

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

**Estudo comparativo entre métodos de diagnóstico da  
Leishmaniose Visceral em cães procedentes de Araguaína –  
Tocantins.**

**Celina Fernandes Sales**

Goiânia – GO  
2010

**Celina Fernandes Sales**

**Estudo comparativo entre métodos de diagnóstico da  
Leishmaniose Visceral em cães procedentes de Araguaína –  
Tocantins.**

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

S163e Sales, Celina Fernandes.

Estudo comparativo entre métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral em cães procedentes de Araguaína – Tocantins / Celina Fernandes Sales. – 2010

xiv, 96 f. : il.

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

“Orientadora: Dra. Dulcinéa Maria Barbosa Campos”.

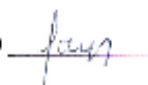
Bibliografia: p. 74-93

1. Leishmaniose visceral canina – Araguaína (TO). 2. Cães – doenças. 3. Zoonoses. I. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. II. Universidade Estadual de Goiás. III. Centro Universitário de Anápolis. IV. Título.


CDU: 616.993.161(811.7Araguaína)(043.3)

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

DEFENDIDA PELA MESTRANDA CELINA FERNANDES SALLES, EM  
29 DE OUTUBRO DE 2010, CONSIDERADA aprovada  
PELA BANCA EXAMINADORA.

1) Dra. Dulceza Maria Barbosa Campos / Uui Evangélica (Presidente) 

2) Dra. Giszer Alves de Sousa Pereira / Uui Evangélica (Membro Externa) 

3) Dr. Gilberto Lucio Benedito de Aquino / UBG (Membro Interno) 

## *Dedicatória*

*A minha família,*

*Aos meus pais (Socorro e Salim), meus exemplos valiosos de honestidade, profissionalismo e sabedoria.*

*Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos pela inspiração de minhas investidas.*

*Ao meu esposo **Oswaldo** pelo amor e carinho. Obrigada pelo incentivo e compreensão em meus momentos de ausência e limites de intolerância.*

*A minha vizinha **Débora**, pelo exemplo de vida e perseverança (in memoriam).*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, incondicionalmente:

A **Deus**, pela sua infinita bondade, e esperança nos momentos mais difíceis da minha caminhada...

À **Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Dulcinéa Maria Barbosa Campos**, exemplo de seriedade e competência. Minha gratidão por sua orientação.

Ao **Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior**, por todo apoio, atenção, disponibilidade e colaboração nesse trabalho. Seu profissionalismo, competência, dedicação, simplicidade, mas acima de tudo, seus valores humanos, tornam-no um exemplo a ser seguido.

À **Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Regina Meirelles Eckman** por todo apoio, e colaboração para realização deste trabalho, suas contribuições e sugestões construtivas engrandeceram esse estudo.

Ao **Prof. MSc. Bruno Medrado Araújo** pelo profissionalismo, disponibilidade, atenção e constante incentivo, além da essencial colaboração na coleta de amostras dos cães.

À **Prof<sup>ª</sup>. MSc. Marlene Neves Antunes** pelo apoio fundamental durante o decorrer da pós-graduação, a senhora passou de uma ex-professora e para uma grande amiga.

À **Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Irma Seixas Duarte, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Carla Pagliari e Elaine Raniero Fernandes** do Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis da Faculdade de Medicina/Universidade de São Paulo (FM/USP) pela disponibilidade e colaboração na realização da histopatologia e imunohistoquímica.

Ao **Dr. Roberto Hiramoto** do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pela gentil contribuição na realização desse trabalho, através da disponibilização dos Kit's de Teste Rápido para LVC, e das cepas positivas e negativas para controle dos testes.

Aos membros do Centro de Controle de Zoonoses de Araguaína – TO, especialmente a **Dra. Rosângela**, pela cordialidade, a **Mara** e o **Leonardo** pela disponibilidade e auxílio na coleta, a **Julice** pelas sugestões.

Ao prof<sup>º</sup>. **Dr. Ademir João Camargo** da Universidade Estadual de Goiás pelo auxílio na realização dos testes estatísticos.

Aos **cães** envolvidos nesse estudo, pois eles deram, literalmente sangue por esse trabalho.

Aos professores de graduação e amigos da Fundação de Medicina Tropical, **Prof. Adriane de Andrade, Prof. Hebert Batista, Prof<sup>ra</sup>. Rosa Sena, Amanda Vidal, Douglas Bringel, Franciano Cardoso, e aos demais colegas** pelo empenho e excelente colaboração para realização desse projeto e conquista desse sonho.

Aos fiéis amigos do Instituto de Medicina Tropical do Tocantins (IMT-TO), **André, Aline, Alexandre, Lorena, Orleanes e Shirley**, pelo incentivo constante e agradável companhia.

Ao **Prof. Dr Cláudio Henrique Fernandes** da Unitins Agro pela colaboração na realização da coleta dos cães.

As Pessoainhas maravilhosas: **Andrés, Bruna, Camila, Juliana, Marina, Rose, Dona Fran, Solange** do laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-SP) USP – São Paulo, pelas valiosas contribuições e demonstrações de amizade que me permitiram concluir com êxito este trabalho.

À amiga **Verissa Martins**, companheira incansável, que esteve presente em várias etapas da minha vida, contribuindo, sofrendo, vibrando, incentivando. Obrigada por tudo, amiga.

À amiga **Virginia Marques** por me receber gentilmente no seu apartamento em São Paulo, pelo incentivo constante, pelos diálogos e passeios para distrair e diminuir a ansiedade.

A todos da turma de mestrado, pela amizade, confraternizações, brincadeiras, conversas, por todos os momentos compartilhados durante o curso.

À **FMTTO**, pelo apoio institucional e financeiro, sem o qual não teria sido possível a realização desta pesquisa.

## **Estudo comparativo entre métodos de diagnóstico da Leishmaniose Visceral em cães procedentes de Araguaína – Tocantins.**

### **RESUMO**

A leishmaniose visceral é uma zoonose típica de áreas tropicais, dependente da tríade: hospedeiro (homem), vetor (flebotomíneo) e reservatório (cão e animais silvestres). Nos países do novo mundo o protozoário responsável pela infecção é *Leishmania chagasi*. No Brasil, até o presente momento, os surtos da doença estão associados à presença de cães soropositivos e em várias regiões geográficas a epidemia canina precedeu a humana. *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor, possui ampla distribuição geográfica no novo mundo, sendo apontado como o principal responsável pela persistência da doença em várias áreas tropicais e neotropicais do planeta. O Brasil é responsável por 90% dos casos ocorridos na América Latina e a região Nordeste do país registra os maiores índices da infecção seguida pela região Sudeste, Norte, Centro-Oeste e Sul, respectivamente. Era considerada uma enfermidade de caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte. O estado do Tocantins destaca-se como um dos maiores responsáveis pelo aumento das estatísticas envolvendo a leishmaniose visceral humana na região Norte do Brasil. Araguaína é responsável por aproximadamente 50% dos casos de leishmaniose visceral humana notificados anualmente no Tocantins, e ainda detém o maior número de notificações de leishmaniose visceral canina do Estado. Para o efetivo controle do reservatório canino é preciso haver acurácia no diagnóstico. O diagnóstico laboratorial desta enfermidade continua sendo um desafio. Observa-se um amplo espectro clínico da doença, tanto em humanos, como em animais e segundo alguns autores este fato é responsabilizado, em parte, por dificuldades no diagnóstico laboratorial. Por esta razão, propôs-se avaliar o emprego dos métodos: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Teste Rápido (DPP®), Imunohistoquímica (IH), Imunoensaio Enzimático (ELISA) e Coloração pela Hematoxilina Eosina (HE) em 20 amostras de soro e de linfonodos de cães, considerados positivos para leishmaniose visceral canina, que seguiram para eutanásia no Centro de Controle de Zoonoses de Araguaína em 2009. Foram encontrados 100% de positividade através da RIFI, 95% tanto por DPP®, como por PCR, 90% por ELISA, e 25%, em cada um dos testes IH e HE. Com o objetivo de realizar um estudo comparativo entre os testes, empregou-se o método Kappa de Cohen. Melhores resultados de concordância foram observados quando se comparou ELISA com DPP® obtendo índice Kappa (0,643) considerado bom, conforme parâmetros sugeridos por Landis & Koch (1977). Os resultados obtidos através do presente trabalho, permitem propor o emprego do teste rápido DPP® em inquérito soropidemiológico canino tendo em vista sua praticidade e facilidade de execução quando se compara com o ELISA.

**Palavras-chave:** Leishmaniose visceral canina, diagnóstico, sorológico, parasitológico, molecular.



## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a zoonotic disease typical of tropical areas, dependent on the triad: host (man), vector (sandfly) and reservoir (dogs and wild animals). In the new world countries the infection is responsible for protozoan *Leishmania chagasi*. In Brazil, until now, outbreaks of disease are associated with the presence of seropositive dogs and in various geographic regions the epidemic preceded the human canine. *Lutzomyia longipalpis* is the main vector, has a wide geographical distribution in the new world, having been appointed as the main responsible for the persistence of the disease in many tropical and neotropical the planet. Brazil accounts for 90% of cases occurring in Latin America and the Northeast region recorded the highest rates of infection followed by Southeast, North, Midwest and South, respectively. It was considered an illness of a rural and more recently has expanded into urban areas of medium and large. The state of Tocantins, Brazil stands out as one of the most responsible for the increase of statistics involving human visceral leishmaniasis in northern Brazil. Araguaína is responsible for approximately 50% of cases of human visceral leishmaniasis reported annually in Tocantins, and still has the largest number of reports of canine visceral leishmaniasis in the state. For the effective control of the canine reservoir, there must be accurate in the diagnosis. The laboratory diagnosis of this disease remains a challenge. There is a wide clinical spectrum of disease in both humans and animals and according to some authors, this fact is blamed, in part, to difficulties in laboratory diagnosis. For this reason, we proposed to evaluate the use of methods: Immunofluorescence Assay (RIFI), Polymerase Chain Reaction (PCR), Quick Test (DPP®), Immunohistochemistry (IH), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Staining by hematoxylin and eosin (HE) in 20 samples of serum and lymph of dogs, considered positive for canine visceral leishmaniasis, would go for euthanasia by the Center for Zoonosis Control from Araguaína in 2009. We found 100% positive by IFA, 95% for both DPP®, for PCR, 90% for ELISA and 25% in each test HI and HE. Aiming to do a comparative study between the methods, we used the method of Cohen's Kappa. Best agreement results were observed when compared with DPP® ELISA getting Kappa (0.643) considered good, according to parameters suggested by Landis & Koch (1977). The results obtained from this study, allow us to propose the use of DPP® rapid test in canine seroepidemiological survey in view of its convenience and ease of implementation when compared with ELISA.

**Keywords:** Leishmaniasis canine visceral, diagnosis, serological, parasitological, molecular.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral segundo município, Brasil 2002.....	17
<b>Figura 2.</b> Distribuição da leishmaniose visceral no mundo.....	17
<b>Figura 3.</b> Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.....	19
<b>Figura 4.</b> Casos confirmados de leishmaniose visceral humana, região norte e Tocantins, 1990 a 2008*.....	25
<b>Figura 5.</b> Óbitos por leishmaniose visceral humana na região norte e Tocantins, no período de 2000 a 2006.....	27
<b>Figura 6.</b> Municípios do Tocantins segundo estratificação epidemiológica da Leishmaniose Visceral com registro de <i>Lu. longipalpis</i> .....	28
<b>Figura 7.</b> Ciclo de transmissão da leishmaniose visceral canina.....	37
<b>Figura 8.</b> Percentual de positividade resultante do emprego de seis métodos laboratoriais em amostras de soro e tecidos de 20 cães, naturalmente infectados por leishmaniose visceral, procedentes de Centro de Controle de Zoonoses de Araguaína –TO, durante o ano de 2009.....	65
<b>Figura 9.</b> Análise dos amplificadores de PCR em gel de agarose a 1,5%, referente as 20 amostras fixadas em etanol de linfonodos de cães de Araguaína, 2009.....	66
<b>Figura 10.</b> Gel de Agarose 1,5% dos produtos de PCR, <b>PM:</b> Padrão de Peso Molecular – 100 pb. <b>CN:</b> Controle Negativo – sem DNA. <b>CP:</b> Controle Positivo para <i>Leishmania</i> sp.....	66
<b>Figura 11.</b> Formas amastigotas, cor marrom, presentes em linfonodo do cão nº 09, procedente de Araguaína – TO. Aumento (600x).....	67
<b>Figura 12.</b> Corte de tecido de linfonodo do cão nº 10 submetido a coloração por hematoxilina/eosina. Aumento de (600x).....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Características dos Oligonucleotídeos utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (K13A-K13B).....	<b>61</b>
<b>TABELA 2.</b> Parâmetros sugeridos por Landis & Koch (1977) para interpretar a estatística de Kappa.....	<b>64</b>
<b>TABELA 3.</b> Percentual de Concordância e Índice Kappa resultante da análise (dois a dois) dos métodos ELISA e RIFI, com os demais testes empregados no estudo.....	<b>68</b>
<b>TABELA 4.</b> Percentual de Concordância e Índice Kappa resultante da análise (dois a dois) dos métodos PCR, DPP®, HE e IH, com os demais testes empregados no estudo.....	<b>68</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCZ	- Centro de Controle de Zoonoses
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxiribonucleotídeos trifosfatados
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	- Teste de Aglutinação Rápida (do inglês <i>Fast Agglutination-screening Test</i> )
FM/USP	- Faculdade de Medicina da USP
FMTTO	- Fundação de Medicina Tropical do Tocantins
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de Hidrogênio
HCl	- Ácido Clorídrico
HE	- Hematoxilina Eosina
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IH	- Imunohistoquímica
IMT-SP	- Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
kDNA	- DNA de Cinetoplasto
LACEN	- Laboratório Central
LV	- Leishmaniose Visceral
LVC	- Leishmaniose Visceral Canina
LVH	- Leishmaniose Visceral Humana
M	- Molar
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	- Miligrama
ml	- Mililitros
mM	- Milimolar
mm	- Milímetros
MS	- Ministério da Saúde
N	- Normalidade
nm	- Nanômetros
°C	- Graus centígrados
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OPAS	- Organização Panamericana de Saúde
OPD	- Orto-fenilendiamina
Pb	- Pares de bases
PBS	- Solução salina tamponada com fosfatos (do inglês <i>phosphate buffer saline</i> )
PBSTL	- Solução salina tamponada com fosfatos, adicionada a Tween e Leite
PCLV	- Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

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
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SESAU	- Secretaria de Estado da Saúde do Tocantins
SFM	- Sistema fagocitário mononuclear
Taq	- <i>Thermus aquaticus</i> (enzima de DNA polimerase termoestável)
TBE	- Tris, Borato e EDTA
Tris-HCl	- Tampão Tris-HCl
TE	- Tris e EDTA
μl	- Microlitros
μm	- Micrômetros
μg	- Microgramas

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
1.1 HISTÓRICO.....	15
1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	16
1.3 AGENTE ETIOLÓGICO, CICLO EVOLUTIVO E TRANSMISSÃO.....	18
1.4 ASPECTOS RELACIONADOS AOS VETORES.....	21
1.5 ASPECTOS RELACIONADOS AOS RESERVATÓRIOS.....	22
1.6 URBANIZAÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	23
1.7 LEISHMANIOSE VISCERAL NO TOCANTINS.....	24
<b>1.7.1 Leishmaniose Visceral Humana</b> .....	<b>25</b>
<b>1.7.2 Leishmaniose Visceral Canina</b> .....	<b>28</b>
1.8 ASPECTOS CLINICOS.....	30
<b>1.8.1 Leishmaniose Visceral Humana</b> .....	<b>30</b>
<b>1.8.2 Leishmaniose Visceral Canina</b> .....	<b>31</b>
1.9 TRATAMENTO E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL .....	32
<b>1.9.1 Tratamento da Leishmaniose Visceral Humana</b> .....	<b>32</b>
<b>1.9.2 Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina</b> .....	<b>35</b>
<b>1.9.3 Medidas de Controle</b> .....	<b>37</b>
1.10 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	42
<b>1.10.1 Métodos Parasitológicos</b> .....	<b>43</b>
<b>1.10.2 Métodos Sorológicos</b> .....	<b>45</b>
<b>1.10.3 Métodos Moleculares</b> .....	<b>49</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>52</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>53</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	53
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	53
<b>4 ANIMAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
4.1 ÁREA DE ESTUDO.....	55
4.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	55
4.3 LOCAL DE TRABALHO.....	56
4.4 ANIMAIS.....	56

<b>4.4.1 Obtenção de Soros e Linfonodos Cervical e Poplíteo.....</b>	<b>56</b>
<i>4.4.1.1 Sedação e Coleta Sanguínea.....</i>	<b>56</b>
<i>4.4.1.2 Eutanásia e Obtenção de Linfonodos.....</i>	<b>57</b>
<b>4.5. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS UTILIZADOS.....</b>	<b>58</b>
<b>4.5.1 Ensaio Imunoenzimático – ELISA.....</b>	<b>58</b>
<b>4.5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI.....</b>	<b>59</b>
<b>4.5.3 Teste Rápido DPP® Leishmania Visceral Canina.....</b>	<b>59</b>
<b>4.5.4 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....</b>	<b>60</b>
<i>4.5.4.1. Amplificação de DNA por PCR.....</i>	<b>61</b>
<b>4.5.5 Estudo Histológico.....</b>	<b>62</b>
<b>4.5.6 Estudo Imunohistoquímico.....</b>	<b>63</b>
<b>4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>63</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>94</b>

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 HISTÓRICO

A leishmaniose visceral - LV, também conhecida como calazar, é uma antroponose típica de áreas tropicais, endêmica em várias regiões do mundo. É causada por um protozoário flagelado, intracelular obrigatório que se reproduz dentro do sistema fagocitário mononuclear (SFM) dos mamíferos. É uma doença cíclica dependente da tríade: hospedeiro (homem), vetor (flebotômico) e reservatório (cão e animais silvestres) (MELO *et al.*, 2004; VERONESI e FOCACCIA, 2005).

A correta descrição da LV foi realizada pela primeira vez em 1835 na Grécia. Posteriormente houve relatos da doença na Índia no ano de 1869, a enfermidade era denominada como Kala-azar (DEANE, 1956; MARZOCHI *et al.*, 1981).

O agente etiológico da LV foi descrito inicialmente por Willian Boog Leishman em 1900. James Donovan em 1903 observou a presença de estruturas ovais com 2 a 3 µm de diâmetro em esfregaços sanguíneos obtidos de pacientes residentes na Índia, idêntico ao encontrado por Leishman. No entanto os relatos de Leishman só foram publicados em 1903, em virtude da coincidência nas datas de publicação os pesquisadores foram homenageados através do nome dado ao parasito - *Leishmania donovani* (CANTARINO, 1998).

A LV foi descrita pela primeira vez em cães por Nicolle e Comte (1908). Esses pesquisadores durante o desenvolvimento de um trabalho na Tunísia encontraram *Leishmania* em cães, sugerindo a introdução da *L. chagasi* no Novo Mundo, através da provável vinda de cães infectados acompanhando os primeiros colonizadores portugueses e espanhóis.

No Brasil, o primeiro registro de leishmaniose visceral humana - LVH ocorreu em 1913 por Migone no Paraguai, de amostra proveniente de paciente do Mato Grosso (MIGONE, 1913). No entanto, o início dos estudos sobre Leishmaniose no país ocorreram com os relatos de Penna (1934), que durante a realização de uma pesquisa com objetivo de diagnosticar e detectar focos de distribuição da febre amarela no Brasil encontrou 41 casos positivos para *Leishmania* (LV) em indivíduos procedentes das regiões Norte e Nordeste (Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte e Pará).



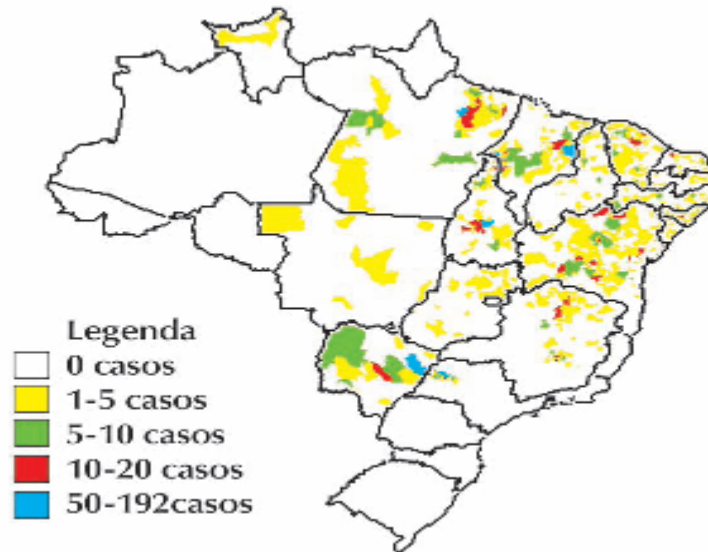
Em seguida, Chagas *et al.*, (1938) em Belém – PA observaram os primeiros casos da infecção em cães. Concomitantemente, teve início o processo de descoberta da principal espécie vetora *Lutzomyia longipalpis* (DEANE e DEANE, 1954b).

## 1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A LV ocorre na maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo. Está presente em todos os continentes, com exceção da Antártida e Austrália (DEREURE, PRATLONG e DEDET, 1999). É endêmica em 88 países (22 das Américas e 66 no Velho Mundo) (MONTEIRO; LACERDA e ARIAS, 1994), com mais de 90% dos casos provenientes de Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (VANNIER-SANTOS; MARTINY e SOUSA, 2002; MENDES *et al.*, 2003; MELO *et al.*, 2004) a maioria dos casos associada às condições de pobreza e desnutrição infantil.

A incidência anual de casos de LV no mundo é de aproximadamente 500.000 novos casos, em torno de 50.000 mortes causadas por LV a cada ano (MENDES *et al.*, 2003).

Na América Latina destacam-se os casos ocorridos na Argentina (SALOMON *et al.*, 2008), Colômbia (CORREDOR *et al.*, 1989a), Honduras (NUERNBERGER; RAMOS e CUSTÓDIO, 1975), Bolívia, Equador, Guatemala, Paraguai, Suriname (MILES *et al.*, 1999), México (MONROY-OSTRIA; HERNANDEZ-MONTES e BAKER, 2000), Nicarágua (BELLI *et al.*, 1999) e Venezuela (DELGADO *et al.*, 1998; ZERPA *et al.*, 2000). Nas Américas, a grande maioria dos casos autóctones da LV estão representados no Brasil, onde a LV está presente em 21 das 27 unidades federadas (MONTEIRO, 2002) e 90% dos casos ocorridos na América Latina são registrados no Brasil (COURA, 2005). As áreas de transmissão da doença no Brasil estão representadas na Figura 1.



**Figura 1.** Distribuição de casos autóctones de Leishmaniose Visceral segundo município, Brasil 2002.

**Fonte:** SINAN- COVEV/ CGDT/DEVEP/SVS/MS.

No ano de 2009 foram notificados no Brasil 3.892 casos de LV, assim distribuídos: Região Nordeste (49,8%), Região Sudeste (21,2%), Região Norte (19,9%), Região Centro-Oeste (8,9%) e Região Sul com apenas (0,3%) (BRASIL, 2010 – SINAN).

O número de municípios brasileiros com casos notificados de LV aumentou visivelmente nos últimos anos, acompanhando a intensificação da doença, conforme demonstração da distribuição de casos de leishmaniose visceral no mundo, segundo a OMS (Figura 2).



**Figura 2.** Distribuição da Leishmaniose Visceral no Mundo.  
**Fonte:** WHO, 2009.

Segundo a Organização Pan Americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde (OPAS/OMS), a LV é considerada como uma doença negligenciada de categoria 3, pois o campo da saúde pública não possui ferramentas efetivas para o controle avançado. Nos últimos anos foi registrada uma média anual de 3.357 casos humanos e 236 óbitos (OPAS, 2006).

### 1.3 AGENTE ETIOLÓGICO, CICLO EVOLUTIVO E TRANSMISSÃO

A LV é causada por protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*, tendo três espécies: no velho mundo a *Leishmania (L.) donovani* (LAVERAN e MESNIL, 1903) é responsável pela doença na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Kênia, e a *Leishmania (L.) infantum* (NICOLLE, 1908) na Ásia Central e Sudoeste, nordeste da China, norte da África e Europa Mediterrânea. No novo mundo a espécie *Leishmania (L.) chagasi* (CHAGAS *et al.*, 1937) é o agente etiológico da LV.

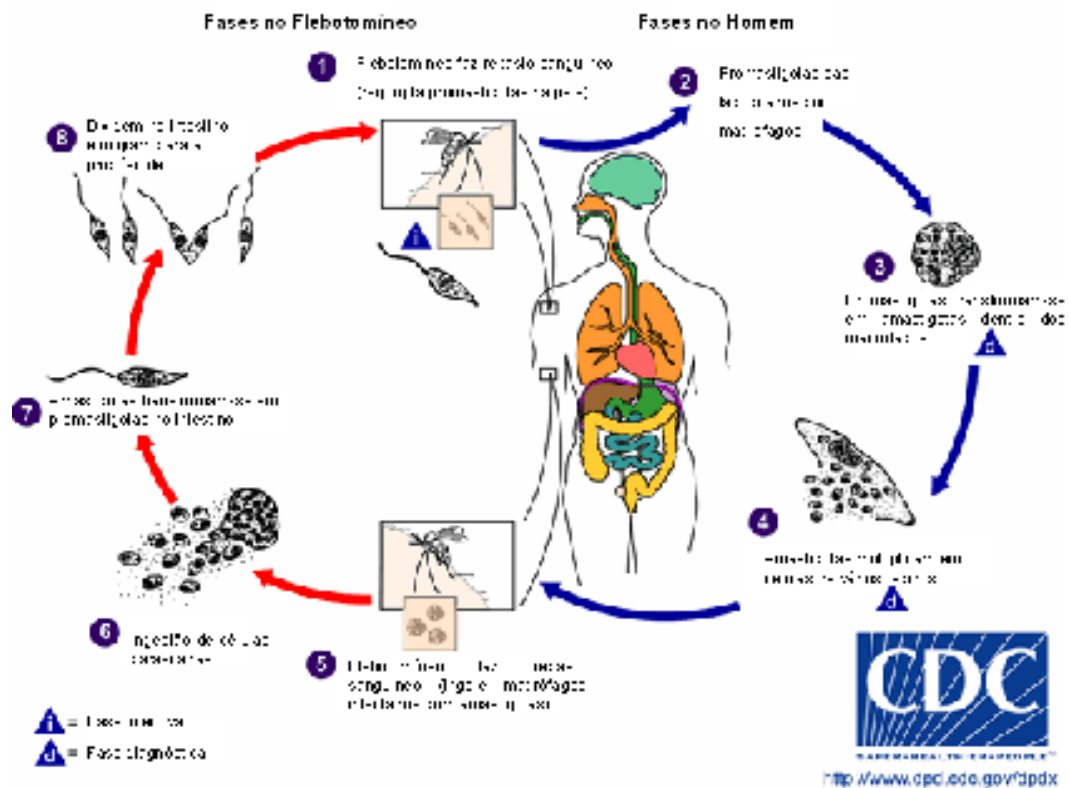
Shaw (2006) realizou um estudo utilizando técnicas bioquímicas e moleculares, e considerou a *L. chagasi* e a *L. infantum*, como única espécie, sugerindo o uso do nome *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Devido à ausência de um consenso a respeito desse assunto, neste trabalho optou-se pela denominação *L. chagasi* ao parasito em questão, por se tratar de um estudo realizado no Brasil.

O protozoário apresenta um ciclo biológico heteroxênico, apresentando duas formas distintas: a forma promastigota, presente no vetor (*Lutzomyia longipalpis*) que se caracteriza por ser flagelada e considerada como a forma infectante (transmitida pelo vetor aos novos hospedeiros - homem, cães ou animais selvagens), e a forma aflagelada ou amastigota, encontrada no interior de macrófagos e monócitos, apresentando um tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros e reservatórios (LAINSON; RYAN e SHAW, 1987; KILLICK-KENDRICK, 1990).

Os parasitos multiplicam-se assexuadamente por divisão binária simples tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado, apesar de existirem evidências para a

possibilidade de troca de material genético sexual e parassexualmente (BASTIEN; BLAINEAU e PAGES, 1992).

Nos flebotomíneos as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas flageladas, as promastigotas, que são, posteriormente, inoculadas na pele de mamíferos durante novo repasto, conforme ilustração na Figura 3.



**Figura 3.** Ciclo biológico da *Leishmania* sp.  
**Fonte:** [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)

*L. chagasi* é transmitida pela fêmea da espécie *Lu. longipalpis*, apresenta hábito hematófago, especialmente durante seu período reprodutivo, em virtude da demanda por um suprimento protéico necessário a produção de ovos. A ingestão de sangue em um animal infectado com macrófagos contendo formas amastigotas de *L. chagasi* ocasiona a infecção do vetor. Decorridos alguns dias (aproximadamente sete dias), as formas amastigotas sofrem alterações bioquímicas e estruturais e convertem-se em formas intermediárias (exclusiva do vetor) denominadas paramastigotas e começam a fixar-se nas paredes do aparelho digestivo

do inseto até atingir a probóscide do inseto, se transformam na forma flagelada infectante denominada promastigota. Considera-se que o acúmulo destas formas na probóscide do inseto promova um aumento na frequência destes repastos, possivelmente ampliando o número de animais picados. Esta obstrução parcial da probóscide provocaria, também, um movimento de regurgitação do conteúdo (inclusive com formas promastigotas do parasito) para o interior do hospedeiro durante o ato de sugar o sangue o que facilitaria a disseminação da infecção entre um número maior de hospedeiros (LAINSON e RANGEL, 2005).

No hospedeiro vertebrado as formas amastigotas se multiplicam nos vacúolos parasitóforos até o rompimento dos macrófagos parasitados e invasão de novos macrófagos, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células Sistema Fagocitário Mononuclear - SFM como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (FEITOSA, 2006)

Costa e Pereira (1990) destacam a preocupação, não somente com o inseto, mas também com determinadas áreas, os pés de serra e boqueirões são os principais locais de transmissão da doença, por causa da umidade e dos demais fatores que favorecem o desenvolvimento dessa enfermidade, principalmente devido o vetor ser encontrado mais facilmente nessas áreas. Sendo assim, uma atenção especial deve ser dada ao meio ambiente, que pode aumentar o risco de infecção.

Marcondes (2001) afirma que tal dificuldade em se controlar a doença é possivelmente por conta da grande dispersão dos criadouros e a falta de conhecimento sobre suas características.

Alguns autores citam a transfusão sanguínea como uma possível forma de transmissão em seres humanos, não tão comum, ressaltam que o sangue pode permanecer contaminado com parasitas viáveis por até 30 dias a 4°C (DEY e SINGH, 2006).

Em alguns países europeus a transmissão através do compartilhamento de seringas por usuários de drogas tem sido relatada, estando associado também à transmissão do vírus HIV, o que intensifica a evolução de ambas as enfermidades (PASQUAU *et al.*, 2005).

Existem relatos de que a transmissão congênita já foi observada em humanos (MEINECKE *et al.*, 1999), no caso dos cães é rara e não foi comprovada nos estudos realizados por Andrade *et al.*, (2002). Os prováveis mecanismos relacionados com esse episódio e de que, as células do sistema fagocítico mononuclear parasitadas atravessem a fina

membrana que separa a circulação fetal materna ou que a contaminação aconteça durante o contato do sangue materno e fetal no momento do parto (NEVES *et al.*, 2000).

#### 1.4 ASPECTOS RELACIONADOS AOS VETORES

No Brasil, duas espécies de vetores denominados flebotomíneos estão relacionadas com a transmissão da LV, *Lutzomya longipalpis* e *Lutzomya cruzi*. A primeira espécie citada é o principal vetor (DEANE e DEANE, 1954a; DEANE, DEANE e ALENCAR, 1955a; DEANE, 1956), sendo o único de grande importância pela sua capacidade vetorial, e pela sua ampla distribuição geográfica no novo mundo. E a segunda espécie é capaz de atuar como vetor de importância secundária (TRAVI *et al.*, 1996; GALATI *et al.*, 1997).

É um inseto pequeno, seu tamanho varia de 1 a 3 mm, seus vôos são curtos e baixos, conferindo um comportamento saltitante e uma dispersão não superior a 200m. São conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros (GONÇALVES; ROZEMBAUM e CUNHA, 1986).

Originalmente era encontrado em matas participando do ciclo primário de transmissão da doença. Progressivamente houve adaptação desse inseto para o ambiente rural. A ocupação desordenada pelo homem de áreas próximas de encostas e/ou matas, acarretando desequilíbrios ambientais, favoreceu a instalação do ciclo extraflorestal da doença, beneficiando seu caráter peridomiciliar (UCHÔA *et al.*, 2001).

Recentemente no final da década de 80, verificou-se a adaptação deste vetor aos ambientes urbanos, em periferias de grandes centros, podendo ser encontrados no peridomicílio, como em galinheiros, chiqueiro, canil, paiol, entre outros ambientes e também no intradomicílio (DEANE e DEANE, 1954b; 1962).

*Lutzomya longipalpis* possui hábito noturno quando busca ativamente os animais para seu repasto sangüíneo. Adapta-se facilmente a variadas temperaturas, sendo que o período de maior transmissão da LV ocorre durante e logo após a estação chuvosa, quando há um aumento da densidade populacional do inseto (FERRO; MORRISON e TORRES, 1995; SHERLOCK, 1996).

Apenas as fêmeas realizam hematofagia, sendo capazes de transmitir o parasito. Quando infectadas pelo parasito tornam-se vetores da doença, podendo transmiti - la para os

hospedeiros vertebrados, são responsáveis pela manutenção do ciclo do parasito na natureza (DEANE, 1956).

## 1.5 ASPECTOS RELACIONADOS AOS RESERVATÓRIOS

O cão é considerado como o principal reservatório no ambiente doméstico e peridoméstico, apontado como o principal responsável pela persistência da LV em várias áreas tropicais e neotropicais do planeta. Fato observado tanto nas Américas como no Mediterrâneo (CHAGAS *et al.*, 1937; DESJEUX, 1996).

Já no ambiente silvestre os animais incriminados como hospedeiros vertebrados, são principalmente: as raposas *Dusycion vetulus* (= *Lycalopex vetulus*), encontrada infectada no Sudoeste do Ceará, Brasil (DEANE e DEANE, 1954a) e *Cerdocyon thous*, na Região Amazônica – Brasil (LAINSON; SHAW e LINS, 1969), e o gambá *Didelphis marsupialis*, na Venezuela (CORREDOR *et al.*, 1989b).

O cão constitui importante fonte de infecção no Brasil, devido ao grande contingente de animais assintomáticos com intenso parasitismo cutâneo verificado em várias áreas endêmicas estudadas (SHERLOCK *et al.*, 1984; BRASIL, 2006a).

Marzochi *et al.*, (1985) em estudo realizado no Rio de Janeiro verificaram que 43,5% dos cães examinados não apresentavam sinais clínicos sugestivos da infecção, mas após necropsia observaram que dos 40 animais estudados, foram evidenciadas *Leishmania* em 39 animais (97,5%).

Quanto ao papel do homem como reservatório da *Leishmania chagasi*, e ser fonte de infecção durante os surtos epidêmicos, existe a necessidade de estudos mais aprofundados acerca do potencial de transmissão do ser humano, antes de se comparar o comportamento destas epidemias com o calazar indiano, onde não há a existência de reservatório animal e a transmissão se dá diretamente homem-vetor-homem (COSTA e PEREIRA, 1990).

No Brasil, até o presente momento, todos os surtos descritos na literatura estão associados com a presença de cães soropositivos. Em várias regiões geográficas a epidemia canina precedeu a epidemia humana (CAMARGO-NEVES *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

## 1.6 URBANIZAÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Inicialmente a leishmaniose visceral no Brasil, tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte (BRASIL, 2006a).

Na América do Sul, especialmente no Brasil, a migração e a urbanização estão evidenciadas desde a década de 1980 (BRASIL, 1984; MARZOCHI *et al.*, 1983; 1985; 1987; GENARO *et al.*, 1990; JERÔNIMO *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1997; TAVARES, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2001a), e contribuem fortemente para o aumento da doença.

O fato foi observado claramente a partir da década de 90, quando ocorreram mudanças no padrão de episódios da doença, com registro de casos nas grandes cidades, e isso não quer dizer apenas as periferias, mas também as regiões nobres, contestando o que era observado anteriormente a esta década, em que se considerava esta doença como sendo apenas do meio rural e de cidades do interior ou até mesmo de áreas periféricas das grandes metrópoles. Acreditava-se ainda que o gênero *Lutzomyia* tivesse pouca resistência e não conseguiria agüentar as condições ambientais urbanas e também poluídas (ROSA, 2006).

Nos últimos anos os dados epidemiológicos demonstram a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e dentre as epidemias ocorridas, destaca-se Palmas (TO), além dos municípios de Três Lagoas (MS) e Campo Grande (MS) (BRASIL, 2006a).

Em um estudo realizado por Costa (2008), tratou-se da caracterização e especulações acerca da urbanização da leishmaniose visceral no Brasil. Segundo o autor as hipóteses ou explicações apresentadas até o momento para o processo de urbanização da leishmaniose visceral americana são insatisfatórias. Uma possível seria que, as mudanças na ecologia e biologia do vetor, *Lutzomyia longipalpis*, poderiam explicar as feições epidemiológicas urbanas da doença.

Com intuito de preencher lacunas no conhecimento sobre esse processo de urbanização, ele citou algumas linhas de pesquisa prioritárias: - a investigação do papel de



cães na amplificação da transmissão da doença nas cidades; - ensaios de campo com novos inseticidas; - investigação dos determinantes ecológicos ou moleculares que participam da transmissão de *Leishmania chagasi*.

O mais novo estado da federação, Tocantins passou um processo de migração populacional devido às grandes possibilidades de emprego e perspectivas de desenvolvimento. O estado recebeu uma grande população oriunda de áreas urbanas e rurais, oferecendo em troca baixa qualidade de vida, tendo esses indivíduos que viverem em condições sub-humanas (NASCIMENTO, 2005).

Maués (2008) afirma que o aumento da densidade populacional e a migração da população da zona rural para as cidades e sua concentração principalmente nas áreas periféricas, está estritamente relacionada com o processo de urbanização e expansão da enfermidade no estado do Tocantins.

## 1.7 LEISHMANIOSE VISCERAL NO TOCANTINS

O Tocantins está inserido na área corresponde a Amazônia Legal, um dos biomas mais complexos e ricos do mundo e entre os nove estados que o integra, o Tocantins é o que atualmente possui a maior incidência de leishmaniose visceral em humanos.

Acredita-se na possibilidade da LV ter sido introduzida na Região Amazônica Brasileira, por meio de cães infectados acompanhando imigrantes procedentes da Região Nordeste, no entanto, na época da descoberta da leishmaniose visceral no estado do Pará (PENNA, 1934). O acesso a esta região era unicamente realizado por barco ou avião, colocando em discussão a possibilidade de uma fonte silvestre autóctone de infecção (LAINSON, 1983; RANGEL e LAINSON, 2003).

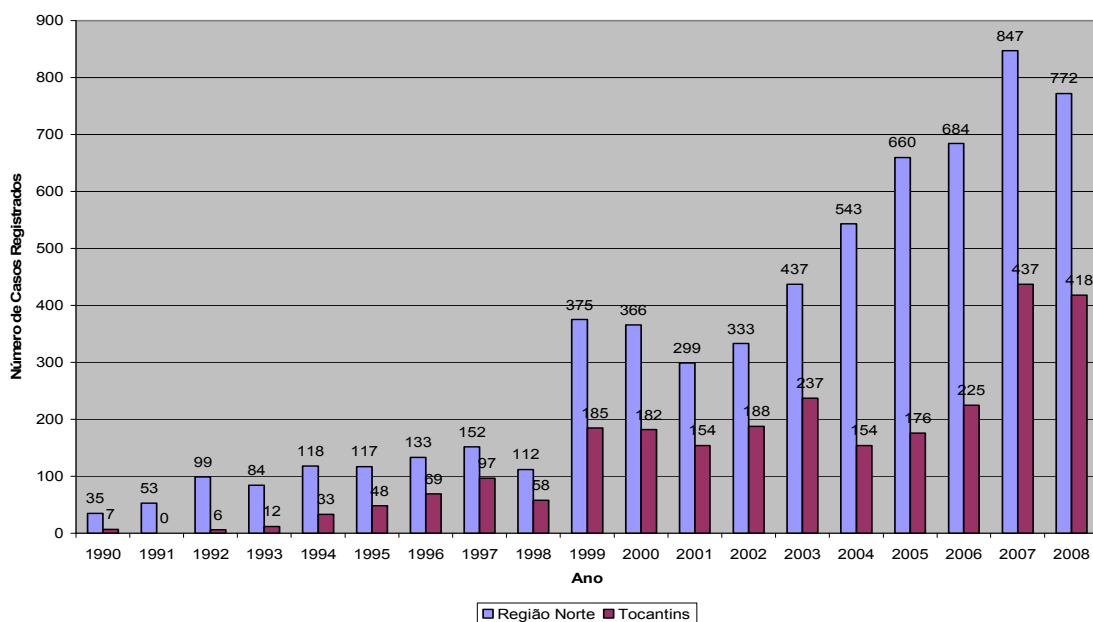
Foram registrados casos humanos em Roraima, Pará e Tocantins, com o maior número de casos no Estado do Pará, seguido por Tocantins e Roraima (CASTELLON e DOMINGOS, 1991; GUERRA *et al.*, 2004; BRASIL, 2006a).

### 1.7.1 Leishmaniose Visceral Humana

No Estado do Tocantins, o calazar humano é notificado desde 1989, um ano após a criação do Estado, pois os casos anteriores foram notificados como ocorridos no Estado de Goiás.

Desde então, apenas no ano de 1991 não houve notificação de nenhum caso, mas a partir deste ano o número de notificações foi crescente, aumentando de 06 em 1992 para 226 em 2002, com 82,7% (1591 casos) dos casos notificados apenas no período de 1999 a 2005, o que demonstra a expansão da doença no Estado (BRASIL, 2006b).

No período de 1999 a 2003, o Estado do Tocantins apresentou o maior número de notificações da Região Norte, com a taxa de incidência aumentando de 0,79 /100.000 habitantes em 1999 para de 19,91/100.000 em 2003 (BRASIL, 2006b), considerada a maior taxa de incidência já registrada no país. O Estado do Tocantins destaca-se como um dos maiores responsáveis pelo aumento das estatísticas envolvendo a LVH na região Norte do Brasil. Conforme demonstração na figura 4.



**Figura 4.** Casos confirmados de leishmaniose visceral humana, região norte e Tocantins. 1990 a 2008\*. (\* Dados sujeitos a revisão).

**Fonte:** SINAN/SVS/MS - 2009.

Com a elevação do número de casos no Estado, medidas de vigilância e controle foram implementadas nos municípios onde ocorreram a maioria dos casos e a incidência diminuiu a partir de 2003, porém de acordo com os dados do Ministério da Saúde, até 2004 o Tocantins ainda apresentava a maior taxa de incidência de LV do país (12,04/100.000) (BRASIL, 2006b).

Segundo a Gerência de Núcleo das Leishmanioses/SESAU-TO, os casos de LVH em 2008 somaram 1.462 casos notificados, e um coeficiente de incidência de 11.41 casos/10.000 habitantes (TOCANTINS, 2009).

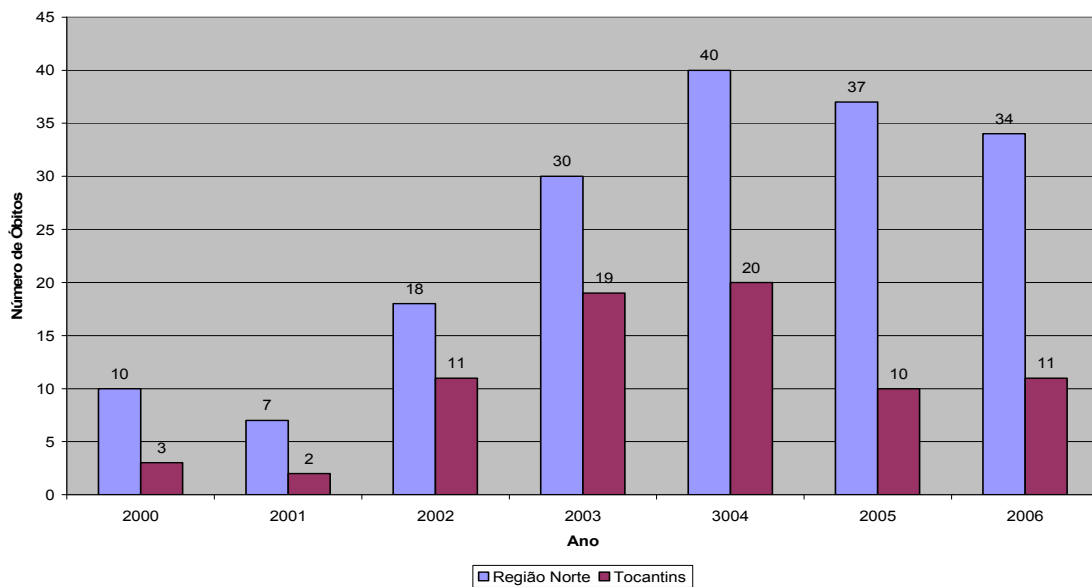
Desde 1999 observou-se no Estado um grande aumento no número de casos humanos, com a maioria dos casos registrados na cidade de Palmas-TO, capital do Estado, que após sua criação em 1989, atraiu um grande contingente humano, vindo de diversas regiões do Estado do Tocantins e do Brasil e com eles os animais de estimação, possíveis reservatórios. Pouco se discute sobre a origem e as causas da elevação no número de casos na capital e em cidades do interior do Estado do Tocantins (SANTOS, 2008).

As informações sobre a distribuição e prevalência de LVC no Estado do Tocantins estão restritas aos inquéritos realizados pela Secretaria de Estado da Saúde, através dos Centros de Controle de Zoonoses e Secretarias Municipais de Saúde e o conhecimento destas informações é essencial para o estabelecimento de medidas de controle apropriadas, bem como para nortear estudos epidemiológicos que possam contribuir para o controle da doença (SANTOS, 2008).

De acordo com o sistema de notificação de agravos (SINANET) o Estado do Tocantins notificou, em 2007, 392 casos novos confirmados de leishmaniose visceral sendo que destes, 196 são de Araguaína correspondendo a 50% do total de casos do Estado.

Diante dos indicadores de letalidade encontrados no Estado, o programa de controle da LV, estabelecido pela SESAU-TO, realiza ações com objetivo de reduzir as taxas de letalidade e grau de morbidade, através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos, bem como diminuir os riscos de transmissão mediante controle da população de reservatórios e do agente transmissor. (BRASIL, 2007 – SINAN).

Observa-se na figura 5 o número de óbitos por LVH na região norte, e a representação do Tocantins, no período de 2000 a 2006.

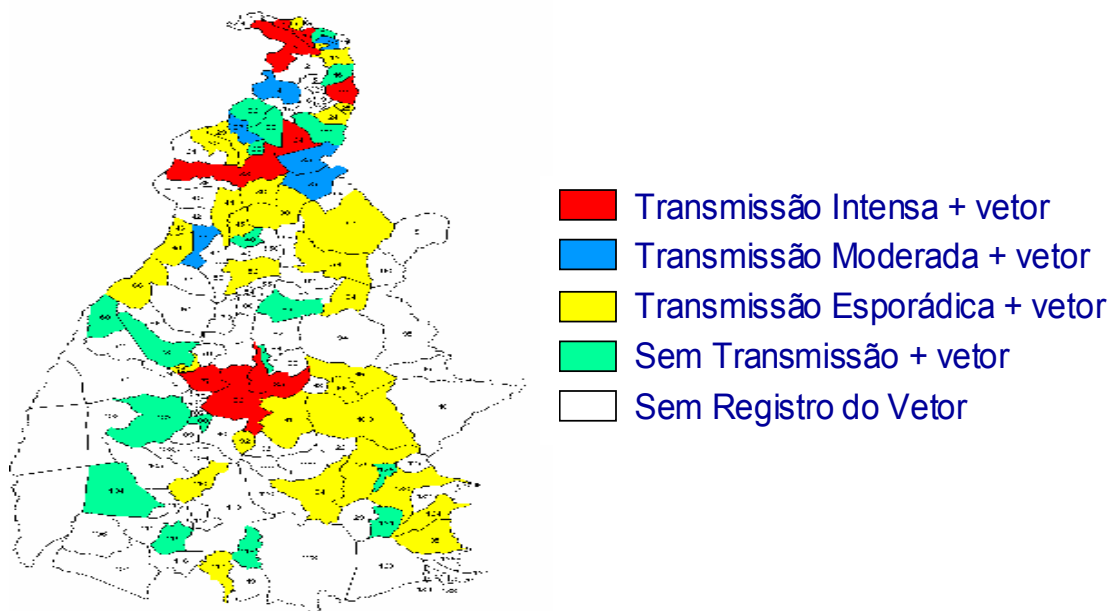


**Figura 5.** Óbitos por Leishmaniose Visceral Humana na Região Norte e Tocantins, no período de 2000 a 2006.

**Fonte:** SINAN/SVS/MS - 2009.

Considerando a distribuição da LVH no Tocantins, o município de Araguaína detém o maior número de notificações. Estando classificado como município de transmissão intensa de casos humanos, portanto possui indicação de atividades de controle químico (borrifação) e inquérito canino censitário.

Em 2009 os municípios do Tocantins estão classificados como sendo 11 de transmissão intensa, 05 de transmissão moderada, 55 de transmissão esporádica, 19 de transmissão vulnerável receptiva, 47 sem transmissão vulnerável e 02 sem transmissão não vulnerável para esta doença. Os municípios de Araguaína e Palmas, classificados como de transmissão intensa, notificaram 275 e 34 casos, respectivamente (TOCANTINS, 2009).



**Figura 6.** Municípios do Tocantins segundo estratificação epidemiológica da Leishmaniose Visceral com registro de *Lu. longipalpis*.  
**Fonte:** GRASER, 2009.

### 1.7.2 Leishmaniose Visceral Canina

Do ponto de vista epidemiológico, a LV canina tem sido considerada mais importante do que a doença humana, visto que tem a maior prevalência, e têm sido detectados parasitos na pele de muitos animais assintomáticos residentes em áreas endêmicas (MARZOCHI *et al.*, 1985).

Nas Américas, a doença canina só veio a ser reconhecida com os estudos realizados por Evandro Chagas (CHAGAS *et al.*, 1937; 1938), na região Norte do Brasil, estado do Pará.

A partir daí, Deane e Deane (1955b) estudaram a LVC no Brasil, em uma área de grande endemicidade no nordeste brasileiro, o Ceará. Em estudo comparativo entre a infecção humana e canina encontraram *Leishmania* na pele de 16,3% dos indivíduos e em 77,6% dos cães naturalmente infectados.

Além disso, verificou que a infecção experimental de flebotomíneos era mais frequente e intensa quando os insetos se alimentavam em cães (75%) do que em pacientes humanos (28,5%). Estas observações, bem como as de outros trabalhos que têm estudado a

doença canina em áreas endêmicas de LVH, mostram o cão como a principal fonte de infecção para os flebotomíneos (MARGONARI *et al.*, 2006).

Isto se deve a alta prevalência da doença no animal nessas regiões e pela presença do parasito na sua pele, o que favorece a infecção do inseto vetor e, conseqüentemente, a transmissão ao homem (BRENER, 1957; ALENCAR, 1959; DEANE e DEANE, 1962; IVERSSON *et al.*, 1983; MARZOCHI, *et al.*, 1985).

Deane (1956) esclareceu o papel do cão na manutenção da transmissão da LV no ciclo peridomiciliar, confirmando sua atuação como principal reservatório.

O centro de controle de zoonoses de Araguaína - CCZ, no período de janeiro a dezembro de 2007 realizou inquérito canino nas áreas com transmissão de casos humanos, nas quais foram colhidas 6.317 amostras, sendo 2.321 soros reagentes, 3.178 não reagentes, 709 indeterminados e 109 hemolisados. Também foram executadas atividades de controle químico, resultando num total de 5551 imóveis borrifados no mesmo período.

Em 2007, além de Araguaína outros 55 municípios do Tocantins encaminharam amostras de soro canino aos Laboratórios Centrais - LACEN, perfazendo o total de 24.902 amostras analisadas, obtendo positividade em 5.397 amostras de cães (TOCANTINS, 2009).

Em 2008 a estimativa da população canina na zona urbana de Araguaína era de 9136 animais. Neste período foram encaminhadas para o Laboratório de Saúde Pública do município o total de 7.922 amostras para análise, destas 2.519 cães apresentaram resultado positivo, 4.172 cães foram descartados, pois apresentaram resultado negativo, e 690 cães obtiveram resultado indeterminado. Até o mês de novembro de 2008, já haviam sido eutanasiados 2.232 cães soro positivos (ARAGUAÍNA, 2009).

Com base nos números registrados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Araguaína, é possível constatar que a LVC no município vêm crescendo progressivamente ano a ano, fato que gera preocupação ao Ministério da Saúde.

No decorrer de 2008, sessenta e três dos 139 municípios do estado enviaram amostras de soro canino ao LACEN, essas amostras resultaram no total de 35.997 ensaios sorológicos realizados. Das análises realizadas, foi confirmado positividade para LVC de 7.580 amostras, que representa 21,3% de positividade do total de amostras recebidas (TOCANTINS, 2009).

De todas as amostras suspeitas de LVC oriundas de Araguaína enviadas para análise no LACEN, temos 8,4% de positividade em 2005, 32,5% em 2006, 36,7% em 2007, 32% em 2008 e 44% em 2009 (ARAGUAÍNA, 2009; ARAGUAÍNA, 2010).

Vale ressaltar que em 2009 dos 2.980 cães soropositivos para LV, foi constatado que em 73% dos casos os cães foram eutanasiados e os 27% restantes, morreram por outros agravos, ou ocorreram mudanças de endereço dos proprietários, e outros apresentaram contraprovas realizadas em laboratórios particulares escolhidos pelos proprietários do cão, indicando resultados contrários. (CRUZ *et al.*, 2010)

## 1.8 ASPECTOS CLINICOS

### 1.8.1 Leishmaniose Visceral Humana

A LV pode não apresentar manifestações em humanos, assim, a doença assume um curso assintomático, sem qualquer manifestação clínica aparente. Por outro lado, têm-se casos em que a doença apresenta uma história natural, característica, dita como “forma clássica do calazar” (TOLEDO; MARZOCHI e COUTINHO, 1983).

O curso clínico da doença pode depender tanto de fatores relacionados à natureza da resposta imune do hospedeiro, à virulência do parasito, à baixa idade e ao estado nutricional do paciente. Os indivíduos infectados podem apresentar desde a forma assintomática, até uma doença de evolução fatal (PEDROSA E ROCHA, 2004).

No período inicial ou fase aguda, a sintomatologia pode incluir febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia, sintomas esses que variam para cada paciente. A evolução da doença é seguida pelo período de estado, caracterizado por febre irregular, associada ou não a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia. Geralmente é um quadro clínico arrastado, freqüentemente com mais de dois meses de evolução, acometendo o estado geral do paciente (BRASIL, 2005a).

Caso não seja estabelecido o diagnóstico e tratamento, a doença evolui progressivamente para o período final, com febre contínua e comprometimento mais intenso

do estado geral. Instala-se a desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca) e edema dos membros inferiores podendo evoluir para anasarca. Outras manifestações importantes incluem hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite. Nesses pacientes, o óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramentos (BRASIL, 2005a).

Associadas aos sinais e sintomas, as alterações laboratoriais se fazem presentes evidenciando muitas vezes anemia, trombocitopenia, leucopenia e baixa de albumina, elevação dos níveis das aminotransferases, das bilirrubinas e aumento discreto dos níveis de uréia e creatinina (PEREIRA, 2003; BRASIL, 2006a).

Segundo o Ministério da Saúde, deve ser considerado suspeito de LV todo paciente que apresentar febre e esplenomegalia associada ou não a hepatomegalia, obtendo confirmação diagnóstica por Enzyme-linked immune assay (ELISA), e diagnóstico parasitológico ou Imunofluorescência Indireta (BRASIL, 2003).

### **1.8.2 Leishmaniose Visceral Canina**

A LVC é uma doença sistêmica grave cujas manifestações clínicas dependem do tipo de resposta imunológica expressada pelo animal infectado. O quadro clínico de cães infectados apresenta um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a um grave estágio final (CABRAL *et al.*, 1998).

Apesar da grande diversidade de sinais clínicos da LVC, existem animais aparentemente saudáveis e aqueles que exibem sintomatologia característica de estágios finais da enfermidade. Um fato intrigante é que a doença canina pode permanecer clinicamente inaparente por longos períodos (LONGSTAFFE *et al.*, 1983).

O período de incubação é variável e difícil de ser determinado, uma vez que, em condições naturais, não se consegue estabelecer com segurança o momento da infecção. Em termos gerais, varia de 3 meses até vários anos (GENARO, 2000).

Desta forma, os sinais clínicos e o tempo de aparecimento da doença não são previsíveis, podendo ocorrer ausência total dos sinais, e até uma síndrome clínica caracteriza por: febre, emagrecimento progressivo, alopecia, anemia – geralmente normocítica e normocrômica, hipergamaglobulinemia, descamação cutânea e outras dermatites, ulceração



cutânea –normalmente nas orelhas, articulações, focinho e cauda, áreas de hiperqueratose, conjutivite, onicogribose, apatia, diarreia, vômito, linfadenopatia, edema das patas e, tardiamente, paresia das patas posteriores e caquexia (DEANE e DEANE, 1955b; BRENER, 1957; ALENCAR, 1959; MARZOCHI *et al.*, 1985; ABRANCHES *et al.*, 1991; GENARO, 2000).

As principais lesões da LVC observada em cães, no Velho e Novo Mundo, ocorrem em órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, como baço, fígado, linfonodos, medula óssea, rins, pulmões, intestino e pele (BOGLIOLO, 1956; ALENCAR, 1959; TAFURI *et al.*, 1996; TAFURI; OLIVEIRA e MELO, 2001; LIMA *et al.*, 2004).

As alterações histopatológicas observadas na LVC são semelhantes às descritas na doença humana (KEENAN *et al.*, 1984), embora as lesões cutâneas nos cães sejam mais intensas e estejam presentes em grande parte dos casos. As alterações laboratoriais, particularmente as hematológicas, revelam anemia normocrômica, linfocitose com leucopenia que pode ser moderada ou intensa, neutrofilia e trombocitopenia (KEENAN *et al.*, 1984; ABRANCHES *et al.*, 1991).

De acordo com a clínica apresentada, e considerando a classificação adotada por Rocha (2002) e Moreira (2003), temos cães: **Assintomáticos:** que não apresentaram nenhum sinal característico de LVC ao exame clínico; **Oligossintomáticos:** que apresentaram até três sinais compatíveis de LVC e; **Polissintomáticos:** que apresentaram mais de três ou todos os sinais comuns à LVC. Independente do tipo clínico que o cão se enquadra, a capacidade de atuar como fonte de infecção é fato notório. Cães sintomáticos e assintomáticos são capazes de infectarem flebotomíneos vetores, mesmo quando apresenta pele sadia (ADLER e THEODOR, 1931), fato evidenciado pelo intenso parasitismo cutâneo, conforme demonstrado por Alvar *et al.*, (1994).

## 1.9 TRATAMENTO E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL

### 1.9.1 Tratamento da Leishmaniose Visceral Humana

Segundo Yamey e Torreele (2002), a LVH é uma das doenças mais negligenciadas no

mundo atualmente, com um impacto significativo nas comunidades de baixa renda, em virtude do baixo investimento no desenvolvimento de novos fármacos.

Em todo o mundo estão disponíveis no arsenal terapêutico da LVH os seguintes fármacos: Stibogluconato de sódio, antimoniato-N-metil glucamina, anfotericina B, anfotericina B lipossomal, pentamidinas (isotionato e mesilato), miltefosine (BRASIL, 2006a)

No Brasil, para o tratamento em humanos o fármaco de primeira escolha é o antimoniato N-metil glucamina, um derivado pentavalente (SB+5 – compostos antimoniais pentavalentes). O medicamento é distribuído pelo Ministério da Saúde, recomendado a dose de 20mg de SB+5 Kg/dia, por no mínimo 20 e no máximo 40 dias, com limite de 2 a 3 ampolas/dia (BRASIL, 2006a).

Atua nas formas amastigotas do parasito, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. O principal efeito colateral é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular, traduzindo em distúrbios de repolarização, ficando dessa forma contra-indicado em pacientes que fazem uso de beta-bloqueadores e drogas antiarrítmicas (BRASIL, 2006a).

Na área endêmica de Jacobina, Bahia, onde a LV é diagnosticada precocemente, os resultados, são eficazes com 15 dias de tratamento (BADARO *et al.*, 1986).

Relatos demonstram que a duração do tratamento em Fortaleza (REY *et al.*, 2005) com antimoniato variou de 20 a 40 dias, mostrando alta taxa de cura (96%) e baixa toxicidade (4%), como relatado também em Natal (JERÔNIMO *et al.*, 1994).

O desoxicolato sódico de anfotericina B e suas formulações lipossomais são fármacos de tratamento alternativo (em terapia não responsiva aos antimoniais pentavalentes em gestantes, crianças menores de seis meses, cardiopatas e nefropatas).

A anfotericina B lipossomal apresenta custo elevado, impossibilitando o seu uso na rotina do serviço. É indicada aos pacientes graves de leishmaniose visceral, que desenvolveram insuficiência renal ou toxicidade cardíaca durante o uso do Antimoniato de N-metilglucamina e de outras drogas de escolha não obtendo melhora ou cura clínica (BRASIL, 2006a).

São fármacos com atividade leishmanicida mais potente disponível comercialmente, atua nas formas promastigotas e amastigotas do parasita, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Seu

mecanismo de ação se dá através da ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática da *Leishmania* (BRASIL, 2006a).

É altamente tóxica para as células do endotélio vascular, com comprometimento renal em praticamente todos os pacientes ao longo do tratamento (VERONESI e FOCACCIA, 2005; GOODMAN e GILMAN, 2006).

As principais reações agudas consistem em febre (80%), calafrios, taquipnéia, hipotensão moderada, dor local, flebites, cefaléia, anorexia, convulsões, reação anafilática, arritmia, insuficiência cardíaca e diminuição da filtração glomerular (VERONESI e FOCACCIA, 2005; GOODMAN e GILMAN, 2006).

Outros fármacos com atividade leishmanicida foram introduzidos no tratamento da LVH, como as pentamidinas (isotionato e mesilato) principalmente na Europa e África. Sua eficácia é inferior a dos antimoniais pentavalentes e anfotericina B e seus paraefeitos maiores. A dose utilizada é de 4mg/kg/dia em dias alternados no total de 15 doses, não devendo ultrapassar a 2g como dose total.

Seus efeitos colaterais mais comumente encontrados são anorexia, astenia, náusea, dor abdominal, hipoglicemia prolongada, taquicardia e outras arritmias, insuficiência renal em 25% dos pacientes, geralmente reversível e pancreatite que pode levar ao aparecimento de diabetes *mellitus*, em 10 a 15% dos casos.

Recentemente uma droga oral (miltefosine) vem sendo utilizada na Índia, com resultados promissores no tratamento do calazar indiano (BRASIL, 2006a).

Os critérios de cura são essencialmente clínicos. Geralmente é caracterizado pelo desaparecimento da febre, redução da hepatoesplenomegalia, melhora dos parâmetros hematológicos, ganho ponderal, retorno do apetite e melhora do estado geral (REY, 1991).

O seguimento deve ser feito aos 3, 6 e 12 meses após o tratamento e na última avaliação se permanecer estável o paciente é considerado curado. As provas sorológicas são de pouca utilidade no seguimento porque negativa tardiamente (JERONIMO *et al.*, 1994)

Antes da introdução dos antimoniais no arsenal terapêutico por Gaspar Vianna (1913) *Apud* (REY, 1991), estimava-se que a taxa de letalidade dos pacientes variava entre 75 e 95%

Em Fortaleza Rey *et al.*, (2005), verificaram que a letalidade foi de 8,7% , sendo semelhante aos relatos de São Paulo (PASTORINO *et al.*, 2002), São Luis (MENDES *et al.*,

2002), Natal (JERONIMO *et al.*, 1994), Brasília (CAMPOS, 1995) e Mato Grosso do Sul (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

### **1.9.2 Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina**

As tentativas de tratamento da LVC por meio de fármacos tradicionalmente empregadas em humanos como (antimoniato de meglumina, anfotericina B, isotionato de pentamidina, alopurinol, cetoconazol, fluconazol, miconazol e itraconazol), têm tido baixa eficácia.

O tratamento dos cães, no Brasil, é expressamente proibido pelos órgãos de saúde pública, além da resposta terapêutica ser baixa, frequentemente ocorre recidiva da enfermidade durante ou logo após o tratamento. A proibição do uso de produtos destinados a uso humano ou que não possuem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - (MAPA), foi estabelecido pela portaria interministerial Nº 1.426 de 11 de julho de 2008, elaborada e publicada pelo MS, em conjunto com o MAPA. (BRASIL, 2006a),

Com relação ao antimoniato de meglumina (Glucantime®), a dosagem utilizada para o tratamento canino é aproximadamente 10 vezes maior que o recomendado para o tratamento humano. O uso rotineiro de medicamentos em cães induz à remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotômíneos e leva ao risco de selecionar parasitos resistentes aos fármacos utilizadas no tratamento humano. Portanto, o tratamento canino não tem apresentado eficácia e nem diminuído a importância do cão como reservatório do parasito (MORENO *et al.*, 1999; BRASIL, 2006a).

MORENO *et al.*, (1999), cita as desvantagens observadas no tratamento da LVC com o Glucantime®: a seleção de parasitos resistentes a fármacos com o passar do tempo, levando ao risco de selecionar linhagens de parasitos resistentes; o tratamento é doloroso e, para animais de grande porte, é caro; o tratamento gera a falsa impressão de efetividade, induzindo os proprietários na decisão de tratar pessoalmente os animais por curtos períodos, aumentando o risco de falhas no tratamento.

Os estudos sugerem que o tratamento da LVC, conforme os modelos propostos até então, pode levar a melhoria transitória do quadro clínico laboratorial do cão, redução dos níveis de anticorpos séricos contra o parasito, associados a uma possível redução (também transitória) na carga parasitária em alguns tecidos (MANNA *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008).

Os trabalhos que estudaram a infectividade para flebotomíneos são inconclusivos e apresentam evidências de que animais tratados mantêm a capacidade de infectar esses insetos (MIRET *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008).

A literatura sobre o tratamento da LVC no Velho Mundo alerta sobre o perigo potencial de geração e circulação de cepas do parasito resistentes às drogas usualmente utilizadas para o tratamento de seres humanos, tais como: o antimonial pentavalente, anfotericina B e a miltefosine (GRAMICCIA; GRADONI e ORSINI, 1992; CARRIÓ e PORTÚS, 2002).

O surgimento e disseminação de cepas resistentes do parasito como têm ocorrido em alguns países (SUNDAR *et al.*, 2000; SUNDAR, 2001) tem sido alertada em comunidades nas quais o tratamento de cães é praticado (GRAMICCIA; GRADONI e ORSINI, 1992), pode ter caráter irreversível e consequências imprevisíveis.

A miltefosine é utilizada para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose humana em alguns países, como: Colômbia, Guatemala, Argentina, Venezuela, Paraguai, Equador e Honduras (GRAMICCIA; GRADONI e ORSINI, 1992; ROUGIER *et al.*, 2008). Recentemente, foi lançada para uso veterinário nos países do Mediterrâneo (Portugal, Espanha, Itália, Grécia e Ilha de Chipre), existe a possibilidade de os cães que receberem esse tratamento, e os parasitos que infectarem esses cães tratados, apresentarem resistência e serem disseminados por meio da migração desses animais para os países em que o medicamento tem sido utilizado em humanos.

Durante a realização do II Fórum de discussão sobre o tratamento LVC, em Brasília/DF nos dias 01 e 02 de outubro de 2009, um grupo de expertises em Leishmaniose para tratar da política nacional de vigilância e controle da LV no Brasil (BRASIL, 2009). Com intuito de alterar o ponto de vista científico sobre a proibição do tratamento da LVC com medicamentos utilizados em seres humanos ou não regulamentadas pelo MAPA.

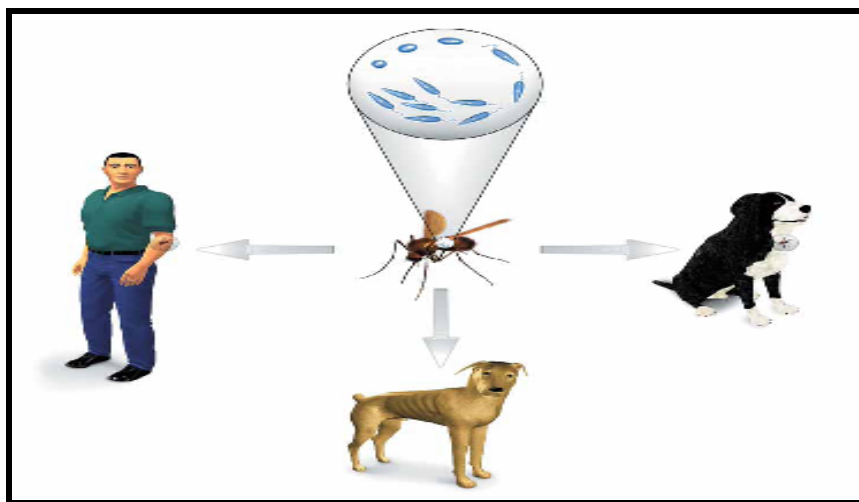
Esse grupo concluiu que o tratamento canino representa risco para a saúde pública com graves conseqüências, que vai desde a disseminação da doença nos demais continentes, até a geração de cepas resistentes ao pequeno arsenal disponível para a doença.

### 1.9.3 Medidas de Controle

Considerando a grande diversidade da doença e de sua epidemiologia, é quase impossível o controle com apenas uma estratégia. No Brasil, assim como no Estado do Tocantins, atualmente as estratégias utilizadas para o controle da leishmaniose visceral são fundamentadas em três medidas:

- 1) detecção e tratamento de casos humanos;
- 2) combate ao vetor;
- 3) investigação da infecção canina com eliminação dos cães soropositivos.

As medidas citadas devem interromper o ciclo de transmissão da doença, cujo percurso está demonstrado na figura 7 (MARZOCHI; SCHUBACH e MARZOCHI 1999; ASHFORD, 2000; BRASIL, 2006a).



**Figura 7.** Ciclo de Transmissão da Leishmaniose Visceral Canina

**Fonte:** Manual Técnico da Leishmaniose Visceral Canina – Leishmune – Fort Dodge®

Para Deane (1956), os humanos podem ser incriminados como reservatório, ainda que represente pequena importância epidemiológica. Com a utilização de medidas de proteção individual como: repelentes e mosquiteiro, os indivíduos, principalmente, os que exercem contato com a mata, auxiliarão na diminuição da incidência da doença.

Segundo Marzochi; Schubach e Marzochi, (1999), na maioria das vezes as medidas supracitadas são consideradas utópicas, principalmente em países tropicais e em comunidades subdesenvolvidas. O diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos devem ser associados às demais medidas de controle, visando a redução dos índices de morbimortalidade.

As ações de controle do vetor são feitas através da vigilância entomológica. O levantamento entomológico tem como objetivos verificar a presença de *L. longipalpis* e/ou *L. cruzi* em municípios sem casos humanos de LV ou municípios silenciosos; e também conhecer a dispersão do vetor no município com transmissão esporádica, moderada ou intensa, a fim de apontar naqueles sem casos autóctones de LV as áreas receptivas para a realização do inquérito amostral canino e nos municípios com transmissão da LV orientar as ações de controle do vetor.

O objetivo do monitoramento é conhecer a distribuição sazonal, visando estabelecer o período de maior chance de transmissão da LV, direcionando as medidas de prevenção e controle químico, como a aplicação de inseticidas no interior e nos arredores do domicílio, medida preconizada pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), elaborado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2003).

A detecção dos reservatórios é realizada principalmente através de inquéritos sorológicos realizados pelos Centros de Controle de Zoonoses, órgãos ligados ao Ministério da Saúde, onde os animais soropositivos são recolhidos e eutanasiados em cumprimento ao Decreto nº. 51.838 - MS, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose visceral devam ser eutanasiados (BRASIL, 2003).

No entanto, ainda existe uma grande resistência dos proprietários em entregar os animais, o que compromete esta ação de controle, pois prolonga o tempo de permanência do reservatório no ambiente.

A eliminação de cães positivos e de vetores no domicílio têm um impacto significativo na redução dos casos humanos, afirmação bem vista tanto para o pesquisador Alencar (1961), como para Sherlock e Almeida (1970).

O fato foi comprovado por Magalhães *et al.*, (1980), quando conseguiram controlar a LV no Vale do Rio Doce, Minas Gerais, através do sacrifício de cães positivos pela RFC e/ou por exame de esfregaço por aposição da pele da orelha, do controle vetorial por aplicação de inseticidas e do tratamento de todos os casos humanos com Glucantime®.

Entretanto, Ashford *et al.*, (1998), trabalhando em região endêmica de Jacobina, BA, ao avaliarem o impacto da eliminação de cães soropositivos como medida de controle sobre a incidência da doença, não conseguiram interromper a transmissão, apesar da redução da prevalência de cães soropositivos em 26% (de 36% para 10%).

De fato, a eliminação tardia dos cães, ocasionada pela baixa capacidade de processamento de amostras pelos laboratórios públicos, deixando-os por um longo período atuando como reservatórios, além da baixa sensibilidade dos testes diagnósticos e das dificuldades de identificar o cão assintomático de área endêmica parecem ser capazes de comprometer o sucesso dos programas de controle (SILVA, 2005).

Estes dados sugerem que a eliminação de cães, sem o concurso de outras medidas, é insuficiente para controlar a doença.

Com intuito de estabelecerem medidas complementares David *et al.*, (2001) avaliaram a efetividade do uso de coleiras de deltametrina para proteger os cães contra picadas de flebotomíneos (*Lu. Longipalpis*). Segundo estes autores, houve um potente efeito de inibição do repasto para ambas as espécies de flebotomíneos utilizadas, variando de 96% a 100% nas primeiras semanas de uso, com progressiva redução do efeito após vinte semanas.

Além disso, observou-se também efeito letal sobre os vetores, com mortalidade máxima na terceira e quarta semanas (91% a 96%). Ademais, foi demonstrada a efetividade dos colares mesmo em animais expostos a intempéries, como sol e chuva, constituindo uma medida de grande valor para proteção individual dos animais (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1997; DAVID *et al.*, 2001).

Reithinger, Teodoro e Davies, (2001) realizaram alguns testes e concluíram que 90% dos flebotomíneos, que realizaram um repasto sangüíneo em cães com essas coleiras, não sobreviveram.

O uso rotineiro dessas coleiras por cães domésticos, na Itália, reduziu o risco desses animais se infectarem com *L. (L.) infantum*. No Irã, um estudo randomizado mostrou redução da infecção canina para 54% e, também risco de infecção significativamente menor para as



crianças habitantes das vilas com cães que fizeram uso das coleiras (MAZLOUMI-GAVGANI *et al.*, 2002).

No Brasil, um estudo em Araçatuba – SP mostrou maior redução do coeficiente de soroconversão para cães que usaram coleiras impregnadas com deltametrina em comparação com os que não usaram. No entanto, os resultados sobre o impacto da utilização dessas coleiras como medida de controle, não foram conclusivos (GLASSER, 2005).

Vale ressaltar que as medidas de controle devem ser adaptadas à realidade local, conforme as características epidemiológicas da região. No entanto, muitos aspectos da epidemiologia da doença continuam controversos, principalmente em relação à biologia do inseto vetor, seus hábitos, criadouros e condições naturais de evolução.

Situações novas, como a urbanização, o caráter emergente e a associação com o HIV, dificultam ainda mais o controle da transmissão. Apesar dos esforços para o controle e vigilância da LV no estado e municípios, Araguaína vem apresentando um crescente número de casos da doença, o que tem amedrontado a população, e levantando questionamentos quanto às estratégias para impedimento e diminuição da expansão dos casos ou ainda a interrupção da cadeia de transmissão.

Contudo, para obtenção do sucesso das ações de controle da LV, a vigilância deve abranger todos os elementos da cadeia de transmissão. Para tanto, é fundamental que haja um permanente controle sobre a população canina, com a realização de inquéritos sorológicos de frequência e abrangência compatível com a classificação epidemiológica do município (BRASIL, 2003).

Além disso, são requeridas melhorias na resolutividade diagnóstica dos municípios, com capacitação dos profissionais de saúde e apoio logístico, essencial para o diagnóstico precoce dos casos humanos (PROFETA-DA-LUZ *et al.*, 2001).

Por fim, destaca-se o controle entomológico, com a identificação da distribuição e da densidade vetorial em diferentes áreas (MARZOCHI; SCHUBACH e MARZOCHI, 1999), direcionando a aplicação de inseticidas de efeito residual no ambiente domiciliar e em seus anexos, tais como galinheiros, chiqueiros, currais e outros (MAGALHÃES *et al.*, 1980).

Os procedimentos que são adotados atualmente vêm combatendo a doença, mas ainda é necessário um melhor controle de desenvolvimento urbano, com realização de saneamento básico, cuidados com o meio ambiente, educação e conscientização da população para que

esta sociedade possa também colaborar para a melhoria das condições de saúde, buscada nas políticas de saúde pública (REICHMAN, 2006).

A profilaxia da LV através da vacinação dos cães constitui uma importante intervenção no ciclo epidemiológico, apresentando-se como uma medida ideal e com potencial para substituir a eutanásia dos cães, procedimento de grande rejeição por parte da população e das sociedades protetoras dos animais, com grande vantagem operacional e financeira.

Ademais, a introdução de uma vacina eficaz representaria a atuação de forma profilática sobre o reservatório canino e, sua utilização em massa, certamente reduziria o número de cães infectados, amenizando o problema da permanência de animais assintomáticos, não diagnosticados, participando da transmissão (SILVA, 2005).

Recentemente foi lançada no mercado brasileiro uma vacina para LVC. A vacina, nomeada Leishmune®, é reconhecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e está sendo industrializada e comercializada pela Fort Dodge Saúde Animal desde 2004 (MENZ, 2006).

Apresenta capacidade de proteger 75% dos cães vacinados contra leishmaniose visceral, mas o Ministério da Saúde não aprova esta vacina como medida de controle no Brasil por faltarem mais estudos na área. No momento, a secretaria de vigilância em saúde do MS, em parceria com um instituto de pesquisa está conduzindo um ensaio vacinal, a fim, de esclarecer melhor estas questões (GONTIJO e MELO, 2004).

A vacina Leishmune® foi desenvolvida pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a condução do Prof. Paulo de Góes e da pesquisadora Dra. Clarisa Palatnik de Sousa, resultado de 24 anos de trabalho de pesquisa. É importante destacar que a vacina só é útil como forma preventiva, em animais soronegativos (MENZ, 2006).

Os pesquisadores Reithinger e Davies (2002) e Moreno e Alvar (2002), concensuaram quanto à necessidade de produção de uma vacina para o controle da LV canina. Mesmo já existindo a vacina no mercado, diversos estudos estão em andamento, visando deslumbrar a real efetividade desta no controle da transmissão da LV.

Guarga *et al.*, (2002) e Alvar *et al.*, (2004), questionam, se o cão vacinado pode apresentar uma resistência ao desenvolvimento da doença, porém permanecer infectivo para o flebótomo vetor. Com isso, os grupos têm desenvolvido estudos visando o conhecimento da

resposta imunopatológica do cão infectado e técnicas que permitam diferenciar animais transmissores de não transmissores do parasito para o vetor, visto que essas são de grande valia para o controle desta zoonose.

A existência de evidências científica sobre a efetividade da vacina na prevenção da infecção e sobre a infectividade do cão vacinado ao vetor, são pontos fundamentais para avaliação da vacina como estratégia de controle de LV.

Sabe-se que a vacina altera o estado imunológico do cão, devido a isso, é impossível detectar a diferença entre cães naturalmente infectados de cães vacinados, através dos testes imunológicos preconizados pelos MS.

Com a comercialização da vacina contra leishmaniose no Brasil é importante para a saúde pública dispor de métodos diagnósticos que possam assegurar que cães imunizados ou tratados estejam transmitindo a doença para a população humana (GUARGA *et al.*, 2002; ALVAR *et al.*, 2004).

A princípio essa confirmação só é possível através da utilização do xenodiagnóstico, um método de difícil execução, pois consiste em submeter o animal a picadas do inseto vetor criado em laboratório e posterior verificação de parasitos nos insetos.

## 1.10 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

O diagnóstico da LVC é realizado com base nos aspectos clínicos, epidemiológicos e em testes laboratoriais. As técnicas preconizadas para diagnosticar LVC são divididas em técnicas de imunodiagnóstico, e em métodos diretos detecção do parasita.

É preconizado para o diagnóstico definitivo da LV canina, a detecção direta do parasita, e para sua demonstração são comumente utilizados materiais de biópsias ou aspirados de medula óssea, linfonodos, baço ou fígado (REITHINGER e DUJARDIN, 2007).

Para que se tenha segurança no diagnóstico da LVC é recomendado combinar diferentes métodos, uma vez que essa enfermidade apresenta um amplo espectro clínico tanto em humanos (REITHINGER e DUJARDIN, 2007) quanto em cães (GONTIJO e MELO, 2004) e ainda não existe um teste 100% específico e sensível (ALVAR *et al.*, 2004).

O Ministério da Saúde (2003), a partir desse ano preconizou no Brasil a utilização do teste ELISA como método de triagem inicial dos cães suspeitos e a reação de

imunofluorescência indireta (RIFI) como confirmatório dos casos positivos, para avaliação da soroprevalência nos inquéritos caninos amostrais e censitários.

Os indicadores de sensibilidade e especificidade de um teste devem ser analisados, quando da escolha de um teste diagnóstico para ser utilizado em um programa de controle. Portanto, tornam-se necessário a utilização de métodos laboratoriais, a fim de identificar, com maior segurança, os cães infectados. Compondo o diagnóstico laboratorial desta doença, os métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares (ALVAR; CANAVATE e GUTIÉRREZ-SOLAR, 1997).

### **1.10.1 Métodos Parasitológicos**

Estes métodos baseiam-se na observação do parasita em esfregaços e cortes de tecidos, tratados com corantes derivados de Romanowski – como Leishman e Giemsa, em isolamento por cultura ou em inoculação em animais.

Dentre os órgãos pesquisados, se encontram o baço (GIRAUD e CABASSU, 1933), linfonodos (GIRAUD e CABASSU, 1936), medula óssea (GIRAUD e CABASSU, 1933; ALENCAR e COELHO-NETO, 1956), fígado (GIRAUD e CABASSU, 1933; CHAGAS *et al.*, 1938; DEANE e DEANE, 1954a, DEANE, DEANE e ALENCAR, 1955a, DEANE e DEANE, 1955b; BRENER, 1957) e pele (GIRAUD e CABASSU, 1932; ALENCAR e COELHO-NETO, 1956; BRENER, 1957).

A microscopia e a cultura destacam-se como os métodos mais utilizados para detecção direta do parasito. Em ambos são utilizadas amostras obtidas por métodos invasivos como biopsias de linfonodo ou medula óssea e geralmente não são úteis para a detecção de parasitas de cães assintomáticos.

Na cultura as formas promastigotas são cultivadas em meios específicos e em condições de temperatura adequadas ao seu desenvolvimento, com finalidade de simular o habitat do parasita, e propiciar condições para sua proliferação. A microscopia consiste na observação direta da *Leishmania*, na forma amastigota livre ou no interior das células do SFM.

Com intuito de determinar os índices de positividade diversos autores realizaram estudos buscando, indicar a melhor técnica.

Lépine e Bifilger (1936) encontraram maior índice de positividade para o exame de material de punção de medula óssea (90%), quando comparados com material de punção esplênica (76,3%) e de punção hepática (38,1%). Brener (1957) comparou a punção hepática com a biópsia de pele em 19 cães, encontrando resultado positivo pela biópsia de pele e negativo pela punção hepática em 15 cães, e resultado positivo exclusivamente pela punção hepática em apenas 1 cão. Conclui o autor pela superioridade do exame de material da biópsia de pele.

Siddig *et al.*, (1988) encontraram índice de positividade superior para punção esplênica (98%) em relação à punção de medula óssea (54 a 86%) ou linfonodos (64%).

Segundo Brener (1957), a comparação entre os resultados obtidos por diferentes autores dificilmente pode ser efetuada devido à falta de uniformidade entre as diferentes técnicas empregadas. No entanto, há um consenso na literatura quanto à baixa sensibilidade do exame de material obtido por punção hepática para o diagnóstico da LVC. Pela simplicidade operacional da biópsia de pele, e pelos bons índices de positividade relatados, esta técnica mostra-se superior aos exames de material hepático e esplênico. No entanto, para a execução destes últimos *in vivo* é necessária uma maior capacitação do pessoal da coleta, a fim de minimizar os riscos de complicações para o animal.

A cultura de material de biópsia, em paralelo ao exame de cortes e esfregaços de tecidos, aumenta consideravelmente os índices de positividade. Esta é normalmente executada em meio bifásico NNN/LIT (MAYRINK, 1967), com temperatura de incubação variando entre 23°C e 26°C.

Genaro *et al.*, (1988) destacaram que a mielocultura é capaz de fornecer uma maior positividade, quando comparada ao mielograma e ao exame de pele.

O cultivo *in vitro* de promastigotas apresenta problemas referentes à demora em obter o resultado, dificuldade de se isolar parasitos de ambientes silvestres em meio de cultura, a dependência da quantidade de parasitas no material e das possíveis contaminações microbianas que inviabilizam a obtenção do resultado, mesmo sabendo que o teste apresenta 100% de especificidade.

Como desvantagens da microscopia podem citar: a exigência de pessoal treinado, fazendo com que o método seja de difícil utilização em estudos de campo quando um grande número de amostras precisa ser analisado em um curto período de tempo.

Entretanto, podem fornecer resultados falso negativo porque sua sensibilidade depende da quantidade de parasitas presentes na amostra, ou resultado falso positivo porque outros artefatos podem ser visualizados podendo se erroneamente considerado como amastigota (ALVAR *et al.*, 2004; BANETH e AROCH, 2008; GOMES *et al.*, 2008), além de não permitir a distinção de espécie do parasita (ARANSAY; SCOLULICA e TSELENTIS, 2000; REALE *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2001b).

A introdução do isolamento do parasita por inoculação em hamsters (*Mesocricetus auratus*), de material de punção de fígado, baço ou medula óssea, constitui-se em uma alternativa para a melhoria da sensibilidade. Contudo, seu emprego na rotina é inviável, pois o método apresenta pouco valor prático devido aos custos elevados para manutenção de animais e ao tempo exigido para superar o período pré-patente e obter-se a positividade dos mesmos.

Devido ao fato de algumas vezes ser impossível detectar o parasita em animais infectados (FERRER *et al.*, 1995), utilizam-se métodos de detecção de anticorpos parasita-específicos no soro por métodos sorológicos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

### **1.10.2 Métodos Sorológicos**

Nas áreas endêmicas do Brasil, onde a prevalência da LV é a maior das Américas, os cães são periodicamente analisados por sorologia, geralmente pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o imunoensaio enzimático (ELISA) (BADARÓ; REED e CARVALHO, 1981).

O ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) foi introduzido por Hommel; Peters e Rangué (1978) no diagnóstico das leishmanioses. Foi empregado, em seguida, em vários países em inquéritos epidemiológicos humanos mostrando-se bastante sensível.

Badaró *et al.*, (1986) descreveram o emprego de ELISA para diagnosticar LV, obtendo sensibilidade de (98%) e especificidade de 96%.

Estudos comparativos entre métodos diagnósticos da LVC têm sido amplamente realizado por diversos autores, em comparação entre as técnicas de ELISA e RIFI, considerado como padrão ouro, Machado (2008) obteve sensibilidade do ELISA de 87,23%, similar ao encontrado por Araújo *et al.*, (2004) (84,13%). Vexenat *et al.*, (1993), Mancianti *et*

*al.*, (1995), Vercammen *et al.*, (1997), Bernadina *et al.*, (1997), Machado (2004) e Rosário *et al.*, (2005) observaram sensibilidade para ELISA variando de 97% a 100%.

Braga *et al.*, (1998) comparando o programa de rotina da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), que preconizava a RIFI como método de diagnóstico, com o emprego do ELISA e eliminação rápida dos animais, observaram que na área submetida ao controle da FUNASA foi possível observar uma diminuição de 9% da prevalência, enquanto na área onde foi utilizado o método ELISA e a eliminação rápida dos cães a prevalência reduziu 27%. Contudo, não foi possível definir se houve maior sensibilidade do ELISA ou se a eliminação imediata dos cães teria causado maior impacto na redução da prevalência da LVC.

Desde 1960 a RIFI é utilizada no diagnóstico da LV, a sensibilidade varia de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro (GENARO, 2000).

Os inquéritos soroepidemiológicos da LVC no Brasil são realizados desde a época da implantação do PCLV, e nesse período a RIFI já era utilizada (LANOTTE *et al.*, 1979; POZIO *et al.*, 1981; MARZOCHI *et al.*, 1985; GRADONI *et al.*, 1988; COSTA *et al.*, 1991; GENARO *et al.*, 1991).

A RIFI é considerado menos sensível e mais específico do que o método de ELISA (GONTIJO e MELO, 2004). Ambos os testes envolvem a utilização de antígenos brutos e possuem algumas limitações quanto à sua especificidade e reprodutibilidade (SUNDAR e RAI, 2002; SINGH, 2006).

Costa *et al.*, (1991) empregando a reação de fixação de complemento (RFC) e RIFI, realizaram estudo sorológico em áreas endêmicas dos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo, utilizando cães infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*. Nos resultados demonstrou-se que a RIFI apresentou 75% de reações cruzadas entre *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* e 83,3% entre *L. (L.) chagasi* e *Trypanosoma cruzi*, não devendo, portanto, os seus resultados serem considerados como indicadores específicos de infecção por *Leishmania*.

A RIFI, além de ser um ensaio qualitativo, como o teste rápido, é também um método quantitativo, o que torna possível avaliar os títulos de anticorpos produzidos pelos cães. Camargo-Neves (2004) demonstrou a alta especificidade da RIFI na detecção de animais positivos, considerando boa a concordância do resultado de RIFI em relação ao exame parasitológico.

Pelo fato das técnicas sorológicas não serem espécie – específicas, e diante dos inúmeros relatos de reação cruzada de LVC com outras zoonoses, quando se utiliza testes sorológicos, pode-se estar contribuindo para a permanência de animais falsos negativos no ambiente epidêmico.

O grupo de pesquisa do Hospital Veterinário (UNESP) de Araçatuba com o intuito de implementar o diagnóstico da LVC, compararam o método de imunofluorescência direta (IFD) com a pesquisa direta do parasito em esfregaços corados pelo método de Romanowsky. Nos resultados obtidos, podemos observar que dos 60 cães com sinais clínicos da doença, o exame direto foi positivo em 50% (n=30), duvidoso em 36,7% (n=22) e negativo com reatividade do linfonodo em 13,3% (n=8). Quando os linfonodos foram submetidos a reação de IFD observamos reação positiva em 93,3% (n=56) e reação negativa em 6,7% (n=4). Os resultados do estudo mostraram que a reação de IFD apresentou alta sensibilidade quando comparada a pesquisa direta do parasito pela coloração de Romanowsky (MOREIRA *et al.*, 2002).

Para verificar a existência de reação cruzada entre LV, erliquiose e babesiose, nos ensaios sorológicos utilizados nos programas de controle da LV humana, os autores utilizaram amostras de soro canino provenientes de áreas endêmicas e não endêmicas para LV, empregando os métodos (RIFI) e (ELISA). Observaram que 100% das amostras provenientes de área endêmica foram positivos para *Leishmania* sp. pelos em ambos os testes. Pelo emprego da RIFI 51% apresentaram positividade para *Babesia canis* e 43% para *Ehrlichia canis*. Dos soros provenientes de área não endêmica todos foram submetidos ao RIFI, nenhuma amostra positivou para *Leishmania* sp., 67% apresentaram positividade para *B. canis* e 78% para *E. canis*. Quando testados pelo ELISA apenas quatro soros apresentaram positividade para *Leishmania* sp. Os autores concluíram que já é fato em regiões endêmicas: há a presença de uma co-infecção entre os três parasitos citados nas áreas endêmicas, e não há reação cruzada entre eles, nos testes sorológicos de RIFI e ELISA (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Em países onde a doença é endêmica têm sido reportado que alguns animais infectados permanecem soronegativos, o fato foi observado através da experiência clínica de Ferrer *et al.*, (1995).

Outros testes diagnósticos têm sido propostos e com surgimento de novas metodologias mais atualizadas os grupos de pesquisa do mundo inteiro têm se empenhado para testá-las, como Western Blotting (AISA *et al.*, 1998), teste de aglutinação direta (EL



HARITH *et al.*, 1989), fast- ELISA (ASHFORD *et al.*, 1993), dot-ELISA (DIETZE *et al.*, 1995) ou Fucosemannose ligand-ELISA (GULNARA *et al.*, 1999), entre outras.

A proteína recombinante K39, além de estar sendo utilizada nos testes de ELISA convencionais, tem sido empregada nos testes imunocromatográficos, ditos como teste rápido, e tem se demonstrado eficiente para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, além de possibilitar sua realização em campo, sem a necessidade de automação.

Estudos realizados por Silvio *et al.*, (2003) compararam os resultados de um teste utilizando um antígeno recombinante K39 (teste de tiras) com ELISA in house (usando como antígeno todo o parasita) em 128 casos de LV procedentes do estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Os resultados demonstraram uma sensibilidade e especificidade de 90% e 100%, respectivamente. Comparando com estudos similares realizados em outros países, como Nepal, Sudan, Venezuela e Índia, os índices encontrados foram satisfatórios.

Atualmente, inúmeros kits comerciais para a detecção rápida de anticorpos anti-*Leishmania* estão disponíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana e têm mostrado perda de sensibilidade e especificidade, quando utilizados para o diagnóstico em cães. (REITHINGER e DAVIES, 2002; MOHEBALI; TARAN e ZAREI, 2004). Podem ser observadas variações de 52,9% a 99,2% para a sensibilidade e de 61% a 87,9% para a especificidade destes testes (REITHINGER e DAVIES, 2002; MOHEBALI; TARAN e ZAREI, 2004; METTLER *et al.*, 2005).

Araújo (2007), comparando o antígeno recombinante K39 em teste imunocromatográfico com com RIFI, utilizando tanto eluato sanguíneo com soro sanguíneo, observaram sensibilidades de 66,0% (rK39 eluato/RIFI soro) a 79,7% (rK39 soro/ RIFI eluato) e especificidades que variaram de 80,4% (rK39 sangue /RIFI soro) a 95,9% (rK39 eluato/EIE soro). Reithinger e Davies, (2002) compararam o teste rápido imunocromatográfico com ELISA e PCR e concluíram que o teste rápido apresentou baixa especificidade (61-75%) apontando uma alta proporção de cães como falsos positivos, e apenas 72 a 77% de sensibilidade.

Em contradição ao resultado encontrado por Araújo (2007), Da Costa *et al.*, (2003) e Otranto *et al.*, (2004), observaram alta sensibilidade e especificidade para dois diferentes testes rápidos de imunocromatografia.

No estudo de Da Costa *et al.*, (2003) foram utilizados testes rápidos com antígenos recombinantes K39 com sensibilidade de 96% e especificidade de 100% e K26 com

sensibilidade menor, mas, também com a máxima especificidade. Os pesquisadores concluíram então, que os antígenos se complementam, aumentando a sensibilidade do teste.

Otranto *et al.*, (2004), realizaram um estudo que objetivou avaliar o desempenho do teste imunocromatográfico rK39 comparado com a RIFI para o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina no sudeste da Itália. Os resultados revelaram que a RIFI foi positiva em 67/68 cães com infecção comprovada por *Leishmania* e que o teste rápido foi positivo em 66/68 cães infectados. A partir de tais resultados o teste rápido mostrou sensibilidade de 97% e especificidade de 100%, enquanto a RIFI mostrou sensibilidade de 99% e especificidade de 100%.

A sensibilidade dos testes diagnósticos para detecção de anticorpos anti *Leishmania* não alcançam 100%, o fato é explicado pelo tipo de antígeno empregado nas técnicas. Sendo geralmente utilizados parasitas totais ou lisados.

Segundo Araújo (2007) existe uma grande dificuldade em se estabelecer a sensibilidade e a especificidade de um teste sorológico para o diagnóstico das leishmanioses, pois não se dispõe, até o momento, de testes parasitológicos ou sorológicos que possam ser considerados um padrão ouro.

### **1.10.3 Métodos Moleculares**

Os testes moleculares têm se mostrado como boa opção diagnóstica, pois permitem a detecção de seqüências de DNA específicas do parasita. A Reação em Cadeia da Polimerase ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é um importante exemplo e é um procedimento que permite a amplificação de segmentos de DNA em até 1.000.000 de vezes.

É crescente a utilização de técnicas baseadas em análise de DNA, tanto no diagnóstico, como na caracterização de espécies de *Leishmania* (SALMAN; RUBEIZ e KIBBI, 1999).

Dentre as técnicas de diagnóstico molecular disponíveis temos a hibridização com sondas de DNA, análise de kDNA por enzimas de restrição e PCR, sendo essa considerada de grande sucesso devido sua alta sensibilidade e especificidade, e ainda possibilitam à aplicação mesmo quando dispomos de pequena amostra de material (GREVELINK e LERNER, 1996).

Muitos trabalhos já demonstraram a aplicabilidade da PCR para o diagnóstico da leishmaniose canina indicando ser esta uma técnica mais sensível e específica do que os métodos tradicionais (MANNA *et al.*, 2004; REALE *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2001b; STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004).

A técnica de PCR objetiva a detecção de sequências conservadas do DNA de *Leishmania*, obtendo o desenho de *primers* específico para tais sequências, é possível detectar o DNA de minicírculo, kDNA, presente em várias cópias no cinetoplasto do parasito.

Existem diferentes alvos de amplificação no genoma de *Leishmania* que já foram descritos para diagnóstico. Vários sistemas de detecção baseados na PCR foram desenvolvidos (SCHALLIG e OSKAM, 2002), e a busca de sua padronização é tida como um importante objetivo para os programas de controle da leishmaniose (WHO, 2002).

O PCR é uma alternativa atraente no contexto do diagnóstico da LVC, possui sensibilidade e especificidade bem satisfatória, e agilidade no atendimento das necessidades dos programas de controle, também pelo fato dos animais vacinados e não infectados não apresentam reação positiva na técnica de PCR, o método têm se apresentado como uma possível solução para o monitoramento dos cães imunizados.

A técnica de PCR permite caracterizar espécie do agente etiológico simultaneamente à realização da confirmação diagnóstica, além de possibilitar a utilização de amostras estocadas (DEGRAVE *et al.*, 1994) e amostras que não passaram por preparo (DE BRUJIN *et al.*, 1993) sem prejuízo nos resultados, apresentando a vantagem de analisar inúmeras amostras concomitantemente, fatores que facilitam sua aplicação em áreas endêmicas e condições de campo (WILSON, 1995).

A sensibilidade e a especificidade da PCR estão diretamente ligadas ao conjunto de iniciadores utilizados para a amplificação do alvo, ao número de cópias do alvo a ser amplificado, ao método de extração de DNA utilizado, ao tipo de material a ser analisado e ao protocolo de PCR (ALVAR *et al.*, 2004; CORTES *et al.*, 2004; BANETH e AROCH, 2008).

No atual cenário têm sido utilizados como alvos de amplificação do genoma de *Leishmania* minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA) (com aproximadamente 10000 cópias por célula) (RODGERS; POPPER e WIRTH, 1990; SMYTH *et al.*, 1992).

O ensaio qualitativo de PCR é útil quando há necessidade de se obter o diagnóstico rápido, preferencialmente nos casos em que os resultados sorológicos sejam duvidosos (VITALE *et al.*, 2004).

Um estudo utilizando 27 cães soropositivos para LV, que almejava investigar a concentração de DNA parasitário de *Leishmania chagasi* em diferentes tecidos de cães infectados, demonstrou que o parasito foi detectado em todas as amostras de linfonodo analisadas (100%), sendo esse órgão eleito como o tecido com maiores níveis de DNA parasitário, seguido pelo baço, sangue, medula e pele, independente da sintomatologia clínica do animal. Assim, em cães o linfonodo é o tecido mais acometido pelo parasito, podendo ser considerado como o sítio ideal para monitoramento da leishmaniose canina (CARVALHO, 2007).

## 2 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral no Tocantins encontra-se em expansão geográfica, assumindo caráter emergente. Encontra-se em franca urbanização, processo decorrente de más condições de vida da população, sobretudo nas periferias.

Para o efetivo controle do reservatório canino é preciso haver melhor acurácia nos métodos diagnósticos. Faz-se necessário a disponibilidade de métodos diagnósticos que expressem resultados fidedignos, que apresentem grande sensibilidade e baixo custo. O diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral continua sendo um desafio.

Os métodos sorológicos são preferidos nos inquéritos epidemiológicos caninos por apresentarem elevada sensibilidade. Diante dos inúmeros relatos de reação cruzada de LVC com outras zoonoses, quando se utilizam testes sorológicos, pode-se estar contribuindo para a permanência de animais falsos negativos no ambiente epidêmico.

Os testes comerciais para a detecção rápida de anticorpos anti- *Leishmania* estão disponíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana e têm mostrado perda de sensibilidade e especificidade, quando utilizados para o diagnóstico em cães. (REITHINGER e DAVIES, 2002; MOHEBALI; TARAN e ZAREI, 2004).

O RIFI além de ser um ensaio qualitativo e quantitativo, possibilita avaliação dos títulos de anticorpos produzidos pelos cães. É considerado menos sensível e mais específico do que o método de ELISA (GONTIJO e MELO, 2004).

Ambos os testes possuem algumas limitações quanto à sua especificidade e reprodutibilidade (SUNDAR e RAI, 2002; SINGH, 2006).

De acordo com Araújo (2007) a falta de padronização dos testes parasitológicos, moleculares ou sorológicos, que possam ser considerados um padrão ouro, impossibilita o estabelecimento da sensibilidade e a especificidade de um teste sorológico para o diagnóstico das leishmanioses.

É preconizado a detecção direta do parasita para o diagnóstico definitivo da LVC e para sua demonstração são comumente utilizados os métodos parasitológicos, como: microscopia, cultura e inoculação em animais. No entanto, as formas de obtenção das amostras geralmente utilizam técnicas invasivas e necessitam de maior capacitação pessoal. Além de não permitirem a distinção da espécie do parasita, podem fornecer resultado falso

negativo porque sua sensibilidade depende da quantidade de parasitas presentes na amostra, ou resultado falso positivo porque outros artefatos podem ser visualizados podendo se erroneamente considerado como amastigota. Algumas vezes exigem muito tempo e demandam alto custo, fatos que geram inconveniência para utilização destas técnicas na rotina dos serviços.

Os ensaios de PCR permitem caracterizar a espécie do agente etiológico simultaneamente à realização da confirmação diagnóstica, além de possibilitar a utilização de amostras estocadas. Por outro lado, pecam por sua extrema especificidade, falhando na detecção de seqüências de *Leishmania* não codificadas pelos oligonucleotídeos iniciadores. É útil quando há necessidade de se obter o diagnóstico rápido, preferencialmente nos casos em que os resultados sorológicos sejam duvidosos (VITALE *et al.*, 2004).

De maneira geral, as técnicas de imunohistoquímica e reação em cadeia da polimerase (PCR) quando padronizadas e validadas têm alta sensibilidade para o diagnóstico. No entanto, em relação à leishmaniose, até o presente momento para as técnicas supracitadas não existem protocolos validados e preconizados (BRASIL, 2009).

O correto diagnóstico é importante para evitar a eliminação de cães não infectados e na identificação correta dos animais contaminados. As técnicas usualmente utilizadas para o diagnóstico da LV canina ainda apresentam falhas, de forma que ainda hoje permanece o desafio para obtenção de um método sensível, específico, simples, rápido e aliado ao baixo custo. É recomendada a combinação de diferentes métodos, uma vez que essa enfermidade apresenta um amplo espectro clínico tanto em humanos (REITHINGER e DUJARDIN, 2007) quanto em cães (GONTIJO e MELO, 2004).

Esforços com investimento público devem ser empregados para o desenvolvimento de testes de diagnóstico para LV em humanos e cães, fato que não parece estar tão distante. Diagnóstico seguro e precoce pode reduzir substancialmente o impacto dessa doença que, nos últimos tempos, tem desafiado a ciência e a saúde pública mundo afora.

Diante dos inúmeros desafios, no que se refere ao diagnóstico da leishmaniose visceral, este estudo propôs-se a avaliação de metodologias diagnósticas disponíveis que possam ser empregadas na rotina dos serviços de saúde.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral canina no município de Araguaína Estado do Tocantins, Brasil.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Avaliar o desempenho das técnicas parasitológicas, imunológicas e moleculares no diagnóstico da leishmaniose visceral canina em cães soropositivos de área de alta endemicidade.

Demonstrar a frequência da infecção por *Leishmania* sp. entre as diferentes metodologias em cães soropositivos que habitam em região de alta endemicidade, encaminhados para eutanásia no Centro de Controle de Zoonoses de Araguaína – To.

Avaliar comparativamente a concordância e o índice Kappa entre os seis testes empregados no estudo.

## 4 ANIMAIS E MÉTODOS

### 4.1 ÁREA DE ESTUDO

Araguaína fundada em 1958 é considerado um dos mais populosos municípios do estado do Tocantins, está localizado na região norte do estado. Segundo estimativa do IBGE, em 2009 o município contava com 119.637 (cento e dezenove mil e seiscentos e trinta e sete) habitantes e mostra uma grande concentração da população na zona urbana (93,6%), apresentando uma densidade populacional de 28,8 habitantes por km<sup>2</sup> (IBGE, 2009).

Possui uma área de 3.920,01 Km<sup>2</sup>, está situada na região ocidental, no extremo norte tocantinense a 7° 11' 28" de latitude, 48° 12' 26" de longitude e numa altitude de 227m. Seu relevo é bastante variado, destaca-se o planalto sem a presença de grandes elevações. Altitude média dos morros varia de 100 a 300m. O município apresenta clima tropical úmido, a temperatura se mantém elevada durante todo o ano, com temperatura média, máxima de 32°C, mínima de 20°C. Estações definidas de chuva entre os meses de novembro a maio e uma estação seca entre os meses de junho a outubro, com precipitação pluviométrica com média anual de 1.750mm. A vegetação é constituída predominantemente por floresta Amazônica e Cerrado (IBGE, 2009; TOCANTINS, 2004).

Além da posição estratégica, às margens da rodovia Belém-Brasília, sendo até hoje o principal meio de ligação entre o centro-sul e o norte do país, Araguaína destaca-se política e economicamente como expressivo centro comercial e financeiro da região e como um núcleo especializado de prestação de serviços nas áreas de saúde e educação (ARAGUAINA, 2008).

Os serviços de saúde municipais se encontram no modelo pleno da atenção básica, sendo disponibilizadas à população diversas unidades de complexidade variada. Sob a responsabilidade do Governo do Estado está à média e alta complexidade.

### 4.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Esse projeto de pesquisa foi autorizado pelo Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins – FMTTO. O Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Instituição, encontra-se em fase de implantação.



### 4.3 LOCAL DE TRABALHO

Os procedimentos foram realizados no complexo laboratorial da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins – FMTTO, situado na cidade de Araguaína – Tocantins, no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – IMT/SP e no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FM/USP.

### 4.4 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados vinte cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses – CCZ de Araguaína, com infecção confirmada para LV, durante a realização de inquérito soropidemiológico no município. Foram empregados os testes: ELISA para triagem inicial e a RIFI para confirmação do diagnóstico, ambos executados pelo laboratório de saúde pública de Araguaína – LSPA. A partir da obtenção dos resultados positivos, os animais foram capturados pelo CCZ e destinados a eutanásia. Para esse estudo, os animais não foram identificados quanto a apresentação ou não de sinais clínicos da doença, sem distinção de sexo e sem determinação do local de residência.

O CCZ, em atendimento as recomendações do ministério da saúde – MS, determina captura e eutanásia para os cães que apresentem sorologia positiva para LV através dos testes sorológicos, imunoensaio enzimático (ELISA) e da reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

#### **4.4.1 Obtenção de Soros e Linfonodos Cervical e Poplíteo**

##### *4.4.1.1 Sedação e Coleta Sanguínea*

Para realização da coleta sanguínea os animais foram previamente sedados, conforme protocolo adotado pelo CCZ, utilizando Acepromazina 1%, na dosagem de 0,1 mL/kg de peso

por via intravenosa. Após 10 minutos, foi administrado anestésico geral, Tiopental Sódico 2,5%, na dose de 0,5 mL/kg de peso pela via intravenosa (MELO *et al.*, 2008).

Depois de atingido o plano anestésico adequado os animais foram encaminhados individualmente à sala de procedimentos do CCZ para realização da assepsia (álcool 70%) da região alvo e posteriormente à punção sanguínea. O material obtido foi adicionado em tubos de ensaio devidamente identificados. Em seguida, todas as amostras sanguíneas foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 2.000 rpm (rotação por minuto), para obtenção dos sobrenadantes (soros). Os soros assim obtidos foram transferidos para tubos previamente identificados e mantidos em freezer a temperatura de -20°C até o momento do uso.

#### *4.4.1.2. Eutanásia e Obtenção de Linfonodos*

A eutanásia foi realizada conforme parâmetros estabelecidos pela Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre os procedimentos e métodos de eutanásia em animais. Para sacrifício dos animais administrou-se por via (IV) uma dose letal (1 mg/kg) de Cloreto de Potássio (MELO *et al.*, 2008). A necropsia foi realizada para obtenção dos linfonodos cervical e poplíteo.

Os animais foram submetidos à tricotomia, a fim de garantir a assepsia do local (álcool 70%), e posteriormente foram realizadas as incisões com auxílio de bisturi acoplado a lâmina nº 24. O procedimento foi realizado obedecendo à ordem de identificação dos animais.

Após a comprovação da morte do animal foram iniciados os procedimentos para a retirada dos órgãos a serem analisados – linfonodo poplíteo (01) e cervical (01), perfazendo o total de dois órgãos por animal.

Os linfonodos foram dispostos sobre papel filtro até completa dessecação dos órgãos, sendo em seguida acondicionados em frascos estéreis e identificados.

Para extração de DNA os linfonodos cervicais foram submersos em aproximadamente 30 ml de etanol PA.

Para realização dos cortes histológicos e do estudo imunohistoquímico os linfonodos poplíteos foram mantidos em igual volume de solução formalina tamponada 10% pH 7,2. O material acima obtido foi mantido sob refrigeração a 4°C.

## 4.5 DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS UTILIZADOS

### 4.5.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O ensaio foi desenvolvido de acordo com a metodologia descrita na literatura (VENKATESAN e WALKLIN, 1993). Placas de poliestireno com 96 poços para microtitulação, para alta ligação de proteínas (Costar<sup>®</sup>), foram sensibilizadas com 10µg/mL de antígeno solúvel de *L. chagasi* (100µL/poço) produzido e fornecido pelo laboratório de protozoologia do IMT/SP, suspenso em tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9,5. Após sensibilização por 20 h a 4°C em câmara úmida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS 0,01 M pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20 (PBST), e bloqueadas com 0,3% de solução de leite desnatado (Molico<sup>®</sup>) em PBST durante uma hora em estufa a 37°C. Após o bloqueio, foram realizadas mais cinco lavagens e as amostras de soros, em duplicata, foram diluídas 1/100 e 1/200 em PBSTL, adicionando-se às placas 100 µL/poço, e incubou-se por 1 hora a 37°C. Após esse processo, foram feitas mais cinco lavagens, e cada poço recebeu 100µL de conjugado anti-IgG de Cão (1/20.000) (Sigma Chem Co<sup>®</sup>) marcado com peroxidase e a placa foi novamente incubada por 1 hora a 37°C. Após lavagem, as reações foram reveladas com (100µL/poço) de cromógeno OPD, sendo utilizado em seguida (50 µL/poço) de ácido clorídrico 4N como solução de bloqueio.

A leitura das absorbâncias (ou densidade óptica - D.O.) de todas as amostras de soro em duplicata, nas diluições 1/100 e 1/200, foram realizadas em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS<sup>®</sup>) em filtro com comprimento de onda de 492nm. A partir da análise das D.O's obtidas nas diluições 1/100 e 1/200, considerou-se ideal as absorbâncias expressas na diluição 1/200. O resultado final de cada soro foi expresso a partir da média aritmética das D.O's obtidas em duplicata na diluição 1/200. Concomitantemente foi realizada a leitura de vinte soros padrão negativos na diluição 1/200 e foi determinada uma média aritmética desses resultados para o estabelecimento do cutoff, adicionando-se três desvios-padrão. Estabeleceu-se como cutoff o valor de 0,385 com 99% de intervalo de confiança.

#### 4.5.2 Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)

A reação de imunofluorescência indireta foi realizada conforme a metodologia descrita por Camargo; Leser e Leser, (1976). Utilizando-se como antígenos promastigotas de *L. chagasi* preparadas e fornecidas pelo laboratório de protozoologia do IMT/SP.

Durante o processamento do teste foram adicionados, em cada orifício da lâmina, 10µl de soro em diferentes diluições, a partir de 1/8 até 1/256, e incubadas a 37°C, em câmara úmida, por 30 minutos. Decorrido o período de incubação, as lâminas foram lavadas três vezes, por 10 minutos cada, com PBS 0,01M pH 7.2. Em seguida, foram adicionados 10µl de conjugado IgG anti-imunoglobulina de cão (Sigma Chem Co<sup>®</sup>) marcado com fluoresceína e, as lâminas foram novamente incubadas a 37°C, em câmara úmida, por 30 minutos.

Após incubação com o conjugado, as lâminas foram novamente lavadas três vezes com PBS e secas ao ar. Em seguida, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato 0,5M pH 8.5 e laminulas de 24x50mm (GlassTécnica<sup>®</sup>) para posterior leitura.

Para padronização deste teste foram utilizados soros controles positivo e negativo, gentilmente cedidos pelo laboratório de protozoologia do IMT/SP. Para os soros foi considerada reação positiva a diluição 1/8, a partir da qual as promastigotas apresentam fluorescência. Para titulação do conjugado, foi utilizado solução de Azul de Evans 0,01% em PBS, considerando-se ideal o título de 1/20.

\*

#### 4.5.3 Teste Rápido DPP<sup>®</sup> Leishmania Visceral Canina

O teste Rápido DPP<sup>®</sup> Leishmania Visceral Canina - LVC é de caráter qualitativo, tendo sido desenvolvido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Bio-Manguinhos – Fundação Oswaldo Cruz/Ministério da Saúde para o diagnóstico *in vitro*. O princípio do teste é a detecção de anticorpos anti-LVC.

Para a realização do teste Rápido DPP<sup>®</sup> LVC foram utilizados os kit's contendo suportes de teste, alças coletoras descartáveis (5µl), tampão de corrida. Os procedimentos

foram executados conforme instruções descritas no manual de instrução de uso. Os soros a serem testados foram retirados da refrigeração para atingir temperatura ambiente, assim como os controles positivos e negativos cedidos pelo laboratório de protozoologia do IMT/SP. Os suportes de testes foram identificados. Em cada poço denominado de “#1” foram adicionados 5 µl de soro, seguido por 2 gotas, aproximadamente 60 µl de tampão de corrida. Passados 5 minutos, e confirmado o desaparecimento das duas linhas azuis, foram adicionados 4 gotas, aproximadamente 150 µl de tampão ao poço denominado de “Buffer Well #2”. Para leitura dos resultados, foram aguardados de 10 a 15 minutos após adição do tampão ao poço “Buffer Well #2”. A reação foi considerada positiva pela visualização de duas linhas de coloração vermelha, sendo que a primeira caracteriza o controle do teste e a segunda reatividade da amostra.

#### **4.5.4 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR**

Para realização da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR, foram utilizadas 20 mg de peso úmido de cada linfonodo cervical. As amostras foram maceradas em gral e pistilo até completa pulverização do material e em seguida suspensas em 100 µl de Tris/EDTA - TE, para posteriormente serem armazenadas à - 20° C até extração de DNA.

A extração de DNA das amostras foi executada de acordo com Da Silva e Langoni, (2001). Inclui-se neste processo, digestão com proteinase K, extração com fenol clorofórmio e precipitação com etanol. Para a extração propriamente dita foi necessário quantificar a amostra e acertá-la a concentração de aproximadamente  $10^7$  parasitas/ml. Após centrifugação de 1 ml desta amostra, adicionou-se ao precipitado obtido 500 µl de tampão de digestão contendo: 25 µl de Tris-HCl 1M pH 9,0 a 0,05M, 200 µl de EDTA 0,25 M pH 7,5, 25 µl de NaCl 4 M, 25 µl de SDS 20%, 2,5 µl de proteinase K 20% e 222,5 µl de Água MilliQ. As amostras foram acondicionadas em tubos eppendorf's individualmente e submetidas à agitação no vortex® por aproximadamente 20 segundos. Decorrido esse período os tubos contendo o pellet e o tampão de digestão foram incubados em Banho Maria a 37°C e mantidos “over night”. Em seguida, foram adicionados 550 µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, levado a centrifugação refrigerada (4 °C) a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi submetido ao mesmo procedimento por mais duas operações, seguida de mais três lavagens idênticas as anteriores, utilizando apenas 500 µl clorofórmio. Ao último

sobrenadante foram acrescentados 50 µl de acetato de sódio pH 5,2 a 3M e 1000 µl de etanol “gelado”, e mantido “over night” no freezer. No dia seguinte foi levado a centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos e ao precipitado formado foi adicionado 500 µl de etanol 70%. Em seguida, procedeu-se a lavagem em etanol (por três vezes) e ao final o tubo foi invertido sobre um papel toalha para retirar o excesso de etanol, até completa secagem. Para ressuspensão do pellet de DNA foi acrescentado 100 µl de Tris/EDTA a cada tubo contendo amostra.

#### 4.5.4.1 Amplificação de DNA por PCR

A PCR foi conduzida para detecção de um fragmento de 120 pares de bases - pb do gene 5’ – GTG GGG GAG GGG CGT TCT – 3’, *Leishmania* sp. Os oligonucleotídeos iniciadores foram obtidos a partir da seqüência descrita por LAURENCE LACHAUD *et al.*, (2002b), e estão apresentados na tabela abaixo:

**TABELA 1.** Características dos Oligonucleotídeos utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (K13A-K13B).

<b>Características do PCR</b>	<b>K13A-K13B</b>
PCR DNA alvo	kDNA minicirculo (10,000 cópias)
Tamanho do produto (bp)	120
Referência (s)	34
Especificidade	<i>Leishmania</i> sp.
Seqüência do Primer	5’-GTGGGGGAGGGGCGTTCT-3’ 5’-ATTTTACACCAACCCCCAGTT-3’
Condições do PCR	
MgCl <sub>2</sub> conc. (mM)	3
Tempo de <i>Taq</i> polymerase (IU)	1,5
Temperatura de Anelamento (°C)	58
Tempo de Extensão	30

a) kDNA - kinetoplasto DNA.

b) bp – Pares de Bases.

Tabela modificada de (LAURENCE LACHAUD *et al.*, 2002b).

A reação de PCR foi realizada em 25 µl com Tris/HCl pH 8,4 20 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP’s 8 mM, “primers” 0,2 µM, adicionados Taq DNA Polimerase, 5 U

(Invitrogen®) e 5 µl de DNA das amostras a serem testadas. Foram incluídos os controles positivo, amostra de DNA extraída de cultura fornecida pelo Instituto Adolfo Lutz, controle negativo, amostra de água ultra pura estéril e um padrão de amostra (Lader), com número de pares de bases aproximado do primer utilizado, 100 pb (Invitrogen®).

A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf Mástercycler Gradient®), utilizando-se um ciclo a 94°C por 04:30 segundos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 30 segundos e extensão final de 10 minutos.

Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6% em tampão de corrida Tris-Borato-EDTA pH 8,0 (TBE), onde 10 µl de cada amostra amplificada foi homogeneizada com 2 µl de solução de azul de bromofenol. A corrida foi realizada a voltagem de 90 V/cm e o gel foi corado pelo nitrato de prata. Após a amplificação por poliacrilamida, 10 µl dos produtos de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose (Invitrogen®) a 1,5%. Durante o preparo do gel foi adicionado o brometo de etídio para a coloração do gel antes do processo de polimerização, com voltagem constante (90 V).

#### **4.5.5 Estudo Histológico**

Os linfonodos poplíteos foram fixados em solução de formalina tamponada 10% pH 7,2, por 24 horas, com duas trocas. Em seguida, foram submetidos à inclusão em parafina. A microtomia foi realizada com corte de aproximadamente 5µm, colocados em lâminas sinalizadas. A seguir foram hidratados e submetidos a coloração usual por Hematoxilina e Eosina - HE. As lâminas foram micrografadas em microscópio Olympus com ótica planacromática e câmera digital de resolução de 1.2 Megapixel.

#### **4.5.6 Estudo Imunohistoquímico**

Os cortes aderidos às lâminas silanizadas foram desparafinadas em banhos de tolueno e rehidratados em concentrações decrescentes de etanol. Após hidratação, os antígenos foram recuperados por processo térmico (Banho Maria a 96°C). A seguir, a biotina e a peroxidase

endógenas foram eliminadas por tratamento específico com metanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e eliminador de biotina. O material foi então incubado anticorpo primario o soro hiperimmune de camundongo infectado com cepa de *L. amazonensis*, na diluição 1:100, por uma hora em câmara úmida. Após lavagens, os cortes foram incubados com diluição apropriada de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com biotina. Após novas lavagens, os cortes foram incubados com diluição apropriada do complexo ABC-peroxidase “Avidin-Biotin Peroxidase”. Após novas lavagens, a ligação do anticorpo foi verificada pela adição de Diaminobenzidina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gerando um precipitado marrom. Após a revelação, as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris e montadas. Os cortes foram observados e micrografados em microscópio Olympus com ótica planacromática e câmera digital de resolução de 1.2 Megapixel. Os procedimentos acima descritos ocorreram conforme metodologia de Hsu; Raine e Fanger (1981). Para interpretação do resultado o tecido foi considerado positivo para *Leishmania* quando haviam amastigotas evidenciadas dentro de células com coloração marrom, como demonstrado fotograficamente. Ocasionalmente, marcações intracelulares em macrófagos foram consideradas evidência de presença de antígeno.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir da distribuição dos resultados pareados obtidos nos diferentes métodos diagnósticos, em tabelas de contingência tipo 2x2, foram empregados dois estimadores de confiabilidade para variáveis categóricas: percentual de concordância e o índice Kappa de Cohen (Apêndices B e C), para o intervalo de confiança de 95% do programa Open Epi (versão 2.3), interface: Andrew G. Dean, EpiInformatics.com, and Roger Méis.

O índice Kappa é um indicador para avaliar o grau de concordância entre métodos diagnósticos, é uma prova não paramétrica, destinada a comparar proporções da mesma variável. Para a interpretação do nível de concordância revelado pelo índice Kappa de Cohen considerou-se os parâmetros sugeridos por Landis & Koch (1977), conforme tabela 2.

A designação "NC" que aparece na interpretação de alguns resultados indica que "essa quantidade não pode ser calculado pelo Open Epi". Normalmente ocorre somente quando as entradas de dados na tabela incluem uma proporção substancial de zeros.

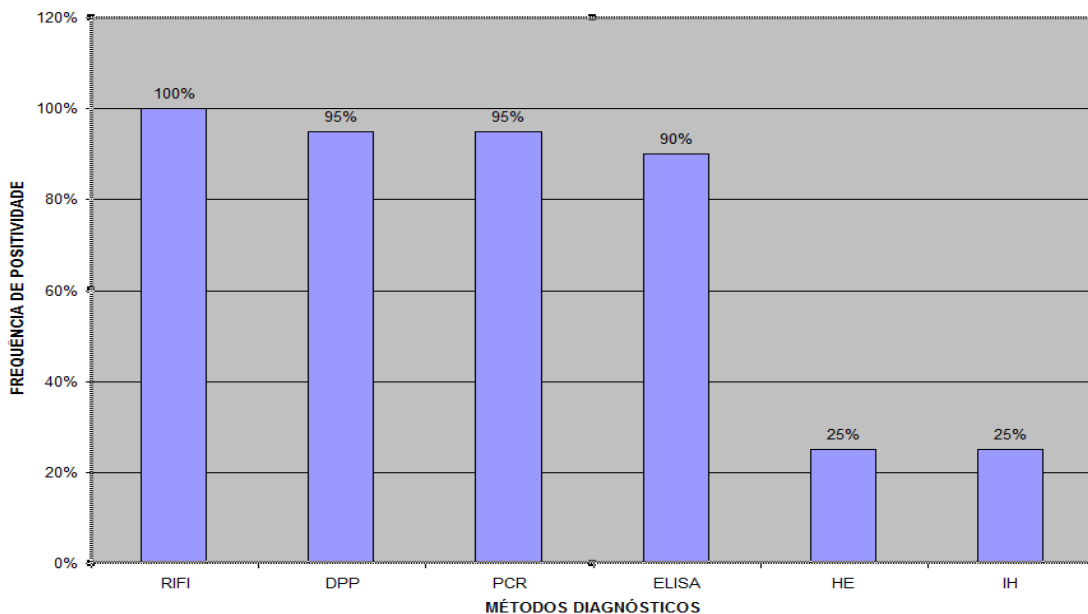


**TABELA 2.** Parâmetros sugeridos por Landis & Koch (1977) para interpretar a estatística de Kappa.

<b>Valor de Kappa</b>	<b>Interpretação</b>
Maior que 0,75	Concordância Excelente
Entre 0,40 e 0,75	Concordância Regular e Boa
Menor que 0,40	Concordância Ruim

## 5 RESULTADOS

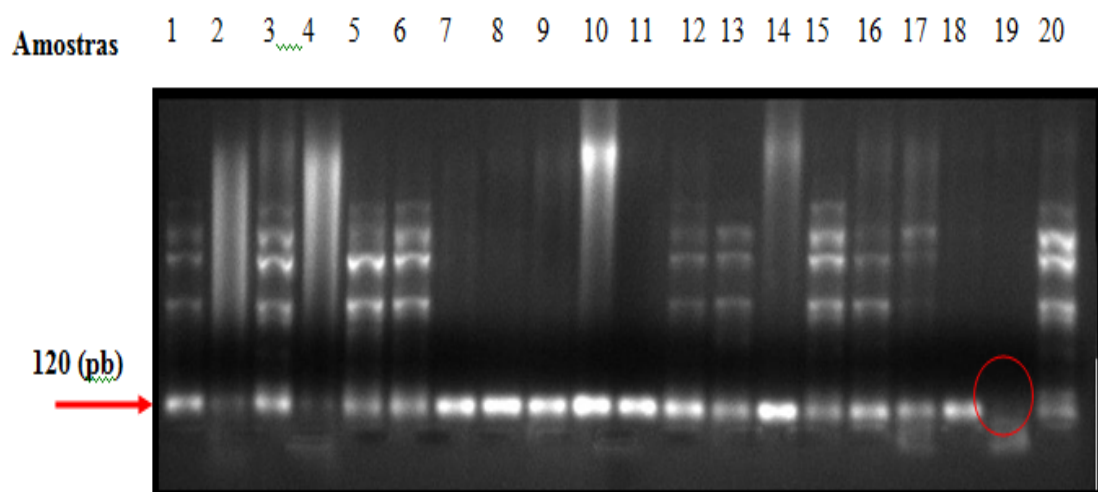
Os resultados obtidos através dos testes ELISA, RIFI, DPP®, PCR, HE, IH encontram-se expressos na figura 8, e podem ser visualizados com maiores detalhes no apêndice A.



**Figura 8.** Percentual de positividade resultante do emprego de seis métodos laboratoriais em amostras de soro e tecidos de 20 cães, naturalmente infectados por leishmaniose visceral, procedentes do Centro de Controle de Zoonoses de Araguaína –TO, durante o ano de 2009.

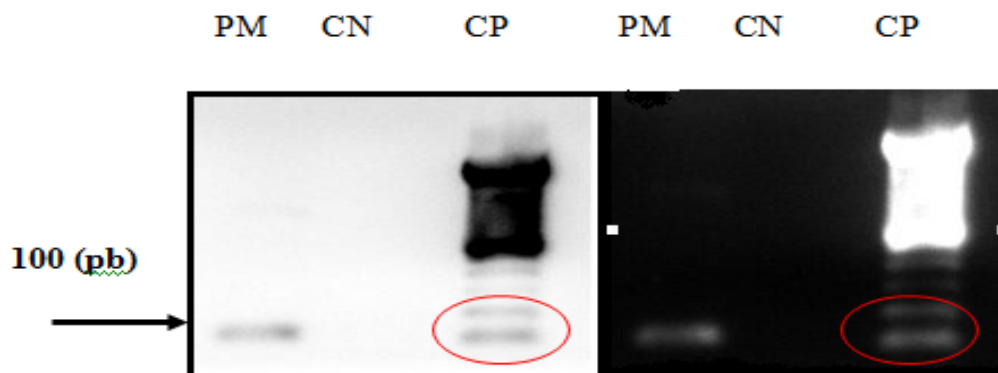
A técnica de PCR permitiu amplificar fragmentos de DNA em isolados de 95% das amostras.

Através da Figura 9 observa-se o perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de PCR dos isolados de *Leishmania* sp. em cães utilizados no presente estudo. A seta indica as bandas formadas com 120 pb, confirmando positividade para as amostras de 1 a 20, com exceção da 19, marcada com um círculo vermelho, considerada como amostra negativa, por não ter ocorrido a formação de banda.



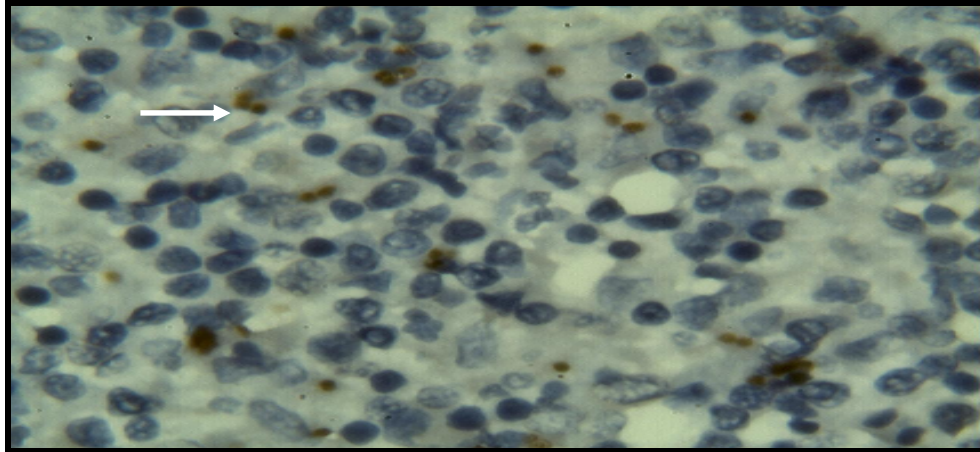
**Figura 9.** Análise dos Amplificados de PCR em gel de agarose a 1,5%, referente as 20 amostras de linfonodos de cães de Araguaína, 2009.

Através da figura 10 evidencia-se o Padrão de Peso Molecular com 100 pb (Invitrogen), o Controle Negativo – sem DNA e o Controle Positivo para *Leishmania* sp., empregados na reação.



**Figura 10.** Gel de Agarose 1,5% dos produtos de PCR, **PM:** Padrão de Peso Molecular – 100 pb. **CN:** Controle Negativo – sem DNA. **CP:** Controle Positivo para *Leishmania* sp.

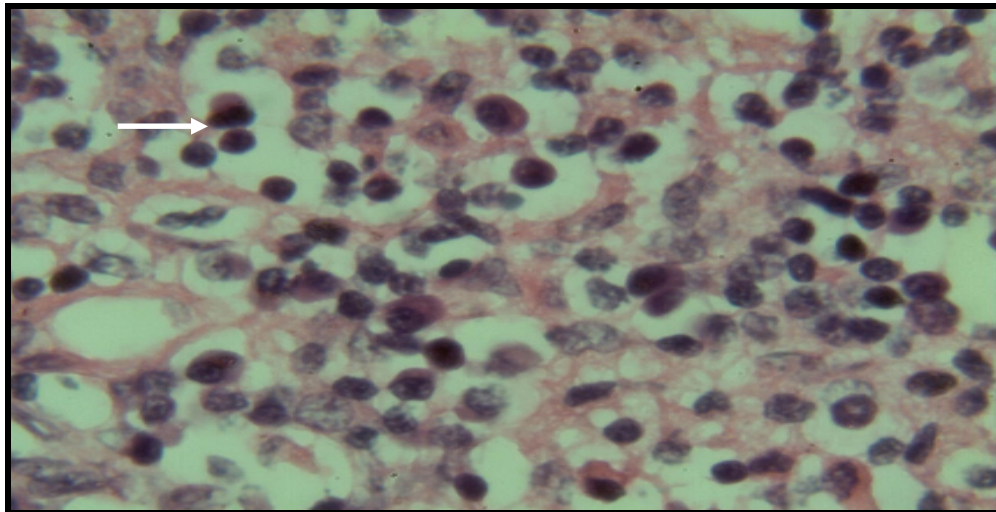
O método de IH detectou apenas 25% de positividade entre os animais analisados neste estudo. Através da Figura 11 evidenciam-se formas amastigotas de *Leishmania* sp. oriundas do linfonodo do cão nº 09.



**Figura 11.** Formas amastigotas, cor marrom, presentes em linfonodo do cão n° 09, procedente de Araguaína - TO  
Aumento (600x).

O método de coloração por Hematoxilina Eosina revelou 25% de positividade, entre os cães examinados.

Observando-se a Figura 12 identificam-se formas amastigotas em corte de tecido de linfonodo do cão n° 10, naturalmente infectado com leishmaniose visceral.



**Figura 12.** Corte de tecido de linfonodo do cão n° 10 submetido a coloração por hematoxilina/eosina. Aumento de (600x).

Os resultados da análise dois a dois, entre os métodos IH, HE, RIFI, ELISA, DPP® e PCR, estão apresentados nas tabelas 3 e 4. As porcentagens de concordância observadas no presente estudo variaram de 20% a 100%. O índice Kappa de Cohen calculado para essas comparações variou de -0,010 a 0,643, revelando-se de ruim a bom, conforme ilustração nas tabelas 3 e 4.

**TABELA 3.** Percentual de Concordância e Índice Kappa resultante da análise (dois a dois) dos métodos ELISA e RIFI, com os demais testes empregados no estudo.

	MÉTODOS DIAGNÓTICOS								
	ELISA x RIFI	ELISA x DPP	ELISA x PCR	ELISA x HE	ELISA x IH	RIFI x DPP	RIFI x PCR	RIFI x HE	RIFI x IH
Concordância (%)	90,0	95,0	85,0	35,0	35,0	95,0	95,0	25,0	25,0
Índice Kappa	0,000	0,643	-0,071	0,071	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000
Interpretação	NC	Bom	Ruim*	Ruim	Ruim	NC	NC	NC	NC

\* Pior que a concordância esperada.

NC: Não calculado (alta proporção substancial de zero).

**TABELA 4.** Percentual de Concordância e Índice Kappa resultante da análise (dois a dois) dos métodos PCR, DPP®, HE e IH, com os demais testes empregados no estudo.

	MÉTODOS DIAGNÓTICOS					
	PCR x DPP	PCR x HE	PCR x IH	DPP x HE	DPP x IH	HE x IH
Concordância (%)	90,0	20,0	20,0	30,0	30,0	100,0
Índice Kappa	-0,052	-0,010	-0,010	0,034	0,034	0,000
Interpretação	Ruim*	Ruim*	Ruim*	Ruim*	Ruim*	NC

\* Pior que a concordância esperada.

NC: Não calculado (alta proporção substancial de zero).

## 6 DISCUSSÃO

Atualmente existem vários métodos para o diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral. Inúmeros pesquisadores têm trabalhado em prol da elucidação de métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares que apresentem eficácia e rapidez na detecção da infecção.

Segundo ALVES; BEVILACQUA, (2004) é importante ressaltar a necessidade de se avaliar as características das técnicas diagnósticas a serem padronizadas. Essas características poderão nos auxiliar na escolha das metodologias mais adequadas e servirão como parâmetros importantes na definição do teste a ser utilizado num programa de controle da leishmaniose visceral canina, prioritariamente quando a eliminação do cão positivo é uma das medidas adotadas.

Os resultados obtidos nesse estudo permitem comparar o desempenho dos testes ELISA, RIFI, DPP®, PCR, HE, IH, estabelecendo a performance dos testes entre si, de modo a vislumbrar os testes mais promissores para o diagnóstico da LVC.

No presente estudo os testes RIFI, ELISA e DPP® apresentaram frequência de positividade de 100, 95 e 95%, respectivamente. Concordante ao encontrado por Moreira *et al.*, (2002), que relatam índice de positividade para RIFI de 93,36%. Nossos resultados se mostraram mais significantes do que os encontrados por Assis *et al.*, (2010) que reportam os percentuais de 56% para RIFI e 65% para ELISA.

Neste estudo a PCR demonstrou 95% de positividade, resultado semelhante ao descrito por Manna *et al.*, (2004) que obtiveram alta positividade (94%) na PCR realizada com os mesmos iniciadores utilizados neste estudo, em pesquisa realizada com 95 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, na Itália.

Nunes *et al.*, (2007), em uma pesquisa no município de Poxoréo – MS, utilizando iniciadores idênticos ao do presente estudo, obtiveram 55% de concordância entre os testes RIFI x PCR.

Contudo, existe uma grande variação na sensibilidade do método de PCR, em grande parte no que se refere ao método de extração de DNA utilizado, por vezes relacionado a escolha dos oligonucleotídeos iniciadores, como também pela escolha das amostras clínicas utilizadas, bem como pelo tempo de infecção (LACHAUD *et al.*, 2002a)

O material obtido do cão nº 19, linfonodo, não apresentou replicação de DNA de *Leishmania* sp., contudo foi soro reagente nos testes ELISA, RIFI, DPP® e foi possível visualizar formas amastigotas nos métodos IH e HE. Carvalho (2007) descreve o linfonodo como um dos maiores sítios de parasitismo, fato justificado por Cardoso e Cabral (1998), que demonstram a correlação com a resposta imunológica do hospedeiro, que após a fagocitose dos parasitos pelos macrófagos, ocorre à drenagem através da via linfática para os linfonodos, com posterior disseminação para outros órgãos. O resultado obtido em amostra do animal nº 19 provavelmente está relacionado à problemas metodológicos, visto que a PCR possui elevada sensibilidade e não foi capaz de amplificar fragmentos de DNA na referida amostra.

A amostra obtida do cão nº 11 apresentou resultados discordantes entre os testes empregados, demonstrando negatividade no ELISA, DPP®, IH e HE e positividade no RIFI e na PCR. Os métodos sorológicos ELISA e RIFI, são usados na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em amostras caninas, porém, podem apresentar reação cruzada com outras enfermidades (OLIVEIRA *et al.*, 2008). A discrepância observada entre o resultado dos testes sorológicos ocorre possivelmente devido à falta de padronização das técnicas, ou seja, dos diferentes protocolos adotados (ROSARIO *et al.*, 2005). Resultados concordantes aos do presente trabalho foram encontrados por Assis *et al.*, 2010, quando os testes sorológicos apresentavam altos títulos de anticorpos anti-(*L.*) *chagasi*.

O achado de uma forma amastigota é conclusivo para o diagnóstico da LV (LUVIZOTTO, 2006). Estudo realizado em Araçatuba por Ishizaki *et al.*, (2006) a partir da análise de 363 amostras de soro canino encaminhados ao CCZ, pela RIFI e exame parasitológico direto de fragmentos de linfonodos, demonstraram elevada positividade no RIFI 48%, dos animais (176/363) foram soropositivos, e percentagem de positividade inferior no exame direto, 32,8% das amostras (119/363) apresentaram formas amastigotas de *Leishmania* sp. Ressaltando que 22,6% animais soropositivos (82/176) não apresentaram parasitos nos linfonodos e 6,9% dos cães (25/187) não reagentes pela RIFI apresentaram “imprints” positivos.

Segundo Carvalho (2007) é necessária a busca por informações que possibilitem um entendimento sobre a dinâmica da doença em áreas endêmicas. Dificuldades sobre a expressão de resultados fidedignos dos testes usualmente empregados no diagnóstico da LVC deve-se a falta de entendimento sobre o curso da infecção canina e ao estágio de desenvolvimento da doença.

Os resultados obtidos através das técnicas de Hematoxilina Eosina (25%) e Imunohistoquímica (25%) foram menos expressivos quando comparados aos métodos sorológicos e de biologia molecular. Estes resultados estão concordantes ao descrito por Passos (2003), que refere-se à frequência de positividade para os ensaios de IH e HE, com variação de 14 a 60%, sendo relatado 14,1% (WEIGLE *et al.*, 1987), 18% (NAVIN *et al.*, 1990), 20% (SOTTO *et al.*, 1989), 40% (GUTIERREZ *et al.*, 1991), 42% (KENNER *et al.*, 1999), 60% (RASO e GENARO, 2000), até 63% foi relatado por (MAGALHÃES *et al.*, 1986).

A presença de parasitos no histopatológico poderá variar com o tempo de evolução da enfermidade, forma da doença, experiência do examinador, bem como o número de amastigotas presentes no corte selecionado para análise (NAVIN *et al.*, 1990).

Navin *et al.*, (1999) afirmam que a utilização do teste histopatológico como único meio de diagnóstico, pode ocasionar uma margem de erro variando em 42% de casos confirmados. Acredita-se que a escassez e a distorção de amastigotas durante a fixação do material possam limitar a sensibilidade dos testes histopatológicos (WEIGLE *et al.*, 1987).

A discordância de resultados entre os testes sorológicos e a não detecção de amastigotas em tecidos de alguns animais observada neste estudo, propõe a utilização de técnicas mais sensíveis. Neste contexto, a PCR tem demonstrado ser uma técnica com elevada sensibilidade para o diagnóstico laboratorial da LVC em cães por ser capaz de amplificar o kDNA de *Leishmania* sp. a partir de poucos exemplares de amastigotas presentes na amostra (MANNA *et al.*, 2004; NUNES *et al.*, 2007). Esses autores mostraram que os cães assintomáticos e negativos na IH foram positivos na PCR para *Leishmania* sp, indicando que o baixo número de parasitas nos tecidos dificulta a identificação, quando são empregadas técnicas específicas como a IH.

Assis *et al.*, (2010) utilizando amostras sanguíneas nos ensaios de RIFI e ELISA, obtiveram concordância de 82% e Kappa de (0,6370). No presente estudo a concordância encontrada para esta análise (RIFI x ELISA) foi de 90%.

A comparação entre os ensaios de PCR versus DPP® apresentou concordância de 90%, contudo o Kappa foi interpretado como ruim (- 0,052). Entretanto a PCR x RIFI apresentou 95% de concordância e kappa (0,000). Nunes *et al.*, (2007) obtiveram baixo índice Kappa (0,213) na comparação PCR x RIFI, considerando os mesmos critérios adotados nesse estudo



para interpretação, descrito por Landis e Koch (1977). Assis *et al.*, (2010) obtiveram nessa comparação 65% de concordância e Kappa de 0,2184.

Resultados intermediários foram expressos para ELISA versus PCR, 85% de concordância, entretanto o comportamento do Kappa foi interpretado como ruim -0,071. Esses resultados foram mais significativos que os encontrados por Assis *et al.*, (2010), que obtiveram para essa comparação 59% de concordância e Kappa de - 0,021.

Os resultados obtidos nos estudos IH e HE realizados com amostras de linfonodo de todos os cães foram comparados entre si, demonstrando 100% de concordância. Quando comparado aos demais testes, dois a dois, as análises comparativas revelaram baixas porcentagens de concordância, de 20 a 35% e índices Kappa, variando de -0,010 a 0,071. Resultados contraditórios foram apresentados por Assis *et al.*, (2010) que utilizaram amostras de linfonodos e obtiveram 75% de concordância e Kappa de 0,500 na comparação ELISA x IH, concordância de 78% e Kappa 0,6140 na comparação de RIFI x IH, e 59% de concordância e Kappa 0,187 no PCR versus IH.

No presente estudo, os melhores índices de concordância e kappa foram observados na comparação entre os testes ELISA versus DPP®, com 95% de concordância e índice kappa de 0,643. A frequência de positividade (95%) do teste rápido DPP® corrobora com os resultados de Otranto *et al.*, (2004), que obtiveram positividade de 90% para DPP® em cães com infecção confirmada por *Leishmania*, enquanto obteve para o RIFI 95% de positividade.

A LV é uma zoonose de extrema importância no Brasil, os cães soropositivos devem ser submetidos obrigatoriamente a eutanásia de acordo com o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Nesse contexto, Araguaína é um dos municípios que mais tem contribuído para elevação das estatísticas envolvendo LVC no país. O município de Araguaína possui ampla extensão geográfica, constituída na sua maioria por zona rural, de difícil acesso, o que inviabiliza o controle da doença nessas áreas. Entretanto, boa parte dos cães positivos são assintomáticos dificultando seu diagnóstico clínico e a notificação aos órgãos oficiais. Neste cenário, é prioritário e fundamental a inclusão de novas formas diagnósticas de rotina e que possam ser executadas em condições de campo. Diante dos resultados supracitados, propomos a inclusão do teste rápido DPP® na realização de inquéritos soropidemiológicos e na triagem dos cães suspeitos por sua praticidade e facilidade de execução nas condições de campo.

## CONCLUSÕES

O emprego da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Teste Rápido (DPP®), Imunohistoquímica (IH), Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) e Coloração pela Hematoxilina Eosina (HE) em 20 amostras de soros e de linfonodos de cães, procedentes de Araguaína – TO, demonstra que os melhores resultados de percentagem de concordância e coeficiente Kappa foram obtidos quando se comparou DPP® com ELISA. Esses resultados permitem propor que o teste rápido DPP® possa ser utilizado em inquéritos soroepidemiológicos por sua praticidade e facilidade de execução.

Os resultados obtidos através do presente estudo permitem considerar que nenhum método de diagnóstico, quando utilizado isoladamente, confere segurança no diagnóstico individual da leishmaniose visceral canina. A associação de métodos, quando possível, permite o esclarecimento de casos inconclusivos e a obtenção do diagnóstico definitivo da doença.

Neste estudo não foram utilizados testes para avaliar a sensibilidade e especificidade dos métodos empregados e embora tenha sido observado baixo grau de concordância (índice Kappa) entre PCR e IH e HE, o percentual de positividade (95%), detectado pela Reação em Cadeia da Polimerase possibilita considerá-la como um método relevante. A técnica permite caracterizar a espécie do agente etiológico simultaneamente à realização da confirmação diagnóstica, além de possibilitar a utilização de amostras estocadas e que não passaram por preparo, sem prejuízo nos resultados, apresentando a vantagem de analisar inúmeras amostras concomitantemente, fatores que facilitam sua aplicação em áreas endêmicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C. D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. M.; SANTOS-GOMES, G. M.; JANZ, J. G. Canine leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **Journal of Parasitology**, v.77, p. 557-561, 1991.
2. ADLER, S.; THEODOR, O. Investigations on Mediterranean Kala-Azar. I. Introduction and Epidemiology. **Proceedings of Royal Societe**, London, v. 108, p. 447-453, 1931.
3. AISA, M. J.; CASTILLEJO, S.; GALLEO, M.; FISA, R.; RIERA, M. C.; COLMENARES, M.; TORRAS, S.; ROURA, X.; SENTIS, J.; PORTUS, M. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n.2, p. 154-159, 1998.
4. ALENCAR, J. E.; COELHO-NETO, B. Leishmaniose canina no Ceará. **XIII Congresso Brasileiro de Higiene**, Fortaleza, Ceará, Brasil, 1956.
5. ALENCAR, J. E. **Calazar Canino: Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil**. Tese, Imprensa Oficial, Fortaleza, Ceará, Brasil, 342 p, 1959.
6. ALENCAR, J. E. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 3, n. 4, p. 175-180, 1961.
7. ALVAR, J.; MOLINA, R.; ANDRÉS, M.S.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONÇALES, F.; BOGGIO, J.; RODRIGUES, F.; SAINZ, A. & ESCACENA, J. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **An. Trop. Med. Parasitol.**, v. 88, n. 4, p. 371-374, 1994.
8. ALVAR J.; CANAVATE, C.; GUTIÉRREZ-SOLAR, B. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Revista Microbiologia Clínica**, v. 10, p. 298-319, 1997.
9. ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances Parasitology**, v. 57, n. 1, p. 1-88, 2004.
10. ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 20, n.1, p. 259-265, 2004.
11. ANDRADE, H. M.; TOLEDO, V. P. C. P.; MARQUES, M. J.; FRANÇA-SILVA, J. C.; TAFURI, W. L.; MAYRINK, W.; GENARO, O. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 1-2, p. 71-81, 2002.
12. ARANSAY, A. M.; SCOLULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by semi-nested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1933-1938, 2000.

13. ARAGUAINA. **Plano Diretor.** Disponível em: <[www.araguaina.to.gov.br/secobrasplanodiretor.html](http://www.araguaina.to.gov.br/secobrasplanodiretor.html)>. Acesso em: 20 maio 2008, 2008.
14. ARAGUAÍNA. Secretaria Municipal de Saúde. Centro de Controle de Zoonoses. **Estimativa população canina 2008 e resultados sorológicos LVC 2007-2008.** 2009.
15. ARAGUAÍNA. Secretaria Municipal de Saúde. Centro de Controle de Zoonoses. **Resultados sorológicos LVC 2008-2009.** 2010.
16. ARAÚJO, W. N.; LANGONI, H.; CASTRO, A. P. B.; SILVA, R.C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; LUCHEIS, S. B. A comparasion of indirect fluorescencete antibody test, indirect enzymatic immunoassay and serum gelification technique in 40% formol in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia (Ars. Vet)**, v. 20, p. 338-346, 2004.
17. ARAÚJO, M. F. L. **Avaliação do antígeno recombinante k39, em teste imunocromatográfico, no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina endêmica na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil.** Dissertação. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 147 p, 2007.
18. ASHFORD, D.; BADARÓ, R.; EULALIO, C.; FREIRE, M.; MIRANDA, C; ZALIS, M.; DAVID, JR. Studies on the control of Visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme linked immunosobernt assay screening (FASTELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 8, p. 1-8, 1993.
19. ASHFORD, D; DAVID, JR.; FREIRE, M.; DAVID, I.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M.C.; SAMPAIO, D.P. & BADARÓ, R. Studies on control of visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brasil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n.1, p.53-57, 1998.
20. ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, v. 30, p. d1269-81, 2000.
21. ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; NORONHA JR, A. C. F.; NEVES, M. F.; MACHADO, R. Z.; BUZETTI, W. A. S. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinaria**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.
22. BADARÓ, R.; REED, S. G.; CARVALHO, E. M. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis, sensitivity and specificity of different morphological forms of two Leishmania species. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, p. 480-484, 1981.
23. BADARÓ, R. J.; REED, S. G.; BARRAL, A.; ORGE, G.; JONES, T. C.; Evaluation of the micro enzyme-linked assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection specific responses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, p. 72-78, 1986.

24. BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis – a diagnostic and clinical challenge. **Journal of Veterinary**, v. 175, p. 14-15, 2008.
25. BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; PAGES, M. Leishmaniasis: Sex, Lies and Karyotype. **Parasitology Today**, v. 8, p. 174-176, 1992.
26. BERNADINA, W. E.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; CIARAMELLA, P. Na immunodiffusion assay for the detection of canine leishmaniasis due to infection with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 73, p. 207-213, 1997.
27. BOGLIOLO, L. Nova contribuição ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral. A propósito de um caso brasileiro e com especial referência a fibrose hepática leishmaniótica. **O Hospital**, v. 3, p.101. 1956.
28. BRAGA, M. D. M.; COELHO, I. C. B.; POMPEU, M. L.; EVANS, T. G.; MACAULLIFE, I. T.; TEIXEIRA, M. J.; LIMA, J. W. O. O controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel de filtro. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 3, n. 5, p. 419-424, 1998.
29. BRASIL. Ministério da Saúde. SUCAM. **Informações epidemiológicas. Expansão e urbanização do calazar no Brasil**. Ministério da Saúde, ano III, n. 25, 1984.
30. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 120 p, 2003.
31. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6ª ed. Brasília, 816 p, 2005a .
32. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a.
33. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: **relatório da situação: Tocantins**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b.
34. BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Leishmaniose Visceral - **Casos confirmados por UF Notificação segundo Ano Notificação** - Período: 2007. Disponível em: <[http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet\\_def](http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet_def)>. Acesso em: 18 de novembro de 2009. 2007.
35. BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **II Fórum de Discussão Sobre o Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina**. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em:

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii\\_forum\\_tratamento\\_relatorio\\_final](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii_forum_tratamento_relatorio_final). Acessado em: 12/12/2009. 2009.

36. BRASIL. 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](http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet_def)>. Acesso em: 05 set 2010. 2010.

37. BRENER, Z. **Calazar canino em Minas Gerais**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 90 p, 1957.

38. BELLI, A.; GARCIA, D.; PALACIOS, X.; RODRIGUEZ, B.; VALLE, S.; VIDEA, E.; TINOCO, E.; MARIN, F.; HARRIS, E. Widespread atypical cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) chagasi* in Nicaragua. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n.3, p. 380-385, 1999.

39. CABRAL, M.; O'GRADY, J. E.; GOMES, S.; SOUSA, J. C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The Immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 76, p. 173-180, 1998.

40. 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, Sao Paulo, Brazil, 1998-1999. **Cad. Saúde Pública**, v.17, p.1263-1267. 2001.

41. CAMARGO-NEVES, V. L. F. **Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo, Brasil**. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2004.

42. CAMARGO, M. E.; LESER, P. G.; LESER, W. S. P. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis: I A comparative study of hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM immunofluorescence tests in 3, 752 serum samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 18, n. 1, p. 215 – 226, 1976.

43. CAMPOS, JR. D. Características clínico-epidemiológicas do calazar na criança. Estudo de 75 casos. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 71, p. 261-265, 1995.

44. CANTARINO, L. M. **Leishmaniose Tegumentar Americana: uso de técnicas de biologia molecular (PCR) no diagnóstico de infecção em roedores da coleção do museu nacional** – UFRJ. Dissertação de mestrado: Mestrado em Ciências da Saúde Pública. Rio de Janeiro: ENSP-FIOCRUZ. 70 p, 1998.

45. CARVALHO, C. C. **Determinação da carga parasitária por PCR semiquantitativa em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e sua associação com sinais clínicos da doença**. UFMA. Dissertação de mestrado: Mestrado em Saúde e Ambiente. São Luiz: Universidade Federal do Maranhão. 70 p, 2007.

46. CARRIO, J.; PORTUS, M. In vitro susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during in vitro or in vivo passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. **B. M. C. Pharmacol.**, v.2, p. 11, 2002.
47. CARDOSO, L., CABRAL, M. *Leishmania* e Leishmaniose canina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 93, n. 527, p. 119 – 170, 1998.
48. CASTELLON, E. G.; DOMINGOS, E. D. On the focus of kala-azar in the state of Roraima, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 3, p. 375, 1991.
49. CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; CASTRO, G. O.; FERREIRA, L. C.; ROMANA, C. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 32, p. 321-385, 1937.
50. CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; FERREIRA, L. C.; DEANE, L. M.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F. N.; PAUMGARTEN, M. J. VON.; SÁ, B. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1937. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 33, p. 89-229, 1938.
51. CORREDOR, A.; GALLEGO, J. F.; TESH, R. B.; MORALES, A.; CARRASQUILLA, C. F.; YOUNG, D. G.; KREUTZER, R. D.; BOSHELL, J.; PALAU, M. T.; CACERES, E.; PELAEZ, D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 5, p. 480-486, 1989a.
52. CORREDOR, A.; GALLEGO, J. F.; TESH, R. B.; PELÁEZ, D.; DIAS, A.; MONTILLA, M.; PALÁU, M. T. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. **Transaction of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 83, p. 195, 1989b.
53. CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s. l. specific kinetoplastid primers. **Transaction of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 12-17, 2004.
54. COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F. Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública** v. 24, n. 5, p. 361-372, 1990.
55. COSTA, C. A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P. A.; DIAS, M.; MICHALICK, S. M. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 24, n. 1, p. 21-25, 1991
56. COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2959-2963, 2008.
57. COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, 2005.

58. 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.
59. DA COSTA, R. T.; FRANÇA, J. C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; GENARO O. Standardization of a rapid immunocromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transaction of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 678-682, 2003.
60. DA SILVA, A. V.; LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 3, p. 191-198, 2001.
61. DAVID, J. R.; STAMM, L. M.; BEZERRA, H. S.; SOUZA, R. N.; KILLICK-KENDRICK, ROBERT.; OLIVEIRA-LIMA, J. W. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent antifeeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia Migonei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 839-847, 2001.
62. 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. **O Hospital**, v. 45, p. 419-421, 1954a.
63. DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Infecção natural de *Phlebotomus longipalpis* por leptomonas, provavelmente de *Leishmania donovani*, em um foco de calazar no Ceará. **O Hospital**, v. 45, p. 697-701, 1954b.
64. DEANE, L. M.; DEANE, M. P.; ALENCAR, J. E. Observações sobre o combate ao *Phlebotomus longipalpis* pela dedetização domiciliária, em área endêmica de calazar, no Ceará. **Revista Brasileira Malariol. Doenças Trop.**, v. 7, p. 131-141, 1955a.
65. DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. **O Hospital**, v. 48, p. 61-76, 1955b.
66. DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará**. Tese. Fac. Med. Univ. S. Paulo, Brasil, Ed. S.N.E.S., Rio de Janeiro, 162 p, 1956.
67. DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 198-212, 1962.
68. DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* a mini-review. **Memórias do Instituto de Oswaldo Cruz**. v. 89, n. 3, p. 463-9, 1994.



69. DELGADO, O.; FELICIANGELI, M. D.; GOMEZ, B.; ALVARADO, J.; GARCIA, L.; BELLO, C. The re-emergence of american visceral leishmaniasis in na old focus in Venezuela: present situation of human an canine infections. **Parasite**, v. 5, p. 317-323, 1998.
70. DE BRUJIN, M. H. L.; LABRADA, L. A.; SMYTH, A. J.; SANTRICH, C.; BARKER, D. C.; A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. **Tropical Medicine of Parasitology**, v. 44, p. 201-207, 1993.
71. DESJEUX, P. Leishmaniasis: Public Health Aspects and Control. **Clinics in Dermatology**, v.14, p.417-423. 1996.
72. DEREURE, J.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P. Canine leishmaniasis: an update. **Proceedings of a canine leishmaniasis forum**. Barcelona(Stiges). Geographical distribution and teh identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin. v. 28, n. 3, p. 18-25, 1999.
73. DEY, A.; SINGH, S. Transfusion transmitted leishmaniasis: A case report and review of literature. **Indian Journal Medicine Microbiology**, v. 24, n.3, 2006.
74. DIETZE, R.; FALQUETO, A.; VALLI, L. C. P.; RODRIGUES, T. P.; BOULOS, M.; CORREY, R. Diagnosis of canine Visceral leishmaniasis with a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 40-42, 1995.
75. EL HARITH, A.; SLAPPENDEL, R. J.; REITER, I.; VAN KNAPEN, F.; KORTE, P.; HUIGEN, E.; KOLK, A. H.; Application of a direct agglutination test for detection of specific anti Leishmania antibodies in the canine reservoir. **Journal Clinic Microbiology**, v. 27, n. 10, p. 2252 - 2257, 1989.
76. FEITOSA, M. M. **Avaliação Clínica de Animais Naturalmente Infectados**. 1º Fórum Sobre Leishmaniose Visceral Canina, p. 9-12, Jaboticabal, 2006.
77. FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTUS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, n. 136, p. 514-516, 1995.
78. FERRO, C.; MORRISON, A. C.; TORRES, M. Species composition and relative abundance of sand flies of the genus Lutzomyia (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **J. Medicine Entomology**, v. 32, n. 4, p. 527-37, 1995.
79. GALATI, E. A. B.; NUNES, V. B. L.; REGO JR, F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.
80. GENARO, O.; MAYRINK, W.; MICHALICK, M. S. M.; DIAS, M.; COSTA, C. A.; MELO M. N. Naturally occoring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 43, 1988.

81. GENARO, O.; COSTA, C. A.; WILLIAMS, P.; SILVA, J. E.; ROCHA, N. M.; LIMA, S. L.; MAYRINK, W. Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, p. 121, 1990.
82. GENARO, O.; COSTA, C. A.; WILLIAMS, P.; SILVA, J. E.; ROCHA, M. N.; LIMA, S.; MAYRINK, W. Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 2, p. 121, 1991.
83. GENARO, O. Leishmaniose visceral In: **Parasitologia humana**. NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. organizadores. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu. p. 56-72, 2000.
84. GIRAUD, P.; CABASSU, H. La Leishmaniose canine dans la region de Marseille. **Bulletin Societe Pathologic Exotique**, v. 25, p. 1040-1043, 1932.
85. GIRAUD, P.; CABASSU, H. Le chien est-il le réservoir de virus de la leishmaniose interne? **Archives Medicine Gen. Colon.**, v. 2, p. 23-27, 1933.
86. GIRAUD, P.; CABASSU, H. Le diagnostic de la leishmaniose canine par la ponction ganglionnaire. **Bulletin Societe Pathologic Exotique**, v. 29, p. 958-963, 1936.
87. GLASSER, P. R. **Avaliação do emprego de coleiras impregnadas com deltametrina em cães, como medida complementar de controle da leishmaniose visceral americana na cidade de Araçatuba – SP – Brasil**. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2005.
88. GOMES, Y. M.; PAIVA CAVALCANTI, M.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G.; ALVES, L. C.; Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Journal of Veterinary**, v. 175, p. 45-52, 2008.
89. GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11º ed. Brunton, 2006.
90. GONÇALVES, A. J. R.; ROZEMBAUM, R.; CUNHA, R. Q. Calazar: relato de três pacientes adultos internados no HSE/INAMPS (RJ). Considerações sobre esta endemia de grande importância no nosso território. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária**, v. 60, n. 5, p. 369-376, 1986.
91. GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.
92. GUARGA, J. L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA, M. J.; PERIBÁNEZ, M. A.; CASTILLO, J. A. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, n. 1-2, p.13-20, 2002.
93. GUERRA, J. A.; BARROS, M. L. B.; FÉ, N. F.; GUERRA, M. V.; CASTELLON, E.; PAES, M. G.; SHERLOCK, I. A. Leishmaniose Visceral entre índios no Estado de Roraima,

Brasil. Aspectos clínico-epidemiológicos de casos observados no período de 1989 a 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 4, p. 305-311, 2004.

94. GULNARA, P.; CABRERA, B.; SILVA, V. O.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; PALATNIK-DE-SOUZA, C. B. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine Visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 296-301, 1999.

95. GUTIERREZ, Y.; SALINAS, G. H.; PALMA, G.; VALDERRAMA, L. B.; SANTRICH, C. V.; SARAVIA, N. G. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania brasiliensis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 281-289, 1991.

96. GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control . Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 568-571, 1988.

97. GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; ORSINI, S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. **Annals of the Tropical Medicine Parasitology**, v. 86, p. 613-620, 1992.

98. GRASER, C. Plano estadual de intensificação das ações de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral em municípios prioritários. Disponível em: [www.saude.to.gov.br/download/cib/material/ApresentaçãoSanitária.ppt](http://www.saude.to.gov.br/download/cib/material/ApresentaçãoSanitária.ppt). Acessado em: 02/08/2009.

99. GREVELINK, A. S.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. **Journal American of Academy Dermatology**, v. 34, n. 2, p. 257 -272, 1996.

100. HOMMEL, M.; PETERS, W.; RANGUE, J. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals of the Tropical Medicine Parasitology**, v. 72, p. 213-218, 1978.

101. HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochem Cytochem.**, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

102. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades. Tocantins – Araguaína**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 28 dez 2009. 2009.

103. IVERSSON, L.B.; CAMARGO, M.E.; VILLANOVA, A.; REISHMANN, M.I.; ANDRADE, E.A.; TOLEZANO, J.E. Serological survey for research on visceral leishmaniasis in an urban dog population of the municipality of São Paulo, Brazil (1979-1982). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, p. 310-317, 1983.

ISHIZAKI, M. S.; AMARANTE, A. F. T.; SAVANI, E. S. M. M.; BONELLO, F. L.; TÁPARO, C. V.; SERRANO, A. C. M.; AURIA, S. R. N.; UESUGUI, M. G.; CAMARGO, M. C. G. O.; PERRI, S. H. V.; BRESCIANI, K. D. S. Estudo comparativo da sorologia e

“imprint” de linfonodos em cães encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba, SP. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1., 2006, Jaboticabal. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p. 62, 2006.

104. JERÔNIMO, S. M. B.; OLIVEIRA, R. M.; MACKAY, S.; COSTA, R. M.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E. T.; LUZ, K. G.; FERNANDES, M. Z., JERNIGAN, J. & PEARSON, R. D. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Transaction of the Royal Societe of Tropical Medicine Hygiene**, v. 88, p. 386-388, 1994.

105. KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H. K.; JOHNSON, A. J. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd dog. I. Infection, clinical disease and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 74-79, 1984.

106. KENNER, J. R.; ARONSON, N. E.; BRATTHAUER, G. L.; TURNICKY, R. P.; JACKSON, J. E.; TANG, D. B.; SAU, P. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasite in fixed tissues. **Journal Cutan. Pathology**, v. 26, p. 130-136, 1999.

107. KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annals of Parasitology Human. Comp.**, v. 65, p.37- 42, 1990.

108. KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, M.C.; DEREURE, J.; PUECH, M.P.; CADIERGUES, M.C. Protection of dogs from bites of Phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Mem. Veterinary Entomology**, v. 11, p. 105-111, 1997.

109. LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; DEREURE, J.; LAMOTHE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, v. 125, p. 197-207. 2002a.

110. LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210–215, 2002b.

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

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

113. LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 421-424, 1987.

114. LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.
115. LANDS, JR.; KOCH. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159 – 174, 1977.
116. LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PIRIERES, J.; VOLHARDT, J. Écologie des leishmanioses dans le sud de France. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bioclinique a finalité epidemiologique. **Annals of Parasitology Hum. Comp.**, v. 54, p. 277-295, 1979.
117. LAVERAN, A.; MESNIL, F. Sur um protozaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. & Mesn.). Parasite d' une fièwre d' I'Ind. Com. R. Héb. Séanc. **Academy of Sciencis**, v.137, p. 957-961, 1903.
118. LÉPINE, P.; BILFINGER, F. Recherche de la leishmaniose viscerale ches lès chiens defourrière d'Athenes. **Bulletin Societe Pathology Exotique**, v. 29, p. 131-135, 1936.
119. LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymphnodes. **Acta Tropica**, v. 92, p. 43-53, 2004.
120. LONGSTAFFE, J. A.; JEFFERIES, A. R.; KELLY, D. F.; BEDFORD, P. G. C.; HERRTAGE, M. E.; DARKE, P. G. G. Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdon; a potential human health hazard. **Journal Small. Anim. Pract.**, v. 24, p. 23-40, 1983.
121. LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1., 2006, Jaboticabal. **Anais. Jaboticabal: FUNEP/UNESP**, p. 13-21, 2006.
122. MACHADO, J. G. **Comparação do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina entre laboratórios de Belo Horizonte, 2003-2004.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 48 p, 2004.
123. MACHADO, J. G.; TRONCARELLI, Z. M.; HOFFMANN, L. J.; CAMARGO, B. L.; FACCIOLI, Y. P.; MENOZZI, D. B.; LANGONI, H. Comparação do ensaio imunoenzimático com a imunofluorescência indireta no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Veterinária e Zootecnia**. v. 15, n. 1, p. 85-90, 2008.
124. MAGALHÃES, P. A.; MAYRINK, W.; COSTA, C. A.; MELO, N. M.; DIAS, M.; BATISTA, S. M.; MICHALICK, M. S. M.; WILLIAMS, P. Calazar na zona do Rio Doce – Minas Gerais. Resultado das medidas profiláticas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 22, p.197-202, 1980.
125. MAGALHÃES, A. V.; MORAES, M. A. P.; RAICK, A. N.; LLANOS – CUENTAS, A.; COSTA, J. M. L.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Histopalogia da Leishmaniose

Tegumentar por *Leishmania brasiliensis*: 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, p. 253-262, 1986.

126. MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L.M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different sampling for PCR-based diagnosis and followup of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 251-262, 2004.

127. 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.

128. MANCIANTI, F. FALCONE, M. L.; GIANELLI, C.; POLI, A. Comparasion between na enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 59, p.13-21, 1995.

129. MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica Veterinária**. São Paulo. Atheneu. 2001.

130. MARGONARI, C.; FREITAS, C. R.; RIBEIRO, R. C.; MOURA, A. C. M.; TIMBÓ, M.; GRIPP, A. H.; PESSANHA, J. P.; DIAS, E. S. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 101, p. 31-38, 2006.

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

132. MARZOCHI, M. C. A.; TOLEDO, L. M.; MARZOCHI, K. B. F.; COUTINHO, S. G.; TRAMONTANO, N. C. Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro. Aspectos epidemiológicos humanos. *In Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, Anais, p. 60, 1983.

133. MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S.; TOLEDO, L. M.; GRIMALDI JR., G.; MOMEN, H.; PACHECO, R. S.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; RANGEL JR., F. B.; TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings. (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 349-357, 1985.

134. MARZOCHI, M. C. A.; BARBOSA-SANTOS, E. G. O.; CONCEIÇÃO, N. F.; SILVA, V. L. Epidemiological survey of canine cutaneous leishmaniasis by intradermal reaction in na endemic área of Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 1, p. 163, 1987.

135. MARZOCHI, M. C. A; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmaniose tegumentar americana. In: CIMERMAN, B & CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais**. Ed. Atheneu, cap. 9, p.39-64, 1999.

136. MAUÉS, E. G. A. Avaliação da classificação clinica de gravidade e da resposta ao tratamento contra Leishmaniose Visceral grave em crianças do hospital de referencia em

Palmas, TO. Dissertação de Mestrado. Programa de Mestrado em Medicina Tropical. Universidade de Brasília. 163 p. 2008.

137. MAYRINK, W. **Contribuição ao diagnóstico parasitológico da leishmaniose visceral**. Tese, Belo Horizonte, 112 p, 1967.

138. MAZLOUMI-GAVGANI, A. S.; HODJATI, M. H.; MOHITE, H.; DAVIES, C. R. Effect of insecticide impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis of Iranian children: a matched-cluster randomized trial. **Lancet**. v. 360, p. 374-379, 2002.

139. MEINECKE C. K.; SCHOTTELIUS J.; OSKAM L.; FLEISCHER B. Congenital Transmission of Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar) from an asymptomatic mother to her child. **Pediatrics**, v. 104, p. 65, 1999.

140. MELO, H. R. L.; BRITO, C. A. A.; MIRANDA, F.; DEMOCRITO, B. **Conduitas em doenças infecciosas**. Rio de Janeiro: Medsi, Cap. 51, p. 569-577, 2004.

141. MELO, F.; AMARAL, M.; OLIVEIRA, P.; LIMA, W.; ANDRADE, M.; MICHALICK, M.; RASO, P.; TAFURI, W. Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 79, p. 198-204, 2008.

142. MENDES, W. S.; SILVA, A. A. M.; TROVÃO, J. R.; SILVA, A. R.; COSTA, J. M. L. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira da Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 227-231, 2002.

143. MENDES, C. O.; SOUZA, E. P.; BORJA-CABRERA, G. P.; BATISTA, L. M. M.; SANTOS, M. A.; PARRA, L. E.; MENZ, I.; PALATINIK, M. & PALATINIK-DE-SOUSA, C. B. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in será of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 21, p. 2589-2597, 2003.

144. MENZ, I. Leishmune® - Desenvolvimento e Resultados Atuais (Dez 2005). **1º Fórum Sobre Leishmaniose Visceral Canina**, p.7-8, Jaboticabal, 2006.

145. METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzymelinked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

146. MIGONE, L. E. Um caso de kala-azar a Assuncion (Paraguay). **Bulletin of the Societe Pathology Exotique**, v. 6, p. 118-120, 1913.

147. MILES, M. A.; VEXENAT, J. A.; FURTADO CAMPOS, J. H.; FONSECA CASTRO, J. A. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona**, Spain, p. 46-53, 1999.

148. 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.
149. MOHEBALI, M.; TARAN, M.; ZAREI, Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rK 39 test and direct agglutination. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 239-245, 2004.
150. MONROY-OSTRIA, A.; HERNANDEZ-MONTES, O.; BAKER, D. C. A etiology of visceral leishmaniasis in México. **Acta Tropica**, v. 75, p. 155-161, 2000.
151. MONTEIRO, S.; LACERDA, M. M.; ARIAS, JR. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. 3, p. 67-72, 1994.
152. MONTEIRO, S. Leishmaniose visceral no Brasil: perspectivas de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 1, p. 335, 2002.
153. MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; NUNES, C. M.; SILVA, T. C. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n.2, p. 103-106, 2002.
154. MOREIRA, M. A. B. **Leishmaniose visceral canina em Araçatuba-São Paulo: Diagnóstico parasitológico, imunológico, molecular e alterações histopatológicas de órgãos linfóides e fígado**. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2003.
155. MORENO, J.; NETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZÁLEZ, F.; BLANCO, F.; BARRER, D.; ALVA J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, p. 181-195, 1999.
156. MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitology**. v. 18, p. 399-405, 2002.
157. NASCIMENTO, A. **Estudo da História e Geografia do Tocantins**. 2005.
158. NAVIN, T. R.; ARANA, F. E.; DE MÉRIDA, A. M.; ARANA, B. A.; CASTILLO, A. L.; SILVERS, D. N. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.42, p. 36-42, 1990.
159. NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 428 p. 2000.
160. NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine canine du Kala-azar. **Bulletin of the Societe Pathology Exotique**, v.1. p. 299-301, 1908.
161. NICOLLE, C. Reproduction expérimentale du kala-azar chez le chien. Origine canine probable de cette affection. **Bulletin of the Societe Pathology Exotique**, v. 1, p. 188-190, 1908.



162. NUERNBERGER, S. P.; RAMOS, C. V.; CUSTÓDIO, R. Visceral Leishmaniasis in Honduras. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 6, p. 917-920, 1975.
163. NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDI, F. P.; PAULA, H. B. DE; AZEVEDO, M. A. A DE; LIMA, V. M. F. DE; GARCIA, J. F. Polymerase chain reaction evaluation for canine visceral leishmaniasis diagnosis in dog blood samples. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.
164. OLIVEIRA, C. D.; ASSUNCAO, R. M.; REIS, I. A.; PROIETTI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994- 1997. **Caderno de Saúde Pública**, v.17, p.1231-1239. 2001.
165. OLIVEIRA, A. L. L.; PANIAGO, A. M. M.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; LEAL, C. R. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 446-450, 2006.
166. OLIVEIRA, T. M.F. DE S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D. DE; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, v. 17, n. 1, p.7-11, 2008.
167. 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.
168. OTRANTO, D.; PARADIES, P.; SASANELLI, M.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2769-2770, 2004.
169. PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W.; SAMPAIO, M. M. C. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 2, p. 120-127, 2002.
170. PASSOS, L. N. **Avaliação da reação em cadeia de polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil**. Tese de Doutorado: Doutorado em Ciências. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 157 p, 2003.
171. PASQUAU, E.; ENA, J.; SANCHEZ, R.; CUADRADO, J. M.; AMADOR, C.; FLORES, J.; BENITO, C.; REDONDO, C.; LACRUZ, J.; ABRIL, V.; ONOFRE, J. Leishmaniasis as an opportunistic infection in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a collaborative study of 228 episodes in a Mediterranean region. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 24, p. 411-418, 2005.

172. PEDROSA, C. M.; ROCHA, E. M. Aspectos clínicos e epidemiológicos da Leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedente de Alagoas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 4, p. 300-3004, 2004.
173. PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil-Médico**, v. 48, p. 949-950, 1934.
174. PEREIRA, N. D. **Leishmaniose Visceral Americana**. In: Parasitologia Dinâmica. São Paulo: Atheneu, p.1101-112, 2003.
175. POZIO, E.; GRADONI, L.; BETTINI, S.; GRAMICIA, M.; Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grossto). **Acta Tropica**, v. 38, p. 383-393, 1981.
176. PROFETA-DA-LUZ, Z. M.; PIMENTA, D. N.; CABRAL, A. L. L. V.; FIÚZA, V. O. P.; RABELLO, A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 3, p. 249-254, 2001.
177. RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotómíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 360 p, 2003.
178. RASO, P.; GENARO, O. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. In: BRASILEIRO FILHO, G.; BOGLIOLO. Patologia. 6º ed. Guanabara Koogan, Cap. 33, p. 1207-1214, 2000.
179. REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N. S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2931-2935, 1999.
180. REICHMANN, M. L. A. B. Leishmaniose Visceral Canina – Uma Zoonose Emergente. **1º Fórum Sobre Leishmaniose Visceral Canina**, p.7-8, Jaboticabal, 2006.
181. REITHINGER, R.; TEODORO, V.; DAVIES, C. R. A comparative trial of topical insecticide treatments to protect dogs from bites of sandfly vectors of leishmaniasis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7: p. 872-876, 2001.
182. REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. **Trends Parasitology**, v. 18, n.7, p. 289-290, 2002.
183. REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p.21-25, 2007.
184. REY, L. C. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem**. 2º. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
185. REY, L. C.; MARTINS, C. V.; RIBEIRO, H. B.; LIMA, A. A. M. Leishmaniose visceral americana (calazar) em crianças hospitalizadas de área endêmica. **Jornal de Pediatria**, v. 81, p. 73-78, 2005.
186. ROCHA, M. F. **Validação do teste rápido para detecção de anticorpos anti-*Leishmania donovani* (TRALd) no diagnóstico da leishmaniose visceral canina em**

**Montes Claros, Minas Gerais , Brasil.** [Dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2002.

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

188. 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. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p.2564-2572, 2008.

189. ROSA, I. C. A. Reflexões Epidemiológicas Sobre o Controle da Leishmaniose Visceral. **1º Fórum Sobre Leishmaniose Visceral Canina**, p. 26-31, Jaboticabal, 2006.

190. ROSARIO, E. Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude Leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 197-203, 2005.

191. ROUGIER, S.; VOULDOUKIS, I.; FOURNEL, S.; PERES, S.; WOEHRLE, F. Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniosis: a pilot study. **Veterinary Parasitology.**, v.153, p.244-254. 2008.

192. SALMAN, S. M.; RUBEIZ, N. G.; KIBBI, A. G. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 291 – 296, 1999.

193. SALOMON, O.; SINAGRA, A.; NEVOT, M.; BARBERIAN, G.; PAULIN, P.; ESTEVEZ, J.; RIARTE, A.; ESTEVEZ, J. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p.109-111, 2008.

194. SANTOS, H. D. **Fatores Associados a Soropositividade para Leishmaniose Visceral Canina no Município de Piraquê, Estado do Tocantins, Brasil.** Tese de Doutorado - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 89 p, 2008.

195. SCHALLIG, H. D. F. H.; OSKAM, L. Review: Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine Int. Health**, v.7, n. 8, p. 641-651, 2002.

196. SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p. 577-579, 2006.

197. SHERLOCK, I. A.; ALMEIDA, S. P. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. Resultados das medidas profiláticas. **Revista Brasileira de Malariol. Doenças Tropicais**, v. 22, p.175-182, 1970.

198. 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, p. 511, 1984.
199. SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 6, p. 671-83. 1996.
200. SIDDIG, M.; GHALIB, H.; SHILLINGTON, D. C.; PETERSEN, E. A. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Transaction of the Royal Societe of Tropical Medicine Hygiene*, v. 82, p. 66-68, 1988.
201. SILVA, A. R.; VIANA, G.; VARONIL, C.; PIRES, B.; NASCIMENTO, M.; COSTA, J. Leishmaniose visceral (calazar) na Ilha de São Luiz, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30, n. 5, p. 359-368, 1997.
202. SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S.; FIÚZA, V. O. P.; BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001a.
203. SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R. P. Short report: detection of leishmania DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, v. 65, n.6, p. 896-898, 2001b.
204. SILVA, M. V. **Avaliação de testes sorológicos para leishmaniose visceral canina utilizando coleta de amostra sanguínea em papel de filtro**. 163 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, 2005.
205. SILVIO, F.; GUIMARÃES, C.; LEMOS, E. M.; COREY, R.; DIETZE, R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian Visceral Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, v. 68, n. 3, p. 321–324, 2003.
206. SMYTH, A. J.; GHOSH, A.; HASSAN, M.Q.; BASU, D.; DE BRUIJN, M. H.; ADHYA, S.; MALLIK, K. K.; BARKER, D. C. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, v. 105, p. 183-192, 1992.
207. SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian. Journal Med. Res.*, v.123, p. 311-330, 2006.
208. SOTTO, M. N.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H.; DA MATA, V. L.; DE BRITO, T. Cutaneous leishmaniasis of the New World: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. *Acta Tropica*, v. 476, p. 121- 130, 1989.
209. STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C. L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *Journal Infectious Diseases*, v. 189, p. 1729-33, 2004.

210. SUNDAR, S.; MORE, D. K.; SINGH, M. K.; SINGH, V. P.; SHARMA, S.; MAKHARIA, A.; KUMAR, P. C.; MURRAY, H. W. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clinicals Infectious Diseases**, v.31, p.1104-1107, 2000.
211. SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine. Institute Health**, v. 6, p. 849-854, 2001.
212. SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical Diagnosis Laboratory Immunology**, v. 9, p. 951-958, 2002.
213. TAFURI, W. L.; BARBOSA, A. J. A.; MICHALICK, M. S.; GENARO, O.; FRANCA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v.38, p.81-89, 1996.
214. TAFURI, W. L.; DE OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case report from Brazil. **Veterinary e Parasitology**, v. 3, p. 203-212, 2001.
215. TAVARES, L. M. S. A. Avaliação do processo de urbanização da leishmaniose visceral no município de Aracajú – Sergipe. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 1, p.37, 2000.
216. TOCANTINS (Estado). Secretaria de Planejamento e Meio Ambiente. Diretoria de Pesquisa e Inovação. **Anuário Estatístico do TO 1997- 2004**. 150p, 2004.
217. TOCANTINS (Estado). Secretaria Estadual de Saúde. Diretoria do Laboratório de Saúde Pública. **Consolidado Anual de Amostras encaminhadas para Exame em Leishmaniose Canina no Método ELISA e IFI. LACEN. 2004 – 2008**. 2009.
218. TOLEDO, L. M.; MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G. **Detection of subclinic forms of visceral leishmaniasis in na endemic área in Rio de Janeiro**, In: Anais da X Reunião de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambú – MG, p. 1-25, 1983.
219. TRAVI, B. L.; MONTOYA, J.; GALLEGOS, J.; JARAMILLO, C.; LLANO, R.; VÉLEZ, I. D. Binomics of *Lutzomyia evansi* (Díptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. **Journal Medicine Entomology**, v. 33, n. 3, p. 278-785, 1996.
220. UCHÔA, C. M. A.; SERRA, C. M. B.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C. M.; SILVA, R. M.; THEOPHILO, F.; FIGLIUOLO, L. P.; HORTA, F. T.; MADEIRA, M. F. Aspectos sorológicos e epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana em Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 6, p. 563-568, 2001.
221. VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; SOUSA, W. Cell biology of *Leishmania* spp: Invading and Evading. **Current Pharmaceutical Desing, Schiphol**. v. 8, p. 297 – 318, 2002.

222. VENKATESAN, P.; WAKELIN, D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs, *Parasitol. Today*, v. 9, n. 6, p. 228-232, 1993.
223. VERCAMMEN, F.; BERKVEN, D.; LE RAY, D.; JACQUET, D.; VERVOOT, T. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. *Veterinary Record*, v. 141, n. 13, p. 328-330, 1997.
224. VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3° ed. v. 2. Atheneu, 2005.
225. VEXENAT, J. A.; FONSECA DE CASTRO, J. A.; CAVALCANTE, R.; SILVA, M. R.; BATISTA, W. H.; CAMPOS, J. H.; PEREIRA, F. C.; TAVARES, J. P.; MILES, M. A. Preliminary observations on the diagnosis and transmissibility of canine visceral leishmaniasis in Teresina, NE, Brazil. *Archives of Institut Pasteur of Tunis*, v. 70, p. 467-472, 1993.
226. VITALE, F.; REALE, S.; VITALE, M.; PETROTA, E.; TORINA, A.; CARACAPPA, S. TaqMan – based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Annals of New York Academy of Sciences*, v. 1026, p. 139 – 143, 2004.
227. WEIGLE, K. A.; DE DÁVALOS, M.; HEREDIA, P.; MOLINEROS, R.; SARAVIA, N. G.; D' ALESSANDROS, A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colômbia: a comparison of seven methods. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, v. 36, p. 489-496, 1987.
228. WILSON, S. M. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field applications and practicalities. *Annals Tropical Medicine Parasitology*, v. 89, p. 95–100, 1995.
229. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Strategic direction for research: Leishmaniasis**. Disponível em <[www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm)>. Acesso em 12/12/2009. 2002.
230. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of leishmaniasis**. Geneva WHO, 2004. <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/index.html>. Acesso em 07/08/2009. 2004.
231. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Contém informações institucionais, notícias técnicas, publicações, projetos e serviços**. Disponível em <[www.who.int/topics/leishmaniasis/en/](http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/)>. Acesso em 19/02/2009. 2009.
232. YAMEI, G.; TORRELE, E. The world's most neglected diseases. *B. M. J.*, v. 325, p. 176- 177, 2002.
233. ZERPA, O.; ULRICH, M.; NEGRON, E.; RODRIGUEZ, N.; CENTENO, M.; RODRIGUEZ, V. Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela). *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*, v. 94, p. 484-487, 2000.

**APÊNDICE A.** Resultados obtidos através do emprego de seis métodos laboratoriais em amostras de soro e tecidos de 20 cães, naturalmente infectados por leishmaniose visceral, procedentes de Centro de Controle de Zoonoses de Araguaína –TO, durante o ano de 2009

Número Amostra	ELISA	D. O. ELISA	RIFI	Titulação RIFI	Teste Rápido DPP®	PCR	HE	IH
01	1	1,1325	1	(1/32)	1	1	0	0
02	1	0,5245	1	(1/8)	1	1	0	0
03	1	2,4755	1	(1/64)	1	1	0	0
04	1	1,9565	1	(1/64)	1	1	0	0
05	1	0,5050	1	(1/32)	1	1	0	0
06	1	2,8145	1	(1/128)	1	1	0	0
07	1	2,2500	1	(1/32)	1	1	1	1
08	1	1,7120	1	(1/64)	1	1	0	0
09	1	2,7690	1	(1/128)	1	1	1	1
10	1	1,9455	1	(1/128)	1	1	1	1
11	0	0,3085	1	(1/32)	0	1	0	0
12	1	2,6085	1	(1/64)	1	1	0	0
13	1	0,6575	1	(1/256)	1	1	0	0
14	1	2,4975	1	(1/256)	1	1	0	0
15	1	0,8640	1	(1/16)	1	1	0	0
16	0	0,2275	1	(1/8)	1	1	0	0
17	1	2,6880	1	(1/64)	1	1	0	0
18	1	1,4320	1	(1/128)	1	1	0	0
19	1	0,6655	1	(1/32)	1	0	1	1
20	1	1,2520	1	(1/64)	1	1	1	1

ELISA: imunoenensaio enzimático; RIFI: reação de imunofluorescência indireta; DPP®: teste rápido para detecção de leishmaniose visceral canina; PCR: reação em cadeia da polimerase; HE: histológico (hematoxilina/eosina); IH: imunohistoquímico.

**1 – Positivo; 0 – Negativo**

**APÊNDICE B.** Quadros com Percentual de Concordância e Índice Kappa resultante da análise (dois a dois) dos métodos ELISA , RIFI e PCR com os demais testes empregados no estudo.

ELISA/RIFI	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	18	2	20
<b>NEG</b>	0	0	0
<b>Kappa</b>	0,000		20
Concord	90%		

RIFI/DPP	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	19	0	19
<b>NEG</b>	1	0	1
<b>Kappa</b>	0,000		20
Concord	95%		

PCR/RIFI	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	19	1	20
<b>NEG</b>	0	0	0
<b>Kappa</b>	0,000		20
Concord	95%		

ELISA/DPP	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	18	1	19
<b>NEG</b>	0	1	1
kappa	0,643	boa	20
Concord	95%		

RIFI/ELISA	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	18	0	18
<b>NEG</b>	2	0	2
Kappa	0,000		20
Concord	90%		

PCR/ELISA	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	17	1	18
<b>NEG</b>	2	0	2
Kappa	- 0,071	Ruim*	20
Concord	85%		

ELISA/PCR	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	17	2	19
<b>NEG</b>	1	0	1
kappa	- 0,071	Ruim*	20
Concord	85%		

RIFI/PCR	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	19	0	19
<b>NEG</b>	1	0	1
<b>Kappa</b>	0,000		20
Concord	95%		

PCR/DPP	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	18	1	19
<b>NEG</b>	1	0	1
<b>Kappa</b>	- 0,052	Ruim*	20
Concord	90%		

ELISA/HE	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	5	0	5
<b>NEG</b>	13	2	15
kappa	0,071	Ruim	20
Concord	35%		

RIFI/HE	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	5	0	5
<b>NEG</b>	15	0	15
<b>Kappa</b>	0,000		20
Concord	25%		

PCR/HE	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	4	1	5
<b>NEG</b>	15	0	15
<b>Kappa</b>	- 0,103	Ruim*	20
Concord	20%		

ELISA/IH	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	5	0	5
<b>NEG</b>	13	2	15
kappa	0,071	Ruim	20
Concord	35%		

RIFI/IH	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	5	0	5
<b>NEG</b>	15	0	15
Kappa	0,000		20
Concord	25%		

PCR/ IH	POS	NEG	TOTAL
<b>POS</b>	4	1	5
<b>NEG</b>	15	0	15
Kappa	- 0,103	Ruim*	20
Concord	20%		



**APÊNDICE C.** Quadros com Percentual de Concordância e Índice Kappa resultante da análise (dois a dois) dos métodos DPP®, HE e IH com os demais testes empregados no estudo.

DPP/RIFI	POS	NEG	TOTAL
POS	19	1	20
NEG	0	0	0
Kappa	0,000		20
Concord	95%		

HE/RIFI	POS	NEG	TOTAL
POS	5	15	20
NEG	0	0	0
Kappa	0,000		20
Concord	25%		

IH/RIFI	POS	NEG	TOTAL
POS	5	15	20
NEG	0	0	0
Kappa	0,000		20
Concord	25%		

DPP/ELISA	POS	NEG	TOTAL
POS	18	0	18
NEG	1	1	2
Kappa	0,643	boa	20
Concord	95%		

HE/ELISA	POS	NEG	TOTAL
POS	5	13	18
NEG	0	2	2
Kappa	0,071	Ruim	20
Concord	35%		

IH/ELISA	POS	NEG	TOTAL
POS	5	13	18
NEG	0	2	2
Kappa	0,071	Ruim	20
Concord	35%		

DPP/PCR	POS	NEG	TOTAL
POS	18	1	19
NEG	1	0	1
kappa	- 0,052	Ruim*	20
Concord	90%		

HE/PCR	POS	NEG	TOTAL
POS	4	15	19
NEG	1	0	1
Kappa	- 0,103	Ruim*	20
Concord	20%		

IH/PCR	POS	NEG	TOTAL
POS	4	15	19
NEG	1	0	1
Kappa	- 0,103	Ruim*	20
Concord	20%		

DPP/HE	POS	NEG	TOTAL
POS	5	0	5
NEG	14	1	15
Kappa	0,034	Ruim	20
Concord	30%		

HE/DPP	POS	NEG	TOTAL
POS	5	14	19
NEG	0	1	1
Kappa	0,034	Ruim	20
Concord	30%		

IH/DPP	POS	NEG	TOTAL
POS	5	14	19
NEG	0	1	1
Kappa	0,034	Ruim	20
Concord	30%		

DPP/ IH	POS	NEG	TOTAL
POS	5	0	5
NEG	14	1	15
Kappa	0,034	Ruim	20
Concord	30%		

HE/ IH	POS	NEG	TOTAL
POS	5	0	5
NEG	0	15	15
Kappa	0,000		20
Concord	100%		

IH/HE	POS	NEG	TOTAL
POS	5	0	5
NEG	0	15	15
Kappa	0,000		20
Concord	100%		

