o</sup> ed. **Editora Atheneu**. São Paulo; 1997. Capítulos 06 e 09.

NICOLAS, L., et al. *Real time* PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology** 40, 1666–1669, 2002.

OLIVEIRA, A. G., et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 869-874, 2006.

PALATNIK-DE-SOUZA, C.B et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, p.510-517, 2001.

PAREDES, R. R., et al. Leishmaniasis in HIV infection. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n. 1, p. 39-49, 2003.

PARANHOS-SILVA, M., et al. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 1, p. 39-44, 1996.

PASSOS DIAS FO et al. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública** 19, p.1373, 2003.

PEDROSA, C. M. & ROCHA, E. M. Clinical and epidemiological aspects of visceral

leishmaniasis in children up to 15 years of age in Alagoas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 300-304, 2004.

PESSOA, S. B. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1972.

PROFETA DA LUZ, Z.M.et al. Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, p.249-254, 2001.

QUARESMA, P. F., et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by *real time* PCR. **Acta Tropica**, v.111, p.289-294, 2009.

QUINNELL, R. J., et al. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 6, p. 195-200, 1992.

QUINNELL RJ, et al. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. **Parasitology**. V115,p143-56,1997.

QUEIROZ, N. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v.19, p.34-40, 2010.

RACHAMIM, N., et al. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: Comparison of three methods. **Animals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 85, n. 5, p. 503-508, 1991.

RASSAM, M. B. & AL-MUDHAFFAR, S. A. Comparative diagnostic study of kala azar. **Animals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 74, n. 3, p. 283-287, 1980.

RAJASEKARIAH, G. H. R. Worldleish II: impressions from a 'new leishmaniac'. **TRENDS in Parasitology**, v. 17, n. 9, p. 403-405, 2001.

REALE S. et al. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymphnode aspirates and blood. **Journal Clinical Microbiology**. v 37.p 2931-2935, 1999.

REIS, A.B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are Associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research Veterinary Science**, v.81, p.68-75, 2006.

REITHINGER, R. & DAVIES, C. R. Canine leishmaniasis: Novel strategies for control. **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 7, p. 289-290, 2002.

REY, L. Parasitologia. *Leishmania* e Leishmaniasis: Os parasitos. **Editora Guanabara Koogan AS**. 3<sup>o</sup> m. Rio de Janeiro, 2001. Capítulos 15 a 19.

ROLÃO, N et al. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by *real time* polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme – linked immnusorbent assay. **Journal Parasitology**,v 5,p 1150-1154,2004.

RUIZ-PIÑA, H. & CRUZ-REYES, A. The opossum *Didelphis virginiana* as a Synanthropic Reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 613-620, 2002.

RYAN JR, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **Journal Clinical Microbiology**, n 40, p.1037-1043, 2002.

SANCHEZ, M et al. Detection of *Leishmania Infantum* Kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infection: relationship between polymerase chain reaction results and other leishmania infection markers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V, 70, p 545-548, 2004.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. **Nota técnica nº. 007/2010/DIVE/SES**. Disponível em: <[http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/noticias/2010/nota\\_tecnica\\_lvc\\_fpolis.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/noticias/2010/nota_tecnica_lvc_fpolis.pdf)>. Acesso em: 24 jan. 2011.

SANTOS, S. O. et al. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato grosso do Sul State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 633-634, 2003.

SAVANI, E. S. M. M., et al. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 2, p. 260-262, 2003.

SERGENT, E. D. et al. La leishmaniose a alger infection simultanée d'un enfant d'un chien et d'un chat dans la meme habitabion. **Bull Society Pathology Exot**, n. 5, p. 93-98, 1912.

SILVA LJ. O conceito de espaço na epidemiologia das doenças infecciosas. **Cadernos de Saúde Pública**, n 13, p.585-593, 1997.

SILVA, E.S., et al. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

SILVA, A. V. M. et al. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 324-328, 2005.

SILVA, F. L., et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 55–59, 2009<sup>a</sup>.

SILVA, S. M., et al. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 159–162, 2009<sup>b</sup>.

SILVA, S. M., et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Preventive Veterinary**

**Medicine**, v. 97, p. 131–133, 2010.

SILVEIRA, F. T., et al. Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 6, p. 830-832, 1982.

SIRENA, M. G. A., et al. Leishmaniose visceral, 1º caso autóctone no Rio Grande do Sul. **Boletim Epidemiológico: Núcleo Hospitalar de Epidemiologia Hospital Nossa Senhora da Conceição**. v. 2, n. 4, 16p., 2009.

SINGH, S. P., et al. Risk factors for visceral leishmaniasis in India: further evidence on the role of domestic animals. **Tropical Medicine and International Health**, v 15 (supl. 2), p 29–35, 2010.

SOLANO-GALLEGO, L et al. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal Clinical Microbiology**, v.39, p.560-3, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L., et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 315–319, 2007.

SOUZA, M. B. et al. Ausência da *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no município do Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 6, p. 1881-1885, 2003.

SOUZA, V. M. M., et al. Estudo Epidemiológico de um Surto de Leishmaniose Visceral numa Área de Manguezal. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 76, n. 1, p. 14-24, 2006.

SUNDAR S, PAI K, SAHU M. Immunochromatographic strip test detection of anti K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. **Annals Tropical Medical Parasitology**, 96: 19-23, 2002.

SCOTT, J. M., et al. A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 3, p. 272-277, 1991.

SCORZA, J. V., et al. *Didelphis marsupialis*: reservorio primario de *Leishmania* sp. En la ciudad de Trujillo, Venezuela. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 36, p. 194-200, 1984.

SCHULTZ, A. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic leishmania organism by fluorescence resonance energy transfer based *real time* PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v 4.p 1529-1535, 2003.

SHAW, J. J. Animal reservoirs of *Leishmaia* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83 (Supl), p. 486-490, 1988.

SHERLOCK, I. A., et al. Natural infection of the opssum *Didelphis albiventris* (Marsupialia,

Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 511, 1984.

SHERLOCK, I. A., et al. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia.VI – Investigações sobre reservatórios silvestres e comensais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 1, p. 23-27, 1988.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.

TAVARES, L. M. S. A. & TAVARES, E. D. Incidência, Distribuição Geográfica e Aspectos Ambientais das Áreas Endêmicas da Leishmaniose Visceral em Sergipe. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 1, p. 47-52, 1999.

TÁVORA MPF et al. Estudo de validação comparativo entre técnicas ELISA e RIFI para diagnosticar *Leishmania sp* em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, n 40, p.482-483, 2007.

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

TRAVI, B. L. et al. *Didelphis marsupialis*, an Important Reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 50, n. 5, p. 557-565, 1994.

TRAVI, B. L. et al. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: Clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of new world visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 88, p.73-75, 1998.

TRAVI, B. L, et al. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 64, n. 3 e 4, p. 119–124, 2001.

VAN EYS et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Molecular Biochemical Parasitology**, v.51, n.1, Mar, p.133-42. 1992.

VIEIRA JBF, COELHO GE. Leishmaniose Visceral ou Calazar: Aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista. Sociedade. Brasileira. Medicina. Tropical**. n 34, p.90, 1998.

VITALE, F et al. Taq Man-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. **Annals New York Academy Sciences**, v.1026, p.139-143, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/en\\_](http://www.who.int/leishmaniasis/en_)>. Acesso em 28 de janeiro de 2008

YANG & ROTHMAN. PCR based diagnostic for inactions diseases: uses limitations and future applications in acute acore settings. **The Lancet**,v 4,p 337-348,2004.

YAMAMOTO, Y. I. et al. Estudo da eficiência das reações de imunofluorescência e de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 143-152, 1988.

ZELEDON R et al. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) and possibilities of the existence of visceral leishmaniasis in Costa Rica. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, n 79, p.455, 1984.

ZIJLSTRA EE, et al. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant k39 strip test: experience from the Sudan. **Tropical Medicine and International Health**; v 6: 108-13, 2001.

ZULUETA, A.M. et al. Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in a endemic focus in Eastern Venezuela. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.61, n.6, p.945-950, 1999.

XAVIER, S.C et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **Biomedcentral Veterinary Research**, v.8, p.2-17, 2006.

XIMENES, M. F. F. M., et al. Density of sandfly (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4, p. 427-432, 1999.