

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS

**Ensaio Imunoenzimático aplicado para a redução de ligações  
inespecíficas e de imunocomplexos na Leishmaniose Visceral Canina**

**Verissa Martins Teixeira**

Goiânia – GO  
2010

**Verissa Martins Teixeira**

**Ensaio Imunoenzimático aplicado para a redução de ligações inespecíficas e de imunocomplexos na Leishmaniose Visceral Canina**

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica**, oferecido numa associação entre a Pontifícia Universidade Católica de Goiás, a Universidade Estadual de Goiás e o Centro Universitário de Anápolis, para obtenção do título de mestre.

**Orientadora: Dra. Dulcinéa Maria Barbosa Campos.**

Goiânia – GO  
2010

T266e Teixeira, Verissa Martins.

Ensaio imunoenzimático aplicado para a redução de ligações inespecíficas e de imunocomplexos na leishmaniose visceral canina / Verissa Martins Teixeira. – 2010.

67 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Universidade Estadual de Goiás, Centro Universitário de Anápolis, Goiânia, 2010.

“Orientação: Profª. Drª. Dulcinéia Maria Barbosa Campos”.

Bibliografia.

1. Teste imunoenzimático. 2. Leishmaniose visceral – Tocantins. 3. Diagnóstico de laboratório. 4. Cão – doenças. I. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. II. Universidade Estadual de Goiás. III. Centro Universitário de Anápolis. IV. Campos, Dulcinéia Maria Barbosa. V. Título.

CDU: 616.993.161(043.3)

DISSERTAÇÃO DO MESTRADO PROFISSIONAL EM GESTÃO,  
PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM TECNOLOGIA  
FARMACÊUTICA

DEFENDIDA PELA MESTRANDA VERISSA MARTINS TEIXEIRA,  
EM 01 DE OUTUBRO DE 2010, CONSIDERADA  
aprovada PELA BANCA EXAMINADORA.

1) Dra. Dulcinea Maria Barbosa Campos / Uni Evangélica (Presidente)



2) Dra. Gisner Alves de Sousa Pereira / Uni Evangélica (Membro Externo)



3) Dr. Gilberto Benedito Aquino / UEG (Membro Interno)



*Trabalho dedicado*

*à Raimunda Martins Teixeira, a mãe, a mulher, a fonte de  
admiração e inspiração.*

*e ao mais novo impulso para aprender e crescer. O meu presente!*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por tudo que me proporciona e por participar em todos os momentos de minha vida.

À **Fundação de Medicina Tropical do Tocantins (FMT-TO)** pelo apoio institucional e financeiro dispensado, primordiais para a realização da pesquisa.

Ao Prof<sup>o</sup> **Dr. Heitor Franco de Andrade Junior** pela ajuda sempre dispensada, sendo figura essencial para realização desta conquista.

À **Dra. Dulcinéa Maria Barbosa de Campos**, pelo apoio, compreensão e orientação neste trabalho.

À **toda a equipe do laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo**, pela grandiosa colaboração na realização da etapa experimental da pesquisa, em especial a Camila Aparecida Carvalho, Roselaine Pereira Alvim Carvalho, Luciana Regina Meirelles e Andrés Galisteo Gimenez Junior.

Aos profissionais do **Centro de Controle de Zoonose de Araguaína** e aos veterinários **Adriana Genellu, Arivan Arrais e Dr. Cláudio Henrique Clemente Fernandes**.

A **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Almeida e Silva do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/ Universidade Federal de Goiás**, ao **Dr. Joenes Peluzio da Universidade Federal do Tocantins** e ao **Msc. Hebert Lima Batista da FMT** pelo relevante auxílio em estatística.

Ao **Setor de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolf Lutz** e ao **Dr. Roberto Hiramoto**, pela colaboração na realização de testes experimentais.

Ao **Governo do Estado do Tocantins** por meio da **Secretaria de Ciência e Tecnologia**, pelo apoio financeiro.

A todos os **docentes do Mestrado Profissionalizante em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica**, por todo o aprendizado que proporcionaram.

A todos os **discentes do mestrado** pelo companheirismo, apoio e incentivo dispensados e pelos momentos de descontração comungados.

A amiga **Celina Fernandes Sales**, por estar sempre presente, incentivando e oferecendo apoio.

Aos **colegas da FMT-TO**, pelas sugestões e conselhos oportunos.

A todos aqueles que, não citados nominalmente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

*"De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre começando; a certeza de que é preciso continuar; a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar; Portanto devemos: fazer da interrupção um caminho novo; da queda um passo de dança; do medo, uma escada; do sonho, uma ponte e da procura... um encontro".*

*Fernando Sabino*

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV), enfermidade de ampla distribuição, torna-se relevante pela alta incidência e letalidade relatadas em diferentes países do mundo. O Brasil acompanha a tendência global, com 21 unidades federadas atingidas. No estado do Tocantins são altos os índices da doença, especialmente na cidade de Araguaína, encontrada entre as mais prevalentes do país. A LV comporta-se como uma típica zoonose, tendo um flebótomo como vetor e o cão como o principal reservatório. Na área urbana esses canídeos são considerados a principal fonte de infecção devido ao alto parasitismo cutâneo e à proximidade ao homem. A epidemia canina é ainda importante por geralmente preceder a epidemia humana. O diagnóstico da infecção humana e canina baseia-se principalmente em métodos sorológicos, entre eles se destaca o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Devido ao caráter endêmico da doença, torna-se primordial que métodos diagnósticos mais efetivos sejam disponibilizados. Com o objetivo de fornecer resultados mais seguros e livres de interferentes, como reações inespecíficas e imunocomplexos, frequentemente observados no imunodiagnóstico da LV humana e canina, realizou-se através deste trabalho, variações de Ensaio Imunoenzimático em amostras de soro de 140 cães procedentes de região endêmica do estado do Tocantins. Para verificar se havia reações inespecíficas em testes ELISA adicionou-se ureia como diluente das amostras. Observou-se a diminuição das densidades ópticas das amostras testadas, presumindo que houve a quebra de ligações fracas ou de anticorpos de baixa avidéz. Para avaliar a interferência de imunocomplexos no ensaio ELISA foram adicionados Glicina e Tris, com choque de pH, constatando-se que houve aumento do título das absorbâncias. Estes resultados sugerem que o método é efetivo para eliminar os anticorpos complexados, antes bloqueados por antígenos circulantes. Acredita-se que os resultados obtidos através deste trabalho sejam relevantes na perspectiva da busca constante pelo aprimoramento diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias.

**Palavras-chave:** leishmaniose visceral, cães, diagnóstico laboratorial, ELISA, imunocomplexos.



## ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL), a widespread disease, becomes relevant for its high incidence and lethality in different countries around the world. Brazil follows the global trend, reaching 21 federate units. In the state of the Tocantins the illness indices are high, especially in the city of Araguaína, among the most prevalent of the country. The VL behaves as typical zoonose, the sandflies as vector and the dog as the main reservoir. In the urban area these canids are considered the main infection source due to the high skin parasitism and the man proximity. The canine epidemic is still important for it generally comes from the human epidemic. The diagnosis of the human and canine infection is mainly based on serological methods, in which the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) stands out. Due to the illness endemic character, the more effective diagnostic methods became primordially available. Aiming to provide safer results free of interferences, as unspecified and immune complex reactions, frequently observed in the immune diagnostic of the human and canine VL, accomplished in this research, variations of the ELISA in serum samples from 140 dogs from the Tocantins endemic region. Verifying if there are unspecified reactions in the ELISA tests urea was added to the samples as diluents. The reduction of the optic densities was observed in the tested samples, presuming that it was break in the weak links or of low antibodies. Glicine and Tris were added to evaluate the interference of the immune complexes in the ELISA test to evaluate the interference with the pH shock, proving that there was an increase of the absorbing rate. These results suggest that method is effective to eliminate the complex antibodies, which had been blocked by circulating antigens. It is believed that the results acquired in this work are relevant in the perspective of the constant search for the diagnostic improvement of infectious and parasitic illnesses.

**Keywords:** visceral leishmaniasis, dogs, laboratory diagnosis, ELISA, immune complexes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	15
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do ELISA convencional (A) e sua visualização em placa de microtitulação (B), onde P: reação positiva e N: reação negativa.....	31
<b>Figura 3.</b> Localização do estado do Tocantins, destaque para o município de Araguaína (A) e cidade de Araguaína-TO (B).....	38
<b>Figura 4.</b> Cão apresentando fotofobia, lesões cutâneas, úlceras nas orelhas e focinho e apatia. Ao fundo, presença cão com sinais semelhantes. Animais encontrados pela equipe do CCZ ao realizar inquérito epidemiológico.....	39
<b>Figura 5.</b> Local de moradia dos animais com suspeita clínica de LVC. Residência localizada na área urbana do município de Araguaína-TO, apresentando grande quantidade matéria orgânica. Galinheiro ao fundo.....	40
<b>Figura 6.</b> Dispersão de absorbâncias por emprego do teste ELISA “Clássico” em 140 amostras de soros de cães procedentes de Araguaína-TO, durante o ano 2009.....	44
<b>Figura 7.</b> Dispersão de absorbâncias por emprego dos testes ELISA “Clássico” e ELISA “Ureia” em amostras de soros de 140 cães procedentes de Araguaína-TO durante o ano de 2009.....	45
<b>Figura 8.</b> Dispersão de absorbâncias por emprego dos testes ELISA “Clássico” e ELISA “Glicina-Tris” em amostras de soros de 140 cães procedentes de Araguaína-TO durante o ano de 2009.....	46
<b>Figura 9.</b> Repetibilidade entre os testes ELISA Clássico e ELISA Glicina-Tris aplicados em amostras de soros de 140 cães procedentes de Araguaína-TO durante o ano de 2009, utilizando o Coeficiente de Correlação Interclasses.....	47
<b>Figura 10.</b> Repetibilidade entre os testes ELISA Clássico e ELISA Ureia aplicados em amostras de soros de 140 cães procedentes de Araguaína-TO durante o ano de 2009, utilizando o Coeficiente de Correlação Interclasses.....	47
<b>Figura 11.</b> Representação dos deltas dos ELISA Ureia e ELISA Glicina-Tris realizados em amostras de soro canino de 140 cães provenientes de Araguaína-TO. Onde: Delta ELISA Ureia representa ELISA Ureia – ELISA Clássico, e Delta ELISA Glicina-Tris representa ELISA Glicina-Tris – ELISA Clássico.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	- Microgramas
µL	- Microlitros
µm	- Micrômetros
CCZ	- Centro de Controle de Zoonoses
DAT	- Teste de Aglutinação Direta (DAT – do inglês <i>Direct Agglutination Test</i> )
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
DO	- Densidade Óptica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
ELISA	- Ensaio imunoenzimático (ELISA – do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )
FAST	FAST (do inglês <i>Fast Agglutination-screening Test</i> )
FMTTO	- Fundação de Medicina Tropical do Tocantins
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de Hidrogênio
HCl	- Ácido Clorídrico
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Adquirida
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDH	- Índice de Desenvolvimento Humano
IMT/FM/USP	- Instituto de Medicina Tropical / Faculdade de Medicina / Universidade de São Paulo
LC	- Leishmaniose Cutânea
LMC	- Leishmaniose Mucocutânea
LV	- Leishmaniose Visceral
LVC	- Leishmaniose Visceral Canina
LVH	- Leishmaniose Visceral Humana
M	- Molar
mL	- Mililitros
mm	- Milímetros
nm	- Nanômetros
°C	- Graus centígrados
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OPD	- Orto-fenilenodiamina
PBS	- Solução salina tamponada com fostados
PBSTL	- Solução salina tamponada com fostados, adicionada a Tween e Leite
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - do inglês <i>Polimerase Chain Reactton</i> )
pH	- Potencial hidrogeniônico
RFC	- Reação de Fixação do Complemento
RIFI	- Reação de Imunofluorescência Indireta
RPM	- Rotações por Minuto
Tris	- Tris (hidroximetil) aminometano
WB	- Western Blotting

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 ASPECTOS GERAIS.....	13
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO.....	14
<b>1.2.1 Ciclo biológico do parasito</b> .....	<b>15</b>
1.3 TRANSMISSÃO E VETORES .....	16
1.4 RESERVATÓRIOS.....	18
1.5 ASPECTOS CLÍNICOS.....	20
<b>1.5.1 A doença do homem</b> .....	<b>20</b>
<b>1.5.2 A doença no cão</b> .....	<b>21</b>
1.6 EPIDEMIOLOGIA.....	22
1.7 TRATAMENTO E PREVENÇÃO.....	24
1.8 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	27
<b>1.8.1 Diagnóstico Clínico</b> .....	<b>27</b>
<b>1.8.2 Diagnóstico Laboratorial</b> .....	<b>28</b>
1.8.2.1 Métodos Parasitológicos.....	28
1.8.2.2 Métodos Sorológicos.....	29
1.8.2.3 Métodos Moleculares.....	34
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
3.1 ÁREA DE ESTUDO.....	38
3.2 LOCAL DE TRABALHO.....	39
3.3 ANIMAIS.....	39
3.4 OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS SOROS.....	40
3.5 MÉTODOS DE EXAME.....	40
<b>3.5.1 Enzyme Linked immunosorbent assay (ELISA)</b> .....	<b>40</b>
3.5.1.1 ELISA Clássico.....	40

3.5.1.2 <i>ELISA Ureia</i> .....	41
3.5.1.3 <i>ELISA Glicina-Tris</i> .....	42
3.6 ORGANIZAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS.....	43
<b>4 RESULTADOS</b> .....	44
4.1 ELISA “CLÁSSICO”.....	44
4.2 ELISA “UREIA”.....	44
4.3 ELISA “GLICINA-TRIS”.....	45
4.4 INTERPRETAÇÃO DOS DADOS.....	46
<b>4.4.1 Avaliação da repetibilidade</b> .....	46
<b>4.4.2 Avaliação das diferenças das densidades ópticas</b> .....	48
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>CONCLUSÕES</b> .....	54
<b>PERSPECTIVAS E RESULTADOS ESPERADOS</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS GERAIS

As Leishmanioses são enfermidades parasitárias de distribuição mundial, consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) um grave problema de saúde pública. Formam um grupo de doenças que apresenta grande diversidade de manifestações clínicas, incluindo os três maiores grupos de desordens: Leishmaniose Visceral (LV), Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Mucocutânea (LMC) (OMS, 2007).

A forma visceral é mais severa, fatal se não tratada adequadamente. É uma doença grave e crônica que se caracteriza por atingir principalmente órgãos ricos em fagócitos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea, podendo levar ao óbito número significativo de casos (GONTIJO; MELO, 2004).

A LV foi descrita pela primeira vez na Grécia em 1835, sendo caracterizada como uma doença febril, que provocava anemia e esplenomegalia e que acometia principalmente crianças. A partir de 1869, na Índia, a doença denominada como Kala-azar (doença negra), denominação hindu, dada em razão dos acometidos apresentarem com frequência uma pigmentação escurecida da pele, observada facilmente em indianos de pele clara (DEANE, 1956; MARZOCHI *et al.*, 1981).

A evidenciação de estruturas ovais com 2 a 3µm de diâmetro em esfregaços de sangue de pacientes foi relatada por Willian Boog Leishman em 1900. Posteriormente, em 1903 James Donovan observou estruturas semelhantes às encontradas por Leishman em esfregaço esplênico, sugerindo que se tratava do agente etiológico causador da infecção (NEVES, 1998; VERONESI; FOCACCIA, 1996).

No Brasil, o primeiro relato de Leishmaniose Visceral Humana (LVH) foi descrito em 1913, quando um imigrante italiano que vivia em Santos-SP adoeceu após viajar para o Mato Grosso, tendo a doença diagnosticada no Paraguai (MIGONE, 1913). Entretanto, o marco inicial dos estudos sobre a doença no Brasil se configura com o trabalho de Penna (1934), quando encontrou leishmanias em fragmentos de fígado humano colhido “post-mortem” de suspeitos de febre amarela. Na publicação, 40.000 pacientes foram pesquisados em todo o Brasil, onde foram encontrados 41 casos de LV.

Já o envolvimento de um vetor inseto para a doença foi observado por John Sinton quando, na Índia, verificou a coexistência de insetos hematófagos e de doentes com leishmaniose visceral em uma região endêmica. Amparado em suas constatações Sinton publicou seus relatos entre 1924 e 1925 (CHELALA, 2004 *apud* SILVA, 2007)

A infecção de cães foi apontada inicialmente por Nicolle e Comte (1908). Entretanto, nas Américas, animais infectados por LV foram inicialmente observados por Chagas *et al.* (1938) no Estado do Pará. Um reservatório silvestre para a doença foi relatado por Deane e Deane (1954a) quando constataram a infecção de uma raposa (*Lycalopex vetulus* Lund, 1842) em uma zona endêmica do estado do Ceará. Logo depois os mesmos pesquisadores verificaram a atuação do flebótomo *Phlebotomus longipalpis* como vetor da LV (DEANE; DEANE, 1954b).

A expansão da LV e a constatação da presença de cães infectados nos focos da doença humana levaram ao reconhecimento do animal como importante agente disseminador da enfermidade (BRASIL, 2006).

## 1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

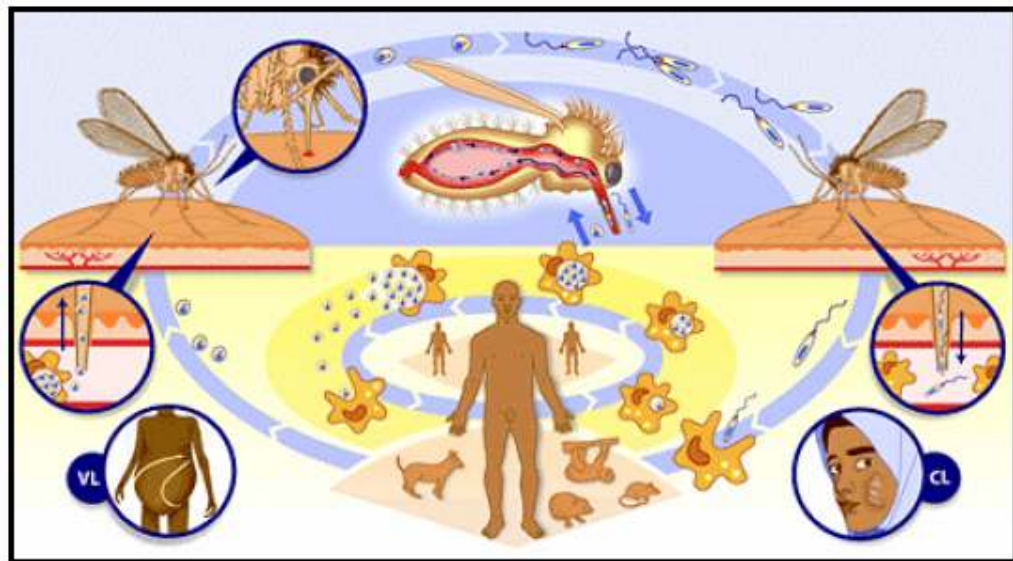
Doença zoonótica e antroponótica de considerada relevância, a leishmaniose visceral é causada por protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Tripanosomatidae*, gênero *Leishmania* Ross, 1903 e subgênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1987). As espécies causadoras da doença estão agrupadas no complexo *donovani*, sendo representadas pela *Leishmania (Leishmania) donovani* Laveran e Mesnil, 1903 e *Leishmania (Leishmania) infantum* (NICOLLE, 1908) no Velho Mundo e pela *Leishmania (Leishmania) chagasi* no Novo Mundo (CUNHA; CHAGAS, 1937).

Muito tem se discutido a respeito da origem e semelhança genética das espécies *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*. Métodos genéticos e enzimáticos demonstraram que estas espécies estão intimamente relacionadas, e alguns estudos defendem que são a mesma espécie com origem recente nas Américas, devido a colonização europeia. Estes achados indicam que a nomenclatura correta para os agentes do Novo Mundo seria *L. (L.) infantum* (RIOUX *et al.*, 1990; CUPOLILLO; GRIMALDI JUNIOR; MOMEN, 1994; MAURÍCIO; STOHARD; MILES, 2000). Por outro lado, a distinção das espécies tem sido justificada em estudos que se baseiam nas diferenças fenotípicas e genotípicas das mesmas e na presença de canídeos

infectados originados da Amazônia há milhões de anos, sugerindo neste caso uma origem autóctone. Baseados neste argumento os estudiosos defendem que o agente etiológico da LV no Novo Mundo seria *L. (L.) chagasi* (SHAW, 1994; LAINSON *et al.*, 1987).

### 1.2.1 Ciclo biológico do parasito

A transmissão natural da *Leishmania* spp ocorre através da picada de um vetor infectado que inocula formas promastigotas do parasito na pele do hospedeiro vertebrado no momento do repasto sangüíneo (Figura 1).



**Figura 1:** Ciclo biológico de *Leishmania* spp  
Fonte: WHO/TDR, 2005

Os parasitos causadores da LV possuem ciclo heteroxênico, que acontece, parte no inseto vetor e parte em diferentes espécies de mamíferos hospedeiros.

O vetor, após ingerir células parasitadas, tem no seu trato digestivo anterior o rompimento dos macrófagos liberando as formas amastigotas. Estas reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas (BRASIL, 2006).



Após este período, os vetores infectantes ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (BRASIL, 2006).

### 1.3 TRANSMISSÃO E VETORES

A principal forma de transmissão do parasito é por meio da picada de fêmeas de pequenos dípteros da família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros.

Nas Américas a espécie *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 é considerada a maior responsável pela transmissão da LV, porém espécies como *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia evansi* já foram encontradas parasitadas, atuando como vetores de importância secundária (BARATA *et al.*, 2004; MARCONDES; LOZOVEI; VILELA, 1998, GALATI *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 1998). *Lutzomyia longipalpis* é um vetor efficientíssimo da *L. chagasi* e, segundo Rangel (2006), é o único no conjunto dos transmissores das leishmanioses a cumprir todos os critérios estabelecidos para avaliação de competência vetorial.

Apesar do vetor ser massivamente estudado, alguns estudos têm sugerido que *Lu. longipalpis* não seria somente uma espécie, mas um complexo (BAUZER *et al.*, 2007).

*Lu. longipalpis* mede de 1 a 3 mm de comprimento, tem o corpo revestido por finas cerdas de coloração clara e é reconhecido pela característica de voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas (BRASIL, 2006). São vetores de grande facilidade de adaptação a diversos ambientes, sendo encontrados em ambiente domiciliar e peridomiciliar próximos às suas fontes de alimento. A fêmea tem hábitos antropofílicos, pois necessita das proteínas e aminoácidos presentes no sangue para o desenvolvimento dos ovos; os machos não são hematófagos.

A infecção dos flebotomos ocorre no momento em que a fêmea, ao fazer o repasto sanguíneo, ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*.

Estes insetos são extremamente eficientes na transmissão do parasito e isto é creditado, principalmente, aos componentes de sua saliva que contém substâncias vasodilatadoras e imunossupressoras (BRAZIL; GOMES BRAZIL, 2003).

De acordo com Gomes *et al.* (1989) as alterações ambientais ocasionadas pelo homem e, como consequência, a dispersão de animais silvestres que serviam como fonte de alimentação aos insetos, causam a adaptação de muitas espécies a diferentes ambientes. A proximidade do homem às zonas de floresta e a criação de animais domésticos atraem um grande número de espécies de flebotomíneos ao peridomicílio. Uma vez atraídos, eles se estabelecem nessas áreas podendo manter o ciclo de transmissão entre animais domésticos e em humanos.

Existe uma variação sazonal da densidade de *Lu. longipalpis*. Apesar da espécie ocorrer durante todo o ano, há indício de que o período de maior transmissão da leishmaniose visceral ocorra durante e logo após a estação chuvosa, quando há aumento da densidade populacional do inseto (BRASIL, 2006).

A atividade dos flebotomíneos é crepuscular e noturna. Durante o dia, estes insetos ficam em repouso, em lugares sombreados e úmidos, protegidos do vento e de predadores naturais (BRASIL, 2006). No intra e peridomicílio, *Lu. longipalpis* é encontrada principalmente próximas a uma fonte de alimento, o que demonstra o caráter oportunista da espécie. As fêmeas alimentam-se preferencialmente em aves e roedores, mas também em humanos, gambás, bois, cavalos e cães (MISSAWA; LOROSA; DIAS, 2008).

Nas Américas *Lu. longipalpis* é encontrada desde o México até a Argentina. No Brasil, a espécie é o principal vetor e parece estar em expansão, quer por sua capacidade vetorial, quer por sua ampla distribuição geográfica (DEANE, 1956; ARAÚJO E SILVA; ANDREOTTI; HONER, 2007; DEANE; DEANE, 1954b), sendo atualmente encontrada em quatro das cinco regiões geográficas: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2006).

Nas regiões Norte e Nordeste, o flebotomíneo era encontrado originalmente nas matas participando do ciclo primário de transmissão da doença. Progressivamente houve adaptação desse inseto para o ambiente rural e sua adaptação a este ambiente foi somada à presença de animais silvestres e sinantrópicos (BRASIL, 2006).

Pouco se sabe a respeito da fauna flebotomínica do estado do Tocantins. No então norte do estado de Goiás, Lustosa *et al.* (1986) identificaram as espécies *Lu. whitmani* e *Lu. gomezi* (Nitzulescu) em áreas pouco populosas, e Andrade-Filho *et al.* (2001) em cidades do centro e sul tocantinense apanharam 32 espécies, onde as mais capturadas foram as *Lu. whitmani* (53%) e *Lu. longipalpis* (25,2%). Apesar de poucas publicações a respeito, sabe-se que *Lu. longipalpis* apresenta-se bem distribuída no Tocantins, sendo registrada em 64 (46%) dos 139 municípios que compõem o Estado (TOCANTINS, 2006 apud GOMES, 2008), com Araguaína classificada como município de transmissão intensa com a presença de vetor, de acordo com a estratificação epidemiológica dos municípios do estado do Tocantins segundo registro de *Lu. longipalpis*.

Gomes (2008) ao realizar capturas de flebotomíneos em 70 localidades (93% urbana e 7% rural) do município de Araguaína - TO encontrou uma variedade de 27 espécies, com maior frequência para *Lu. longipalpis* (70,9%), *Lu. whitmani* (11,1%) e *Lu. bourrouli* (8,1%). Ao contrário de Andrade-Filho *et al.* (2001), Gomes (2008) identificou a zona rural como a fonte da maior diversidade de espécies e em ambos os estudos o peridomicílio apresentou maior número de exemplares capturados.

Outras formas de infecção humana que não envolvem vetores são relatadas como a ocorrência de transmissões vertical (mãe-filho) e transmissão por transfusão sanguínea e transplante (CUMMINS *et al.*, 1995; OMS, 2007). Não ocorre transmissão direta da LV de pessoa a pessoa. Com relação à população canina, alguns autores afirmam que a transmissão é possível de ocorrer por meio da ingestão de carrapatos infectados e mesmo através de mordeduras, cópula, ingestão de vísceras contaminadas, porém não existem evidências sobre a importância epidemiológica destes mecanismos de transmissão para humanos ou na manutenção da enzootia (BRASIL, 2006).

#### 1.4 RESERVATÓRIOS

Devido à complexidade das leishmanioses, o conhecimento de seus reservatórios é de extrema importância para determinar o ciclo natural do parasito e da epidemiologia da doença.

Na enfermidade, os hospedeiros são basicamente vertebrados. Segundo Shaw (1988), há dois tipos principais de hospedeiros vertebrados para a leishmaniose americana.

Hospedeiro primário, o animal que abriga o parasito no ambiente silvestre, sendo responsável pela manutenção da infecção sem a necessidade da co-existência de um outro; e o hospedeiro secundário, um animal parasitado porém incapaz de manter indefinidamente um ciclo enzoótico.

Na área urbana os cães (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) são considerados como a principal fonte de infecção, já no ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* (= *Lycalopex vetulus* Lund, 1842), *Cerdocyon thous* Linnaeus, 1706) e os marsupiais (*Didelphis albiventris* Lund, 1841 e *Didelphis marsupialis*) (DEANE; DEANE, 1954a; SHERLOCK, *et al.*, 1984; TRAVI; JARAMILLO; MONTOYA, 1994; BRASIL, 2006).

Outros animais foram ainda encontrados parasitados por *L. (L.) chagasi*, como roedores (*Rattus rattus* Linnaeus, 1758, *Proechymis canicollis* Alen, 1899, *Proechymis oris* Thomas, 1904 e *Nectomys squamipes* Brants, 1827) e felinos (*Felis catus* Linnaeus, 1758) (LAINSON; SHAW; LINS, 1969; MELLO, *et al.*, 1988; MUKHTAR *et al.*, 2000; SAVANI *et al.*, 2004; LEIVA *et al.*, 2005; DANTAS-TORRES *et al.*, 2006, SILVA, *et al.*, 2008). O fato destes animais possuírem hábitos sinantrópicos poderia promover a ligação entre os ciclos silvestre e doméstico. Outros animais, mesmo não tendo parasitemia por *Leishmania* confirmada, foram relacionados com a LV. Borges *et al.* (2009) constataram que pessoas que abrigavam patos, roedores, pássaros e galinhas em seus domicílios tinham mais chances de contrair a LV.

Entretanto, dentre os reservatórios, ao cão doméstico é dada a maior atenção devido ao elevado parasitismo cutâneo, o que favorece a infecção do vetor, e pela sua proximidade ao homem, principalmente em áreas de progressiva urbanização. Em seus estudos Oliveira *et al.* (2001) demonstraram que a doença humana predominava nas regiões onde se instalara previamente a enzootia canina.

É comum acreditar que pessoas infectadas sejam apenas hospedeiros acidentais da *L. (L.) chagasi*, porém há evidências que indicam que o homem infectado também possa atuar como reservatório da doença para os flebotomíneos em áreas endêmicas (COSTA *et al.*, 2002; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006), especialmente crianças sintomáticas que habitam periferias urbanas (COSTA *et al.*, 1999).

## 1.5 ASPECTOS CLÍNICOS

### 1.5.1 A doença no homem

A infecção pela *L. chagasi* em humanos caracteriza-se por um amplo espectro clínico, que pode variar em manifestações clínicas discretas, moderadas ou graves. Na LVH o período de incubação é de 10 dias a 24 meses, com média entre 2 a 6 meses (BRASIL, 2006).

Considerando a evolução clínica da LVH o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (BRASIL, 2006) dividiu a doença em períodos: período inicial, período de estado e período final, conforme apresentado abaixo.

- **Período inicial:** também chamado de fase aguda caracteriza o início da sintomatologia. Pode variar de paciente para paciente e inclui, na maioria dos casos, febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. Ocasionalmente podem ser relatadas queixas de tosse e diarreia. Em área endêmica, uma pequena proporção de indivíduos, geralmente crianças, pode apresentar um quadro clínico discreto, de curta duração, aproximadamente 15 dias, que frequentemente evolui para cura espontânea (forma oligossintomática).

- **Período de estado:** Caracteriza-se por febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia. Apresenta um quadro clínico arrastado geralmente com mais de dois meses de evolução, na maioria das vezes associado a comprometimento do estado geral

- **Período final:** Se não tratada, a doença evolui progressivamente, com febre contínua e comprometimento mais intenso do estado geral. Na maioria dos casos instala-se a desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca), edema dos membros inferiores que pode evoluir para anasarca, além de hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite.

### 1.5.2 A doença no cão

Proposta primeiramente em cães por Nicolle e Comte (1908), a leishmaniose visceral americana apresenta-se mais prevalente nesses animais do que em humanos. Nas Américas, a doença canina só veio a ser reconhecida com os trabalhos do grupo de Evandro Chagas no estado do Pará (CHAGAS *et al.*, 1938).

Em termos gerais o período de incubação da leishmaniose visceral canina (LVC) varia de 3 meses até vários anos, com média de 3 a 7 meses (BRASIL, 2006) e a evolução pode ser aguda e grave, levando o animal a óbito em poucas semanas, ou como ocorre em alguns animais, a doença pode progredir para cura espontânea (ACEDO-SANCHEZ *et al.*, 1998). As manifestações clínicas estão normalmente dependentes do sistema imunológico do animal infectado (BRASIL, 2006).

Classicamente a LVC apresenta lesões cutâneas, principalmente descamação e eczema, em particular no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras rasas, localizadas mais frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações e pêlo opaco. Com a evolução, observa-se com grande frequência, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além da hiperqueratose. Na fase final da infecção, ocorre em geral a paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo (BRASIL, 2006).

Assim, Brasil (2006) classifica os cães como assintomáticos, quando há ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*; oligossintomáticos, quando são identificados adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pêlo opaco e, sintomáticos, quando estão presentes todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas (alopécia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores.

## 1.6 EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um importante problema de saúde pública. De acordo com o órgão 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção, com registro de 2 milhões de novos casos de diferentes formas clínicas. Estão presentes em 88 países, nos continentes Americano, Europeu, Asiático e Africano, com estimativa de 14 milhões de casos e 59 mil óbitos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2006).

Das leishmanioses, a forma visceral é a que apresenta manifestações clínicas mais graves, de forma que se não diagnosticada e tratada precocemente pode levar a óbito cerca de 90% dos casos (BRASIL, 2006). Estima-se que surjam cerca de 500.000 novos casos e mais de 50.000 mortes de LV a cada ano (DESJEUX, 2004).

Atualmente no Brasil 21 unidades federadas foram afetadas pela variação humana da leishmaniose visceral (BRASIL, 2009a). Em 2009 o país notificou 3.892 casos de LVH, sendo que a região Nordeste representou a maioria dos casos, com 1939 (49,8%) notificações; seguida pelas regiões Sudeste, Norte, Centro-Oeste e Sul, com 824 (21,2%), 774 (19,9%), 345 (8,9%) e 10 (0,3%) casos, respectivamente (BRASIL, 2010).

É bastante discutida a possibilidade da LV ter sido introduzida na Amazônia brasileira por cães infectados acompanhando imigrantes oriundos do Nordeste, porém a limitação de acesso à região amazônica, na ocasião somente via barco ou avião, levantou a possibilidade de uma fonte silvestre autóctone de infecção (LAINSON, 1983; RANGEL; LAINSON, 2003). A partir dos anos 90, os estados do Pará e Tocantins (Região Norte), Mato Grosso do Sul (região Centro Oeste) e Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste) passaram a influir de maneira significativa nas estatísticas da LV no Brasil.

Com a criação do estado do Tocantins em 1989 houve aumento da incidência de LV na região Norte. Isso foi devido às modificações ecoepidemiológicas ocorridas, como a construção da capital, o intenso fluxo migratório e a falta de estrutura básica e sanitária, que propiciaram um ambiente adequado para a urbanização do vetor e a propagação da doença (MACHADO, 2004). Neste estado, a LV humana é notificada desde sua criação; os casos anteriores eram registrados como ocorridos no estado de Goiás.

A leishmaniose visceral canina, assim como a humana, está presente em todo o mundo, tornando-se do ponto de vista epidemiológico tão ou mais importante que a própria

doença humana, já que o cão representa um importante elo no ciclo da transmissão da LV. É considerada uma doença de países subdesenvolvidos, ocorrendo prioritariamente nos bolsões de pobreza, com a maioria dos casos registrada em países da África, Ásia e América do Sul.

No Brasil, vários surtos da epizootia canina foram relatados e, até o presente momento, todos aqueles descritos na literatura estão associados com a presença de cães soropositivos, onde o animal tem sido apontado como o principal responsável pela persistência da LV em várias áreas do planeta (BRASIL, 2009a). Pesquisas realizadas em áreas epidêmicas constataram que a epidemia canina normalmente precede a epidemia humana (CAMARGO-NEVES *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2001; BEVILACQUA *et al.*, 2001) e que quanto maior o número de cães na residência, maior é o risco de ocorrência da doença humana (BORGES *et al.*, 2009).

A ocorrência de surtos de LVC se deu inicialmente em estados da região Nordeste e posteriormente nas demais regiões do país, de forma que a prevalência do parasitismo em cães permanece variável entre as regiões brasileiras, mesmo quando se trata do mesmo estado.

O estado do Tocantins, inserido da região Norte do país, é objeto de atenção do Ministério da Saúde, possuindo municípios considerados áreas de transmissão intensa da LV. No Estado é alto o percentual de cães soropositivos. Em 2008, 63 (45%) dos 139 municípios encaminharam ao Laboratório Central de Saúde Pública amostras de soro canino, totalizando 35.997 análises sorológicas. Destas, 7.580 (21,3%) apresentaram positividade (TOCANTINS, 2009a).

O município de Araguaína, que possuía em 2008 uma população canina estimada em 9.136 animais (ARAGUAÍNA, 2009), destaca-se no cenário estadual e nacional por apresentar alta incidência de LV humana e canina. O número de casos da LVC vem aumentando consideravelmente, com positividade das amostras testadas de 8,4%, 32,5%, 36,7%, 32% e 44% nos anos de 2005 a 2009, respectivamente (ARAGUAÍNA, 2009; ARAGUAÍNA, 2010).

Em 2009, quase a totalidade (98%) das amostras caninas testadas foi proveniente de demanda espontânea da comunidade. Na cidade, devido ao trabalho ativo do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), a população vem colaborando de maneira substancial para a não proliferação da doença e cães vadios não são facilmente encontrados. Em reforço a isso, foi relatado por Cruz *et al.*, (2010) que das 2.980 amostras positivas para LVC, 73% dos animais foram submetidos a eutanásia, com as demais situações justificadas por morte do cão,



mudança de residência dos proprietários do animal, falta de kit diagnóstico no Laboratório Central ou ainda por contraprovas realizadas em laboratórios particulares escolhidos pelos proprietários do cão, indicando resultados contraditórios.

A leishmaniose visceral americana encontra-se em processo de expansão no mundo e em várias regiões brasileiras, sendo registrados casos humanos e caninos em áreas totalmente urbanizadas (SHAW, 2007). Neste sentido, casos autóctones da infecção humana e canina são frequentemente relatados causando preocupação aos órgãos de vigilância do país. A notificação de um caso de leishmaniose visceral, onde anteriormente não havia registro de casos caninos ou humanos, expõe a fragilidade do controle da doença e o risco de sua expansão (FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

## 1.7 TRATAMENTO E PREVENÇÃO

O tratamento da LVH é realizado com um escasso arsenal de medicamentos. As formulações incluem antimoniais pentavalentes, Desoxicolato de Anfotericina B, formulações lipídicas de Anfotericina B, Miltefosina e Paromomicina, todas apresentam limitações em termos de toxicidade, eficácia e custo. São administradas por via parenteral, com exceção da Miltefosina que se destaca por ser administrada oralmente (OMS, 2009a).

**Antimoniais pentavalentes:** Desde a sua introdução no tratamento da LV no início do século 20, os antimoniais pentavalentes são considerados o tratamento de escolha para a doença. Com duas principais formulações, o antimonial sódio estibogluconato (Pentostam®/Glaxo Wellcome, UK) e antimoniato de meglumina (Glucantime®/Rhone- Poulenc Rohrer, França) os antimoniais pentavalentes têm sido amplamente utilizados e têm demonstrado ser geralmente seguros e eficazes (OMS, 2007).

Ambas as drogas são consideradas idênticas em eficácia terapêutica e toxicidade. Tradicionalmente, o antimoniato de meglumina é utilizado nos países da América Latina e o estibogluconato de sódio nos demais países (ZACKIEWICZ, 2006), porém o acesso ao tratamento é geralmente muito melhor nas nações europeias (OMS, 2007). No Brasil, o Glucantime® é distribuído pelo Ministério da Saúde para tratamento de LVH. Porém o medicamento é contra-indicado em pacientes usuários de beta-bloqueadores e drogas

antiarrítmicas, portadores de insuficiência renal ou hepática e em mulheres grávidas nos dois primeiros trimestres de gestação (BRASIL, 2006). Recentemente foi observada por Alvarenga *et al.*, (2010) a letalidade de 85% de pacientes tratados com Glucantime®, sugerindo que o prognóstico da doença torna-se ruim quando a mesma é associada à presença de co-morbidade e pior ainda quando o Glucantime® é administrado.

Devido aos inconvenientes acima mencionados, ao aparecimento de cepas de *Leishmania* resistentes aos antimoniais pentavalentes, aos relatos de toxicidade das drogas e à dificuldade de administração, novos medicamentos alternativos têm sido avaliados (OMS, 2007).

**Anfotericina B** (Fungizone®, BMS): droga altamente eficaz, entretanto está associada a sérios efeitos adversos. É permitida sua administração apenas para pacientes hospitalizados (ZACKIEWICZ, 2006). Não há contraindicações absolutas ao uso da anfotericina B; entretanto, complicações renais são as mais importantes (BRASIL, 2006).

**Anfotericina B liposomal** (AmBisome®, Nextar, EUA): considerado o mais eficaz dos medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da LV, tem um custo proibitivo e deve ser administrado por injeção intravenosa, tornando seu uso mais difícil no campo. O alto custo do medicamento é devido, além das dificuldades técnicas de produção, ao fato do seu alvo ser o lucrativo mercado de antifúngicos para pacientes imuno-deprimidos nos países ricos. No entanto de acordo com Zackiewicz (2006), esta situação é inaceitável e seu acesso precisa ser ampliado através da redução do preço, doação voltada aos pacientes que mais precisam deste medicamento ou de meio de financiamento adicional.

**Miltefosina**: é altamente eficaz contra LV e possui a vantagem de ser administrada por via oral. No entanto, apresenta alto custo e possibilidade de teratogenicidade. Traz em si um risco teórico de desenvolvimento de resistência (OMS, 2009a). A miltefosina está registrada na Índia para tratamento de LV e na Europa para pacientes co-infectados com HIV (ZACKIEWICZ, 2006).

**Paromomicina (conhecida também como aminosidina):** é um antibiótico da família dos aminoglicosídeos com reconhecida atividade leishmanicida. É eficaz e segura, o tratamento tem duração de 21 dias se usado isoladamente, mas pode ser reduzido a 17 dias quando utilizado em combinação com sódio estibogluconato (ZACKIEWICZ, 2006; OMS, 2009a).

Dado os problemas associados com os escassos medicamentos hoje disponíveis para o tratamento da LV e, os cada vez mais frequentes casos de resistência aos medicamentos utilizados (Maltezu, 2010), novos e melhores tratamentos para substituir ou complementar a terapia existente são urgentemente necessários. Neste aspecto atualmente vários medicamentos para tratar a LV estão em fase de testes (OMS, 2009b). A possibilidade de um tratamento eficaz é ainda uma medida para controlar os reservatórios e a transmissão, já que pacientes não tratados podem servir como reservatórios de parasitos e contribuir para a transmissão da doença em áreas antroponóticas de LV (CHAPPUIS *et al.*, 2007; OMS, 2009c).

Inúmeros trabalhos sugerem o tratamento de cães infectados; porém, mesmo com a experiência de alguns países do Novo Mundo em tratar a LVC, no Brasil o tratamento não é permitido (BRASIL, 2008).

Quando tratados, são utilizados os mesmos medicamentos empregados para tratar a LVH. Estudos apontam que o tratamento da LVC acarreta a melhoria transitória do quadro clínico-laboratorial do cão e redução dos níveis de anticorpos séricos contra o parasito associados a uma possível redução transitória na carga parasitária em alguns tecidos (MANNA *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008; BRASIL, 2009a). Todavia trabalhos evidenciam que animais tratados mantêm a capacidade de infectar flebotomíneos vetores (MIRET *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008).

A resistência de cepas do parasito ao tratamento pode ocorrer em cães e em humanos. Brasil (2009a) afirma que a resistência, que já vem ocorrendo em alguns países, pode ter caráter irreversível e consequências imprevisíveis e que o tratamento canino representa risco para a saúde pública já que pode contribuir para a disseminação da doença, resultando em aumento de mortes, inclusive de imunodeprimidos; desenvolver a resistência de parasitos às medicações disponíveis para o tratamento da LVH; dificultar a implementação das medidas de saúde pública reforçando a resistência da população à eutanásia de animais que continuarão como fonte de infecção para o vetor.

Diante das dificuldades de tratamento da LV, o desenvolvimento de uma vacina parece representar uma importante ferramenta para o controle da infecção. A imunização bem sucedida de cães poderia reduzir significativamente a incidência da LVH. No entanto, embora existam abundantes informações sobre a imunologia da LV em humanos e no modelo murino, pouco se sabe sobre a resposta imune dos cães acometidos com LV.

São comercializadas no Brasil duas vacinas contra LVC, a Leishmune® e a Leish-Tec®. Ambas já tiveram ensaios pré-clínicos, testes de Fase I e Fase II completados e estão nos estudos de Fase III (BRASIL, 2009b).

As vacinas registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) cumpriam os requisitos técnicos de eficácia vigentes no momento da concessão dos registros, ano de 2003 para Leishmune® e 2006 para Leishtech®. Todavia o Ministério da Saúde (MS) ainda não recomenda a utilização das vacinas em Saúde Pública, pois estão sendo realizados estudos para avaliar o uso destes produtos para essa finalidade (BRASIL, 2009b).

## 1.8 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

### 1.8.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico da LV torna-se difícil de ser determinado devido à diversidade de suas manifestações clínicas, com sintomas não característicos, podendo sugerir outras enfermidades ou quadros de desnutrição. Nos cães, o diagnóstico clínico é ainda dificultado pelo grande número de animais assintomáticos ou oligossintomáticos (DOURADO *et al.*, 2007). Dessa forma, o diagnóstico para ambos os casos é realizado a partir dos sintomas apresentados, devendo-se ainda fazer correlação com os critérios epidemiológicos (BADARÓ; DUARTE, 1996).

Com isso, ressalta-se a necessidade de utilização de métodos laboratoriais para a confirmação da infecção.

## 1.8.2 Diagnóstico Laboratorial

Para o diagnóstico da LV é necessária a utilização de metodologias seguras e confiáveis, que sejam capazes de identificar a infecção. Os métodos empregados devem necessariamente ter alta capacidade de detecção da infecção na sua fase inicial, fornecer resultados precisos, de fácil execução, com baixo custo e reprodutibilidade. De acordo com Leal (2009) a confiabilidade do resultado será proporcionada pela combinação de técnicas, uma vez que não há uma única técnica que possa de modo inequívoco indicar a infecção.

O diagnóstico laboratorial da LV humana e canina pode ser realizado por meio de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. Como métodos parasitológicos podem ser realizados visualização de formas amastigotas do parasito em amostras de fragmentos de tecidos, isolamento de formas promastigotas em meios de cultura e inoculação de animais de laboratório. Os métodos sorológicos compreendem principalmente reação de fixação do complemento, teste de aglutinação direta, ensaio imunoenzimático (ELISA– do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), testes imunocromatográficos e Western Blotting (WB). Os meios moleculares para detecção da infecção incluem principalmente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*). O diagnóstico pode ainda ser complementado por meio de exames bioquímicos.

### 1.8.2.1 Métodos parasitológicos

Os métodos parasitológicos representam o diagnóstico preciso da infecção, já que baseiam-se na demonstração de formas amastigotas presentes na pele, no sangue ou em órgãos linfóides. Com relação a este último, devido ao caráter invasivo e ao alto custo que apresenta, há pouca aceitação por parte dos proprietários dos cães e frequentemente não é possível realizá-lo. Outras limitações se dão pela variação na intensidade do parasitismo, por dificuldades técnicas ou operacionais que possam interferir na obtenção do material e ainda pelo grau de experiência do observador.

No cão, o diagnóstico parasitológico é realizado por meio de material proveniente de aspirado de baço, linfonodos, medula óssea, fígado e biópsia ou escarificação da pele (LEAL,

2009; BRASIL, 2006). Corantes de Giemsa, Wright, Leishman ou Panóptico® podem ser usados com resultados muito similares na evidenciação das formas amastigotas.

Como método direto parasitológico pode também ser realizada a detecção do parasito por cultivo em meios específicos, geralmente bifásicos. Os meios mais utilizados são o NNN (Neal, Novy e Nicolle), LIT, Schneider e M199. Formas amastigotas do parasito, provenientes de biópsias ou aspirados de órgãos ou tecidos, quando em contato com os meios de cultura se transformam em formas promastigotas, podendo ser observadas em microscopia de contraste de fase. Embora as culturas sejam úteis para o isolamento e identificação do parasito são pouco utilizadas na rotina diagnóstica, já que a acurácia da análise microscópica é influenciada pela habilidade dos profissionais e pela qualidade dos reagentes utilizados (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

O isolamento do parasito por inoculação em hamsters (*Mesocricetus auratus*) é um procedimento de boa sensibilidade. Entretanto a demora na reprodução da infecção (1 a 3 meses) e os altos custos para manutenção dos animais inviabiliza esse método como rotina para o diagnóstico da LV.

#### 1.8.2.2 Métodos Sorológicos

A detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* utilizando técnicas sorológicas constitui um instrumento importante no diagnóstico da LV humana e canina.

A doença provoca uma expansão policlonal de linfócitos B, traduzida por altos níveis de anticorpos, principalmente do tipo IgG e IgM (ALVAR *et al.*, 2004; GONTIJO; MELO, 2004). A soroconversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção e os títulos podem permanecer elevados por pelo menos dois anos.

A intensa produção de anticorpos causada pelo parasitismo faz com que os métodos sorológicos sejam amplamente utilizados e os torna de grande confiabilidade, tanto para o diagnóstico individual da doença, quanto para aplicação em inquérito epidemiológico (KAR, 1995). Entretanto Ferrer *et al.* (1995) salientam que estes testes devem ser interpretados com cuidado, uma vez que não são 100% sensíveis e específicos e falham em detectar animais infectados no período pré-patente da doença. Além disso, cães com menos de três meses de idade não devem ser avaliados por meio de métodos sorológicos, pois podem apresentar resultados positivos pela presença de anticorpos maternos (BRAGA *et al.*, 1998). Outro fator

ainda relevante é a presença de imunocomplexos presentes na amostra, o que pode implicar em resultados sorológicos conflitantes.

A Reação de Fixação do Complemento (RFC) foi a primeira técnica dirigida para a detecção de anticorpos específicos a ser empregada no diagnóstico da LVH (NUSSENZWEIG, 1957). Método que utilizava o antígeno extraído do bacilo da tuberculose foi amplamente utilizado em inquéritos epidemiológicos humanos por apresentar elevada sensibilidade, mas devido ao alto índice de reações cruzadas com a doença de Chagas, sífilis e blastomicose encontra-se em desuso. Em animais, poucos estudos foram realizados com esta técnica.

Os testes sorológicos Reação de Imunofluorescência Indireta e o Ensaio Imunoenzimático se destacam como os mais importantes, uma vez que são utilizados pelo Ministério da Saúde do Brasil para avaliação da soroprevalência da leishmaniose visceral humana e canina.

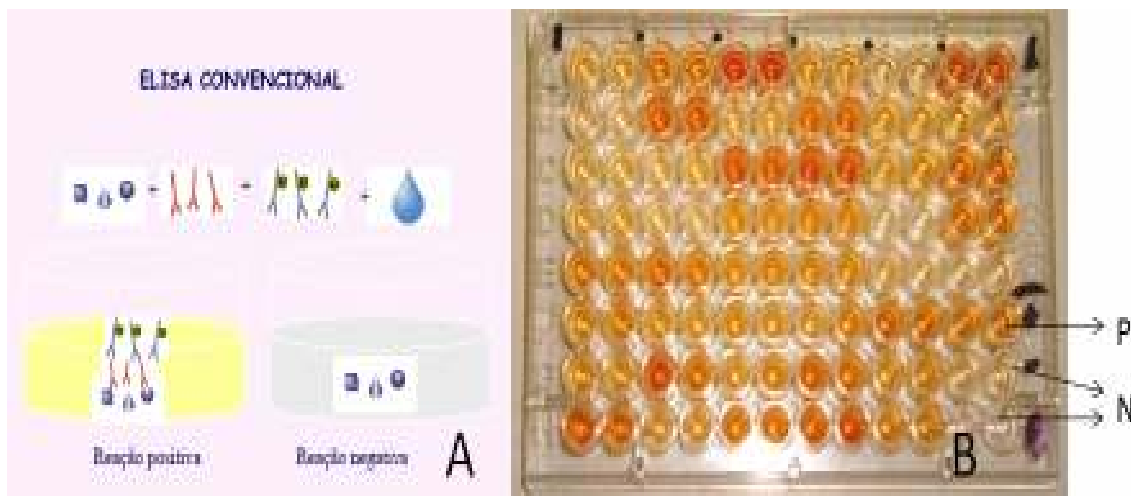
Apesar de a doença estar associada a apenas uma espécie de parasito nas Américas, *L. chagasi* – o que teoricamente deveria facilitar a padronização de um antígeno específico para ser usado nesses testes, ainda hoje não existe um consenso na literatura especializada quanto ao emprego de um antígeno para o uso no diagnóstico da LV humana e canina (LAURENTI, 2009).

Introduzida no diagnóstico da leishmaniose visceral por Duxbury e Sadun (1964), a RIFI é considerada um método sorológico confiável para detectar a LV. É uma técnica de baixo custo e com níveis de sensibilidade considerados altos quando comparados aos das técnicas parasitológicas diretas. Para humanos aceitam-se como positivas diluições a partir de 1:80. Nos títulos iguais a 1:40, recomenda-se a solicitação de uma nova amostra em 30 dias. Esse procedimento é adotado porque em infecções inaparentes ou assintomáticas os títulos são baixos. Já as amostras caninas são consideradas reagentes quando possuem título igual ou superior ao ponto de corte que é a diluição de 1:40 (BRASIL, 2006).

Apesar das vantagens apontadas, a RIFI pode apresentar limitações como alto tempo despendido para leitura das lâminas, baixa sensibilidade ao ser comparado ao ELISA e ainda subjetividade na leitura, principalmente quando os títulos são baixos.

O ELISA, descrito inicialmente por Engvall e Perlmann (1971), foi introduzido no diagnóstico das leishmanioses por Hommel (1976). A técnica ELISA pode ser descrita como uma reação de soros com antígenos de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*,

previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/strips (fase sólida). Uma etapa subsequente consiste na adição dos soros-controle do teste e das amostras a serem analisadas, devidamente diluídos. Possuindo anticorpos específicos, eles irão se ligar aos antígenos. Em uma nova etapa, adiciona-se uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase e esta se ligará aos anticorpos caso estejam presentes. Para evidenciar a reação, utiliza-se uma substância cromógena. Esta reação é interrompida ao adicionarmos um ácido, geralmente sulfúrico ou clorídrico, passando então a apresentar em caso positivo (reagente) uma coloração amarela. Nas cavidades em que não houver anticorpos específicos, a reação será negativa (não-reagente), ou seja, não haverá desenvolvimento de cor. O resultado é expresso de acordo com a densidade óptica, em unidades de absorbância a um raio de luz, em uma reação com diluições fixas. São consideradas amostras reagentes as que apresentarem a densidade óptica igual ou superior ao valor do *cut-off* e são consideradas não reagentes as com valor inferior (VOLLER; BIDWELL; BARTLETT, 1976) (FIGURA 2).



**Figura 2:** Representação esquemática do ELISA convencional (A) e sua visualização em placa de microtitulação (B), onde P: reação positiva e N: reação negativa. Adaptado de Lira, R. A., 2005.

O ELISA é uma técnica de fácil automação, com leitura espectrofotométrica - que proporciona objetividade na leitura e elimina erros de interpretação, de rápida execução, baixo custo e de simplicidade técnica, torna possível a realização de um elevado número de amostras em um mesmo ensaio. O teste é sensível, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos pré-clínicos ou assintomáticos. Ainda sim suas características o fazem o método de escolha para o diagnóstico da LV em larga escala, sendo nos dias atuais amplamente empregado em inquéritos caninos.



A técnica de ELISA comporta inesgotáveis possibilidades de variação. Como forma de aumentar a especificidade das reações sorológicas tem sido utilizada como um método para eliminar os anticorpos não específicos, que consiste no uso, como diluente, de um agente dissociante para ELISA, de alta avidéz, que permite obter resultados mais confiáveis (HEDMAN *et al*, 1989). Dessa forma, a técnica elimina os anticorpos não específicos (de baixa avidéz) e mantém a reação com os anticorpos específicos (alta avidéz ou afinidade). Segundo Hedman *et al* (1989) a técnica pode ser executada utilizando um ensaio imunoenzimático com agente dissociante (caotrópico, como a ureia) para eluir as amostras e romper as pontes de hidrogênio das ligações de anticorpos de baixa avidéz. Entretanto foi Santos (2008) que pela primeira vez introduziu o uso do agente caotrópico como diluente de amostra no diagnóstico da doença de Chagas e da leishmaniose.

A avidéz de IgG também foi testada por Redhu *et al*. (2006) e Teixeira Neto *et al* (2010), com as técnicas diferindo do ELISA convencional em única etapa, pois havia a aplicação de Ureia 6M previamente à adição do conjugado. Assim, as moléculas de IgG que possuíam menos afinidade pelo antígeno foram rompidas, sendo mantidas somente àquelas que apresentavam a ligação mais forte e, portanto, pertencente a pacientes com maior tempo de infecção.

Uma outra variação inovadora do Ensaio Imunoenzimático consiste na dissociação de imunocomplexos presentes na amostra, para promover um diagnóstico mais confiável e preciso, com o mínimo de interferências. A formação de complexos imunes, geralmente produzidos em condições normais, pode ser aumentada em determinados processos patológicos em que há grande quantidade de antígenos circulantes (LARANGEIRA, 2008; CHAKRABORTI; SARKAR; GHOSH, 2003), como na leishmaniose. Paralelo a isto, a hipergamaglobulinemia desenvolvida na enfermidade pode contribuir para a formação destes complexos imunes, que podem ser acumular nos tecidos, causando complicações inflamatórias e também interferindo em testes diagnósticos, como no ELISA.

Carvalho, Hiramoto e Andrade Jr (2009) testando amostras caninas para diagnóstico da leishmaniose visceral verificaram que havia interferência de imunocomplexos quando se comparou um ELISA convencional a outro em que eram adicionadas substâncias que promoviam a dissociação de complexos imunes, por um gradiente de pH. Os pesquisadores observaram que houve aumento de título nas amostras testadas quando se incluiu a etapa para dissociação dos imunocomplexos, positivando reações antes negativas.

Objetivando o aprimoramento no diagnóstico da LV, proteínas recombinantes identificadas tanto em formas amastigotas quanto em promastigotas têm sido estudadas, especialmente pelo método ELISA, incluindo a gp63, a p32 e o k26 (OKONG'O-ODERA; KURTZHALS; HET, 1993; TEBOURSKI *et al.*, 1994; MORALES *et al.*, 1997; BHATIA *et al.*, 1999). Porém a mais utilizada atualmente é a rK39, que contém uma unidade repetitiva de 39 aminoácidos de formas amastigotas de *L. chagasi* (BADARÓ *et al.*, 1996).

Recentemente surgiram outros testes sorológicos que utilizam metodologia mais simplificada e com boa sensibilidade e especificidade: o Teste de Aglutinação Direta (DAT – do inglês *Direct Agglutination Test*) e o FAST (*Fast Agglutination-screening Test*), que utilizam como antígeno formas promastigotas de *L. (L) donovani*. O DAT tem execução simples e é um teste semi-quantitativo (BOELAERT *et al.*, 2007), entretanto possui tempo de incubação prolongado, de cerca de 18 horas, o que pode ser um fator limitante do seu uso. Já o FAST, que apresenta período de incubação de três horas, é qualitativo e também de fácil execução, se tornando um bom candidato como teste de triagem para a LVC. Ambos os testes têm como vantagem a possibilidade de utilização em áreas com pouca infra-estrutura laboratorial e de não precisarem de refrigeração para armazenagem, porém podem ter suas reprodutibilidades comprometidas por variações técnicas e pela dificuldade na padronização dos reagentes (SILVA, E. S. *et al.*, 2005).

Demais testes, como os imunocromatográficos, originados da união das técnicas imunoenzimáticas com a cromatografia, vêm ganhando espaço no mercado, pois se mostram mais sensíveis, rápidos e com custo operacional mais baixo. Um teste imunocromatográfico desenvolvido para a LV humana vem sendo aplicado em estudos para a LV canina: o Teste Rápido Anti *Leishmania donovani* (TRALd). O método utiliza a proteína A conjugada a ouro coloidal como sistema de detecção do antígeno rK39 - o que favorece sua especificidade, e permite a ligação com o anticorpo específico em segundos - e a totalidade do teste pode ser completada entre 1-10 minutos. Este teste tem se mostrado adequado para utilização em condições de campo, podendo ser usado para fornecer o diagnóstico rápido da LV em áreas endêmicas (BOELAERT *et al.*, 2007), dispensando etapas críticas de incubação e equipamentos de leitura óptica, dada sua simplicidade técnica. Todavia esses testes possuem limitações, visto se basearem na pesquisa de anticorpos (IgG) que podem permanecer positivos após a cura da doença (BADARÓ *et al.*, 1996).

Outra técnica bastante sensível e específica para detectar LV canina é o Western Blotting (WB). Em estudos utilizando diferentes frações antigênicas para WB, Silva, E. S. *et al.*

*al.* (2005) verificaram que a técnica apresentava maior sensibilidade quando comparada à RIFI, reconhecendo frações antigênicas até 8 meses antes da soroconversão na Imunofluorescência Indireta. Os resultados sugeriram que o método poderia ser aplicado em inquéritos caninos, uma vez que permitiu a identificação precoce dos animais infectados.

### 1.8.2.3 Métodos Moleculares

O avanço em estudos com técnicas moleculares, como a tecnologia do DNA recombinante, permitiu incrementar o diagnóstico da LV e colaborar na identificação e classificação das espécies de *Leishmania* utilizando ácidos nucleicos específicos do parasito. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), introduzida no diagnóstico das leishmanioses por Rodgers, Popper e Wirth (1990) constitui-se no principal método molecular da LV, sendo avaliada para pesquisa de DNA de *Leishmania* em diferentes materiais biológicos (REITHINGER; DUJARDIN, 2007; BOELAERT *et al.*, 2007). O PCR é considerado altamente sensível e específico quando relacionado a outras técnicas diagnósticas (IKONOMOPOULOS *et al.*, 2003), porém a comparação dos resultados encontrados por diferentes autores é prejudicada pela falta de padronização metodológica. Andrade *et al.* (2006) em seus estudos encontraram especificidade de 100% e sensibilidade variável de 66,7% a 100%, utilizando amostras do fígado e da medula, respectivamente.

Devido ao caráter endêmico da leishmaniose visceral no cenário mundial, tornam-se necessários a progressão e o aprimoramento das metodologias diagnósticas, de forma que sejam disponibilizadas técnicas que forneçam resultados fidedignos, que sejam menos onerosas e desconfortáveis aos pacientes e que apresentem maior facilidade de execução.

Segundo a Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (2004, grifo nosso) “os investimentos em estudos de prevenção da leishmaniose visceral devem envolver não só a avaliação do processo ecológico da transmissão urbana e periurbana, mas também **fomentar o desenvolvimento e avaliações de métodos diagnósticos mais efetivos**, de imunoprofilaxia humana e canina e a simplificação do tratamento, além de incentivar a busca de medidas de redução do vetor do peridomicílio com métodos alternativos que não afetem o meio ambiente”. Por outro lado, FIOCRUZ (2004) afirma ainda que para o controle da infecção / doença, deve ser incentivada a interação com co-responsabilidade entre os profissionais

responsáveis diretamente pelas ações municipais e de outros níveis e pesquisadores, através da busca de técnicas inovadoras, metodologicamente avaliadas, integrando a atuação biomédica e social. Buscando colaborar, este trabalho propõe o estudo e a aplicação de novas metodologias voltadas para o aperfeiçoamento diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias, como a leishmaniose visceral.

No diagnóstico da leishmaniose, interferentes diagnósticos são frequentemente observados, como as reações inespecíficas. Há relatos na literatura sobre a ocorrência de reações sorológicas cruzadas entre agentes etiológicos da leishmaniose com os agentes da toxoplasmose e doença de Chagas (ABRAMO; FONTES; KRETTLI, 1995; SANTOS, 2008), assim como entre os da LVH com os da hanseníase, malária, tuberculose, brucelose e febre tifoide (CHAKRABORTI; SARKAR; GHOSH, 2003). Na sorologia realizada com amostras de soro de cães para LV foram ainda observadas reações cruzadas com a doença de Chagas, toxoplasmose e com os agentes *Ehrlichia spp.* (GOMES; CORDEIRO, 2004; ZANETTE, 2006) e *Babesia canis* (MANCIANTI *et al.*, 1996).

Para distinguir a infecção entre a leishmaniose tegumentar e a doença de Chagas, Santos (2008) utilizou um agente caotrópico como diluente de amostra de soro. No estudo foram obtidos resultados relevantes, sendo relatado o rompimento de ligações inespecíficas fracas, observado pela diminuição das densidades ópticas (D.O.s) das amostras diluídas.

Sabe-se que na LV um grande número de complexos imunes é formado, mas pouco se estudou sobre a interferência que provocam no diagnóstico da doença, especialmente no que tange aos métodos sorológicos. Estudos recentes indicam que imunocomplexos interferem nas reações sorológicas, uma vez que podem provocar resultados errôneos, como falsos negativos (CARVALHO; HIRAMOTO; ANDRADE JR, 2009). Tais constatações são fornecidas pela mensuração das absorbâncias, quando se observa um aumento nos títulos nos testes com substâncias dissociadoras de imunocomplexos.

Os índices de infecção canina medidos pela sorologia podem não corresponder totalmente a realidade, haja vista a sobreposição de doenças em uma mesma área (COSTA *et al.*, 1991) e a presença de imunocomplexos circulantes. No entanto, a utilização da técnica ELISA é justificada por apresentar características de sensibilidade e especificidade aceitáveis e considerando-se que quando utilizada em inquéritos sorológicos nos programas de controle da leishmaniose, contribui para a diminuição das fontes de infecção destas endemias.

Considerando os fatores acima mencionados, propomos neste estudo a aplicação de Ensaio Imunoenzimático para detecção da leishmaniose visceral canina através de uma metodologia que promova a redução de anticorpos não específicos da doença, a partir da adição de um agente caotrópico (ureia) e, ainda de uma técnica que promova a eliminação de imunocomplexos presentes na amostra, a partir da exposição dos soros a um choque de pH – utilização de Glicina ácida e posterior neutralização com Tris - (Tris (Hidroximetil) aminometano).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a influência de substâncias caotrópicas e dissociadoras de imunocomplexos utilizadas em Ensaio Imunoenzimáticos no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

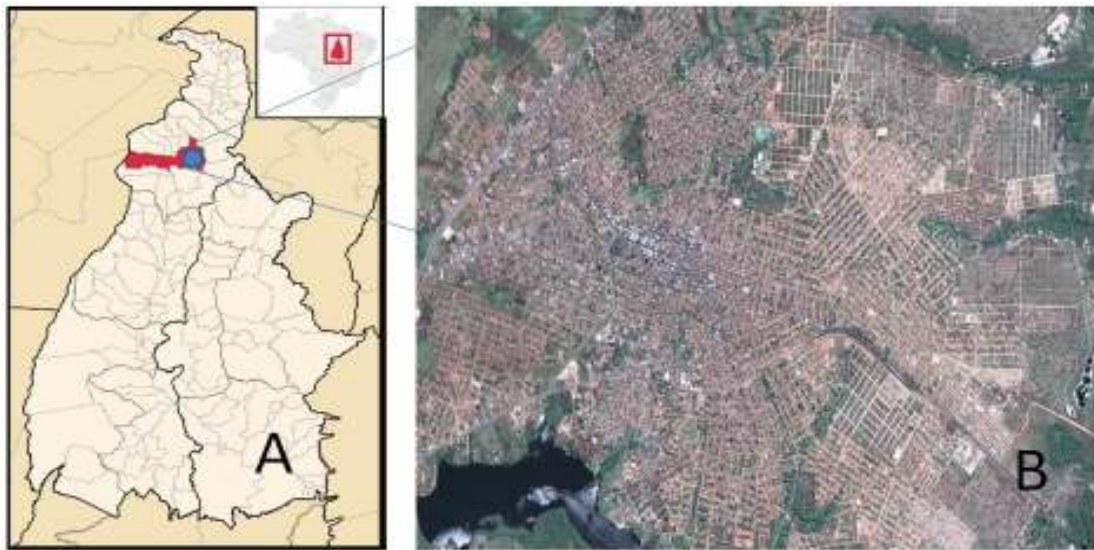
Empregar o Ensaio Imunoenzimático Ureia voltado para a diminuição de reações inespecíficas no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

Aplicar o método dissociador de imunocomplexos Ensaio Imunoenzimático Glicina – Tris no diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de soro de cães oriundos do estado do Tocantins.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDO

Este trabalho foi realizado na zona urbana do município de Araguaína, estado do Tocantins, região Norte do Brasil. O estado, criado pela Constituição de 1988 pela divisão do então estado de Goiás, tem uma população estimada de 1.292.051 habitantes (IBGE, 2009a) e está inserido na área pertencente à Amazônia Legal (Figura 3). Encontra-se localizado em uma área de transição, apresentando características climáticas e físicas tanto da Amazônia Legal quanto da zona central do Brasil. Sua vegetação é composta pelo Cerrado (87%) e por Florestas de transição (12%). O clima predominante é o semi-úmido, de forma que apresenta duas estações climáticas bem definidas, uma seca e outra chuvosa (TOCANTINS, 2009b).



**Figura 3.** Localização do estado do Tocantins, destaque para o município de Araguaína (A) e cidade de Araguaína-TO (B).

Fonte: Google Imagem: Tocantins Município Araguaína. 365 x 600 - 113k e Google Earth.

Criado em 1959, o município de Araguaína –TO, com uma população estimada de 119.637 habitantes (IBGE, 2009b), é hoje um dos maiores centros econômicos do Estado e se destaca pela agroindústria, educação superior e saúde. Porém mesmo em evidência, apresenta incidência de pobreza de 39,81%, com índice de desenvolvimento humano (IDH) de 0,749 (IBGE, 2009b).

Possui uma área de 4.000 Km<sup>2</sup>, com seu relevo bastante variado, destacando-se o planalto sem a presença de grandes elevações. O clima mantém-se durante todo o ano, com temperaturas entre 32°C e 20°C. Há uma estação definida de chuva entre os meses de novembro a maio, e uma estação seca entre os meses de junho a outubro, com precipitação anual acima de 1.700mm. A vegetação apresenta forma irregular, caracterizando-se pelo cerrado ou chapada, matas ciliares e matas tropicais (ARAGUAÍNA, 2010).

### 3.2 LOCAL DE TRABALHO

Os testes laboratoriais foram realizados no complexo laboratorial da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins e no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical/Faculdade de Medicina /Universidade de São Paulo (IMT/FM/USP).

### 3.3 ANIMAIS

Para a realização do presente trabalho foram empregadas amostras de soro de 140 cães (*Canis familiares*) procedentes da cidade de Araguaína, estado do Tocantins. Destas, 78 (55,7%) foram provenientes do Centro de Controle de Zoonoses e 62 (44,3%) de 3 clínicas veterinárias privadas da cidade. Os animais, portadores ou não de sinais clínicos de leishmaniose visceral, não foram distinguidos por idade, sexo, raça ou local de moradia (Figuras 4 e 5). Foram selecionados animais com idade maior que três meses.



**Figura 4.** Cão apresentando fotofobia, lesões cutâneas, úlceras nas orelhas e focinho e apatia. Ao fundo, presença cão com sinais semelhantes. Animais encontrados pela equipe do CCZ ao realizar inquérito epidemiológico.





**Figura 5.** Local de moradia dos animais com suspeita clínica de LVC. Residência localizada na área urbana do município, apresentando grande quantidade matéria orgânica. Galinheiro ao fundo.

### 3.4 OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS SOROS

As amostras de sangue de cada um dos animais foram obtidas por punção venosa e submetidas a centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos.

Os soros foram divididos em duas alíquotas, sendo que em uma delas foi adicionada solução de conservação de Tampão Borato, numa diluição final 1/10. Ambas as alíquotas foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### 3.5 MÉTODOS DE EXAME

#### 3.5.1 *Enzyme Linked immunosorbent assay* (ELISA)

##### 3.5.1.1 ELISA “Clássico”

Para sensibilização, placas de poliestireno com 96 poços para microtitulação (Corning<sup>®</sup>) receberam  $10\mu\text{g/mL}$  de antígeno solúvel de *L. chagasi* ( $100\mu\text{L/poço}$ ), suspenso

em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,1M pH 9,5 e, após envolvidas em plástico filme foram mantidas em câmara úmida a 4°C por 20 horas. O antígeno protéico (1112 µg) gentilmente cedido pelo laboratório de protozoologia do IMT/SP foi obtido por lise do parasito (cepa MHOM/BR/1972/LD) por meio de diferença térmica e ação de um tampão de EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*). Retiradas da câmara úmida e, após atingirem temperatura ambiente, as placas foram lavadas cinco vezes com solução de PBSTL (PBS 0,01 M pH 7,2; contendo 0,05% de Tween 20, e 0,3% de solução de leite desnatado (Molico<sup>®</sup>)). Em seguida, as placas foram bloqueadas com solução de PBSTL durante uma hora em estufa a 37°C. Decorrido este período foram realizadas mais cinco lavagens com PBSTL e, posteriormente foi retirado o excesso de líquido dos poços das placas. Após secas e envolvidas em plástico filme, as placas foram armazenadas a -20° C e no momento do uso foram retiradas do freezer para atingirem temperatura ambiente.

Dando prosseguimento, amostras de soros diluídas a 1/100 em PBS foram adicionadas à placa (100 µL/poço). Depois de incubadas por 1 hora a 37°C, foram feitas cinco lavagens com PBSTL, e cada poço recebeu 100µL de conjugado anti-IgG de cão (1/20.000) marcado com peroxidase e a placa foi novamente incubada por 1 hora a 37°C. Após mais cinco lavagens, as reações foram reveladas com 100 µL de solução de revelador OPD, sendo utilizados 50 µL de ácido clorídrico 4M como solução de bloqueio.

No teste todas as amostras foram feitas em duplicata. A leitura das absorbâncias (ou densidade óptica – D.O.) foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se comprimento de onda de 492 nm, em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS) e, os resultados expressos pela média aritmética das absorbâncias mensuradas.

Os controles positivo e negativo foram procedentes de inquéritos sorológicos caninos de cidades do estado de São Paulo, realizados pelo Instituto Adolfo Lutz.

### 3.5.1.2 ELISA “Ureia”

As fases de sensibilização, bloqueio e armazenamento das placas foram realizadas de acordo com o item 3.5.1.1.

Amostras de soros 1/10 diluídas em Tampão Borato foram adicionadas a solução de Ureia 0,5M até a concentração de 1/100, sendo em seguida adicionadas à placa (100 µL/poço). Depois de incubadas por 1 hora a 37°C, foram feitas cinco lavagens com PBSTL, e cada poço recebeu 100µL de conjugado anti-IgG de Cão (1/20.000) marcado com peroxidase e a placa foi novamente incubada por 1 hora a 37°C. Após mais cinco lavagens, as reações foram reveladas com 100 µL de solução de revelador OPD, sendo utilizados 50 µL de ácido clorídrico 4M como solução de bloqueio.

Os testes foram executados em duplicata. A leitura das absorvâncias foi realizada conforme item 3.5.1.1.

### 3.5.1.3 ELISA “Glicina-Tris”

As etapas de sensibilização, bloqueio e armazenamento foram executadas conforme descrito no item anterior.

Amostras de soros 1/10 diluídas em Tampão Borato foram adicionadas à solução de PBS até a concentração de 1/50, sendo logo depois adicionadas à placa (50 µL/poço). Aos poços foram acrescentados 25 µL de Glicina pH 2,5 e, após agitação manual por 5 minutos foram adicionados mais 25 µL de Tris pH 8,5. Depois de incubadas por 1 hora a 37°C, foram feitas cinco lavagens com PBSTL, e cada poço recebeu 100µL de conjugado anti-IgG de Cão (1/20.000) marcado com peroxidase e a placa foi novamente incubada por 1 hora a 37°C. Após lavagem, as reações foram reveladas por 30 minutos com 100 µL de cromógeno OPD, sendo utilizados 50 µL de ácido clorídrico como solução de bloqueio.

As amostras foram testadas em duplicata. A leitura das absorvâncias se procedeu conforme descrito no item 3.5.1.1.

### 3.6- ORGANIZAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

Um banco de dados foi elaborado em programa “Excel”, contendo as seguintes variáveis: identificação da amostra, resultado do ELISA clássico com valores de absorbância, densidade óptica do ELISA ureia e densidade óptica do ELISA Glicina-Tris.

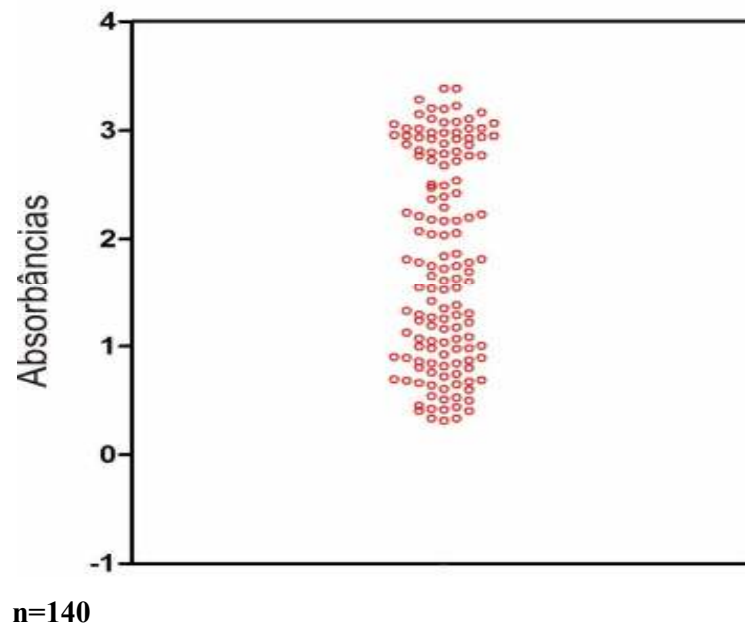
Os dados foram analisados com a aplicação dos programas SPSS v 16, EPI INFO e Graph Pad Prisma 5.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ELISA “CLÁSSICO”

As absorvâncias obtidas no emprego do método ELISA “clássico”, utilizando antígeno produzido pelo IMT/FM/USP, encontram-se expressas através da Figura 6.

As densidades ópticas extremas das amostras foram 0,314 e 3,384. A média aritmética das absorvâncias neste teste foi 1,7933.

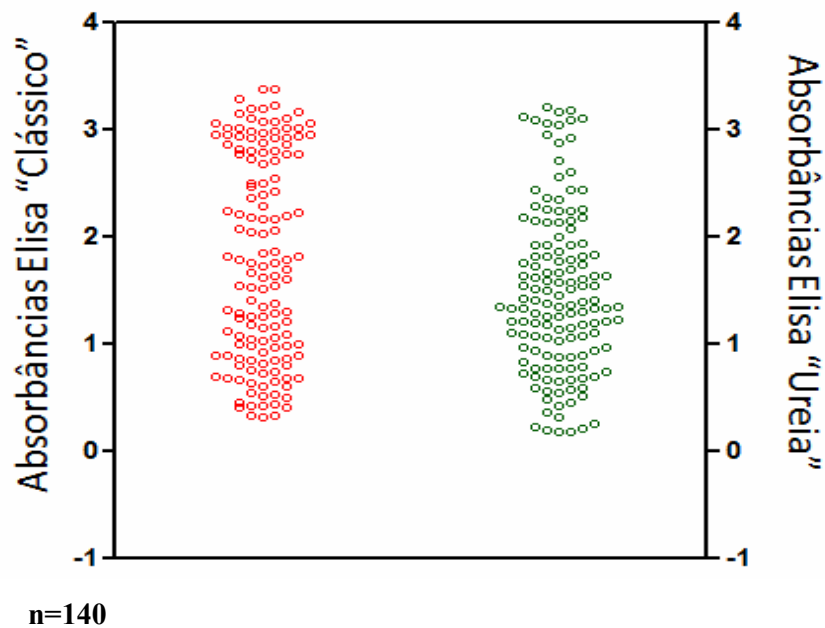


**Figura 6-** Dispersão de absorvâncias por emprego do teste ELISA “Clássico” em 140 amostras de soros de cães procedentes de Araguaína-TO, durante o ano 2009.

### 4.2 ELISA “UREIA”

Os resultados obtidos através do emprego do teste ELISA Ureia são expressos na Figura 7.

O ELISA Ureia promoveu a queda nos valores de absorvância de soros testados quando se compara com os resultados do ELISA clássico. A menor densidade óptica obtida foi de 0,1775 enquanto a maior registrada neste teste foi de 3,2185, e a média aritmética das amostras testadas foi 1,4858.

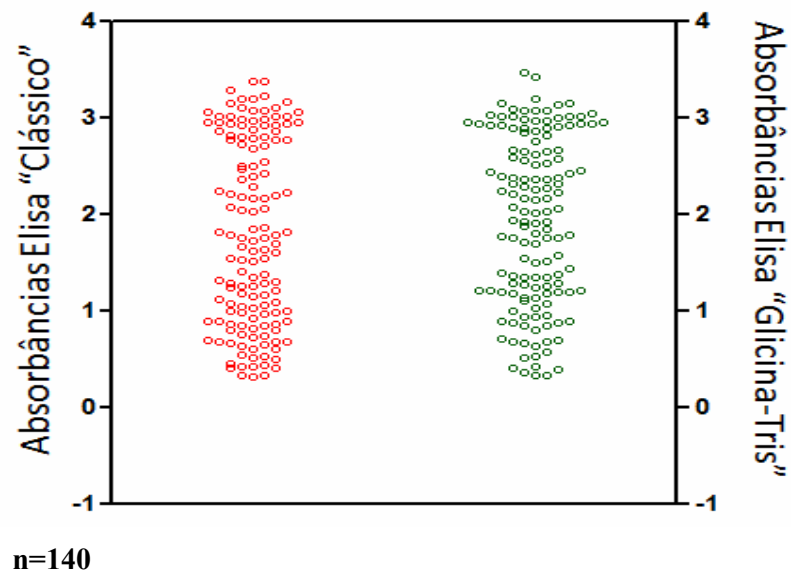


**Figura 7-** Dispersão de absorbâncias por emprego dos testes ELISA “Clássico” e ELISA “Ureia” em amostras de soros de 140 cães procedentes de Araguaína-TO durante o ano de 2009.

#### 4.3 ELISA “GLICINA-TRIS”

Os resultados do ELISA “Glicina-Tris” em soro canino, descrito no item 2.5.1.3, estão apresentados na figura 8.

Analisando as densidades ópticas deste teste em comparação às absorbâncias das mesmas amostras obtidas a partir do ELISA Clássico nota-se aumento nos valores dos títulos quando se adicionou as substâncias dissociadoras de imunocomplexos Glicina e Tris. O menor e maior valor de absorbância encontrada neste teste foi de 0,323 e 3,4675, respectivamente, de forma que a média aritmética obtida foi 1,9366.



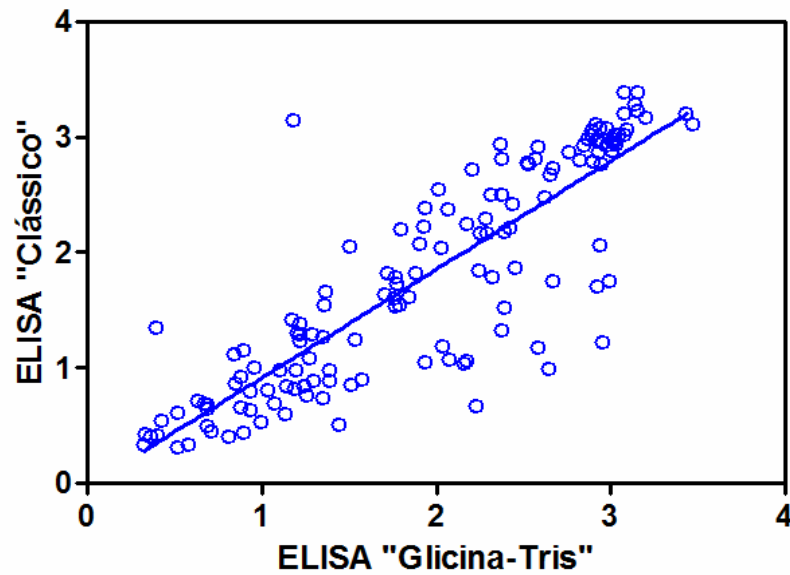
**Figura 8:** Dispersão de absorbâncias por emprego dos testes ELISA “Clássico” e ELISA “Glicina-Tris” em amostras de soros de 140 cães procedentes de Araguaína-TO durante o ano de 2009.

#### 4.4 INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

##### 4.4.1 Avaliação da repetibilidade

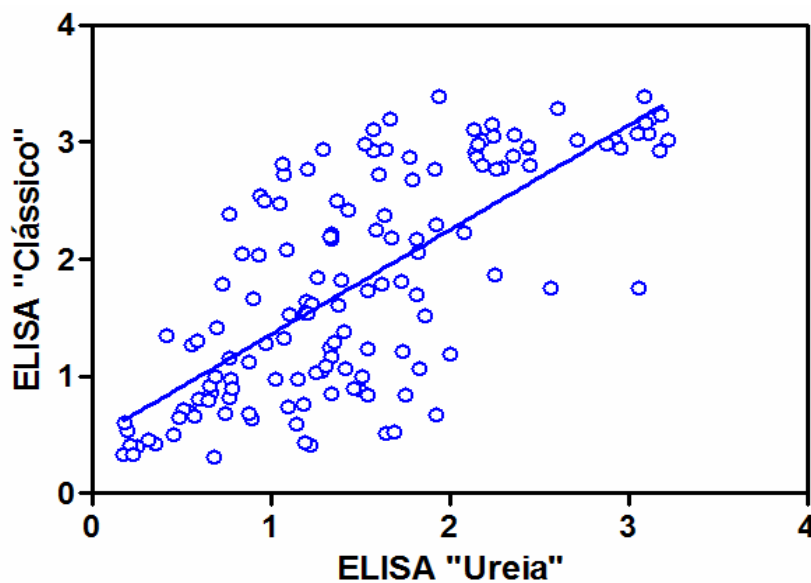
Para avaliação da repetibilidade dos dados foi utilizado o Coeficiente de Correlação Interclasses - CCI (SHROUT; FLEISS, 1979; LANDIS; KOCH, 1977). A análise pode ser utilizada para comparar diferentes métodos aplicados a uma mesma amostra.

Neste teste, o ELISA Glicina-Tris foi o que melhor reproduziu os resultados do ELISA Clássico, com ótima concordância entre os mesmos (Figura 9). A análise realizada com o teste CCI demonstrou resultado de 0.85, IC 95%: 0.79 – 0.89.



**Figura 9.** Repetibilidade entre os testes ELISA Clássico e ELISA Glicina-Tris aplicados em amostras de soros de 140 cães procedentes de Araguaína-TO durante o ano de 2009, utilizando o Coeficiente de Correlação Interclasses.

Apesar disto, o teste ELISA Ureia apresentou também boa concordância, conforme demonstrado na figura 10. O valor de CCI obtido foi de 0.66, IC 95%: 0.40 – 0.77.

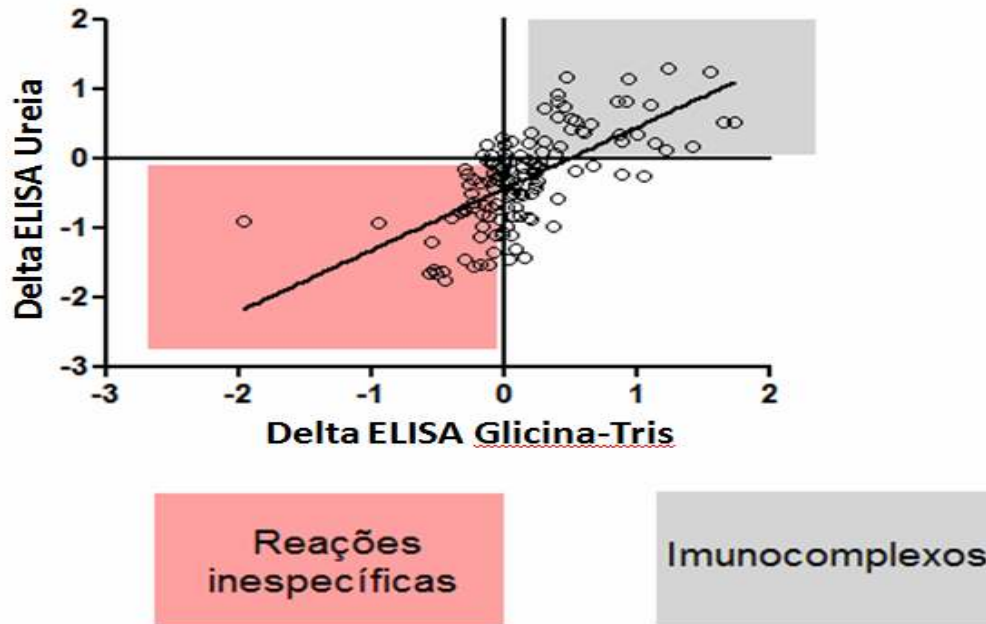


**Figura 10.** Repetibilidade entre os testes ELISA Clássico e ELISA Ureia aplicados em amostras de soros de 140 cães procedentes de Araguaína-TO durante o ano de 2009, utilizando o Coeficiente de Correlação Interclasses.



#### 4.4.2 Avaliação das diferenças das densidades ópticas

As diferenças das absorbâncias dos ensaios testados ELISA Ureia e ELISA Glicina-Tris com as densidades ópticas obtidas no ELISA clássico foram chamadas de deltas.



**Figura 11:** Representação dos deltas dos ELISA Ureia e ELISA Glicina-Tris realizados em amostras de soro canino de 140 cães provenientes de Araguaína-TO. Onde: Delta ELISA Ureia representa ELISA Ureia – ELISA Clássico, e Delta ELISA Glicina-Tris representa ELISA Glicina-Tris – ELISA Clássico.

Analisando-se as diferenças das densidades ópticas dos ensaios Ureia e Glicina-Tris com aquelas obtidas no ELISA Clássico, pode ser verificada a capacidade de evidenciar as reações inespecíficas e anticorpos complexados que as técnicas ELISA ureia e ELISA Glicina-tris apresentaram, respectivamente.

O delta ureia quando apresenta-se negativo sugere que reações inespecíficas de anticorpos estavam interferindo na reação do ELISA Clássico e foram retiradas pela Ureia, aumentando a especificidade da reação.

O delta Glicina-Tris representa o aparecimento de novos anticorpos que estavam bloqueados por antígenos. O que pode ser visualizado pelos índices positivos.

## 5 DISCUSSÃO

Através deste trabalho verificou-se que a adição de substâncias caotrópicas e promotoras de dissociação de imunocomplexos interfere na mensuração da densidade óptica em Ensaio Imunoenzimático.

A detecção de infecção por leishmaniose é complexa. Naturalmente, em fluidos biológicos, antígenos e anticorpos estão em estado de equilíbrio dinâmico entre as formas ligadas e não ligadas, que são dependentes da concentração. Conseqüentemente, o antígeno pode mascarar a proporção do anticorpo correspondente e limitar a detecção tanto do antígeno quanto do anticorpo. Sob certas condições dissociativas, esta interação pode ser interrompida, liberando anticorpos e antígenos e promovendo uma maior acurácia nas análises dos títulos dos anticorpos específicos e da concentração do antígeno (GUSTAW *et al.*, 2008).

Apesar de títulos de anticorpos contra um antígeno específico em um determinado estado de doença poderem ser altamente elevados, apenas uma fração do montante total é provável de ser detectado através do ELISA clássico, devido à interferência de reações inespecíficas e/ou de complexos antígeno-anticorpo (GUSTAW *et al.*, 2008).

A ocorrência de reações inespecíficas no diagnóstico sorológico de enfermidades é causa de muitos transtornos. Metodologias voltadas para o aumento da especificidade destas reações já foram propostas. Neste sentido, podem ser utilizadas substâncias caotrópicas, como a ureia. O reagente elimina anticorpos não específicos (de baixa avidéz) e mantém as ligações com os anticorpos específicos, que apresentam alta afinidade.

Os caotrópicos são bastante utilizados quando se objetiva investigar o tempo de infecção ou a intensidade da ligação do antígeno a seus anticorpos específicos. Entretanto, Santos (2008) inovou ao avaliar a influência da ureia na interferência de reações inespecíficas no diagnóstico da doença de Chagas e da leishmaniose tegumentar em uma região de sobreposição das endemias. No estudo foi verificado que o emprego da substância foi apropriado para a eliminação ou redução das reações cruzadas entre as parasitoses testadas, demonstrando que o agente promove a redução da quantidade de ligações inespecíficas. O pesquisador constatou que houve redução significativa nos valores de absorbância das amostras inicialmente diluídas em solução salina tamponada com fosfatos que apresentaram positividade para doença de Chagas e leishmaniose. Em seu trabalho Santos (2008)

demonstrou que a ureia numa concentração 0,5M, utilizada como diluente de amostras humanas testadas em um ELISA, apresentou melhor rendimento das reações imunoenzimáticas para o objetivo de diminuir a ocorrência de reações cruzadas.

No presente trabalho observou-se que a utilização da solução de ureia como diluente de amostras caninas para a pesquisa de leishmaniose visceral reduz os valores de densidades ópticas em Ensaio Imunoenzimático. A média aritmética das absorbâncias das amostras submetidas à diluição por ureia 0,5M é menor quando comparada à média aritmética das absorbâncias de um ELISA clássico. Conforme descrito por Fonseca *et al.* (1996), o mecanismo de ação de caotrópicos como uréia ainda é motivo de controvérsia, porém Hedman, Lappalainen e Makela (1989) defendem que a ureia, aplicada em imunodiagnósticos, promova o rompimento de pontes de hidrogênio das ligações inespecíficas fracas, mantendo-se somente a reação com anticorpos de alta afinidade, ou específicos. Assim como Santos (2008) este estudo presume que um ELISA Ureia, por meio da redução dos valores das densidades ópticas, seja capaz de promover uma redução de resultados falso positivos.

Neste trabalho os resultados do ELISA ureia são apresentados de acordo com o estudo realizado por Santos (2008), a partir das diferenças entre as densidades ópticas das amostras testadas com e sem a utilização do caotrópico.

A técnica de avidéz de anticorpos (IgG) ainda é amplamente empregada para diferenciar as fases aguda e crônica em doenças como toxoplasmose (Hedman *et al.*, 1989), sendo mensurada pela resistência da ligação do complexo antígeno-anticorpo. Em leishmaniose, foi demonstrado por Redhu *et al.* (2006) que o grau de avidéz da imunoglobulina G ao antígeno de *Leishmania* foi capaz de predizer o “tempo” de infecção por LV, distinguindo pacientes com infecção recente daqueles com infecção crônica. Teixeira Neto *et al.* (2010) verificaram que o índice de avidéz (expresso através da razão das absorbâncias das amostras com ureia e das amostras sem ureia) apresentava tendência a aumentar à medida que o tempo de infecção de cães aumentava e, que cães assintomáticos apresentaram menor índice de avidéz quando comparados aos animais sintomáticos.

Em resumo, a técnica de ELISA de alta avidéz utilizada para predizer o tempo de infecção dos animais indica que as moléculas de imunoglobulinas que possuem menor afinidade pelo antígeno tenham sua ligação rompida, mantendo somente aquelas que possuem a ligação mais forte e, portanto, pertencentes a um animal infectados há mais tempo.

A partir dos dados disponíveis acredita-se que o ELISA Ureia tenha aplicação como ferramenta diagnóstica. Pode ser utilizado objetivando o aumento da especificidade de reações e para analisar a soroprevalência por ser um marcador de infecções antigas.

Cabe ressaltar que esta pesquisa apresenta, pela primeira vez, o registro da utilização de agentes caotrópicos como diluente de amostra em estudos sobre a leishmaniose visceral canina.

A dissociação de complexos imunes visando diagnósticos mais confiáveis também tem sido estudada, sendo aplicada em diferentes situações e patologias, infecciosas ou não. Swartzentruber *et al.* (2009) demonstraram que a adição de substância que provocava a dissociação desses complexos na detecção de *Histoplasma* promovia melhora na sensibilidade sem redução na especificidade, precisão e reprodutibilidade. Na Doença de Alzheimer a inovação metodológica apresentou resultados interessantes, visto que foram encontradas diferenças significantes de autoanticorpos contra a proteína  $\beta$ -amilóide, envolvida na doença, em portadores da enfermidade e em sujeitos controle (GUSTAW *et al.*, 2008). Outros ensaios de sucesso focados na dissociação de imunocomplexos foram ainda relatados por Kummer e Li-Chan (1998), Xu *et al.* (2010) e Li *et al.* (2007), quando aplicaram ELISA para dissociar anticorpos bovinos, anticorpos anti-digoxina e anticorpos de ratos, respectivamente, todos voltados para desenvolvimento de melhores condições de dissociação.

A formação de imunocomplexos *in vivo* frequentemente representa apenas evento secundário durante a evolução de doenças, como as infecciosas e parasitárias (MARIANO *et al.*, 1982). No entanto, em determinadas condições, os complexos imunes podem se depositar em diferentes tecidos e iniciar uma série de eventos responsáveis por mecanismos patogênicos. Muitos dos aspectos da patogênese da leishmaniose visceral canina são atribuídos aos anticorpos produzidos, os quais formam imunocomplexos que se depositam em diversos tecidos, gerando lesões inflamatórias, representadas, principalmente por quadros de vasculites, uveítes, glomerulonefrites e artrites (CARVALHO, 2009).

Na leishmaniose a infecção é caracterizada por uma resposta policlonal de células B, levando a uma grande produção de anticorpos inespecíficos e específicos contra os antígenos parasitários. Esta hipergamaglobulinemia é relevante, podendo ser responsável por fenômenos autoimunes e pela presença de imunocomplexos circulantes - ICC. Esses ICC são produzidos em condições normais, mas sua formação pode ser intensificada em alguns processos

patológicos caracterizados pela presença de antígenos circulantes persistentes (LARANJEIRA, 2008; CHAKRABORTI; SARKAR; GHOSH, 2003).

Além de consequências patológicas, os ICC podem interferir em importantes funções celulares ativando, ainda, células com receptores para os antígenos que os formam (MARIANO *et al.*, 1982). Essas intervenções impactam, inclusive, no diagnóstico da LV, como em testes sorológicos.

Neste estudo observou-se que imunocomplexos presentes na amostra interferem no diagnóstico da LVC, em Ensaio Imunoenzimático. Isso foi demonstrado ao se comparar as absorbâncias de um ELISA convencional a de um ELISA em que havia uma etapa para dissociação de imunocomplexos. Através destes testes foram identificados resultados distintos de densidades ópticas, comprovando que as substâncias utilizadas como dissociadoras foram eficazes em sua atuação.

Na fase dissociadora do ELISA foi empregado um gradiente de pH, por meio das substâncias Glicina pH 2,5 e posteriormente Tris pH 8,5. O pH caracteriza o equilíbrio entre íons  $H^+$  e  $OH^-$  de uma solução e sua mudança afeta o equilíbrio de ionização de grupos ácidos e básicos de uma proteína. Segundo Fonseca *et al.* (1996), mudanças no pH afetam a distribuição de cargas de uma proteína e, conseqüentemente, as interações eletrostáticas entre grupos da proteína, entre a proteína e o solvente e entre as próprias moléculas do solvente.

A reação com choque ácido e posterior neutralização foi aplicada com a mesma finalidade por Carvalho, Hiramoto e Andrade Jr (2009), quando estudaram a influência de imunocomplexos presentes na amostra na sorologia da LV em cães de regiões endêmicas do estado de São Paulo. Trabalhos análogos foram também realizados por Carvalho *et al.* (2008), quando propuseram a dissociação de imunocomplexos na sorologia de *L. chagasi* em hamsters infectados e, por Li *et al.*, (2007), que obtiveram resultados favoráveis ao empregar em um ensaio dissociativo choque ácido nos soros testados e posterior ajuste do pH para neutralizar a reação.

Os dados obtidos nesta pesquisa foram expressos a partir das diferenças das densidades ópticas entre as amostras submetidas a dissociação de imunocomplexos e aquelas realizadas através de um ELISA convencional. Nos estudos de Carvalho *et al.* (2008) e de Carvalho, Hiramoto e Andrade Jr (2009), realizados com metodologia semelhante a empregada neste trabalho, os resultados obtidos foram expressos de forma convergente aos aqui empregados, a partir dos títulos obtidos.

Neste ensaio a adição e interação de substâncias de diferentes potenciais hidrogeniônicos no ELISA foi capaz de dissociar imunocomplexos pré-formados, observado pelo aumento dos títulos, que obtiveram média aritmética maior do que aquela observada no ELISA convencional. A elevação das densidades ópticas das amostras testadas presume que os anticorpos estavam bloqueados por antígenos circulantes, tendo a metodologia proposta grande potencial de eliminar resultados falsos negativos e de definir o diagnóstico de amostras que se encontram na zona cinza (*boderline*).

Acredita-se que o emprego do teste representa uma alternativa simples e pouco onerosa para promover um diagnóstico mais preciso da LV sem, no entanto, ser necessária a utilização de meios invasivos para coleta de amostras. Entende-se que o ensaio tenha capacidade de fornecer sensibilidades aceitáveis para ser utilizado para diagnóstico, especialmente como triagem para amostras de soro.

Propostos para aprimorar os métodos diagnósticos atualmente disponíveis para leishmaniose visceral canina, os ensaios ELISA Ureia e ELISA Glicina-Tris mostraram-se semelhantes ao ensaio aqui considerado padrão, o ELISA Clássico. As informações acima descritas indicam que os testes executados são capazes de promover alterações sem, no entanto, perderem a concordância com o ensaio de referência.

A análise das diferenças das densidades ópticas dos ensaios ELISA Ureia e ELISA Glicina-Tris com aquelas obtidas no ELISA Clássico demonstrou ainda o potencial que os testes apresentam de evidenciar reações inespecíficas e anticorpos complexados, respectivamente.

## CONCLUSÕES

- A utilização de substâncias caotrópicas e promotoras de dissociação de complexos imunes interfere na mensuração da densidade óptica de amostras de soro canino no Ensaio Imunoenzimático para LV;
- O emprego do caotrópico ureia em soros de cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral provoca a diminuição da densidade óptica das amostras testadas, quando comparadas a amostras submetidas a um ELISA convencional. A ocorrência se faz pela quebra das reações inespecíficas ou de baixa avidéz.
- As substâncias Glicina e Tris (pH 2,5 e 8,5, respectivamente) empregadas em um Ensaio Imunoenzimático para detecção de LVC mostram-se eficientes em elevar títulos de absorbâncias quando este é comparado a um ELISA convencional. Este fato indica que no ensaio proposto há a dissociação de imunocomplexos presentes nos soros pelo bloqueio de antígenos circulantes, tendo perspectiva de ser utilizado rotineiramente para promover diagnóstico mais preciso da LV.

## **PERSPECTIVAS E RESULTADOS ESPERADOS**

Ambos os ensaios experimentais empregados neste estudo fornecem resultados preliminares relevantes ao se considerar a busca constante pelo aprimoramento no diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias.

Novas pesquisas devem ser realizadas no sentido de aperfeiçoar os ensaios aqui apresentados, propondo adequações e novas aplicações.

Em um futuro próximo, quem sabe, esta estratégia possa ser aplicada *in vivo* para minimizar a gravidade de doenças decorrentes da deposição de imunocomplexos nos tecidos como malária, leishmaniose e outras enfermidades, podendo inclusive ter aplicação na terapêutica.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMO, C.; FONTES, C. J. F.; KRETTLI, A. U. Cross-reactivity between antibodies in the sera of individuals with leishmaniasis, toxoplasmosis, and Chagas' disease and antigens of the blood-stage forms of *Plasmodium falciparum* determined by Indirect Immunofluorescence. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, v. 53, p. 202-205, 1995.
- ACEDO-SANCHEZ, C.; MORILLAS-MARQUEZ, F.; SANCHÍS-MARÍN, M. C.; MARTÍN-SANCHEZ, J. Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 75, n. 1, p. 1-8, 1998.
- ALVAR, J. CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ALVARENGA, D. A.; ESCALDA, P. M. F.; COSTA, A. S. V.; MONREAL, M. T. F. D. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 194-197, mar-abr, 2010.
- ANDRADE, H. M.; REIS, A. B.; SANTOS, S. L.; SANTOS, S. L.; VOLPINI, A. C.; MARQUES, M. J.; ROMANHA, A. J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 231-238, 2006.
- ANDRADE-FILHO, J. D.; VALENTE, M. B.; ANDRADE, W. A.; BRAZIL, R. P.; FALCÃO, A. L. Flebotomíneos do Estado do Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira da Medicina Tropical**, v. 34, n. 4, p. 323-329, 2001.
- ARAGUAÍNA. Prefeitura Municipal de Araguaína. **Informativos Gerais do Município**. Disponível em: <<http://www.araguaina.to.gov.br/?pg=informativo>>. Acesso em: 10 set 2010.
- ARAGUAÍNA. Secretaria Municipal de Saúde. Centro de Controle de Zoonoses. **Estimativa da população canina 2008 e resultados sorológicos LVC 2007-2008**. 2009.
- ARAGUAÍNA. Secretaria Municipal de Saúde. Centro de Controle de Zoonoses. **Resultados sorológicos LVC 2008-2009**. 2010.
- ARAÚJO E SILVA E.; ANDREOTTI, R.; HONER, M. R. Behaviour of *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of American Visceral Leishmaniasis, in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, p.420-5. 2007.
- BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Ed Atheneu, p. 1234-1259, 1996.
- BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M.C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E.M.; PEDRAL, S.D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J.M.; HOUGHTON, R.L.; DAVID, JR. & REED, S.G. Rk39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, p. 758-761, 1996.

BARATA, R. A.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; FORTES-DIAS, C. L.; SILVA, J. C.; PAULA, E. V. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American Leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais – Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 481-487, 2004.

BAUZER, G. S. R. L.; SOUZA, N. A.; MAINGON, R. D. C.; PEIXOTO, A. A. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 1, p. 1-12, fev 2007.

BEVILACQUA, P. D.; PAIXÃO, H. H.; MODENA, C. M.; CASTRO, M. C. P. S. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 1, p. 1-8, 2001.

BHATIA, A.; DAIFALLA, N. S.; JEN, S.; BADARÓ, R.; REED, S. G.; SKEIKY, Y. A. W. Cloning, characterization and serological evaluation of K39 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 102, p. 249-261, 1999.

BOELAERT, M.; BHATTACHARYA, S.; CHAPPUIS, F.; EL SAFI, S. H.; HAILU, A.; MONDAL, D.; RIJAL, S.; SUNDAR, S.; WASUNNA, M.; PEELING, R. W. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. **Nature reviews. Microbiology Group**, p. 30-39, nov., 2007.

BORGES, B. K. A.; SILVA, J. A.; HADDAD, J. P.; MOREIRA, E. C.; MAGALHÃES, D. F.; RIBEIRO, L. M. L.; FIUZA, V. O. P. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 5, p. 1035-1043, 2009.

BRAGA, M. D. M.; COELHO, I. C. B.; POMPEU, M. M. L.; EVANS, T. G.; MACAULLIFE, I. T.; TEIXEIRA, M. J. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imunoenzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 315, n. 5, p. 419-424, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008**: proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2008.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **II Fórum de discussão sobre o tratamento da leishmaniose visceral canina**. Brasília/DF - 01 e 02/10/2009. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii\\_forum\\_tratamento\\_relatorio\\_final\\_07\\_10\\_2009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii_forum_tratamento_relatorio_final_07_10_2009.pdf)>. Acesso em: 03 jan 2010. 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Nota de esclarecimento sobre as Vacinas Antileishmaniose Visceral Canina registradas no MAPA**, Brasília, mai 2009. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmaniosevisceral\\_nota\\_esclarecimento27052009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmaniosevisceral_nota_esclarecimento27052009.pdf)>. Acesso em: 10 set 2010. 2009b.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Leishmaniose Visceral - Casos confirmados por UF Notificação segundo Ano Notificação - Período: 2009.** Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>>. Acesso em: 10 set 2010. 2010.

BRAZIL, R. P.; GOMES BRAZIL, B. Biologia de flebotomíneos neotropicais. Em: Rangel, E. F. & Lainson, R. **Flebotomíneos do Brasil**. 20 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. Cap 4:257-274.

CAMARGO-NEVES, V. L.; KATZ, G.; RODAS, L. A.; POLETTO, D. W.; LAGE, L. C.; SPINOLA, R. M.; CRUZ, O.G. Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Aracatuba, São Paulo, Brazil, 1998-1999. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, p.1263-1267, 2001.

CARVALHO, C. A.; HIRAMOTO, R. M. ; ANDRADE Jr, H. F. **Influência da dissociação de imunocomplexos na sorologia da leishmaniose visceral em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, provenientes de áreas endêmicas do estado de São Paulo**. VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 2009.

CARVALHO, C. A.; MEIRELES, L. R; BORBOREMA, S. E. T.; ANDRADE JR, H. F. **Influence of pH dissociation of immune complexes in IgG serology during *Leishmania chagasi* infection in hamsters**. XXXV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease and XXIV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2008, Águas de Lindóia. XXXV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, XXIV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2008.

CARVALHO, J. K. M. R. **Leishmaniose Visceral Canina**: aspectos clínicos e de diagnóstico. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Campo Grande, 71f., 2009.

CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; FERREIRA, L. C.; DEANE, L.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F. N.; PAUMGARTTEN, M. J. V.; SÁ, B. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.33, p. 89-229, 1938.

CHAKRABORTI, T.; SARKAR, D.; GHOSH, D. K. Immune complex antigens as a tool in serodiagnosis of kala-azar. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, p. 191-198, 2003.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews – Microbiology**, v. 5, nov., 2007.

COSTA, C. A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P. A.; DIAS, M.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; COSTA, R. T.; MAGALHÃES-ROCHA, N. M.; MAYRINK, W. Leishmaniose Visceral Canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 24, p. 21-25, 1991.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; PEREIRA, C. A.; TAVARES, J. P.; ARAÚJO, M. V.; GONÇALVES, M. J. O. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 464, 1999.

COSTA, C. H. N.; STEWART, J. M.; GOMES, R. B. B.; GARCEZ, L. M.; RAMOS, P. K. S.; BOZZA, M.; SATOSKAR, A.; DISSANAYAKE, S.; SANTOS, R. S.; SILVA, M. R. B.; SHAW, J. J.; DAVID, J. R.; MAGUIRE, J. H. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 334-337, 2002.

CRUZ, F. C.; MARIANO, W. S.; MOURÃO, J. C.; CARAJAR, A. D. G.; NUNES, M. P.; ARAÚJO, B. M. **Aspectos sorológicos e epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina em Araguaína, Tocantins, Brasil**. Jornada do Meio Ambiente – Sociedade Contemporânea e Sustentabilidade, 2010.

CUMMINS, D.; AMIN, S.; HALIL, O.; CHIODINI P. L., HEWITT, P. E., RADLEYSMITH, R. Visceral Leishmaniasis after a Cardiac Surgery. **Archives of Disease in Childhood**, v. 72, p. 235-6, 1995.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem: *Leishmania chagasi*. **O Hospital**, v. 11, n. 2, p. 148-152, 1937.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 3, p. 296–311, mar., 1994.

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**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 111-118, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; SIMÕES-MATTOS, L.; BRITO, F. L. C.; FIGUEREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Feline leishmaniasis: literature review. **Clínica Veterinária**, v. 11, n. 61, p. 32-39, 2006.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de Calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **O Hospital**, v. 45, p. 419-421, 1954a.

\_\_\_\_\_. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em caso humano de Leishmaniose Visceral. **O Hospital**, v. 46, p. 487-489, 1954b.

DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil**. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil, Ed. S.N.E.S., Rio de Janeiro, 162p. 1956.

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

DOURADO, Z. F.; SILVA, H. D.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Visceral até o surgimento dos testes Imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 3, p. 205-214, set.-dez. 2007.

DUXBURY, R. E.; SADUN, E. H. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 13, p. 525-529, 1964.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochem.**, v. 8, p. 871-874, 1971.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, v. 136, p. 514-516, 1995.

FIGUEIREDO, F. B.; BARBOSA FILHO, C. J. L.; SCHUBACH, E. Y. P.; PEREIRA, S. A.; NASCIMENTO, L. D.; MADEIRA, M. F. Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 98-99, jan-fev, 2010.

FONSECA, L. C.; CORRÊA, N. C. R.; GARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; PENHA-SILVA, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, v.29, n. 3, São Paulo, mai-jun, 2006.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Centro de Referência em Leishmanioses – CRLeish. **Manual de rotinas do Centro de Referência em Leishmanioses. Programa de Extensão Pesquisa-Ensino-Serviços / PEPES: Leishmanioses**. Rio de Janeiro, 2004.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. B. L.; REGO JR, F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Estudo de flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GOMES, A. C; BARATA, J. M.; ROCHA E SILVA, E. O.; GALATI, E.A. Ecologic aspects of american tegumentary leishmaniasis. 6. *Anthropophilic Phlebotomus* fauna of residual forests located in the northeastern region of the state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, p. 32-39, 1989.

GOMES, A.P.S.; CORDEIRO, R.L.R. Reação cruzada no diagnóstico sorológico de leishmaniose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, Supl. 1, p. 238, 2004.

GOMES, K. C. **Estudo da fauna dos flebotomíneos no município de Araguaína-TO, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2007**. 2008. Monografia da Especialização em Vigilância em Saúde: Controle de Zoonoses – Instituto de Medicina Tropical do Tocantins, Fundação de Medicina Tropical do Tocantins, Araguaína, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GUSTAW, K. A.; GARRETT, M. R.; LEE, H.; CASTELLANI, R. J.; ZAGORSKI, M. G.; PRAKASAM, A.; SIEDLAK, S. L.; ZHU, X.; PERRY, G.; PETERSEN, R. B.; FRIEDLAND, R. P. e SMITH, M. A. Antigen-antibody dissociation in Alzheimer disease: a novel approach to diagnosis. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, p. 1350-1356, 2008.

HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPPAIA, I.; MAKELA, O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. **Journal of Infectious Diseases**, v. 159, p. 736-740, 1989.

HOMMEL, M. Enzymaimmunoassay in leishmaniasis. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 15-16, 1976.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOULIS, V. G. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 99-113, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estimativas das populações residentes, em 1º de julho de 2009, segundo os municípios**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=to>>. Acesso em: 19 dez 2009. 2009a.

\_\_\_\_\_. **Cidades. Tocantins – Araguaína**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 19 dez 2009. 2009b.

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

KUMMER; LI-CHAN. Application of an ELISA-elution assay as a screening tool for dissociation of yolk antibody-antigen complexes. **Journal of Immunological Methods**, v. 211, p. 125-137, 1998.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETRES, W. e KILLICK-KENDRICK, R. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol 1, **Academic Press Inc. London**, p. 1-120, 1987.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 569-596, 1983.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; LINS, Z. C. Leishmaniasis in Brazil, IV. The fox, *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará State, Brazil. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n.6, p. 741-745, 1969.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 517, 1987.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-74, 1977.

LARANGEIRA, D. F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia. 79f., 2008.

LAUTENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 6, n. 67, jul., 2009.

LEAL, C. R. B. Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 69, set., 2009.

LEIVA, M.; LLORET, A.; PENA, T.; ROURA, X. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 1, p. 71-75, 2005.

LI, Q.; GORDON, M.; CAO, C.; UGEM, K. E.; MORGAN, D. Improvement of a low pH antigen-antibody dissociation procedure for ELISA measurement of circulating anti-Ab antibodies. **Biomed Central Neuroscience**, v. 22, 2007.

LIRA, R. A. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos**. 2005. Dissertação de Mestrado, Mestrado em Saúde Pública. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 43f., Recife, 2005.

LUSTOSA, E. S.; NAVES, H. A. M.; CARVALHO, M. E. S. D.; BARBOSA W. Contribuição para o conhecimento da fauna flebotômica do estado de Goiás: 1984-1985. Nota prévia I. **Revista de Patologia Tropical**, v. 15, p. 7-11, 1986.

MACHADO, M. R. M. **Leishmaniose visceral: uma endemia em expansão no Brasil e emergente no Estado do Tocantins**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2004.

MALTEZOU, H. C. Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 10, 2010.

MANCIANTE, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescent assay. **Veterinary Parasitology**, v.65, p.1-9, 1996.

MANNA, L.; GRAVINO, A. E.; PICILLO, E.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Leishmania DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1149, p.358-360, 2008.

MARCONDES, C. B.; LOZOVEI, A. L.; VILELA, J. H. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 51-58, 1998.

MARIANO, O. N.; CUNHA, R. H.; SILVA, A. A.; CHAVES, J.; VAZ, C. A. C. Complexos imunes no calazar experimental. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 24, n. 3., p. 125-131, mai-jun, 1982.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; AMENDOEIRA, M. R. Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 41, p. 69-84, 1981.

MAURICIO, I. L.; STOHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, v. 16, p.188-9, 2000.

MELLO, D. A.; REGO JR F. A.; OSHOZO, E.; NUNES, V. L. B. *Cerdocyon thous* (*L.*)(*carnivora*, *Canidae*) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha e Chagas, 1973) in Corumbá (Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 2, p. 259, 1988.

MIGONE, L. E. Un caso de Kalazar en Assunción (Paraguay). **Bulletin Societe Pathologic Exotique**, v. 6, p. 118-120, 1913.

MIRET, J.; NASCIMENTO, E.; SAMPAIO, W.; FRANCA, J. C.; FUJIWARA, R. T.; VALE, A., DIAS, E. S.; VIEIRA, E.; DA COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; CAMPOS NETO, A.; REED, S. Evaluation of an immunochemotherapeutic protocol constituted of N-methyl meglumine antimoniate (Glucantime) and the recombinant Leish-110f + MPL-SE vaccine to treat canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.26, p.1585-1594, 2008.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. 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, Uberaba, jul.-ago., 2008.

MORALES, G.; CARRILO, G.; REQUENA, J. M.; GUZMAN, F.; GÓMEZ, L. C.; PATARROYO, M. E.; ALONSO, C. Mapping of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* gp63 protein recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 114, p. 507-516, 1997.

MUKHTAR, M. M.; SHARIEF, A. H.; EL SAFFI, S. H.; HIGAZZI, T. B.; ADAM, A. M.; ABDALLA, H. S. Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminar report. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 33-36, 2000.

NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, 1998. 524p.

NICOLLE, C. Isolament et culture dès corps de Leishman. **Archives de l'Institut Pasteur de Tunis**, v. 3., p. 55-56, 1908.



NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine du Kala azar. **Comptes Rendus de l'Académie des sciences**, p. 146-789, 1908.

NUSSENZWEIG, V. **Contribuição para o estudo da reação de fixação do complemento na leishmaniose visceral com antígeno extraído de bacilos da tuberculose**. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ed. S.N.E.S., Rio de Janeiro, 119p. 1957.

OKONG'O-ODERA, E. A.; KURTZHALS, J. A.; HET, A.S. Measurement of serum antibodies against native *Leishmania* gp63 distinguishes between ongoing and previous *L. donovani* infection. **APMIS - Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 101, p. 642-646, 1993.

OLIVEIRA, C. L.; ASSUNÇÃO, R. M.; REIS, I. A.; PROIETTI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil, 1994-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 5, p. 1231-1239, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Update of American Trypanosomiasis and Leishmaniasis Control and Research: Final Report**. Rio de Janeiro, nov, 2007.

\_\_\_\_\_. **Visceral leishmaniasis therapy: statement on the outcome of a meeting**. Madrid, 19 jun 2009. Disponível em: <[www.who.int/leishmaniasis/resources/Leish\\_VL\\_Therapy\\_statement.pdf](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leish_VL_Therapy_statement.pdf)>. Acesso em: 13 dez 2009. 2009a.

\_\_\_\_\_. **Lead discovery for infectious tropical diseases**. Annual Report 2008. 2009. Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/publications/about-tdr/annual-reports/lead-discovery-for-drugs-2008>>. Acesso em: 17 dez 2009. 2009b.

\_\_\_\_\_. **Research to Support the Elimination of Visceral Leishmaniasis**. Annual Report 2008. 2009. Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/publications/about-tdr/annual-reports/visceral-leishmaniasis-elimination-2008>>. Acesso em: 17 dez 2009. 2009c.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Informe **Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas**. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 2006. 152p. Disponível em: <[www.panaftosa.org.br/Comp/Zoonoses/Leishma/doc/Inf\\_final\\_leish\\_2005.pdf](http://www.panaftosa.org.br/Comp/Zoonoses/Leishma/doc/Inf_final_leish_2005.pdf)>. Acesso em: 28 dez 2009. 2006.

PENNA, H. A., Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, v. 48, p. 949-950, 1934.

RANGEL, E. F. Flebótomos Transmissores de *Leishmania (L.) Infantum Chagasi* nas Américas e Técnicas Disponíveis de Captura para Vigilância Entomológica. In: **Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas**. Organização Pan-americana da Saúde. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 2006.

RANGEL, E. F.; LAISON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: FioCruz, 2003. 360p.

REDHU, N. S.; DEY, A.; BALOONI, V., SINGH, S. Use of Immunoglobulin G avidity to determine the course of disease in Visceral an Post-Kala-Azar dermal leishmaniasis patients. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 8, p. 969-971, 2006.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 21–25, 2007.

RIBEIRO, R. R.; MOURA, E. P.; PIMENTEL, V. M.; SAMPAIO, W. M.; SILVA, S. M.; SCHETTINI, D. A.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; TAFURI, W. L.; DEMICHELI, C.; MELO, M. N.; FREZARD, F.; MICHALICK, M. S. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.2564-2572, 2008.

RIOUX, J. A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 65, p. 111–125, 1990.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, p. 267-275, 1990.

SANTOS, A. P. **Sorologia de leishmaniose tegumentar americana em áreas de avaliação de infecção chagásica no Estado de São Paulo, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Campinas, SP, 2008.

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

SAVANI, E. S. M.; CAMARGO, M. C. G. O.; CARVALHO, M. R.; ZAMPIERI, R. A.; SANTOS, M. G.; D'ÁURIA, S. R. N.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia Country São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 3, p. 229-233, 2004.

SHAW, J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, p. 486-490, 1988.

\_\_\_\_\_. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 471–478, 1994.

\_\_\_\_\_. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, Rio de Janeiro, ago, 2007.

SHERLOCK, I. A., MIRANDA, J. C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI JR G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris (Marsupialia, Didelphidae)* with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n.4, p. 511, 1984.

SHROUT, P. E.; FLEISS, J. L. Intraclass Correlations: Uses in Assessing Rater Reliability. **Psychological Bulletin**, v. 86, n. 2, p. 420-428, 1979.

SILVA, A. V.; SOUZA CÂNDIDO, C. D.; PITA PEREIRA, D.; BRAZIL, R. P.; CARREIRA, J. C. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v. 105, n. 1, p. 92-94, 2008.

SILVA, C. R. C. **Implementação de um Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Sorologia para Leishmaniose Visceral Canina**. 2007. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro, 2007.

SILVA, E. S.; SCHOONE, G. J.; GONTIJO, C. M. F.; BRAZIL, R. P.; PACHECO, R. S.; SCHALLIG, H. D. F. H. Application of Direct Agglutination Test (DAT) and Fast Agglutination Screening Test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. **Kinetoplastid Biol and Disease**, v. 4, p. 4, 2005.

SWARTZENTRUBER, S.; LEMONTE, A.; WITT, J.; FULLER, D.; DAVIS, T.; HAGE, C.; CONNOLLY, P.; DURKIN, M.; WHEAT, L. J. Improved detection of *Histoplasma* antigenemia following dissociation of immune complexes. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 6, n. 3, p. 320-322, mar., 2009.

TEBOURSKI, F.; EL GAIED, A.; LOUZIR, H.; BEM ISMAIL, R.; KAMMOUN, R.; DELLAGI, K. Identification of an immunodominant 32-kilo Dalton membrane protein of *Leishmania donovani infantum* promastigotas suitable for specific diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2474-2480, 1994.

TEIXEIRA NETO, R.C.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C.M.; VITOR, R. W. A.; WENDEL COURA-VITAL, W.; QUARESMA, P. F.; KER, H. G.; MELO, L. A.; GONTIJO, C. M. F.; REIS, A. B. Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, n. 169, p. 248-257, 2010.

TOCANTINS. Secretaria Estadual de Saúde. Diretoria do Laboratório de Saúde Pública. **Consolidado anual de amostras encaminhadas para diagnóstico de Leishmaniose Canina – IFI. Lacen. 2004-2008**. 2009a.

\_\_\_\_\_. Portal de Serviços e Informações do Estado do Tocantins. **Tocantins – Características**. Disponível em: <<http://to.gov.br/tocantins/2>>. Acesso em: 19 dez 2009. 2009b.

TRAVI, B. L.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colômbia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, p. 557-565, 1994.

VERONESI, R., FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**, São Paulo: Editora Atheneu, 1996.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. N. N. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 53, p. 55-65, 1976.

XU, R.; LIN, G.; WANG, W.; LIU, M.; ZHAN, S.; WANG, L.; ZHANG, K.; ZHANG, R.; LI, J. Application of an ELISA-elution assay to dissociate digoxin-antibody complexes in immunoaffinity chromatography. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 71, p. 55-60, 2010.

ZACKIEWICZ, C. Desafios para Estruturar uma Política de Medicamentos para o Tratamento da Leishmaniose Visceral nas Américas. In: **Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas**. Organização Pan-americana da Saúde. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 2006.

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Araçatuba, 2006.