

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELLEN DE SOUZA MARQUEZ

**LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM CÃES
NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL: AVALIAÇÃO DO RISCO
EPIDEMIOLÓGICO USANDO COMO FERRAMENTA A
REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE**

CURITIBA
JULHO/2010

ELLEN DE SOUZA MARQUEZ

**LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM CÃES
NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL. AVALIAÇÃO DO RISCO
EPIDEMIOLÓGICO USANDO COMO FERRAMENTA A
REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)**

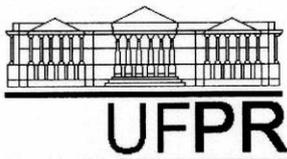
Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração Saúde Humana e Animal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanete Thomaz Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro

CURITIBA

2010



RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

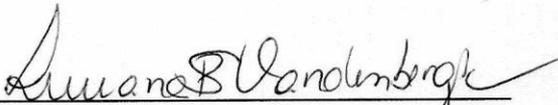
Aos sete dias do mês de julho de 2010, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pelo Prof Dr Carlos Ricardo Soccol, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a Sexagésima Quarta Defesa de Tese de Doutorado, Área de Concentração: Saúde Animal e Humana. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

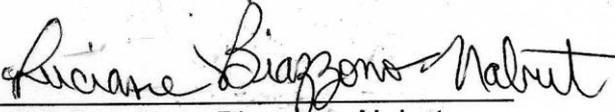
A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores Edilene Alcântara de Castro (UFPR), Itamar Teodorico Navarro (UEL), Luciane Biazzono Nabut (UEL), Luciana Porto de Souza Vandenberghe (UFPR), e Vanete Thomaz Soccol (UFPR - orientadora da tese).

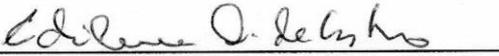
Às 8h30, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Ellen de Souza Marquez** a fazer a apresentação da Tese intitulada: "**Leishmaniose Tegumentar Americana em Cães no Estado do Paraná, Brasil: Avaliação do Risco Epidemiológico Usando como Ferramenta a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)**". Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

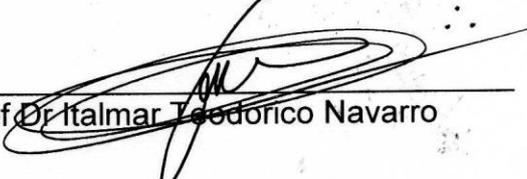
Tendo em vista a tese e a arguição, a banca composta pelos professores Dr^a Edilene Alcântara de Castro, Dr Itamar Teodorico Navarro, Dr^a Luciane Biazzono Nabut, Dr^a Luciana Porto de Souza Vandenberghe, e Dr^a Vanete Thomaz Soccol declarou a candidata Aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 32/33/34/35 da Resolução 13/96 de 23.07.96).

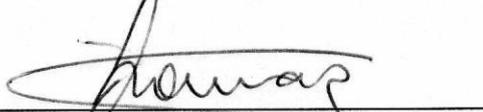
Curitiba, 07 de julho de 2010


Prof^a Dr^a Luciana P S Vandenberghe


Prof^a Dr^a Luciane Biazzono Nabut


Prof^a Dr^a Edilene Alcântara de Castro


Prof Dr Itamar Teodorico Navarro


Prof^a Dr^a Vanete Thomaz Soccol

Universidade Federal do Paraná
Setor de Tecnologia
Curso de Doutorado em Processos
Biotecnológicos

AGRADECIMENTOS

Considero que a elaboração de uma tese de doutorado é um produto coletivo embora sua redação, responsabilidade e *stress* seja predominantemente individual, cada dificuldade vivenciada valeu apenas, faria tudo novamente se fosse preciso. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo. A todas elas registro minha gratidão.

A toda minha família pelo amor e apoio, e em especial meus pais, Carlos e Regina, que me estimularam e ensinaram que o conhecimento é um dos maiores bens que um indivíduo pode adquirir na vida.

À Professora Dra. Vanete Thomaz Soccol, por sua valiosa orientação, a sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, crítica e criativa de argüir as idéias apresentadas, creio que deram norte a este trabalho, facilitando o alcance de seus objetivos. Pelo aconselhamento oportuno que permitiu o meu enriquecimento profissional e pessoal. À Professora Vanete meus irrestritos agradecimentos.

Aos coordenadores do curso de Pós-Graduação, Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol e Professora Dra. Luciana de Souza Vandenberghe pela dedicação e empenho dispensados ao curso.

Ao Prof^o Dr. Itamar Teodorico Navarro, meu co-orientador, pelo estímulo e exemplo de competência e dedicação ao trabalho, ao ensino e à ciência.

À Prof^a Dra. Luciane Biazono Nabut pela amizade e ajuda em muitos momentos da elaboração desse trabalho.

A Professora de Parasitologia, Dra. Edilene A. de Castro, pelo apoio, principalmente na realização da parte prática dessa tese e pelo convívio durante o curso.

Ao Corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, pelo estímulo constante da busca e aperfeiçoamento.

As Professoras de Parasitologia, Dra. Juliana Ferreira de Moura, Dr^a Adriana Costa e Dra. Rosângela C. Paulino, pelo convívio nesses anos.

À técnica do Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica, Luciane Hennig, pelas gentilezas concedidas e competência dedicada durante todo o período da Pós-Graduação.

Aos queridos amigos do Laboratório de Parasitologia Molecular, Silvia Cristina Osaki, Ludmila Toiano, Magda C. V. da Costa Ribeiro, Saloê Bispo, Wilerson Sturm, Juliana Tracz Pereira, Martha Greca, Nelson Fernandes, Samira Schadad, Silvana Alban, Soraia Gilbert, Jessé Trupel, André Mello, Guilherme Garcia e Ricardo Fendrich, pelo companheirismo, amizade, aprendizado e cumplicidade de todos estes anos, que sempre serão lembrados. Obrigada de coração.

À todos os colegas do curso de pós-graduação em Processos Biotecnológicos.

Às amigas de trabalho Laila Herta Mishfeldt, Nina Maria Silva Risso, Luciane Holsback, Celmira Calderon, Érika Consendey Toledo de Mello Peixoto, Hermantina Maria de Almeida Whitaker e Regina Aparecida Munhoz Moreno, pelo apoio, principalmente nos momentos difíceis, deixo aqui meu afetivo muito obrigado.

Aos meus colegas do Curso de Medicina Veterinária, pela compreensão relativa à minha ausência temporária de minhas atividades.

À Universidade Federal do Paraná – UFPR, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina, local onde foi realizada uma parte da prática da pesquisa.

À Universidade Estadual do Norte do Paraná, local em que trabalho, fonte de sustento e de eterno aprendizado, meu muito obrigado.

À Fundação Araucária, pelo incentivo a capacitação a docentes.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho. Desejo que Deus abençoe a todos em suas jornadas.

*“Perguntaram ao Dalai Lama:
O que mais te surpreende na Humanidade?
E ele respondeu: Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem o
dinheiro para recuperar a saúde.
E por pensarem ansiosamente no futuro esquecem do presente de forma que
acabam por não viver nem no presente nem no futuro. E vivem como se nunca
fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido.”*

Dalai Lama

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

FIGURA 01-	Esfregaço por aposição de material biopsiado de lesão de paciente positivo para <i>Leishmania</i> sp.: formas amastigotas (coloração de giemsa, 100x) (A, B e C). Exame histopatológico de material biopsiado de lesão de paciente <i>Leishmania</i> sp. positivo: formas promastigotas (coloração hematoxilina-eosina, 40x) (D)	27
FIGURA 02-	Esfregaço por aposição de material biopsiado de lesão de pacientes (A e B) positivo para <i>Leishmania</i> sp.: formas promastigotas (coloração de giemsa, 100x)	28
FIGURA 03-	Cladograma mostrando a relação dos 15 complexos filogenéticos do gênero <i>Leishmania</i> e a inserção das espécies nos complexos. A análise filogenética foi realizada com base em 80 zimodemas e 13 diferentes isoenzimas utilizando o programa Felsenstein e o método de parcimônia.....	30
FIGURA 04-	Vetores machos da <i>Leishmania</i> sp. (A e B). Vetor fêmea engurgitada da <i>Leishmania</i> sp. (C).....	32
FIGURA 05-	Distribuição da leishmaniose tegumentar no mundo.....	40
FIGURA 06-	Distribuição da leishmaniose cutânea no Brasil.....	41
FIGURA 07-	Localização geográfica de leishmaniose cutânea em três regiões estudadas no Estado do Paraná. r1- Vale da Ribeira; r2 Região Central e r3 – Região Norte do Estado	41
FIGURA 08-	Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pela transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasil 2005.....	42

CAPÍTULO II

FIGURA 01-	Município de Bela Vista do Paraíso, Paraná, Brasil.....	64
FIGURA 02-	Resultado dos testes utilizados para o diagnóstico da LTA em 411 cães naturalmente infectados do Município de Bela Vista do Paraíso, Paraná, Brasil.....	72

FIGURA 03-	Produto da amplificação do DNA de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> pela técnica de PCR. 1 = marcador molecular de 100 pb (pares de base); 2 = controle positivo (dna de cepa referência de <i>L. braziliensis</i> , 3 = controle negativo, 4 a 8 = dna amplificado de <i>L.(V.) braziliensis</i> (70 pb) de amostras de sangue de cães de área endêmica do Município de Bela Vista do Paraíso, Paraná 73	73
------------	--	----

CAPÍTULO III

FIGURA 01-	Local aonde residiam os oito cães eutanasiados provenientes do Município de Rolândia, Paraná, Brasil..... 103	103
FIGURA 02-	Vista do sítio aonde residiam os oito cães eutanasiados provenientes do Município de Rolândia, Paraná, Brasil..... 103	103
FIGURA 03-	Coleta de amostra de lesão de pele de bolsa escrotal em cão suspeito de LTA, região Norte do Estado do Paraná, Brasil..... 103	103
FIGURA 04-	Coleta de amostra de lesão de pele de orelha em cão suspeito de LTA, região Norte do Estado do Paraná, Brasil..... 103	103
FIGURA 05-	Coleta de amostra de lesão de pele de orelha em cão suspeito de LTA, região Norte do Estado do Paraná, Brasil..... 103	103
FIGURA 06-	Coleta de amostra de lesão de pele de orelha em cão suspeito de LTA, região Norte do Estado do Paraná, Brasil..... 103	103
FIGURA 07-	Distribuição das lesões cutâneas dos oito cães com LTA eutanasiados..... 104	104
FIGURA 08-	Porcentagem de animais positivos para <i>Leishmania</i> nas diferentes metodologias diagnósticas nos oito cães eutanasiados. 105	105
FIGURA 09-	Perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de RAPD dos isolados de <i>Leishmania</i> com o iniciador a9 dos cães eutanasiados. Eletroforese em gel de agarose 1,6%. mm – marcador molecular 1kb (invitrogen®); b-controle negativo; 1 animal 1; 2 animal 2; 3 animal 3; 4 animal 4; 5 animal 5; 6 animal 6; 7 animal 7; 8 animal 8; controle positivo - cepa referência (<i>Lb</i>) <i>Leishmania braziliensis</i> , (<i>La</i>) <i>Leishmania amazoneni</i> 105	105
FIGURA 10-	Perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de RAPD dos isolados de <i>Leishmania</i> com o iniciador a3 dos cães eutanasiados. Eletroforese em gel de agarose 1,6%. mm – marcador molecular 1kb (invitrogen®); 1 animal 1; 2 animal 2; 3 animal 3; 4 animal 4; 5 animal 5; 6 animal 6; 7 animal 7; 8 animal 8; (<i>Lb</i>) <i>Leishmania braziliensis</i> 106	106

FIGURA 11- Produto da amplificação do DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (70 pb) pela técnica de PCR de fragmentos de tecidos do cão eutanasiado de número 6, proveniente do Município de Rolândia, Paraná, Brasil. 1 = marcador molecular de 50 pb; 2 a 6 - DNA amplificado de *L.(V.) braziliensis* : 2 = pele íntegra, 3 = sangue, 4 = fígado, 5 = medula óssea e 6 = lesão cutânea, 7 = controle positivo (DNA de cepa referência de *L. braziliensis* e 8 = controle negativo, pb = pares de base..... 107

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 01-	Lista das espécies de mamíferos encontrados infectados naturalmente com uma ou mais espécie de <i>Leishmania</i> na América Latina.....	35
------------	---	----

CAPÍTULO II

TABELA 01-	Resultado dos testes de IFI e ELISA na detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania sp</i> em 489 cães em relação a raça, sexo, idade e procedência do animal no Município de bela Vista do Paraíso - Paraná, entre os anos de 2002 e 2003.....	71
TABELA 02-	Desempenho da associação do Teste de Imunofluorescência (IFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) considerando a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como padrão-ouro no diagnóstico de leishmaniose canina.....	73

CAPÍTULO III

TABELA 01-	Número de animais e metodologia diagnóstica aplicada aos cães suspeitos de LTA da região Norte do Estado do Paraná, Brasil	95
TABELA 02-	Resusltados e metodologia diagnóstica aplicada aos cães suspeitos de LTA da região Norte do Estado do Paraná, BRASIL.....	101
TABELA 03-	Resultado da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em diferentes órgãos em oito cães com Leishmaniose Tegumentar Americana	102
TABELA 04-	Resultado da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em diferentes órgãos em oito cães com Leishmaniose Tegumentar Americana	107

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO I - LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: UMA REVISÃO	22
RESUMO	23
ABSTRACT	24
1. INTRODUÇÃO	25
1.1 HISTÓRICO DA LTA.....	25
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO	26
1.3 PRINCIPAIS HOSPEDEIROS	31
1.3.1 Vetores	31
1.3.2 Reservatórios.....	33
1.3.3 Reservatório Silvestres	34
1.3.4 Animais Domésticos.....	34
1.3.5 O Homem	36
1.4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	36
1.5 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	38
1.6 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	43
1.6.1 Diagnóstico Clínico	43
1.6.2 Diagnóstico Epidemiológico	43
1.6.3 Diagnóstico Parasitológico	44
1.6.4 Diagnóstico Imunológico	44
1.6.5 Diagnóstico Molecular	45
1.7 TRATAMENTO	46
1.8 PREVENÇÃO E CONTROLE	47
1.9 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO II - <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> EM SANGUE DE CÃES ASSINTOMÁTICOS EM FOCO EPIDÊMICO EM BELA VISTA DO PARAÍSO, PARANÁ, BRASIL: AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR	59
RESUMO	60

ABSTRACT	61
1. INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1 ÁREA DE ESTUDO	64
2.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO E COLETA DE AMOSTRAS.....	64
2.2.1 Exame Clínico dos Cães	65
2.3 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	65
2.3.1 Imunofluorescência Indireta (IFI)	65
2.3.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	66
2.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	66
2.4.1 Extração de DNA de sangue dos Animais.....	66
2.4.2 Amplificação de DNA	67
2.4.3 Sensibilidade da PCR	68
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
3. RESULTADOS	70
4. DISCUSSÃO	74
5. CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81
CAPÍTULO III - LEISHMANIOSE E O PAPEL DO CÃO NA MANUTENÇÃO DO CICLO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	89
RESUMO	90
ABSTRACT	91
1. INTRODUÇÃO	92
2. MATERIAL E MÉTODOS	95
2.1 ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	95
2.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO PARASITO	96
2.2.1 Cultivo	96
2.2.2 Identificação dos Isolados por RAPD-PCR	96
2.2.3 Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD)	97
2.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)	98

2.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	98
2.5 SEQUENCIAMENTO	99
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	99
3. RESULTADOS	101
4. DISCUSSÃO	108
5. CONCLUSÃO	114
REFERÊNCIAS	115

INTRODUÇÃO GERAL

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias causadas por mais de 30 espécies de *Leishmania* Ross, 1903. São parasitos digenéticos, isto é no curso do seu ciclo biológico necessitam de um hospedeiro invertebrado e de um hospedeiro vertebrado. Os hospedeiros invertebrados são insetos pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, nos quais são encontradas, no intestino as formas promastigotas. Já nos hospedeiros vertebrados o parasito encontra-se nas células do sistema fagocitário mononuclear sob a forma amastigota. Como hospedeiros vertebrados são assinalados animais silvestres, animais domésticos e o homem.

No homem e em alguns animais domésticos a doença pode apresentar-se na forma viscerotrópicas e ou dermatotrópica/mucotrópica também denominadas de leishmaniose cutânea (ASHFORD, 2000). Como este trabalho tratará apenas da leishmaniose cutânea, somente esta será abordada.

A doença é amplamente difundida no Mundo com exceção da Austrália (WHO, 1990) e estão presentes na Ásia, África do Norte, Sul da Europa, e Américas onde afetam 88 países, dos quais 72 estão em fase de desenvolvimento. A população exposta a risco são 370 milhões de pessoas e o número de novos casos é avaliado entre 1,5 a 2 milhões somando todas as formas clínicas (DESJEUX, 2004). A multiplicidade de formas clínicas está relacionada à espécie do parasito e a variação da resposta imune do hospedeiro (DESJEUX, 2004).

A importância da leishmaniose no mundo está aumentando com registro aproximado de dois milhões de novos casos ao ano. Nos países da América Latina a incidência é elevada, sendo que o Brasil é o país onde há maior ocorrência. Entre 1990 e 2008, o Ministério da Saúde registrou, no país, uma média anual de 27.000 novos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Ao analisar a evolução da doença, no país, observa-se uma expansão geográfica no início da década de 80, quando foram registrados casos em 19 unidades federadas. A partir de 2003, todos os estados registraram autoctonia e a partir da década de 90, o Ministério da Saúde vem notificando uma média anual de 32 mil novos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

No Brasil a doença é denominada de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e é causada por várias espécies que podem ser simpátricas ou se encontrar isoladamente. As espécies mais frequentemente assinaladas são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* L.(V.) *lainsoni*, L.(V.) *naiffi* e L.(V.) *shawi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Leishmania (V.) braziliensis é a espécie mais amplamente distribuída indo desde o sul do México até o Norte da Argentina (THOMAZ-SOCCOL, 1993; COURA, 2005; DEDET, 2009).

No Estado do Paraná, sul do Brasil, no início da colonização os casos de leishmaniose tegumentar eram muitos e a doença foi denominada de pandêmica, especialmente no Vale da Ribeira (MIRANDA *et al.*, 1955). Já na região norte do estado, nos anos 50 e 60 a doença apresentou-se na forma de surtos. Contudo, nos anos 70 e 80 houve um período de baixo número de casos humanos. Mas com recrudescimento nos anos 90 quando foram assinalados 4.873 casos entre 1993 a 1999 em 276, de um total de 399 municípios. Na região norte e oeste do Estado a ação antrópica foi intensa devido ao plantio de monoculturas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000, LONARDONI *et al.*, 2006). Desde os anos 90 a doença vem sendo notificada com freqüência tanto em homens como em mulheres e em todas as faixas etárias (MAYWALD *et al.*, 1996; CASTRO *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2007).

No passado, a LTA no Brasil era uma doença que apresentava um padrão epidemiológico característico de surtos epidêmicos, associados à derrubada das matas para a construção de estradas, a instalação de povoados em regiões pioneiras e a exploração desordenada de florestas para extração de madeira, agricultura e pecuária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Caracterizava-se fundamentalmente como uma zoonose em que os reservatórios eram animais silvestres, e que atingia o homem quando este entrava em contato com focos zoonóticos (LAINSON e SHAW, 1987; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Outro padrão epidemiológico ocorria em regiões de colonização antiga relacionado ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados semi-urbanizados na periferia de centros urbanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

No Estado do Paraná o padrão epidemiológico da doença não era diferente. Todavia, atualmente a parasitose vem sendo relatada principalmente em áreas que tem sofrido modificações ambientais. Em decorrência do desmatamento, as florestas nativas representam apenas 7,5% do território do Estado do Paraná, predominando faixas de florestas remanescentes e arbustos ao redor de casas, instalações como galinheiros, pocilgas e canis onde concentrações enzoóticas de *Leishmania* permanecem (TEODORO *et al.*, 2004). Desta forma, o ambiente antrópico se tornou favorável à manutenção do ciclo parasitário, especialmente de *L. (V.) braziliensis* que é a espécie presente e que vem sendo assinalada em casos autóctones no Estado do Paraná (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2005; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009).

A espécie *Leishmania (V.) braziliensis* é bastante complexa, pois além de ter a mais ampla distribuição geográfica pouco se conhece sobre seus verdadeiros reservatórios nos focos de transmissão (CASTRO, 2001; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2007).

Um reservatório primário de uma zoonose pode ser definido como um hospedeiro apto a manter a transmissão endêmica do patógeno na ausência de qualquer outra espécie hospedeira, isto é, mantém R_0 maior que 1. O número básico de reprodução (R_0) pode ser estimado como $R_0 = 1 + L/A$, onde L é a expectativa de vida do animal e A é a média de tempo para um animal adquirir a infecção (REITHINGER e DAVIES, 2003).

Reservatórios secundários são aquelas espécies de hospedeiros cuja presença aumenta significativamente a R_0 , mas que não é capaz de manter a R_0 maior que 1 na ausência de outra espécie hospedeira (REITHINGER e DAVIES, 2003).

O reservatório acidental, em contraste, não desempenharia nenhum papel na manutenção do ciclo parasitário e sua presença não exerceria nenhum impacto na R_0 . (REITHINGER e DAVIES, 2003).

Segundo alguns autores a infecção de animais domésticos (cães, cavalos e muare) em áreas endêmicas, sugere a participação desses animais na cadeia de transmissão de *Leishmania* nos ambientes domiciliar e peridomiciliar (LONARDONI *et al.*, 1993, VELASQUEZ *et al.*, 2006). No entanto, outros autores

afirmam que os animais domésticos seriam simples hospedeiros acidentais. Diante deste paradigma surge a dúvida quanto ao verdadeiro papel do cão na manutenção do ciclo parasitário (CASTRO, 2001, CASTRO *et al.*, 2007). Evidências circunstanciais de que o cão possa agir como hospedeiro reservatório (primário ou secundário) para LTA é decorrente de duas observações: 1) cepas de *Leishmania* isoladas do cão e do homem são indistinguíveis; 2) o risco da infecção de LTA em cães está correlacionado ao risco de LTA no homem (REITHINGER e DAVIES, 1999).

Com o objetivo de determinar o papel do cão na cadeia de transmissão de *L. (V.) braziliensis*, o presente trabalho foi desenvolvido e está sendo apresentado na forma de capítulos. O primeiro capítulo relata sobre a leishmaniose tegumentar em formato de revisão bibliográfica. O segundo capítulo avalia um foco epidêmico de leishmaniose em cães no município de Bela Vista do Paraíso, no Estado do Paraná para avaliar a taxa de infecção nestes animais. E finalmente, o terceiro capítulo analisa o papel do cão na manutenção da LTA no Estado do Paraná, por meio de testes laboratoriais.

- CAPÍTULO I: Leishmaniose Tegumentar: uma revisão.
- CAPÍTULO II: Detecção de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em sangue de cães em foco epidêmico no município de Bela Vista do Paraíso, Paraná, Brasil.
- CAPÍTULO III: Leishmaniose e o papel do cão na manutenção da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Paraná, Brasil.

REFERÊNCIAS

- ASHFORD, R. W.; DESJEUX, P.; DERADT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 8, p. 103-104, 1992.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.
- BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO M. E.; CARVALHO F. G.; ISHIKAWA E. A.; CUPOLILLO E.; FLOETER WINTER L.; SHAW J. J. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.
- CASTRO, E. A. **Aspectos epidemiológicos e parasitológicos da leishmaniose tegumentar em duas regiões do Estado do Paraná e o papel do cão na manutenção do ciclo de *Leishmania***. 2001. 188f. Tese de (Doutorado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MEMBRIVE, N.; LUZ, E. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 35, p. 445-452, 2002.
- CASTRO E. A.; LUZ, E.; TELLES, F. Q. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Parana state, Brazil. **Acta Tropica**, n. 93, p. 141–149, 2005.
- CASTRO, E.; THOMAZ-SOCCOL, V. AUGUR, C.; LUZ, E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). **Experimental Parasitology**, v. 117, p. 13-21, 2007.
- CENEPI, **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**, Organização: Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses – Coordenação de Vigilância Epidemiologia – Centro Nacional de Epidemiologia – Fundação Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, 62 p, 2002.
- COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, v. 1, p. 697-712, 2005.
- COUTINHO, S. G.; NUNES, M. P.; MARZOCHI, M. C. A.; TRAMONTANO, N. A survey for american cutaneous and visceral leishmaniasis among 1.342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, p. 17-22, 1985.

CUBA-CUBA, C. A.; MILES, M. A.; VEXENAT, D. C.; BARKER, D. C.; PRATT, D. M.; BUTCHER, J.; BARRETO, A. C.; MARSDEN, P. D. A focus of mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia, Brazil: characterization and identification of *Leishmania* stocks isolated from man and dogs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 500-507, 1985.

DEDET, J.P. Leishmanias, leishmanioses: biologie, clinique et thérapeutique. In: **Maladies Infectieuses**, p. 1-14, 2009.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139–146, 2007.

FURTADO, T; VIEIRA J. B. F. Geografia da leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v. 57, p. 135-140, 1982.

LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; ARRAES, S. M. A. A.; SILVEIRA, T. G. V.; BERTOLINI, D. A.; ISHIKAWA, E. A. Y.; SHAW, J. J.; Nota sobre leishmaniose canina no noroeste do Estado do Paraná, sul do Brasil, **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 5, p. 378-379, 1993.

LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; ALVES, W. A.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; MEMBRIVE, U. A.; MEMBRIVE, N. A.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; ZANZARINI, P. D.; ISHIKAWA, E.; TEODORO, U. Leishmaniose Tegumentar Americana humana e canina no Município de Mariluz, Estado do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 12, p. 2713-2716, 2006.

MARZOCHI, M. C. A.; BARBOSA-SANTOS, E. G. O. Evaluation of a skin test on the canine mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 3, p. 391-392, 1988.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil—Emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. 2, p. 359-375, 1994.

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**, p. 39-64, 2002.

MAYWALD, P. G.; MACHADO, M. I.; COSTA CRUZ, J. M.; GONÇALVES PIRES, M. R. F. Canine cutaneous and visceral leishmaniasis and chagas' diseases from countries in the Triângulo Mineiro and Alto Paraíba regions, Minas Gerais State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, São Paulo, v. 12, p. 321-328, 1996.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Controle de Leishmaniose Tegumentar Americana**.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde. Brasília, 2000, 43 p.

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

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007, 180 p.

MODABBER, F. **Tropical disease research: progress 1991-92 eleventh program report of the UNDP/WHO Special Program for Research (TDR)**. Geneve: WHO, 1993.

NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDI, F. P.; PAULA, H. B.; AZEVEDO, M. A. A.; LIMA, V. M. F.; GARCIA, J. F. Avaliação da Reação em Cadeia pela Polimerase para Diagnóstico da Leishmaniose Visceral em Sangue de Cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

PADILHA, A. M.; MARCO, J. D.; DIOSQUE, P.; SEGURA, M. A.; MORA, M. C.; FERNÁNDEZ, M. M.; MALCHIODI, E. L.; BASOMBRIÓ, M. A.; Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina, **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 1-10, 2002.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of american cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 4, p. 530-541, 1999.

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J. C.; DAVIES, C. R. The transmission dynamics of canine american cutaneous leishmaniasis in Huánuco, Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 5, p. 473-480, 2003.

SAMPAIO, R. N. R. ROCHA, R. A. A.; MARSDEN, P. D.; CUBA, C. C.; BARRETO, A. C. Leishmaniose tegumentar americana: casuística do Hospital Escola da UnB. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 55, p. 69-76, 1980.

TEODORO, U.; THOMAZ-SOCCOL, V.; KÜHL, J. B.; SANTOS, D. R.; SANTOS, E. S.; SANTOS, A. R.; ABBAS, M. & DIAS, A. C.; Reorganization and Cleanings of Peridomiciliar Area to Control Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in South Brazil, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 205-212, 2004.

THOMAZ-SOCCOL, V. Les *Leishmania* du Nouveau Monde. Analyse enzymatique. Démarche progressive phénétique-cladistique. Relations phylogénétiques avec les

Leishmania de l'Ancien Monde. 1993.190 f. **These de (Doctorat)- Faculté de Médecine, Montpellier**, 1993.

VELASQUEZ, L. G.; MEMBRIVE, N.; MEMBRIVE, U.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; TESSMAN, I. P. B.; SILVEIRA, T. G. V. PCR in the investigation of canine American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 571-578, 2006.

CAPÍTULO I

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: UMA REVISÃO

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: UMA REVISÃO

Resumo: A leishmaniose tegumentar é uma doença parasitária provocada por um protozoário do gênero *Leishmania* sp., o qual é transmitido através da picada de dípteros da família Psychodidae, gênero *Lutzomyia* sp. No Brasil existem atualmente sete espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença em humanos sendo que a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* possuem maior distribuição geográfica e maior incidência. Várias espécies de flebotomíneos estão implicadas na transmissão do protozoário. Trata-se de uma doença que acompanha o homem desde os tempos remotos e que tem apresentado um aumento do número de casos e ampliação de sua ocorrência geográfica. Neste capítulo, são discutidos aspectos relacionados à doença, seu histórico, taxonomia, epidemiologia, seus vetores e reservatórios, métodos de diagnóstico, medidas de controle e tratamento.

Palavras chaves: Brasil, cão, reservatório.

TEGUMENTARY LEISHMANIASIS: A REVIEW

Abstract: Leishmaniasis is a parasitic disease caused by protozoans of the genus *Leishmania* sp., which is transmitted through the bite of sandflies from the Psychodidae family, genus *Lutzomyia* sp. In Brazil, there are seven species of *Leishmania* responsible for the disease in humans; *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* have wide geographical distribution and incidence. Several species of sandflies are involved in the transmission of the parasite. It is a disease that has accompanied humans since the ancient times and has shown an increase in the number of cases and also in its geographical distribution. In this study, we discuss several aspects related to the disease, its history, taxonomy, epidemiology, vectors and reservoirs, diagnostics, control measures and treatment.

Key words: Brazil, dog, host.

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar é causada por parasito do gênero *Leishmania*, transmitido pela picada de flebotomíneos infectados (REY, 2001) e tem como hospedeiros vertebrados diferentes espécies animais e o homem. A infecção se caracteriza pelo parasitismo de células fagocíticas mononuclear e acomete a pele e/ou mucosas de vias aéreas superiores (COURA, 2005).

A doença está amplamente difundida pelo Mundo estando presente na Ásia, África do Norte, Sul da Europa e Américas, onde afetam 88 países e cerca de 370 a 400 milhões de pessoas então sob-risco de adquirir a doença. A Organização Mundial de Saúde estima que a incidência anual de casos novos/ano seja avaliada em dois milhões de pessoas (WHO, 2004).

Esta patologia pode se apresentar de três formas clínicas a cutânea (LC), a difusa (LCD) e a cutâneo-mucosa (LCM). A forma mucosa é mutilante na ausência de terapêutica. A multiplicidade de formas clínicas está relacionada à espécie do parasito e a variação da resposta imune do hospedeiro (DESJEUX, 2004).

1.1 HISTÓRICO DA LTA

O gênero *Leishmania* foi oficialmente descrito por ROSS, 1903 no Velho Mundo. No Novo Mundo ou continente Americano a primeira espécie do parasito descrita foi *Leishmania braziliensis* por Gaspar Vianna em 1911 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

No entanto, os indícios históricos da ocorrência da leishmaniose existiam já na idade pré-colombiana em populações Andinas (THOMAZ-SOCCOL, 1993). Estes registros estão caracterizados nas Américas, pelo encontro de cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C., feitas pelos índios do Peru, que apresentavam mutilações de lábios e nariz que lembram os casos mutilantes da hoje conhecida leishmaniose cutâneo-mucosa (BASANO e CAMARGO, 2004).

Nas Américas as primeiras suspeitas sobre a doença ocorreram em 1885, época em que já registravam casos no Brasil. Alexandre Cerqueira, no Estado da Bahia, foi o primeiro a identificar a existência da moléstia na pele, relatando como “Botão da Bahia” e a suspeitar do papel do flebotomíneo como vetor (VALE e FURTADO, 2005).

A confirmação da presença do protozoário, em úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas, ocorreram no ano de 1909, quando Lindenberg encontrou o parasito em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamento na construção de rodovias no interior de São Paulo (THOMAZ-SOCCOL, 1993; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Splendore (1911) diagnosticou a forma mucosa da doença e Gaspar Vianna, no mesmo ano, propôs a denominação de *Leishmania braziliensis* (BASANO e CAMARGO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

No ano de 1922, Aragão, pela primeira vez, demonstrou o papel dos flebotomíneos na transmissão da leishmaniose tegumentar e Forattini (1958) encontrou roedores silvestres parasitados em áreas florestais do Estado de São Paulo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Em meados de 1939, o Professor Samuel Pessoa e seus colaboradores descreveram a LTA como doença profissional da margem de mata (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

A *Leishmania*, durante o seu ciclo evolutivo, apresenta dois estágios sucessivos e distintos: o estágio promastigota e amastigota.

Promastigotas: estas formas estão presentes no intestino do inseto vetor, são formas flageladas, móveis e medem de 10 a 25 µm de comprimento (FIGURA 02: A-B).

Amastigotas: são formas intracelulares (sistema fagocítico momonuclear), e são parasitos de forma ovalada ou arredondada, medindo de 2 a 6 µm de comprimento, possuem um núcleo central e um cinetoplasto que é característico da ordem Kinetoplastida (FIGURA 01: A-D).

A multiplicação tanto da forma amastigota quanto promastigota ocorre por divisão binária simples (DEDET, 2009).

O ciclo de vida do protozoário é digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Estes últimos são responsáveis pela transmissão dos parasitos de um mamífero a outro (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

As espécies de *Leishmania* são morfológicamente semelhantes, podendo variar de tamanho. Porém, causam doenças clínicas e epidemiológicas distintas. O quadro clínico da doença está relacionado à espécie do parasito e a imunidade do hospedeiro. Além disso, estes variam de acordo com a distribuição geográfica, os hospedeiros e vetores envolvidos, a taxa de incidência e mortalidade (MARZOCHI, 1991).

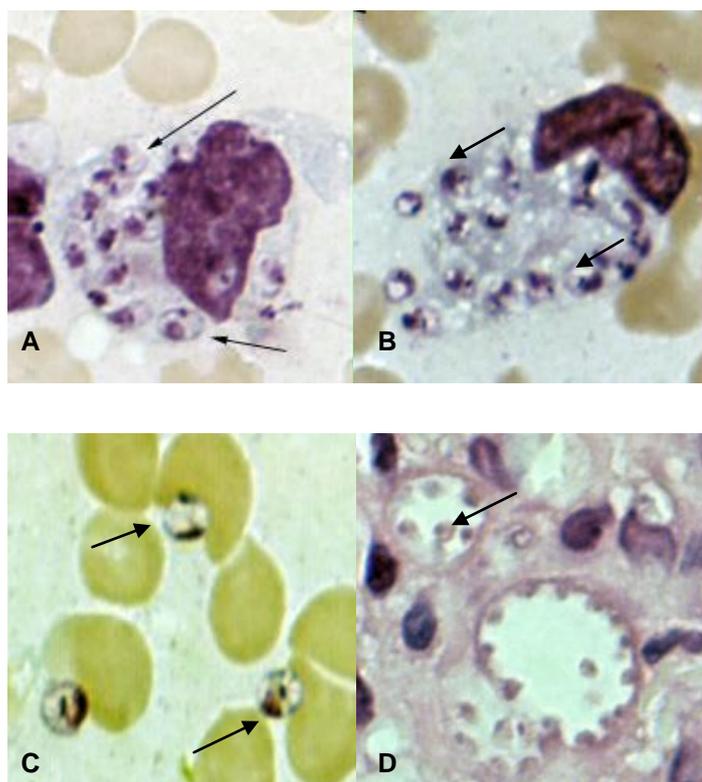


FIGURA 01 - (A, B e C) Esfregaço por aposição de material biopsiado de lesão de pacientes positivos para *Leishmania* sp.: formas aflageladas ou amastigotas (coloração de Giemsa, 100X, setas). (D) Exame histopatológico de material biopsiado de lesão de paciente positivo para *Leishmania* sp.: formas promastigotas (coloração Hematoxilina eosina, 40X, setas). Fonte: www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm

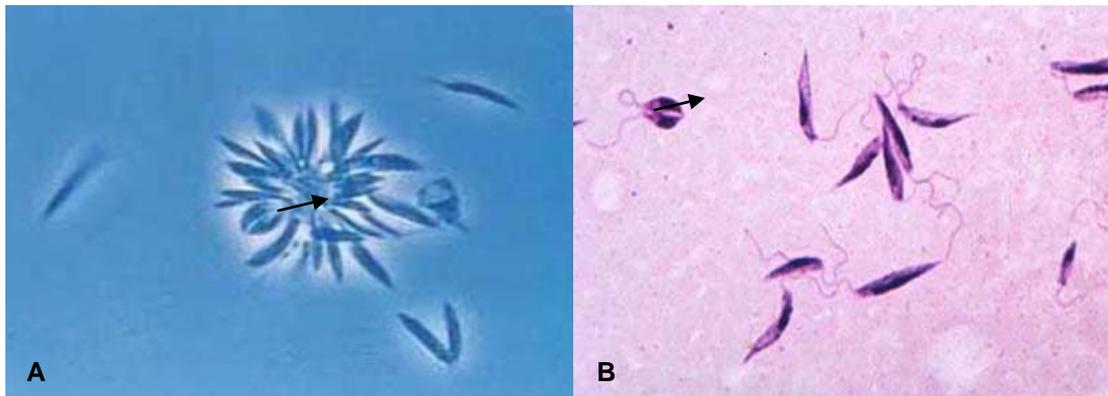


FIGURA 02 – (A e B) Formas flageladas ou promastigotas de *Leishmania* sp. desenvolvidas em meio de cultura (seta). Fonte: www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.h...

A taxonomia do gênero é bastante controversa desde a descrição das primeiras espécies, pois se trata de um parasito que produz clinica diferente (cutânea e visceral), possui reprodução assexuada e são estruturalmente similares, o que dificulta a definição de espécie (THOMAZ SOCCOL, 1993; VALE e FURTADO, 2005), impossibilitando a diferenciação das espécies por critérios Linneanos.

Primeiramente os critérios empregados foram extrínsecos: clínico, epidemiológico, geográfico, e o desenvolvimento de promastigotas no intestino do vetor flebotômíneo. Caracteres intrínsecos foram usados nos anos 90 visando esclarecer a sistemática e a validação das espécies já descritas (LAINSON e SHAW, 1987; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993; VALE e FURTADO, 2005; CUPULLILO *et al.*, 2005).

Dentre os caracteres intrínsecos utilizados estão à mobilidade eletroforética de isoenzimas; a determinação da densidade flutuante do DNA do núcleo e do cinetoplasto; a análise de produtos de degradação do DNA por enzimas de restrição, a respirometria, a caracterização de antígenos específicos de membrana externa pelos anticorpos monoclonais, as técnicas de hibridização do DNA/RNA e a análise do DNA do cinetoplasto por meio da técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (LAINSON e SHAW, 1987; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993; VALE e FURTADO, 2005; CUPULLILO *et al.*, 2005).

Com os avanços representados pela bioquímica e biologia molecular foi possível utilizar caracteres intrínsecos e novas proposições de classificação

foram feitas a nível infra específico (RIOUX *et al.*, 1990, THOMAZ-SOCCOL, 1993a, THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993b, CUPOLLILO *et al.*, 1994;).

Em nível supra genérico a classificação proposta por LEVINE (1980) é ainda aceita e está abaixo descrita.

- Reino: Protista, Haeckel, 1866
- Sub-reino: Protozoa , Golfuss, 1817
- Filo: Sarcomastigophora, Honigberg e Balamuth, 1963, 1981
- Sub-filo: Mastigophora, Desing, 1866
- Classe: Zoomastigophorea, Calkins, 1909
- Ordem: Kinetoplastida, Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976
- Sub-ordem: Trypanosomatina, Kent, 1880
- Família: Trypanosomatidae, Doflein, 1901, emend. Grobben, 1905
- Gênero: *Leishmania*, Ross, 1903 emend. Saf'janova, 1982
- Em nível infra genérico a classificação mais utilizada na atualidade seguem o modelo taxonômico de divisão do gênero em dois subgêneros:
 - *Leishmania* – SafJanova, 1982
 - *Viannia* – Lainson e Shaw, 1987

Em nível infra específico, devido a grande variabilidade genética intra específica THOMAZ-SOCCOL (1993) propõe o agrupamento em complexos filogenéticos (FIGURA 03) tanto para as espécies do Novo quanto as do Velho Mundo. O autor propõe a teoria de origem monofilética do gênero, com base em 20 espécies de *Leishmanias* de diferentes partes do Mundo. A origem remontaria aos períodos cretáceos e jurássicos, há 120 milhões de anos, quando os continentes ainda estavam unidos na pangéia. Estes complexos possuem uma grande variabilidade genética, com repartições geográficas bastante particulares enquanto outras podem ocorrer em condições simpátricas (FALQUETO, 2003).

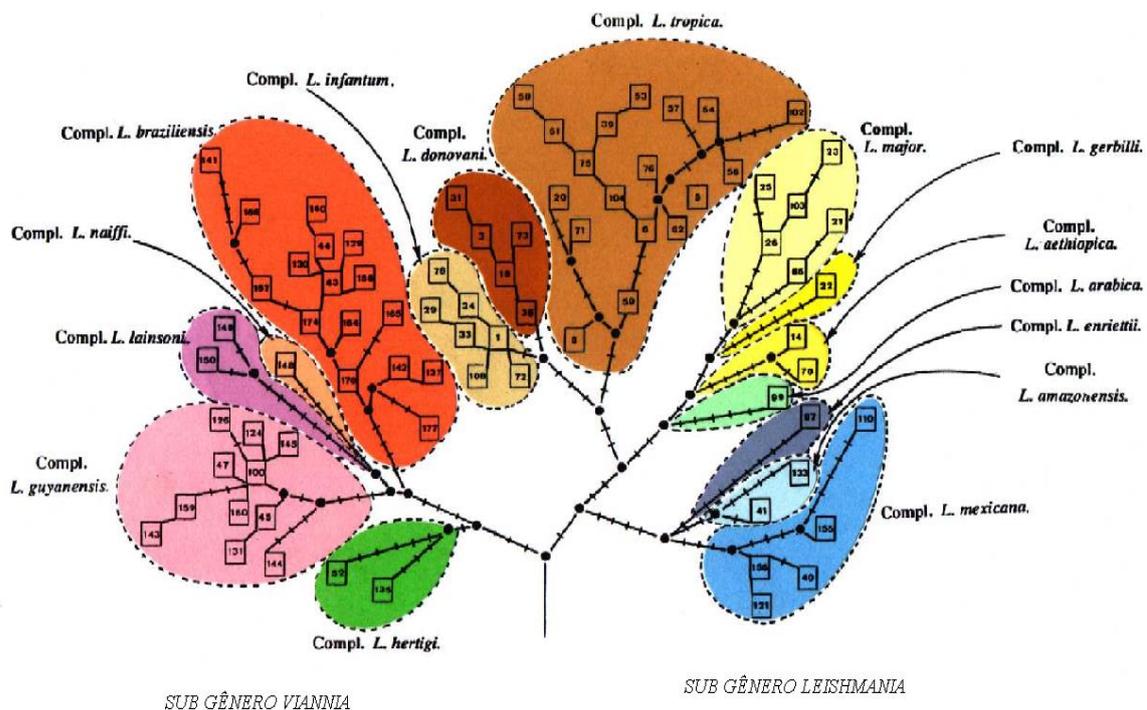


FIGURA 03- Cladograma mostrando a relação dos 15 complexos filogenéticos do gênero *Leishmania* e a inserção das espécies nos complexos. A análise filogenética foi realizada com base em 80 zimodemas e 13 diferentes isoenzimas utilizando o programa Felsenstein e o método de parcimônia. Fonte: Thomaz-Soccol, 1993.

No Brasil até o momento seis espécies de *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, foram identificadas como causadoras da LTA em humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007):

Subgênero *Viannia*

- *Leishmania (Viannia) braziliensis*: é a espécie mais prevalente no homem podendo causar lesões cutâneas e mucosas. É encontrada desde o norte até o sul do país, tanto em áreas de colonizações antigas como recentes, estando associadas à presença de animais domésticos, como cães, cavalos, jumentos e até gatos (SILVEIRA, 1996; SILVEIRA, 2004). É transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos como *Lutzomyia whitmani*, *Lu. wellcomei* e *Lu. intermedia*, dentre outras.

- *Leishmania (V.) guyanensis*: é responsável pela forma cutânea e ou cutâneo disseminada. Ocorre na margem norte do Rio Amazonas em áreas de colonização recente, estando associada a desdentados e marsupiais. Seu principal vetor, apresenta o hábito de pousar durante o dia em troncos de árvores e picar o homem quando perturbado. As principais espécies envolvidas na transmissão são a *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani*.
- *Leishmania (V.) naiffi*: no hospedeiro causa LTA de evolução benigna. Tem distribuição geográfica restrita a Amazônia, tendo sido assinalada nos Estados do Pará e Amazonas. Seus principais vetores são a *Lu. squamiventris*, *Lu. paraensis* e *Lu. ayrozal* e os reservatório naturais são os tatus.
- *Leishmania (V.) shawi*: responsável por casos esporádicos em humanos e foi assinalada no Amazonas e Pará. Tem como reservatórios vários animais silvestres como macacos, preguiças e procionídeos e como vetor *Lu. whitmani*.
- *Leishmania (V.) lainsoni*: causam lesões cutâneas com pouca freqüência. É registrada apenas na Amazônia. Tem como reservatório natural paca e como vetor *Lu. ubiquitalis*,

Subgênero *Leishmania*

- *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: causa no homem a forma cutânea e em pacientes anérgicos a forma cutânea difusa. Apresenta como principal vetor flebotomíneos de hábitos noturnos, vôo baixo e são pouco antropofílicos, incluindo *Lu. flaviscutellata* e *Lu. olmeca*. Seus reservatórios são roedores e marsupiais. É uma espécie resistente a mudanças ecológicas, sobrevivendo em áreas de reflorestamento.

1.3 PRINCIPAIS HOSPEDEIROS

1.3.1 Vetores

Os vetores de *Leishmania* são dípteros hematófagos, denominados flebotomíneos também conhecidos como cangalha, cangalhinha, mosquito-palha, asa dura, asa branca, ligeirinho, pela-égua, arrupiado, birigui, tatuíra, frebóti, orelha de veado, que constituem um grupo de insetos hematófagos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae) (MARZOCHI, 1992) (FIGURA 04 A-C).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, passando pelas fases de ovo, quatro estádios larvários, pupa e adulto. A duração de cada estágio varia de acordo com as espécies, com as condições climáticas e com o tipo de alimentação de que dispõem (RANGEL, 2003).

O vetor, ao picar o homem ou o animal parasitado, suga junto com o sangue ou com a linfa as formas amastigotas, que se transformarão em promastigota no interior do tubo digestivo. Ao alimentar-se com o sangue de outros animais ou pessoas, o inseto passa a regurgitar o material aspirado ficando assegurada, desse modo, a inoculação de formas infectantes (promastigotas) em um novo hospedeiro vertebrado. A simples presença de *Leishmania* no trato intestinal de um flebotomíneo não o define como vetor. É necessário avaliar a sua capacidade de transmissão para incriminá-lo como vetor (GRIMALDI *et al.*, 1989).

O ciclo de *Leishmania* no vetor depende das espécies do protozoário e do inseto, bem como das condições ambientais, e demora geralmente de 6 a 14 dias (MARTÍNEZ-MORENO *et al.*, 1999).

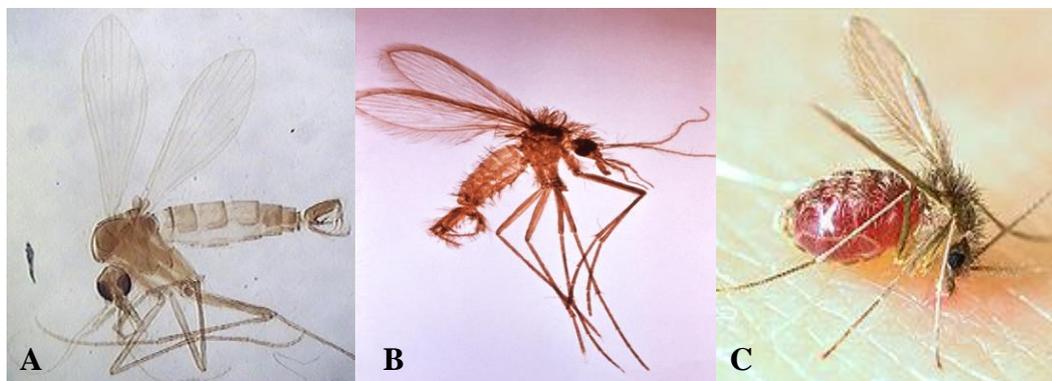


FIGURA 04 – Vetores de *Leishmania* sp. (A e B) machos (C) fêmea ingurgitada de sangue. Fonte: www.ufrgs.br/.../Athropoda/Lutzomyia.htm

1.3.2 Reservatórios

Apenas mamíferos, entre os vertebrados, foram identificados como portadores de protozoários do gênero *Leishmania*. No Velho Mundo são relatadas 37 espécies como verdadeiros reservatórios e 51 no Novo Mundo (DEREURE, 1999). Os mamíferos podem ser hospedeiros acidentais, irrelevantes na manutenção do parasito a longo prazo, ou hospedeiros reservatórios, essenciais à sua persistência e transmissão aos seres humanos (WHO, 1990).

Segundo BRAY (1982), um hospedeiro reservatório para ser eficaz na manutenção do ciclo do parasito deve ser abundante; ter contato com o homem e com os flebotomíneos e para os quais será a principal fonte de alimentação. Para alguns autores a noção de reservatório implica na não patogenicidade por parte do agente. Uma noção importante é a da sintonia entre o reservatório e o vetor: para que haja transmissão aos humanos, é necessário que o nicho ecológico dos vetores intercepte o de um reservatório silvestre ou doméstico e o do homem (DEREURE, 1999).

SAVANI (1998) considera que uma espécie de vertebrado para ser considerado um bom reservatório para *Leishmania* necessita apresentar algumas características como: ter contato com o homem e o vetor; suportar a presença do organismo patogênico por longo período, antes da morte ou recuperação; ter taxa de infecção de 10% ou mais (susceptibilidade crônica); apresentar o parasito em quantidade suficiente e propiciar a infecção do vetor e ser importante fonte de alimentação dos mesmos.

Segundo ASHFORD (2000), em todos os reservatórios primários a infecção por *Leishmania* é crônica e sem mortalidade significativa; nos seres humanos e hospedeiros reservatórios secundários a doença não deveria ser rapidamente fatal, mas epidemias podem reduzir as populações e até limitar a sua distribuição. A leishmaniose, enquanto processo infeccioso apresenta um espectro extremo do qual se observa desde doença clínica até infecção subclínica ou assintomática (PINELLI *et al.*, 1994; CABRAL *et al.*, 1998).

Em função do hospedeiro vertebrado, GARNHAM (1965) propõe a existência de três tipos de ciclos nas infecções por *Leishmania*. Nos ciclos primários

(savanas da África Oriental, estepes da Ásia Central e floresta amazônica), as leishmanioses zoonóticas envolvem essencialmente animais silvestres e acidentalmente o homem. Nos ciclos secundários (bacia mediterrânea e aglomerados urbanos na China e no Brasil), o caráter silvestre está afastado e o reservatório é doméstico ou sinantrópico. Nos ciclos terciários (sobretudo o subcontinente indiano), os seres humanos constituem o único reservatório e a transmissão é assegurada por flebotomíneos antropofílicos.

1.3.3 Reservatórios Silvestres

Nas Américas mais de 50 espécies de mamíferos silvestres são reconhecidas como reservatórios naturais. Em sua maioria são pequenos roedores, marsupiais, edentados, além de alguns representantes carnívoros silvestres e primatas. Os reservatórios silvestres variam conforme a espécie de *Leishmania* (TOLEZANO *et al.*, 1998). Na TABELA 01 são apresentados os reservatórios conhecidos de algumas espécies de *Leishmania*.

1.3.4 Animais domésticos

Devido à transmissão da LTA ter um aumento evidente no ambiente doméstico, e por diversos estudos terem relatado altas taxas de infecção da LTA em cães, acredita-se que eles também possam ser reservatórios da LTA (CUBA CUBA *et al.*, 1985; COUTINHO *et al.*, 1985). Por outro lado os canídeos (ex. *Cerdocyon thous*), especialmente cães (*Canis familiaris*), estão definidos como hospedeiros reservatórios peridomésticos da LVA.

REITHINGER e DAVIES (2003) afirmam que o cão, na ausência de outro reservatório silvestre alternativo, atuaria como reservatório primário. Entretanto, para outros autores, o isolamento do parasita nestes animais, não distingue seu papel como hospedeiro acidental ou reservatório (CASTRO *et al.*, 2007).

TABELA 01 – LISTA DAS ESPÉCIES DE MAMÍFEROS ENCONTRADOS INFECTADOS NATURALMENTE COM UMA OU MAIS ESPÉCIE DE *Leishmania* NA AMÉRICA LATINA.

Ordem/Família	Reservatório	Espécie do parasito R. Habitual	Hosp. Ocasional
MARSUPIALIA	<i>D. marsupialis</i>		<i>L. guyanensis</i>
	<i>Marmosa sp</i>		<i>L. aristidesi</i>
	<i>Philander opossum</i>		<i>L. amazonensis</i>
PRIMATAS	<i>Cebus apella</i>	<i>L. shawi</i>	
	<i>Chiropetes satanas</i>	<i>L. shawi</i>	
XENARTHRA			
Choloepidae	<i>C. didactylus</i>	<i>L. guyanensis</i>	
	<i>C. hoffmanni</i>	<i>L. panamensis</i>	
Bradypodidae	<i>B. infuscatus</i>		<i>L. panamensis</i>
Myrmecophagidae	<i>T. tetradactyla</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>
Dasypodidae	<i>D. novemcinctus</i>	<i>L. naiffii</i>	
RODENTIA			
Heteromyidae	<i>H. desmarestianus</i>		<i>L. mexicana</i>
	<i>H. anomalus</i>	<i>L. amazonensis</i>	
Cricetidae	<i>Ototylomys</i>	<i>L. mexicana</i>	
	<i>Akodon sp.</i>		<i>L. panamensis</i>
	<i>Oryzomys concolor</i>	<i>L. amazonensis</i>	
	<i>O. capiti</i>	<i>L. aristidesi</i>	<i>L. amazonensis</i>
	<i>O. macconnelli</i>	<i>L. amazonensis</i>	
	<i>N. squamipes</i>	<i>L. amazonensis</i>	
Muridae	<i>Rattus rattus</i>		<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
	<i>R. norvegicus</i>		<i>L. infantum</i>
Erethizontidae	<i>Coendou rothschildi</i>	<i>L. hertigi</i>	
	<i>C. prehensilis</i>	<i>L. deanei</i>	
Caviidae	<i>C. porcellus</i>	<i>L. enriettii</i>	
Dasyproctidae	<i>C. paca</i>	<i>L. lainsoni</i>	
Echinimidae	<i>Proechimys guyanensis</i>	<i>L. aristidesi</i>	<i>L. guyanensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. braziliensis</i>
			<i>L. amazonensis</i>
CARNIVORA	<i>N. nasua</i>		<i>L. panamensis</i>
Procyonidae	<i>P. flavus</i>		<i>L. panamensis</i>
Canidae	<i>C. familiaris</i>	<i>L. infantum</i>	
		<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. braziliensis</i>
			<i>L. panamensis</i>
	<i>Vulpes sp.</i>	<i>L. infantum</i>	
	<i>Cerdocyon sp.</i>	<i>L. infantum</i>	

Da mesma forma, a coincidência do relato de pacientes humanos com LTA e a presença de cães infectados, refletem o fato de que o homem e o cão estão expostos ao mesmo risco de ser picado pelo vetor, mas não há evidência de que este último seja reservatório. PADILLA *et al.* (2002) consideram possível que a principal direção da transmissão seja do homem para o cão, mais do que o contrário e sugerem que os cães são importantes indicadores da ocorrência da LTA humana;

contudo, estes animais podem não ser o principal reservatório a disseminar o parasita, mas um hospedeiro altamente suscetível, possivelmente adquirindo a infecção de seres humanos próximos ou de reservatórios silvestres.

1.3.5 O Homem

Segundo MARZOCHI (1992), os humanos são considerados hospedeiros acidentais, não tendo um papel importante na manutenção dos parasitos na natureza. Esta consideração é válida tanto no ciclo de transmissão primário quanto no ciclo secundário e para as espécies causadoras de LTA, nas Américas. Em algumas áreas endêmicas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* existem evidências de transmissão domiciliar e autores têm sugerido que o homem poderia ser portador assintomático desta espécie (CUNHA *et al.*, 2006).\

1.4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

As leishmanioses cutâneas podem ser divididas em diferentes formas clínicas:

A forma cutânea localizada - representa o acometimento primário da pele e apresenta formas clássicas de úlceras de fundo granuloso e bordas elevadas. A lesão é geralmente única, mas pode ser múltipla (até 20 lesões).

Na Região Norte do país, as lesões múltiplas são freqüentemente causadas por *L. (V.) guyanensis* e parecem estar relacionadas às múltiplas picadas de *Lu. umbratilis*. Já na região sul é causada por *L. (V.) braziliensis* e os vetores são *Lu. whitmani* e *Lu. intermedia* (Luz *et al.*, 2000; Teodoro *et al.*, 2004).

A forma localizada pode acompanhar-se de linfadenopatia regional e de linfangite nodular. Esta forma de leishmaniose tem tendência à cura espontânea e apresenta boa resposta ao tratamento.

A forma cutânea disseminada - é uma expressão menos freqüente que pode ser observada em até 2% dos casos. As duas espécies reconhecidas

como causadoras desta síndrome são a *Leishmania (V.) braziliensis* e a *Leishmania (L.) amazonensis*.

Esta forma de apresentação é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco. O número de lesões pode alcançar centenas. A história natural da doença nestes pacientes inicia com uma ou várias lesões localizadas com as características clássicas de úlceras de fundo granuloso e bordas elevadas.

A adenomegalia satélite observada em mais da metade dos casos da forma localizada da doença raramente é detectada nos pacientes com a forma disseminada e quando se apresenta é de forma discreta. Posteriormente ao desenvolvimento das lesões primárias, acontece um fenômeno provavelmente por disseminação do parasito por via hemática ou via linfática, mais ou menos aguda, que se estabelece em poucos dias, às vezes em 24 horas, causando lesões distantes do local da picada.

Também se observa manifestações sistêmicas, como febre, mal-estar geral, dores musculares, emagrecimento, anorexia, entre outros. A detecção do parasito na forma disseminada é baixa, quando comparado com a forma difusa. Finalmente, têm sido descritos pacientes vivendo com HIV com apresentações disseminadas de LTA. No entanto, nos pacientes com HIV ainda não foram relatados casos com todas as características clínicas da síndrome disseminada clássica descrita acima, predominando as lesões ulceradas em vários segmentos corporais. De qualquer maneira, esta forma rara de apresentação pode indicar co-infecção *Leishmania*-HIV, tornando-se recomendável a investigação da infecção por este vírus.

A forma recidiva cútis - caracteriza-se por evoluir com cicatrização da úlcera de forma espontânea ou medicamentosa, com reativação localizada geralmente na borda da lesão.

O acometimento mucoso pode ser concomitante e tem sido observado em até 30% dos pacientes.

A forma cutânea difusa - no Brasil é causada pela *L. (L.) amazonensis*. Constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em

pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia de maneira insidiosa, com lesão única e evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões cutâneas (BRASIL, 2007).

Em geral a LT ou também denominada de leishmaniose cutânea (LC) tem uma tendência para cicatrizar espontaneamente, deixando cicatrizes extensas e que, dependendo da espécie de *Leishmania*, pode evoluir para recidivantes, difíceis de tratar. O estado imunitário do indivíduo parece ter papel fundamental na forma evolutiva da doença. As lesões localizam-se nas partes do corpo que estão expostas à picada do flebotomíneo vetor: face, mãos, membros superiores e inferiores (CASTRO *et al.*, 2002).

Em decorrência da leishmaniose apresentar este amplo espectro clínico, o diagnóstico de casos novos e antigos é difícil. É importante realizar o diagnóstico diferencial, pois doenças causadas por outras etiologias com clínica similar geralmente estão presentes em áreas endêmicas de leishmaniose, por exemplo lepra, câncer de pele, micoses cutâneas e tuberculose, entre outras (DAVIES *et al.*, 2000, PEREIRA *et al.*, 2008). A LC é geralmente não fatal e é caracterizada comparativamente a uma doença benigna limitada à pele e associada a uma forte tendência à resolução espontânea (REITHINGER, 2008).

1.5 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

As leishmanioses são consideradas endêmicas em 88 países (66 no Velho Mundo e 22 no Novo Mundo; 72 dos quais em desenvolvimento), dos trópicos, subtropicais e sul da Europa, em ambientes que variam de floresta nas Américas ao deserto na Ásia, e de áreas rurais a urbanas (HERWALDT, 1999). O sudeste asiático e a Oceania são as únicas grandes superfícies do planeta com clima propício aos vetores e onde as leishmanioses estão ausentes (ASHFORD, 2000).

Calcula-se que as leishmanioses afetem pelo menos 12-14 milhões de pessoas numa população de aproximadamente 350 milhões em risco, com uma incidência anual de 2 milhões de casos e mortalidade de 80 mil (ALVAR, 1997;

WHO, 2001). As formas cutâneas são as mais comuns, representando 50 a 70% de todos os novos casos anuais (DESJEUX, 1996). Noventa por cento dos casos de LC ocorrem no Afeganistão, Arábia Saudita, Argélia, Brasil, Irã, Iraque, Peru e Síria. Cerca de 90% dos casos de LV são encontrados em três regiões: Sudão, Etiópia e Quênia; Índia, Bangladesh e Nepal; e nordeste do Brasil (DAVIDSON, 1999; WHO, 2001).

Dado as leishmanioses serem de notificação obrigatória em apenas 40 dos países endêmicos, os números oficiais subestimam, com frequência, a realidade (GUERIN *et al.*, 2002). Não obstante, verifica-se um aumento de doença no homem em muitas áreas, devido a fatores tais como a urbanização, o desmatamento, a subnutrição, a imunodepressão e também a alterações naturais do meio ambiente, como o aquecimento global (DESJEUX, 2001).

A leishmaniose cutânea ocorre nas Américas desde o sul do México até o Norte da Argentina (CASTRO, 2001). A incidência desta doença vem aumentando na América Latina, especialmente no Brasil, que registrou 610.256 casos, de 1990 a 2008. Neste período, na Região Sul um total de 12.115 casos foram notificados, dos quais 11.557 (95,39%) no Estado do Paraná, onde está presente nas regiões norte, Central e Vale do rio Ribeira (CASTRO *et al.*, 2007; THOMAZ SOCCOL *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2009). Nas regiões norte e noroeste do Paraná têm sido assinalados casos de LTA desde o início de sua colonização. Após a campanha de controle da malária, significativa redução no número de casos foi observada até os anos 80 (LUZ informação pessoal). A partir daí estas regiões vem mostrando caráter endêmico (VERZIGNASSI *et al.*, 1988).

Oficialmente, no Estado do Paraná, a leishmaniose passou a ser notificada a partir de 1980 (SILVEIRA *et al.*, 1999). Foram notificados 540 casos de LTA no ano de 2008, representando 86,4% dos casos da região Sul. Os casos estão distribuídos em 188 (47%) municípios do Estado e apresentam uma incidência de 9,4 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2008) (FIGURA 07). Atualmente, todos os Estados federativos têm registros da enfermidade, sendo que *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* são as espécies com maior distribuição geográfica (FIGURA 08). Três perfis epidemiológicos são observados:

Leishmaniose tegumentar puramente silvestre: ocorre através de surtos epidêmicos associados à derrubada das matas (construção de estradas, gasodutos, instalação de povoados em regiões pioneiras) e à exploração desordenada das florestas (extração de madeira, agricultura, mineração).

Leishmaniose tegumentar puramente silvestre modificada: ocorre através de surtos epidêmicos sazonais, em áreas com pequenos focos residenciais de mata primária. A infecção tem lugar na interface da área peridomiciliar e nas áreas de mata, onde o homem costuma desenvolver atividades ligadas à agricultura, estando ligada às flutuações da densidade populacional dos flebotomíneos.

Leishmaniose tegumentar periurbana: ocorre de forma endêmico-epidêmico, endo ou peridomiciliar, em áreas de colonização antiga onde há suspeita da participação de animais domésticos como reservatórios (cães, gatos e eqüinos) (BASANO, 2004).

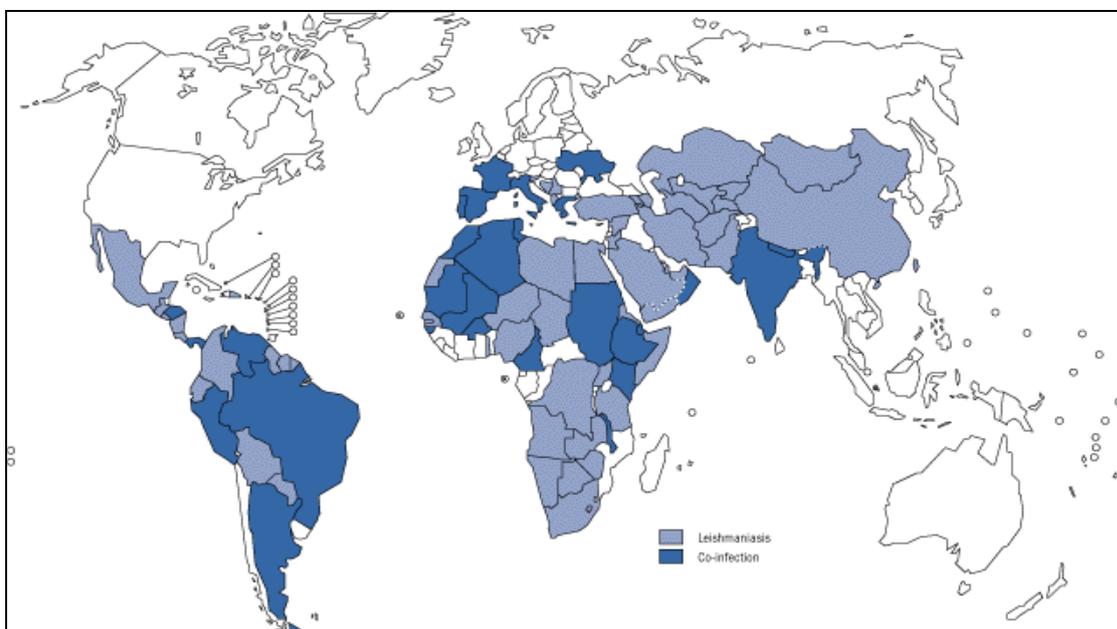


FIGURA 05 – Distribuição da Leishmaniose Tegumentar no Mundo.
Fonte: www.who.int/.../en/index.html

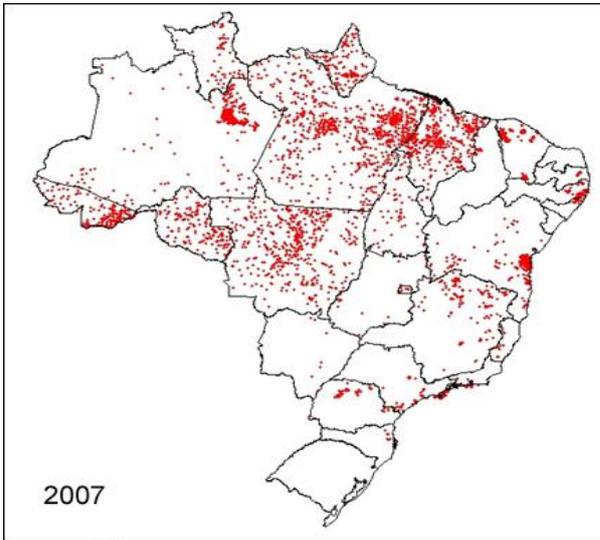


FIGURA 06 – Distribuição da Leishmaniose Cutânea no Brasil. Fonte: Ministério da Saúde, 2007.

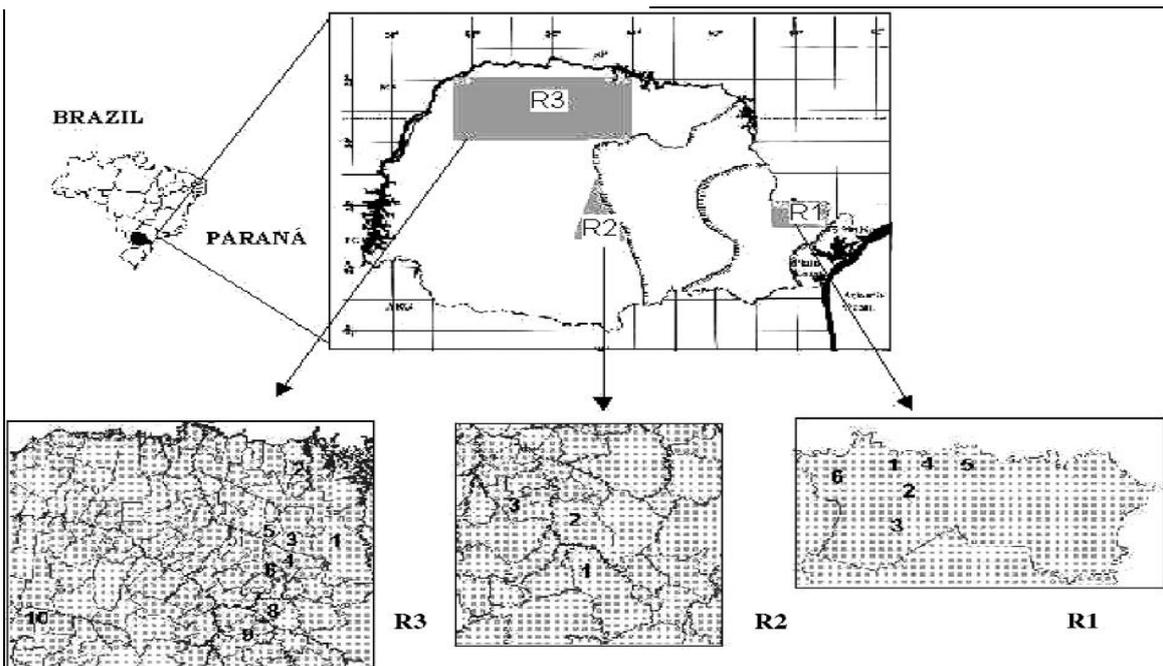


FIGURA 07– Localização geográfica de Leishmaniose Cutânea em três regiões estudadas no Estado do Paraná. R1- Vale da Ribeira; R2 Região Central e R3 – Região Norte do Estado. Fonte: CASTRO *et al.*, 2007

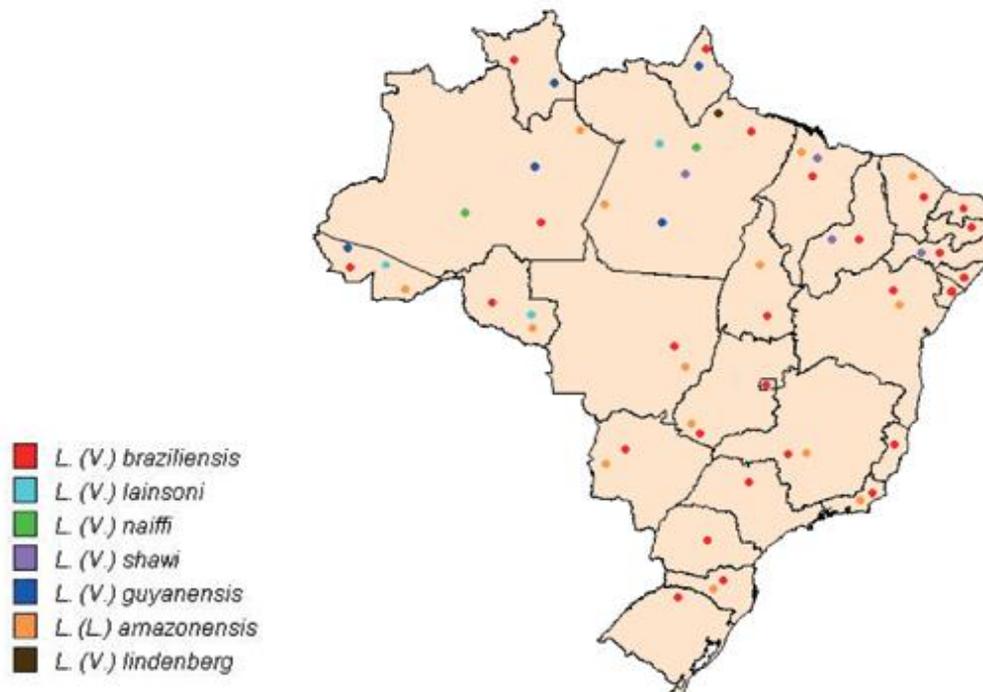


Figura 08 – Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 2005. Fonte: SVS/MS

Não só no Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a LTA constitui problema de saúde pública. Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (SILVA, 1999).

Houve uma mudança no padrão de transmissão e no perfil dos pacientes afetados, inicialmente os casos predominavam em adultos jovens do sexo masculino, porque estes viviam e trabalhavam na zona rural (OLIVEIRA, 2004) e com a transmissão ocorrendo em periferias de área urbana em ambientes domiciliares e peridomiciliares, a doença passou a atingir também crianças e mulheres (TEODORO, 1993). Houve um aumento no registro de casos da co-infecção *Leishmania*-HIV, passando a ser considerada como emergente e de alta gravidade (MARCONDES, 2001).

O padrão de transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Paraná tem vínculo com o ciclo silvestre do parasito em focos naturais que persistem em áreas florestais preservadas como rugosidades em zonas de produção agropecuária tradicional. As ações antrópicas no ambiente, a urbanização crescente e as pressões sócio-econômicas têm expandido as áreas endêmicas e o aparecimento de focos de leishmaniose tegumentar em zonas urbanas. Neste ambiente, a doença tem ocorrido em áreas com preservação de pequenos trechos de cobertura florestal (TEODORO *et al.*, 1998; CASTRO 2001; LIMA *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2008; THOMAZ SOCCOL *et al.*, 2009).

A soroprevalência pode variar bastante entre áreas contíguas (DEPLAZES *et al.*, 1998; CARDOSO *et al.*, 2004), devido a fatores tais como mudanças nas populações de flebotomíneos que afetam a dinâmica natural de transmissão do parasita (KILLICK KENDRICK, 1990; PIRES, 2000).

1.6. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico da leishmaniose baseia-se no aspecto clínico, epidemiológico, e exames laboratoriais (parasitológico, imunológico e molecular). Frequentemente a associação de alguns desses elementos são necessários para se chegar ao diagnóstico definitivo (SZARGIKI *et al.*, 2009).

1.6.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico da LTA pode ser feito com base nas características da lesão associada à anamnese. A LTA produz um amplo espectro de lesões, o que torna o diagnóstico de casos agudo ou crônico, nem sempre simples e imediato (GONTIJO *et al.*, 2003).

1.6.2 Diagnóstico Epidemiológico

Com relação ao diagnóstico epidemiológico, segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2000) nos casos de leishmaniose cutânea, deve-se observar dados

epidemiológicos como a existência de casos humanos ou caninos de LTA procedentes de área endêmica, locais de residência anteriores, verificar se o indivíduo praticou atividades relacionadas ao desmatamento ou atividades de lazer em florestas; referências de animais domésticos, como cães ou eqüinos, com lesões e residindo nas proximidades, a presença de animais silvestres, a existência de mata próxima a residência, entre outras questões relacionadas a esta enfermidade.

1.6.3 Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico parasitológico é considerado padrão-ouro (ou seja, tem 100% de especificidade) no diagnóstico das leishmanioses cutâneas. Tem como objetivo demonstrar formas amastigotas em aspirados de lesões ou esfregações de biópsia. Estes devem ser corados com Giemsa e examinados em microscopia ótica no aumento de 1000x. Ou ainda pode-se proceder a biópsia de lesão fixar em formol para análise histopatológica ou imunohistoquímica, ou ainda, a biópsia pode ser triturada ou aspirados para inoculação em meio de cultura (ASHFORD, 2000; REITHINGER *et al*, 2007b).

O exame microscópico deveria ser o mais utilizado pelo ao baixo custo, facilidade de processamento e alta especificidade. Porém, devido a baixa sensibilidade e a exigência de pessoal treinado nem sempre é utilizada. A técnica de isolamento do parasito em cultivo de tecido de lesão é o método que nos fornece um número maior de informações, possibilitando a identificação e caracterização da espécie. A sensibilidade pode chegar acima de 70% quando adequadamente realizado (PEREIRA *et al.*, 2008, SZARGIKI *et al.*, 2009).

1.6.4 Diagnóstico Imunológico

Os métodos sorológicos são testes de referência no diagnóstico das leishmanioses, principalmente devido a elevada sensibilidade e especificidade que revelam. São técnicas amplamente utilizadas, fáceis de serem realizadas, requerem mínimos conhecimentos tecnológicos e instalações laboratoriais, além de permitirem a realização de grandes quantidades de amostras (REITHINGER *et al.*, 2007a).

Todavia, nem sempre são utilizadas por apresentarem limitações como reação cruzada com outros tripanossomatídeos, falta de resposta humoral em indivíduos imunocomprometidos, resultados positivos em indivíduos que tiveram contato com o parasito, porém não desenvolveram a doença e fraca sensibilidade devido ao baixo título de anticorpo (WEIGLE *et al.*, 2002; GUEVARA *et al.*, 1992, ALVAR *et al.*, 1989, PIÑERO *et al.*, 1999).

Outro método de diagnóstico imunológico convencional é a intradermorreação de Montenegro (IDRM). Esta técnica avalia a presença de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania*, portanto não discrimina se o indivíduo apresenta uma infecção recente ou passada, ou qual a espécie de *Leishmania* causadora da lesão.

A resposta pode desaparecer após alguns anos ou permanecer positiva por toda a vida, não estando claro se isto se deve à presença do parasito no organismo ou a permanência do indivíduo na área endêmica. Na prática, a história epidemiológica, o aspecto clínico das lesões e a IDRM positiva são bons indicadores para o diagnóstico presuntivo da LTA, e com frequência representam a única opção disponível para o médico (HERWALDT, 1999; COURA, 2005)

1.6.5 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular foi desenvolvido extensivamente durante a última década baseado principalmente na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). A principal aplicação da PCR no diagnóstico da leishmaniose é decorrente da rapidez na detecção do DNA de *Leishmania* sp em amostras clínicas. O acondicionamento das amostras pode variar, ou seja, as amostras podem ser refrigeradas, congeladas, ou em temperatura ambiente, ainda mais, podem ser fixadas em formol, ou embebidas em parafina em cortes histológicos.

O uso da PCR ainda possui uma importante aplicação epidemiológica pelo monitoramento da clínica e terapêutica dos pacientes com LTA. Por exemplo, a detecção do parasito no sangue de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, pode indicar que estes estejam em risco de desenvolver a doença mucocutânea. Outra aplicação da PCR é a identificação e caracterização

das espécies de *Leishmania*, quando associada ao seqüenciamento (DAVIES *et al.*, 2000; CAMARGO *et al.*, 2006).

1.7 TRATAMENTO

A droga de primeira escolha para todas as formas clínicas de leishmaniose é o antimonial pentavalente conhecido por glucantime®, embora as formas mucosas exijam maior cuidado com a dosagem e persistência no tratamento, por apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivar. Como efeito colateral podem ocorrer dores musculares e articulares, náuseas, dores abdominais, febre, dor de cabeça, artralgia, mialgia, cefaléia, anorexia, entre outros (FERNANDES, 2004). Geralmente estes sintomas são discretos e não exigem a suspensão do tratamento.

A anfotericina B, droga de 2ª escolha. É um antibiótico de reconhecida ação leishmanicida e é indicada nos casos mais graves ou nos indivíduos que não respondem ao tratamento com antimonial (GONTIJO, 2003).

As lesões ulceradas podem sofrer contaminação secundária, razão pela qual devem ser prescritos cuidados locais.

Segundo o MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL, 2007), nas formas cutâneas localizadas e disseminadas a dose do antimoniato varia entre 10 a 20 mg/Kg/dia. Sugere-se 15 mg/Kg/dia tanto para adultos quanto para crianças, durante 20 dias seguidos. A dose diária não deve ultrapassar 15 mL (três ampolas), se não houver cicatrização completa três meses (12 semanas) após o término do tratamento, o esquema deverá ser repetido, prolongando-se desta vez, a duração da série para 30 dias.

Persistindo o insucesso terapêutico, deve ser utilizada uma das drogas de segunda escolha. Em todas as formas de acometimento mucoso a dose do antimonial recomendada é de 20 mg/Kg/dia, durante trinta dias consecutivos, preferencialmente em ambiente hospitalar. Se não houver cicatrização completa após três meses deverá ser repetido apenas uma vez.

As drogas não podem ser administradas em gestantes, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas. Devido às alterações hepáticas para sua utilização é recomendada a abstinência de bebidas alcoólicas e repouso físico durante o tratamento.

1.8 PREVENÇÃO E CONTROLE

O controle da leishmaniose no Novo Mundo é complicado devido a variedade de agentes etiológicos, de vetores e de reservatórios, associado a ação do homem no meio ambiente, e pelo fato de cada um destes parasitos demonstrar um padrão epidemiológico único. As estratégias para o controle devem ser específicas, daí a necessidade de se considerar o padrão epidemiológico regional e o comportamento de transmissão em cada local (FALQUETO, 2003; NASSER *et al.*, 2009).

O êxito das estratégias contra as doenças endêmicas que, em geral, ocorrem em áreas de pobreza e de subdesenvolvimento, depende basicamente da disponibilidade de recursos econômicos e, necessariamente, do conhecimento das competências locais e atitudes da população diante do problema mórbido, relevantes para a aceitação e participação efetivas nas ações profiláticas (SANTOS *et al.*, 2000)

Segundo o Ministério da saúde o controle da LTA deve ser abordado, de maneira abrangente, sob cinco aspectos:

1. vigilância epidemiológica,
2. medidas de atuação na cadeia de transmissão, através de redução de vetores,
3. vigilância e tratamento dos casos humanos,
4. medidas educativas e administrativas
5. eliminação de reservatórios infectados,

Esta última é discutível, pois em se tratando de animais silvestres torna-se impossível detectar os animais parasitados. A vigilância epidemiológica tem como objetivo diagnosticar e tratar precocemente os casos humanos, a sua

confirmação, o registro de sua terapêutica, o registro das variáveis básicas, fluxo de atendimento e informação (BASANO, 2004).

Imprescindível também é finalizar as análises de dados e distribuí-los em indicadores epidemiológicos (casos autóctones em valores absolutos e os coeficientes gerais e proporcionais) e indicadores operacionais (proporção de métodos diagnósticos auxiliares, cura, abandono e tratamento regular), para que seja caracterizada a distribuição geográfica da doença e de seu perfil clínico e epidemiológico (BASANO, 2004).

As medidas de atuação devem ser baseadas nas características epidemiológicas em particular, aliadas a um sistema de saúde básico, diagnóstico precoce e tratamento adequado.

O controle químico poderá ser efetuado desde que:

- 1- tenha sido efetuada a delimitação da área do foco e definido o espaço de transmissão (que poderá ser o local de residência, local de trabalho ou área para onde o paciente tenha se deslocado)
- 2- haja demonstração que existem fatores condicionantes de transmissão (presença de flebotomíneos vetores em áreas onde houve modificação do ambiente natural)
- 3- que tenha sido detectado um ou mais casos autóctones, (BRASIL, 2007).

As medidas de controle químico com inseticidas de ação residual só serão empregadas quando for constatada que a transmissão ocorreu no ambiente domiciliar e quando for detectado dois ou mais casos humanos na área de foco, no período de seis meses, da notificação do primeiro caso. Para tanto são utilizados inseticidas da classe dos piretróides (deltametrina) (BRASIL, 2007; MURRAY *et al.*, 2005) (BRASIL, 2007; UCHÔA *et al.*, 2004).

Quanto às medidas educativas as atividades de educação em saúde devem estar inseridas em todos os serviços que desenvolvem ações de controle de LTA, requerendo o envolvimento efetivo das equipes profissionais nas diferentes unidades de prestação de serviços e capacitação das equipes englobando conhecimento técnico, os aspectos psicológicos e a prática profissional em relação à doença e ao doente. O esclarecimento da doença, sua forma de transmissão e

conseqüências para a população torna-se imprescindível como ferramenta auxiliar no controle da LTA (BRASIL, 2007; UCHÔA *et al.*, 2004).

Para medida de proteção individual, são recomendados: uso de roupas apropriadas (camisas de manga comprida, calças compridas, meias e sapatos), mosquiteiros, telas finas em portas e janelas, uso de repelentes e evitar a freqüência em horário noturno, a partir das 20 horas (BRASIL, 2007).

Há que se observar que a maioria dos casos de transmissão de leishmaniose ocorre em áreas rurais e de extrema pobreza onde as casas são construídas dentro das matas ou resíduos de matas e são construções precárias. Em áreas de assentamento em que a doença seja endêmica sugere-se que seja feita uma faixa de segurança de 200 a 300 metros entre as residências e a floresta, com cuidado de se evitar o desequilíbrio ambiental (BRASIL, 2007).

Quanto ao controle de reservatórios, não é recomendada a realização de inquéritos sorológicos. A eutanásia em cães só é indicada em situações que o animal apresente lesão cutânea com confirmação diagnóstica, acompanhada da autorização do proprietário (BRASIL, 2007).

As medidas administrativas para controle da Leishmaniose Tegumentar devem ser alvo de uma programação contínua, que tenha como objetivo:

- o diagnóstico do doente, através do atendimento de demanda, fornecimento de insumos para diagnóstico complementar, investigação de focos e recebimento de notificações;
- orientação terapêutica padronizada, com o fornecimento de medicação e acompanhamento do doente;
- a investigação epidemiológica dos focos e adoção de medidas profiláticas pertinentes.

É importante também considerar que apesar de todas as medidas recomendadas pode haver insucesso, pois doenças endêmicas, dentre elas a leishmaniose tegumentar americana são de difícil tratamento, pode haver o abandono do tratamento pelo paciente (BASANO, 2004).

O despreparo das unidades de saúde para o diagnóstico de LTA é, sem dúvida, um grande obstáculo para uma abordagem precoce do doente.

Normalmente, a maior parte dos serviços de saúde não está capacitada a realizar a pesquisa de parasitos em esfregaço da lesão e/ou não possuem o antígeno de Montenegro para se aplicar a intradermorreação. Outros métodos diagnósticos como técnicas sorológicas e PCR ainda não são aplicáveis no âmbito do sistema básico de saúde (BASANO, 2004; MURRAY *et al.*, 2005).

Os diferentes perfis epidemiológicos com os quais a LTA se apresenta sugerem medidas de controle de transmissão diferenciadas. Na forma de transmissão silvestre pura ou modificada, as ações de controle são mais difíceis ou não aplicáveis frente ao caráter zoonótico da parasitose (BASANO, 2004).

Com relação ao perfil de transmissão periurbano, além das medidas antivetoriais e de um eficiente sistema de vigilância epidemiológica, a redução da transmissão está intimamente relacionada com a melhoria das condições de vida da população, problemática que foge ao escopo técnico da área da saúde, representando atualmente mais um obstáculo na abordagem do controle de endemias (BASANO, 2004).

1.9 CONCLUSÃO

As diferenças na morbidade, resposta ao tratamento e prognóstico, evidenciam a importância da caracterização do parasito prevalente em determinada região. No seu conjunto, estes estudos são muito importantes para se compreender a eco-epidemiologia da doença, diagnosticar, tratar, determinar os mecanismos envolvidos e assim definir estratégias e medidas eficientes de profilaxia e controle.

REFERÊNCIAS

ALVAR, J.; BLASQUEZ, R.; NAJERA, R. Association of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus infections. **Journal Infection Diseases**, v. 160, p. 560-561, 1989.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; GUTIÉRREZ-SOLAR, B.; JIMÉNEZ, M.; LAGUNA, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MOLINA, R.; MORENO, J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.10, p. 298-319, 1997.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Intern J.I for Parasitology**, v.30, p. 1269-1281, 2000.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectiva de controle. **Rev. Bras. Epidemiol**, v.7, n.3, p. 328-337, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coordenação de Vigilância epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiologia. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Org: Gerência Técnicas de doenças Transmissíveis por Vetores e Antropozoonoses: Brasília; 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 180 p. (Serie A. Normas e Manuais Técnicos)

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNASA. Programa Nacional de Vigilância e Controle das Leishmanioses. Brasil. Brasília, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNASA. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2008. Brasília, 2009.

BRAY, R. S. The zoonotic potencial of reservoir in the leishmaniasis in the Old World. **Ecol. Dis.**, v. 1, p. 257-267, 1982.

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

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impacto f Leishmaniosis on Public Heath. **J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.**, v. 12, n. 4, p. 527-548, 2006.

CASTRO, E. A. **Papel do Cão na Manutenção do Ciclo de *Leishmania*, Freqüência de Enzoótia através de Estudos Soro-Epidemiológico**. Curitiba,

2001.192 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MEMBRIVE, N.; ASSIS, N.; LUZ, E. Estudos das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar americana notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.35, p.445- 452, 2002.

CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MEMBRIVE, N.; LUZ E. Epidemiological and clinical study of 332 cases of cutaneous Leishmaniasis , manifestations and classification of old world cutaneous. Leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.**, v.46, p. 132-42, 2007.

CARDOSO, L.; RODRIGUES, M.; SANTOS, H.; SCHOONE, G. J.; CARRETA, P.; VAREJÃO, E.; VAN BENTHEM, B.; AFONSO, M. O.; ALVES-PIRES, C.; SEMIÃO-SANTOS, S. J.; RODRIGUES, J.; SCHALLIG, H. D. F. H. Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). **Vet. Parasitol.**, v.121, n.1/2, p. 21-32. 2004.

COURA, J. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: CRUZ, A. M.; PIRMEZ, C. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**, Rio de Janeiro. Editora Guanabara, 2005, v.1, p. 697-712.

CUNHA, J. C. L.; LIMA, J. W. O.; POMPEU, M. M. L. transmissão domiciliar de leishmaniose tegumentar e associação entre leishmaniose humana e canina, durante uma epidemia na Serra de Baturité, no estado do Ceará, Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 9. N. 4, p.425-435, 2006.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JR., G.; MOMEN H. A general classification of the New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, p. 296-311, 1994.

DAVIES, C. R.; REITHINGER, R.; CAMPBELL-LENDRUM, D.; FELICIANGELI, D.; BORGES, R.; RODRIGUEZ, N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries, **Cad. Saúde Pública**, v.16, n.4, p.925-950, 2000.

DAVIDSON, R.N. Visceral leishmaniasis in clinical practice. **J. Infect**, v. 39,p. 112-116, 1999.

DEDET, J.P. Leishmanies, leishmanioses: biologie, clinique et thérapeutique. In: **Maladies Infetieuses**, p. 1-14, 2009.

DEPLAZES, P.; GRIMM, F.; PAPAPRODROMOU, M.; CAVALIERO, T.; GRAMICCIA, M.; CHRISTOFI, G.; CHRISTOFI, N.; ECONOMIDES, P.; ECKERT, J. Canine leishmaniosis in Cyprus due to *Leishmania infantum* MON 1. **Acta. Trop.**, v. 71, p.169-178, 1998.

DEREURE, J.; PRATLONG, F.; DEDET, J.-P. Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean basin. *In* Killick-Kendrick, R. (ed.). *Canine leishmaniasis: an update*. **Hoechst Roussel Vet, Wiesbaden**, v.153, p. 18-25, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Public Health Aspects and Control. **Clinics in Dermatology**, v.14, p.417-23, 1996.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, p. 239-243, 2001.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 27: 305-318, 2004.

DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae) **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, p.1373-1380, 2003.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A.; FERREIRA, A. L.; VIEIRA, V. P.; SANTOS, C. B.; VAREJÃO, J. B. M.; CUPOLILLO, E.; PORROZZI, R.; CARVALHO-PAES, L. E.; GRIMALDI JR, G. Epidemiological and clinical features PF *Leishmania (Viannia) braziliensis* American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.98, n.8, p.1003-1010, 2003.

FERNANDES, N. C.; MORGAN, I.; MACEIRA, J. P.; CUZZI, T.& NOE, R. A. M. Leishmaniose Tegumentar americana: casuística hospitalar no Rio de Janeiro. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.79, n.4, p. 431-439, 2004.

GARNHAM, P.C.C. The *Leishmania*, with special references of the role of animal reservoir. **Am. Zool.**, v.156, n. 5, p.141-151,1965.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M.; BRYCESON, A.D.M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 2, p. 494- 501, 2002.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R.; Leishmaniose Tegumentar Americana. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36., n. 1, p. 71-8-, 2003.

GUEVARA, L.; PAZ, L.; NIETO, E.; LLANOS, A. Use of dot-Elisa procedure for the detection of specific antibodies of new world *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.56, p. 15-26, 1992.

GRIMALDI, J. R.; TESH, R.B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am J Trop Med Hyg**, v. 41, p. 687-725, 1989.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v.354, p. 1191-1199, 1999.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brasil: V Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso State, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, p. 654-667, 1970.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; RONIGBERG, B. M.; LIEEDALE, G. F.; LEOEBLICH, A. R. , LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VÁVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the PROTOZOA. **Journal of Protozoology**, v. 27, p. 37-58, 1980.

LIMA, W. G. (2007). **Leishmaniose visceral canina: estudo quantitativo e Comparativo da expressão do receptor do complemento do Tipo 3 (cr3 – cd11b/cd18) com alguns aspectos histológicos e Parasitológicos do baço, fígado e linfonodos de cães Naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Setor de Patologia Básica, Belo Horizonte, 2007, 111p.

MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**, editora Atheneu, SP, BH, RJ, 2001.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; GÓMEZ-NIETO, C.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S. Leishmaniosis canina. *In*: Cordero-del-Campillo, M.; Rojo-Vázquez, F.A. **Parasitología veterinaria**. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, p. 652-665, 1999.

MARZOCHI, M. C. A. & MARSDEN, P. P.. Ecologia e Controle de Vetores – Leishmanioses *in*: **Encontro Nacional sobre Saúde e Meio Ambiente (Fiocruz)**, Rio de Janeiro, p. 31-36, 1991.

MARZOCHI M.C.A. Leishmanioses no Brasil (As Leishmanioses Tegumentares). **J.B.M.**; v. 63, n. 5/6, p. 81-105, 1992.

MONTEIRO, W. M.; NEIZKE, H. E.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; FERREIRA, M. E. M. C. Pólos de produção de leishmaniose tegumentar americana no norte do Estado do Paraná, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 5, p. 1083-1092, 2009.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, p. 1561 – 1571, 2005.

NASSER, J. T.; DONALISIO, M. R.; VASCONCELOS, C. H. Distribuição espacial dos casos de leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas, Estado de São Paulo, no período de 1992 a 2003. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 309-314, 2009.

OLIVEIRA, A. G. ANDRADE-FILHO, J. D.; FALCÃO, A. L.; BRAZIL, R. P. Estudo de flebotomíneos (Díptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p. 933-944, 2003.

OLIVIERA, C.C.G. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. **Acta Tropica**, v.90, p.155-162, 2004.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v.62, p. 229-235, 1994.

PIÑERO, J.; MARTINEZ, E.; PACHECO, R.; ARAGÓN, Z.; DE ARMAS, F.; DEL CASTILHO, A.; VALLADARES, B. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.**, v. 73, p. 21-29, 1999.

PEREIRA BAS, ALVES CR. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, V. 158, p. 239-255, 2008.

PIRES, C.A. **Os flebotomos (Diptera, Psychodidae) dos focos zoonóticos de leishmanioses de Portugal**. Lisboa, 2000. 228f. Tese de doutoramento. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Med Vet Entomol**, v. 4, n.160, p.1-24, 1990.

RANGEL, E. F.; LAISON, R. **Flebotomíneos do Brasil**, ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **J. Clin. Microbiol** , v.45, p.21-25, 2007a.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis, **The Lancet**, v.7, p.581-596, 2007b.

REINTHINGER, R. Leishmaniasis' Burden of Disease: ways forward for Getting from Speculation to Reality. **Plos Negl Trop Dis**, v. 2, n. 10, p.285-288, 2008.

RIOUX, J. A., LANOTTE, G., SERRES, E., PRATLONG, F., BASTIEN, P., PERIERES, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Ann Parasitol Hum Comp**, .v.65, p. 111-125, 1990.

SAN MARTIN SAVANI, E. M.- "Inquérito sorológico sobre Leishmaniose Tegumentar Americana em cães errantes do município de São Paulo". [*Dissertação de Mestrado*]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 1998.

SANTOS, J. B.; LAUAND, L.; SOUZA, G. S.; MACÊDO, V. O. Fatores sócio-econômicos e atitudes em relação à prevenção domiciliar da leishmaniose tegumentar americana, em uma área endêmica do sul da Bahia, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 16, n. 3, p. 701-708, 2000.

SILVA, N. S. Leishmaniose Tegumentar americana. **Revista de Saúde Pública**, v.33, n.6, 1999.

SILVEIRA, T.G. V.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; GUILHERME, A. L. F.; TOLEDO, M. J. O.; RAMOS, M.; ARRAES, S. M. A. A.; BERTOLINI, D. A.; SPINOZA, R. P.; BARBOSA, O. C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado Paraná, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.12, n.2, p. 141-147, 1996.

SILVEIRA, T. G. V.; ARRAES, S. M. A. A.; BERTOLINI, D. A.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; ROBERTO, A. C. B. S.; RAMOS, M.; SOBRINHO, A. N.; ISHIKAWA, E.; SHAW, J. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 413-423, 1999.

SILVEIRA, F.; LAISON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SZARGIKI, R.; CASTRO, E. A.; LUZ, E.; KOWALTHUK, W; MACHADO, A. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **Braz J Infect Dis.**, Salvador, v.13, n.1, 2009

TEODORO, U.; LA SALVIA FILHO, V.; LIMA, E. M.; SPINOSA, R. P.; BARBOSA, O. C.; FERREIRA, M. E. M. C. & LONARDONI, M. V. C. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista Saúde Pública**, Paraná, v.27, n. 4, p. 242-249, 1993.

TEODORO, U.; KÜHL, L. B.; RODRIGUES, M. Flebotomíneos coletados em matas remanescentes e abrigos de animais silvestres de zoológico no perímetro urbano de Maringá, Sul do Brasil. Estudo preliminar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 6, p. 517-522, 1998.

THOMAZ-SOCCOL, V. (1993) **Les Leishmania du Nouveau Monde. Analyse enzymatique. Demarche progressive phenetique-cladistique.** Montpellier, France. Tese, Doctorar, Université Montpellier I. Faculté de Médecine, 1993.

THOMAZ-SOCOOL, V.; LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PRATLONG, F.; MARTINI-DUMAS, A.; SERRES, E. Phylogenetic taxonomy of the New World *Leishmania*. *Annals de Parasitologie Humaine et Comparée*, v. 68, p. 104-106, 1993a.

THOMAZ-SOCCOL V.; CASTRO, E. A.; SCHUHLI, G. S. E.; CARVALHO, Y.; Marques E.; PEREIRA, E.; LUZ, E. A new focus of cutaneous leishmaniasis in the central area of Parana State, southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 111, p. 308-315, 2009.

TOLEZANO, J. E.; TANIGUCHI, H. H.; BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. F. L.; CUNHA, E. A.; ELIAS, C. R.; LAROSA, R. Occurrence of natural *Leishmania (Leishmania)* infection in *Proechimys heringi* in an endemic area of human and canine American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Ilhabela, São Paulo, Brasil. *In: Resumos da XII Jornada Paulista de Parasitologia da Sociedade Brasileira de Parasitologia. II Jornada Educacional e Biomédica da Superintendência de controle de Endemias, Taubaté*, p. 9, 1998.

UCHÔA, C. M. A.; SERRA, C. M. B.; MAGALHÃES, C. M.; SILVA, R. M. M.; FIGLIUOLO, L. P.; LEAL, C. A.; MADEIRA, M. F. Educação em saúde: ensinando sobre a leishmaniose tegumentar americana. **Cad. Saúde Pública**, v.20, n. 4, p.935-941, 2004.

VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose Tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421-8, 2005.

VERZIGNASSI, T. G.; PEREIRA, D. S.; TEODORO, U.; MISUTA, N. M; DIAS, M. L. G. G.; FERREIRA, M. E. M. C.; FRESSATTI, R. & ARISTIDES, S. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: aspectos epidemiológicos no norte do Paraná – Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 40, p. 884-885, 1988.

WEIGLE, K. A.; LABRADA, L. A.; LOZANO, C.; SANTRICH, C.; BARLER, C. D. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **J. Clin. Microbiol.**, p.601-606, 2002.

WHO (1990). *Lutte contre les leishmanoses*, Geneve, 1990 (Serie de rapports techniques 793).

WHO (2000) *Lutte contre Leishmanioses.*, Geneve, 2000 (Serie de rapports techniques).

WHO (2001). *Leishmaniasis*. Division of Control of Tropical Diseases, World Health Organization, Geneva. <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisdis1.html> (20 de novembro de 2009).

CAPÍTULO II

***Leishmania (Viannia) braziliensis* EM SANGUE DE CÃES
ASSINTOMÁTICOS EM FOCO EPIDÊMICO EM BELA VISTA DO PARAÍSO,
PARANÁ, BRASIL: AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR.**

***Leishmania (Viannia) braziliensis* EM SANGUE DE CÃES ASSINTOMÁTICOS
EM FOCO EPIDÊMICO EM BELA VISTA DO PARAÍSO, PARANÁ, BRASIL:
AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR.**

Resumo: O objetivo deste estudo foi comparar diferentes métodos diagnósticos para detecção da taxa de infecção de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em amostras de sangue de cães provenientes de uma área com brote epidêmico de leishmaniose tegumentar, no norte pioneiro do Estado do Paraná. Após analisar 411 amostras, foi verificada variabilidade na sensibilidade e especificidade nas diversas metodologias diagnósticas devido a fatores diversos como o tipo de amostra analisada, o tempo de infecção e reações cruzadas. Dos 411 cães analisados, 186 (45,3%) apresentaram títulos de anticorpos anti-*Leishmania* igual ou superior a 1:40 através da técnica de IFI. Cento e cinquenta e cinco cães (37,7%) foram sororeagentes para *Leishmania* no teste ELISA e 160 (39%) apresentaram bandas específicas para o fragmento esperado na técnica de PCR. A detecção do parasita na corrente sanguínea evidencia a presença deste em local diferente da lesão cutânea original, demonstrando a disseminação hematogênica.

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar americana, cães assintomáticos, diagnóstico

DETECTION OF *Leishmania (Viannia) braziliensis* IN DOGS IN EPIDEMIC OUTBREAK IN BELA VISTA DO PARAÍSO, PARANA, BRAZIL.

Abstract: The aim of this study was to determine the sensitivity and specificity of serological techniques (Indirect Immunofluorescência and Enzyme Immunoassay) and molecular (Polymerase Chain Reaction) to detect the infection rate of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in blood samples of dogs from an area with epidemic outbreaks of cutaneous leishmaniasis located in the pioneer northern Paraná State. After analyzing 411 samples, was observed variability in sensitivity and specificity in the various diagnostic methodologies due to several factors like the type of sample analyzed, the time of infection and cross-reactions. Of the 411 dogs examined, 186 (45.3%) had anti-*Leishmania* titers greater than or equal to 1:40 by the IFA technique. One hundred and fifty five dogs (37.7%) tested positive for ELISA for *Leishmania* and 160 (39%) showed specific bands for the expected fragment in PCR. The detection of parasite in the bloodstream demonstrates hematogenous dissemination.

Key words: american cutaneous leishmaniasis, dogs, diagnosis

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é considerada um problema de saúde pública mundial. Está entre as cinco doenças infecto-parasitárias endêmicas de maior relevância. Amplamente distribuídas nas Américas, estende-se desde o sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina (GUERRA *et al.*; 2006).

É considerada, nas Américas, uma doença de grande importância, sendo que no Brasil todos os estados são acometidos, revelando uma alta prevalência e ocorrendo de forma autóctone (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; VEDOVELLO-FILHO *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2009;).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença parasitária causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*. Está dividida em dois subgêneros *Leishmania (Viannia)* e *Leishmania (Leishmania)*, a qual é transmitida ao homem e a animais domésticos e silvestres pela picada de insetos vetores (BATISTA *et al.*, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Em 2008 ocorreram 19.542 casos de LTA em humanos, e na região sul foram registrados 625 casos, dos quais 540 no Estado do Paraná (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). A LTA é transmitida pela picada de insetos vetores denominados flebotomíneos. No norte do Paraná na maioria das localidades as espécies de flebotomíneos predominantes são *Lu. neivai* ou *Lu. whitmani* (ZANZARINI, *et al.* 2005). Sendo que *Lu. whitmani* já foi encontrada nesta localidade infectada por *L. (V.) braziliensis* (LUZ *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2005, SILVA *et al.*, 2008, NEITZE *et al.*, 2008).

A LTA é originalmente silvestre, mas vem ocorrendo em áreas rurais e urbanas. A doença acontece em locais onde há derrubada de matas e colonização recente, mas ultimamente vem sendo verificada também em áreas de colonização antiga, onde existem matas residuais ou de segunda formação (SANGIONI *et al.*, 2007).

O aumento da incidência da LTA associada a *Leishmania (Viannia) braziliensis* tem sido relatada em todas as regiões do Brasil (VEDOVELLO FILHO *et al.*, 2008). No Paraná trabalhos confirmam que a espécie prevalente é a *Leishmania*

(*Viannia braziliensis* (LONARDONI *et al.*, 1993, 2006; CASTRO *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2005, THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009).

Três cenários epidemiológicos da leishmaniose são observados neste estado. O primeiro na região do Vale do Ribeira aonde a transmissão da doença vem sendo assinalada desde o século XIX (MIRANDA e SCHWEIDSON, 1955). A doença é considerada endêmica, pois há um número de casos anuais acima de 10 (CASTRO *et al.*, 2005).

O segundo cenário é o do norte e noroeste do estado, cuja colonização foi na década de 50, século XX e aonde vem ocorrendo vários surtos epidêmicos da doença nas duas últimas décadas (CASTRO *et al.*, 2002; SILVEIRA, *et al.*, 1996, 1999).

O terceiro cenário refere-se a locais onde não havia registro da doença nos últimos 20 anos e que por alguma razão (ambiental geralmente) há um surto epidêmico como o que ocorreu na região central do estado (THOMAZ-SOCCOL, *et al.*, 2009).

No município de Bela Vista do Paraíso, região norte do estado do Paraná, no período de 2000 à 2004 ocorreram 61 casos autóctones de LTA em humanos confirmados pela reação de Monte Negro (REIS, 2004). Desde então há uma constância na ocorrência de casos de LTA em humanos nos últimos anos, sendo a maioria no perímetro urbano (Secretaria da Saúde - dados não publicados).

O objetivo deste estudo foi detectar a taxa de infecção de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em sangue de cães assintomáticos provenientes de um foco epidêmico humano na cidade de Bela Vista do Paraíso, Paraná, Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo foi realizado no município de Bela Vista do Paraíso, localizado na região Norte do Estado do Paraná, a 45 km de Londrina e 429 km de Curitiba, latitude 22°, 59'49''sul, longitude 51°, 11'27''oeste e altitude de 590 m. O clima é subtropical. Segundo o IBGE, a população do município é de 20.083 habitantes, apresentando um índice de desenvolvimento humano de 0,771 (IBGE, 2011). De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no período de 2000 a 2004 ocorreram 61 casos humanos de LTA em Bela Vista do Paraíso (dados não publicados).



Figura 01 – Município de Bela Vista do Paraíso (seta maior), Estado do Paraná (seta menor), Brasil. Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:parana-Municipio de Bela Vista do Paraíso.svg>

2.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO E COLETA DE AMOSTRAS

Quatrocentos e onze cães foram escolhidos em regiões da cidade onde existia um perfil do ecossistema para leishmaniose, com característica rural e periurbano em área de colonização. Foram incluídos na amostra cães com proprietários e resenha, idade superior a quatro meses e nascidos ou vivendo na área por mais de dois anos.

As amostras de sangue dos cães foram colhidas entre os anos de 2002 e 2003, por punção da veia jugular, cefálica ou braquial. Uma alíquota de 3 ml

de sangue foi congelada à - 20°C para posterior extração de DNA. O restante do sangue (7 ml) foi utilizado para extração do soro, o qual foi congelado à - 20°C até o seu uso. Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Paraná.

2.2.1. Exame Clínico dos Cães

Os cães que fizeram parte deste estudo passaram por um exame clínico minucioso em busca de lesões ou escaras compatíveis com a leishmaniose tegumentar americana e leishmaniose visceral. Atenção particular foi dada às regiões ao redor da boca, orelha, nariz e escroto. Áreas onde predominantemente encontram-se lesões ulcerosas de animais acometidos por leishmaniose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). O critério utilizado para definir as lesões como compatíveis com leishmaniose foram: forma arredondada, bordas proeminentes, endurecidas e com características de cura lenta ou não cura.

Durante a colheita de sangue um questionário foi aplicado aos proprietários com a finalidade de se obter dados sobre a raça, sexo, idade, procedência dos animais e presença de mata.

2.3. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

2.3.1. Imunofluorescência Indireta (IFI)

As amostras de soro dos cães foram analisadas em duplicata pela reação de Imunofluorescência Indireta (IFI), segundo MARZOCHI *et al.* (1980) e MENDONÇA *et al.* (1988), com a utilização de conjugado anti-IgG canino, marcado com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA CHEMICAL Co. St. Luis, USA) previamente padronizado na diluição de 1:40. Utilizou-se como antígeno a forma promastigota da *Leishmania (Viannia) braziliensis*, cultivadas e preparadas em lâminas com capacidade para oito amostras (CASTRO, 2001b).

Cada lâmina destinada ao teste IFI acompanhadas de um soro controle positivo, um soro controle negativo (proveniente de cães de zona indene) e um

controle do conjugado (sem soro). Os soros foram diluídos a 1:40 e 1:80 e considerou-se positivos aqueles com títulos maior ou igual a 40. A leitura foi realizada em microscópio para imunofluorescência fotomicroscópio (lâmpada HBO 200 e filtro BG 12) em aumento de 400x.

2.3.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para a técnica de ELISA foram seguidos os princípios e protocolos descritos por ENGWALL e PERLAMANN (1972) adaptados para microplacas de poliestireno por CASTRO (2001), utilizando conjugado de soro de coelho anti-IgG canino (diluição 1:1.000) ligado com peroxidase (SIGMA CHEMICAL CO. ST. LUIS, USA). A diluição dos soros dos cães foi realizada a 1:50.

Para o estabelecimento do nível de corte ("cut-off") da reação, amostras de soros de cães provenientes de zona indene para leishmaniose no Estado do Paraná, foram testados para *L. braziliensis*. O nível de corte foi realizado com base na média da absorbância dos soros controle negativos para *Leishmania* acrescidos de três vezes o desvio padrão. Foram consideradas reativas as amostras de soro que obtiveram valores igual ou acima de 0,174 de absorbância. O antígeno solúvel foi produzido a partir das formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (cepa MHOM/BR75/M2903) obtidas de meio de cultura NNN segundo CASTRO (2001).

2.4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

2.4.1. Extração de DNA de Leishmania de Sangue dos Animais

A extração de DNA das amostras de sangue foram realizadas de acordo com o protocolo de SAMBROOK *et al.* (1989), utilizando a metodologia de fenol-clorofórmio modificado segundo a descrição abaixo.

As amostras de sangue foram descongeladas e para cada cão avaliado foi transferido 1 mL de sangue para um tubo eppendorf de 2 ml, adicionado 1 ml de PBS (tampão de fosfato 0,01 M, pH 7,2; 0,15 M NaCl), centrifugado à 3.500 x g por 15 min, à 4°C. O sobrenadante foi desprezado, ressuspendido em 1 ml de solução

de lise (50 mM Tris, pH 8,5; 50 mM NaCl; 25 mM Na₂ EDTA 2 H₂O, pH 8.0; 0,5% sulfato de sódio) e acrescido 10µl de SDS 1% e 5 µL de RNase (Invitrogen®). A amostra foi incubada por 2 h em banho-maria à temperatura de 37°C. Após este período, foi adicionado 5 µL de proteinase K e novamente incubado em banho-maria por 2 h, à teperatura de 55°C.

Em seguida, as amostras passaram por três fases de extração com fenol, sendo adicionada uma proporção de fenol sempre superior ao volume desprezado após a homogeneização (5 min) e centrifugação (12.000 x g por 5 min, a 20°C) de cada fase. A extração com o clorofórmio foi realizada da mesma forma que a extração de fenol, entretanto foram processadas em duas fases apenas. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 ml e o DNA foi precipitado com 20 µL de 10% de acetato de sódio 3 M e 440 µL de etanol absoluto. As amostras permaneceram durante 12 h a 4°C.

Após este período as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado pela inversão delicada do tubo e ao tubo foi adicionado 300 µL de etanol 70%. Subsequente a homogeneização, as amostras foram centrifugadas à 12.000g por 5 min à 20°C. As amostras foram lavadas com etanol 70 % por duas vezes e permaneceram em estufa 37°C até a secagem completa. A etapa final foi ressuspender o *pellet* de DNA em 100 µL de TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) e estocar à temperatura de 4°C até o seu uso. Para cada extração foi adicionado um controle negativo de extração de *Leishmania*.

2.4.2. Amplificação de DNA

O DNA extraído das amostras de sangue dos cães estudados foi amplificado utilizando-se o par de iniciadores MP1L (5' - TACTCCCCGACATGCCTCTG-3') e MP3H (5' - GAACGGGGTTTCTGTATGC-3') (Invitrogen®) descrito por LOPEZ *et al.* (1993) com algumas modificações. Os iniciadores flanqueiam um fragmento do minicírculo do kDNA de 70 pb específico para espécies do complexo *L. braziliensis*. A reação de PCR foi realizada num volume final de 25 µL contendo 1 µM de cada primer MP1L e MP3H (Invitrogen®), 0,2 mM deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) (Invitrogen®), 3 mM MgCl₂, 1 U *Taq* DNA

Polimerase (Invitrogen®), 2 µL de DNA total e extraído, 1 X tampão PCR (10 mM Tris HCl, pH 8,3) e 0,25 µL de Triton 0,1 %.

A amplificação do DNA de *Leishmania* foi realizada no termociclador (Bio-Rad Icyler) utilizando o seguinte protocolo: temperatura de desnaturação à temperatura de 94°C, por 2 min, desnaturação à temperatura de 94°C, por 1 min, anelamento à temperatura de 58°C, por 1 min, extensão à temperatura de 72°C, por 1 min, por 30 ciclos e uma extensão final à temperatura de 72°C, por 10 min. As amostras amplificadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2 % e coradas em brometo de etídeo. Para cada oito amostras analisadas, um controle positivo e um controle negativo foram adicionados. Após a corrida, a presença de bandas de DNA amplificadas foi observada por meio de um transiluminador UV (GIBCO) e o gel foi fotografado.

2.4.3. Sensibilidade da PCR

A determinação da sensibilidade da PCR foi desenvolvida com o objetivo de esclarecer a quantidade mínima de DNA de *Leishmania* que poderia ser detectada no sangue dos cães avaliados. Para este fim, uma solução de promastigotas de *L. (Viannia) braziliensis* cultivada em meio NNN e solução salina foram quantificadas em câmara de Neubauer. Na sequência, os parasitos foram adicionados a 500 µL de sangue de coelho desprovidos de leishmaniose e provenientes de área não endêmica para esta patologia. O sangue infectado foi diluído em diferentes concentrações (1×10^4 ; 1×10^3 ; 1×10^2 ; 1×10^1 ; 1 e 0,1 parasitos/µl). A extração de DNA e a PCR foram processadas de acordo com protocolo citado acima. O DNA do parasito foi quantificado por espectrofotometria (Genova ®) e a sensibilidade foi avaliada através da detecção de bandas de DNA do parasito em gel de agarose.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação e comparação entre as diferentes técnicas de diagnóstico foram realizadas através da análise estatística de acordo com a metodologia proposta por GUIMARÃES (1987) e SAMPAIO (2007). Foi estabelecida

a sensibilidade e especificidade, os valores preditivos positivos e negativos e índice de concordância. Para a comparação das diferentes técnicas diagnósticas optou-se como padrão a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), dada à impossibilidade do diagnóstico parasitológico pela ausência de lesões nos cães. Os dados contidos na ficha epidemiológica foram avaliados utilizando-se o programa Epi-Info versão 6,04 (DEAN *et al.*, 1994), adotando-se 5% de nível de significância.

3. RESULTADOS

A pesquisa de anticorpos contra antígenos do parasito foi realizada em 411 cães provenientes do município de Bela Vista do Paraíso. Destes 186 (45,3%) apresentaram títulos de anticorpos anti-*Leishmania* igual ou superior a 40 pela técnica de IFI e 155 cães (37,7%) foram sororeagentes para *Leishmania* no ELISA no cut-off de 0,174 (FIGURA 02).

Houve predomínio de cães sem raça definida, com idade acima de um ano e sendo a maior parte dos cães machos. Quanto à procedência dos cães preponderaram os de zona urbana. Ao avaliar estatisticamente a prevalência média das variáveis, verificou-se que não houve diferença significativa entre elas ($p \geq 0,05$) (Tabela 01).

Constatou-se ausência de lesões ulceradas que pudessem sugerir leishmaniose cutânea ou cutâneo-mucosa nos cães inquiridos neste estudo. Nos 22 cães cujos linfonodos foram puncionados e submetidos a cultivo na tentativa de isolamento de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em nenhum dos animais foi encontrado parasito apesar de todos os 22 serem sororeagentes pelas técnicas de IFI e ELISA.

Na avaliação da sensibilidade da técnica de PCR verificou-se que a técnica foi capaz de identificar DNA de 1 parasitos/ μ l ou 0,34 fg de DNA. Com exceção da cepa referência de *L. braziliensis* (MCAN/BR/03/Cur237), nenhuma outra teve seu DNA amplificado *L. amazonensis* (MHOM/AR/98/Cur41) e *L. infantum* (MCAN/BR/03/Cur 240) quando usado os iniciados MP3H/MP1L.

A técnica de PCR possibilitou a amplificação de fragmento específico para o complexo *Viannia*, o que faz dela uma técnica padrão para a verificação do desempenho dos diferentes testes aplicados neste estudo (FIGURA 03).

Das 411 amostras analisadas por IFI, PCR e ELISA, 186 (45,3%), 160 (39%), e 155 (37,7%) foram positivas para LTA, respectivamente (FIGURA 02). Quando somados os resultados das diversas técnicas confirmou-se o parasitismo em 17% (70/411) dos cães.

TABELA 01: RESULTADO DOS TESTES DE IFI E ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania sp* EM 489 CÃES EM RELAÇÃO A RAÇA, SEXO, IDADE E PROCEDÊNCIA DO ANIMAL NO MUNICÍPIO DE BELA VISTA DO PARAÍSO - PARANÁ, ENTRE OS ANOS DE 2002 E 2003.

Variáveis	Nº cães (+) ao teste IFI/ Total (%)	X ²	p	Nº cães (+) ao teste ELISA/ Total (%)	X ²	p
Raça		0,65	0,4208		1,60	0,2060
SRD	196/424 (46,2)			169/424 (39,9)		
Definida	26/65 (40,0)			20/65 (30,8)		
Total	222/489 (45,4)			189/489 (38,6)		
Sexo		0,09	0,7621		3,65	0,0559
Macho	127/275 (46,2)			117/275 (42,5)		
Fêmea	95/214 (44,4)			72/214 (33,6)		
Total	222/489 (45,4)			189/489 (38,6)		
Idade		1,19	0,2747		3,06	0,0803
≤ 1 ano	79/188 (42,0)			63/188 (33,5)		
>1 ano	143/301 (47,5)			126/301 (41,9)		
Total	222/489 (45,4)			189/489 (38,6)		
Procedência		1,59	0,2075		0,42	0,5182
Urbana	211/456 (46,3)			174/456 (38,2)		
Rural	11/33 (33,3)			15/33 (45,5)		
Total	222/489 (45,4)			189/489 (38,7)		

SRD = Sem Raça Definida; ≥ 1 ano = maior ou igual a um ano; ≤ = menor ou igual a um ano; LTA = Leishmaniose Tegumentar Americana; Nº cães (+) = Número de Cães Positivos; (%) = Percentagem; IFI = Imunofluorescência Indireta, ELISA = Ensaio Imunoenzimático, x² = Teste de Qui Quadrado, p = Grau de Liberdade do Erro

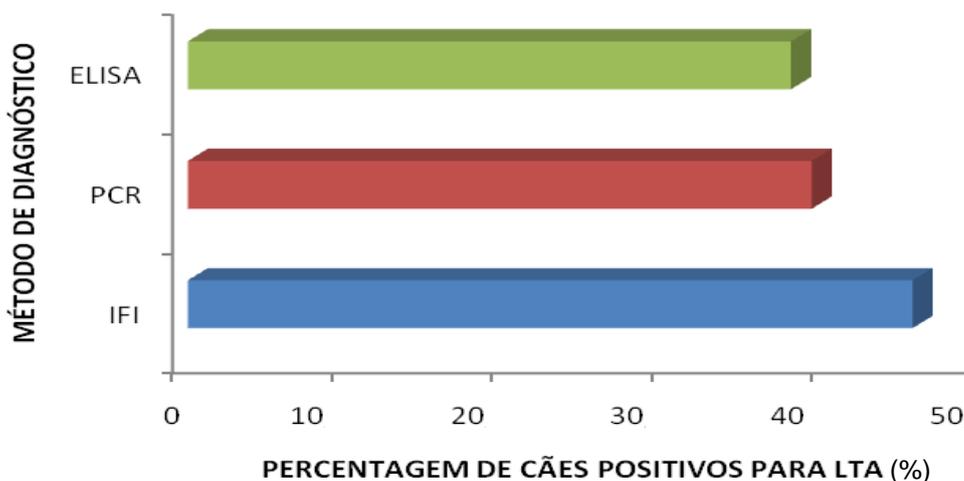


FIGURA 02: Resultados dos testes utilizados para o diagnóstico da LTA em 411 amostras de cães naturalmente infectados do município de Bela Vista do Paraíso, Paraná, Brasil.

Para avaliar a sensibilidade e especificidade das diferentes técnicas (IFI e ELISA) utilizou-se como método diagnóstico padrão a PCR. Quando se avaliou a sensibilidade e a especificidade entre a PCR e a IFI, obteve-se respectivamente, 49,37% e 44,37%, porém ao avaliar a sensibilidade e especificidade da PCR e o ELISA, obteve-se respectivamente, 57,37% e 100% (TABELA 02).

A análise do valor preditivo de um resultado positivo (VPP), referente a probabilidade de doença quando o resultado do teste é positivo, resultou em positividade de 42,47% quando comparado os testes de PCR e IFI, e de 64% quando comparado os testes de PCR e ELISA (TABELA 02).

Já o valor preditivo de um resultado negativo, referente à probabilidade de não-ocorrência de doença quando o resultado do teste é negativo, obteve resultado de 64% quando comparado os testes de PCR e IFI, e de 98,04% quando comparado os testes de PCR e ELISA (TABELA 02).

O coeficiente Kappa, dado que avalia a concordância entre os resultados, neste estudo resultou em 0,065 quando comparado os testes de PCR e IFI, indicando a discordância entre os métodos, e de 0,48 quando comparado os testes de PCR e ELISA, revelando uma boa concordância (TABELA 02), de acordo com tabela de classificação de índice Kappa segundo Zar (1998).

TABELA 02: DESEMPENHO DA ASSOCIAÇÃO DO TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA (IFI) ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) CONSIDERANDO A REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) COMO PADRÃO-OURO NO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR CANINA

	PCR			S (%)	SP(%)	χ^2	κ	VPP	VPN
	Pos.	Neg.	Total						
IFI									
Pos.	79	107	186	49,37	57,37	$p < 0,18$	0,065	42,47	64,00
Neg.	81	144	225						
Total	160	251	411						
ELISA									
Pos.	71	84	155	44,37	100	$p < 0,000$	0,48	45,80	98,04
Neg.	5	251	256						
Total	76	335	411						

Pos = Resultado Positivo, Neg = Resultado Negativo, S = Sensibilidade, SP = Especificidade, (%) = Percentagem, χ^2 = Teste de Qui Quadrado, κ = índice Kappa, VPP = Valor Preditivo Positivo, VPN = Valor Preditivo Negativo

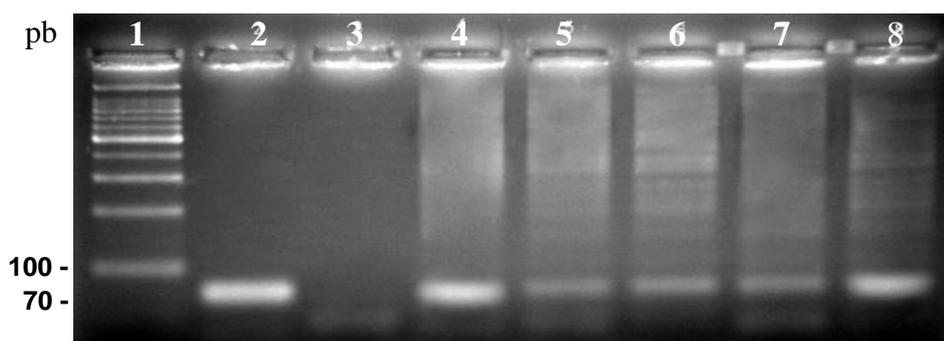


FIGURA 03 – Produto da amplificação do DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* pela técnica de PCR. 1 = marcador molecular de 100 pb (pares de base); 2 = controle positivo (DNA de cepa referência de *L. braziliensis* controle, 3 = negativo, 4 a 8 = DNA amplificado de *L.(V.) braziliensis* (70 pb) de amostras de sangue de cães de área endêmica do município de Bela Vista do Paraíso, Paraná.

4. DISCUSSÃO

A identificação de *Leishmania* em humanos, reservatórios e insetos vetores é considerada o primeiro passo na pesquisa epidemiológica para determinar o correto diagnóstico, o tratamento preciso e medidas estratégicas de controle (SILVEIRA *et al.*, 1996; CASTRO *et al.*, 2005).

Apesar do município de Bela Vista do Paraíso ser considerado área autóctone para LTA desde 2001 e, tendo apresentado surto epidêmico em humanos em 2003, há poucos registros de investigação de *Leishmania* em cães. A infecção nesta espécie pode constituir um indicador do risco de transmissão de *L. braziliensis* à população humana susceptível (GRADONI *et al.*, 1996).

O diagnóstico para a detecção da infecção em cães é normalmente realizado mediante exames clínicos, demonstração do parasita através de aspirado ou cultura e identificação de anticorpos específicos, através de testes sorológicos como IFI e ELISA (BARBOSA *et al.*, 1999).

As técnicas sorológicas aplicadas neste estudo (IFI e ELISA) permitiram estudar a soroprevalência em cães, mesmo sem lesões características, podendo, desta forma, avaliar as condições de risco destes animais para os seres humanos, ou ainda, servindo como animais sentinelas para a ocorrência do agente no ecossistema (CASTRO, 2001).

Foi encontrado 45,3% de positividade na técnica de IFI demonstrando uma alta prevalência de leishmaniose canina em Bela Vista do Paraíso.

A IFI é a técnica de referência mais utilizada para o estudo de soroprevalência da LTA canina (WHO, 1990). Pesquisas realizadas em diferentes regiões do Brasil revelaram taxas de soropositividade variando de 3,2% a 22,32% (AFONSO CARDOSO *et al.*, 1989; GOMES *et al.*, 1990; TOLEZANO *et al.*, 1998). Da mesma forma, no Estado do Paraná, outros trabalhos de soroprevalência realizados, apresentaram coeficientes de 6,6% a 18,2% (SILVEIRA *et al.*, 1996, CASTRO,

2001a; VELASQUEZ *et al.*, 2006; CASTRO *et al.*, 2007; THOMAZ SOCCOL *et al.*, 2009).

A pesquisa de anticorpos em áreas endêmicas vem sendo realizada com IFI e títulos significativos têm sido encontrados em cães com ou sem sinais clínicos (JESUS *et al.*, 2006).

O teste de ELISA, detectou anticorpos anti-*Leishmania sp.* em 37,7% do total, considerada também uma taxa elevada. Dado este, revelado por outros autores (CASTRO *et al.*, 2001). Esta técnica tem sido amplamente empregada no diagnóstico da leishmaniose visceral (MAYWALD *et al.*, 1993; MANCIANTI *et al.*; 1996; PARANHOS-SILVA *et al.*, 1998; CABRAL *et al.*, 1998; RAJASEKARIAH *et al.*, 2008), ao contrário do que se pode verificar no diagnóstico da leishmaniose cutânea, onde o teste sorológico de escolha é a reação de imunofluorescência indireta. Isto tem sido constatado por diversos autores (SILVEIRA *et al.*, 1999; SAVANI *et al.*, 1999; PADILHA *et al.* 2002; MOREIRA *et al.*, 2007).

A inexistência de lesões suspeitas em cães de áreas endêmicas de LTA humana não significa que a doença em cães não esteja presente (BARBOSA *et al.*, 1999). SOLANO-GALLEGO *et al.* (2001) demonstraram que 54% dos cães sadios que viviam numa área endêmica para leishmaniose e considerados assintomáticos carregavam a *Leishmania*, sendo portanto potenciais fonte de infecção do parasito aos insetos vetores. JESUS *et al.* (2006) relataram que as sorologias detectam a maioria dos cães sintomáticos e grande parte dos assintomáticos.

As altas taxas de sorologia encontradas nos cães avaliados são decorrentes, muito provavelmente, da introdução recente da doença na região estudada.

No que diz respeito às variáveis analisadas dos cães positivos, quando consideramos as frequências dos testes sorológicos de IFI e ELISA, observou-se que houve predominância dos animais sem raça definida, acima de um ano de idade e machos. As diferenças de prevalência registradas entre diversas raças podem ser, sobretudo devido ao tipo de atividade ou ao modo de utilização dos cães (DYE *et al.*, 1992; ACEDO-SÁNCHEZ *et al.*, 1998).

Animais de guarda, de pastoreio ou de caça são geralmente mantidos no exterior e estão mais expostos aos flebotomíneos do que aqueles que vivem no interior das habitações. Não obstante, devido à seleção natural, os cães de raças autóctones poderão eventualmente ser mais resistentes à doença do que os de raças importadas (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2005).

PADILHA *et al.* (2002) analisaram 208 cães de uma região endêmica pra LTA, em Salta, Argentina, e verificaram que não havia diferença significativa entre os sexos dos animais, porém, quando analisaram a idade, constataram que a porcentagem de cães soropositivos para *Leishmania* cresceu substancialmente conforme os cães se tornavam idosos, corroborando com os resultados encontrados nesta pesquisa.

FALQUETO *et al.* (1986) constataram a maior frequência de sorologia em fêmeas, (23,4%) de 81 animais examinados com relação aos machos, (12,4%) de 105 animais examinados, diferentemente dos resultados obtidos nesta pesquisa.

A prevalência de infecção nos cães com menos de um ano de idade é geralmente reduzida (ENCINAS-GRANDES *et al.*, 1988; ACEDO-SÁNCHEZ *et al.*, 1996). Alguns estudos indicam picos de prevalência ao redor dos três anos (ABRANCHES *et al.*, 1991b; NIETO *et al.*, 1992) e, depois dos 7-8 anos (AMELA *et al.*, 1995; CAMPINO *et al.*, 1995).

Numa análise retrospectiva as idades de cães doentes variaram de 9 meses a 15 anos, com uma média de 5 anos (KOUTINAS *et al.*, 1999). Foi também verificado que os cães de pelagem curta apresentavam prevalência mais alta do que os de pelagem longa (MORILLAS *et al.*, 1996), o que poderá estar relacionado com maior ou menor facilidade de picada pelos vetores (SIDERIS *et al.*, 1996).

A grande maioria dos animais sororeagentes examinados neste trabalho era proveniente da região peri-urbana. Atualmente, sabe-se que o padrão epidemiológico da leishmaniose vem se modificando. No passado, era caracterizado como uma doença relacionada a áreas de colonização, direcionada a zona rural, e hoje, voltada principalmente a região peri-domiciliar da zona urbana, devido ao extenso processo de desmatamento e a adaptação do parasito ao ecossistema (BRASIL, 2000).

Quando realizado o cultivo na expectativa de isolamento do parasito, em 22 cães que tiveram os linfonodos puncionados, apesar de serem sororeagentes para os testes IFI e ELISA, o resultado foi negativo.

A cultura de promastigotas de tecidos infectados ou o exame direto em microscopia de formas amastigotas tem sido considerado o padrão para o diagnóstico. Embora estas técnicas sejam altamente específicas para o diagnóstico de *Leishmania*, elas não são altamente sensíveis, este fato deve-se, muito provavelmente, à escassez do parasito nas lesões (BENSOUSSAN *et al.*, 2006; CAMERA *et al.*, 2006).

Vários autores demonstraram a dificuldade no isolamento da *Leishmania* de órgãos onde obtiveram isolados apenas das lesões de pele (AGUILAR *et al.*, 1989; LE PON *et al.*, 1989; GOMES *et al.*, 1990), demonstrando índices de prevalência que variaram de 3% a 36% (CASTRO *et al.*, 2007).

CASTRO *et al.* (2001) relatou a dificuldade no emprego do diagnóstico parasitológico em cães, quando comparou o material obtido diretamente das lesões de pele, punção de linfonodos e de órgãos internos. Os autores conseguiram o isolamento apenas de material colhido diretamente das lesões cutâneas, resultando em sete isolados de *L. (Viannia) braziliensis* de 13 cães com lesões de pele. Geralmente é pequeno o número de cães com lesão cutânea que denuncie a possível infecção, sugerindo-se a busca de outras técnicas com melhor sensibilidade para a identificação de animais infectados.

A reação em cadeia pela polimerase permitiu identificar 39% de cães positivos. Sendo considerada por VENZAZZI *et al.* (2007) uma forma alternativa de detectar o parasito em amostras clínicas, uma vez que possibilita a detecção de pequena quantidade de DNA de *Leishmania* em cultura, biópsia, sangue, raspados, flebotomíneos entre outros.

A detecção do parasito em amostras de sangue viabilizou uma forma não invasiva de diagnóstico e elucidou a possibilidade de disseminação hematogênica do parasito comprovando a forma metastática da LTA (MADEIRA *et al.*, 2005).

No confronto com as diferentes metodologias (IFI e ELISA), optou-se pela PCR como teste padrão-ouro, devido à impossibilidade e inviabilidade da

realização de testes parasitológicos (citologia ou cultivo) nos animais. Diferentemente da leishmaniose visceral, que utiliza a técnica de imunofluorescência, a leishmaniose cutânea ainda não estabeleceu um teste padrão-ouro (WHO, 1990).

A análise estatística da PCR das amostras de sangue dos cães colhidas a campo na área endêmica estudada revelou uma baixa sensibilidade (49,37%) e especificidade (57,37%) e fraca concordância ($\kappa = 0,065$) quando comparada a técnica de IFI; e quando a PCR foi comparada com a técnica de ELISA foi observado uma baixa sensibilidade (44,37%) e alta especificidade (100%) e boa concordância ($\kappa = 0,48$).

Estes dados revelam uma melhor eficiência no diagnóstico associando-se a técnica de PCR ao teste de ELISA (100%) em relação à associação da PCR ao teste de IFI (57,37%), pois obtiveram uma especificidade muito superior. Isto pôde ser confirmado pelo índice Kappa que demonstrou uma boa concordância entre a PCR e o teste de ELISA ($k = 0,48$), diferentemente da PCR e o teste de IFI ($k = 0,065$), onde não houve concordância.

O resultado revelado pelo índice Kappa entre a PCR e o teste de ELISA, nesta pesquisa é esperado e válido, em virtude do tipo de amostra trabalhada (sangue) e a característica da doença. A leishmaniose cutânea (imunidade mediada por células) é uma patologia que produz uma resposta imune fraca em comparação a leishmaniose visceral (imunidade humoral), portanto em termos de eficiência diagnóstica, o teste de ELISA não seria recomendado para ser utilizado como teste-padrão, pois necessitaria de maior eficiência com valores de índice Kappa acima de 0,8 (concordância substancial).

Outros dados importantes revelados pela presente pesquisa, na associação da PCR e o teste de ELISA são o valor preditivo positivo e negativo. O VPP demonstrou que a probabilidade de um cão ser positivo quando o resultado for positivo foi baixa (45,8), pois obteve-se baixa sensibilidade (44,37%). Já o VNP revelou que a probabilidade de um cão ser negativo quando o resultado for negativo foi alta (98,0), pois revelou alta especificidade (100%).

Uma observação interessante é o fato de ter-se encontrado menor taxa de positividade no teste de ELISA em relação a PCR em cães assintomáticos

para LTA. Considerando a técnica de PCR 100% sensível, é muito improvável que os resultados da PCR sejam falso-positivos, portanto, muito provavelmente os resultados do ELISA foram falso-negativos. Dados confirmados pelos resultados da sensibilidade e especificidade do teste de ELISA. Outra explicação para este fato pode ser que embora os cães apresentassem infectados, ainda não haviam desenvolvido resposta imune a infecção.

O resultado obtido nas diferentes metodologias de diagnóstico (45,3% IFI, 39% PCR e 37,7% ELISA) demonstra a importância de se realizar mais de uma técnica para o diagnóstico da LTA. Se acaso fosse optado apenas pelo ELISA, animais infectados deixariam de ser diagnosticados, se tivesse sido realizado apenas a IFI, a porcentagem de animais efetivamente infectados seria superestimada, em virtude de possíveis reações cruzadas. A PCR possibilitou um resultado mais preciso em relação à porcentagem real de animais infectados pela *Leishmania*, sendo de grande valia no diagnóstico para confirmar os casos positivos ou inconclusivos pelos métodos sorológicos e principalmente em casos de animais assintomáticos.

Diversos fatores contribuíram para a variação encontrada entre as diferentes técnicas (PCR, IFI e ELISA). A PCR é uma técnica altamente sensível e específica, os valores observados são decorrentes, muito provavelmente, do baixo grau de parasitemia no sangue dos animais infectados (NUNES *et al.*, 2007). A PCR demonstra uma maior sensibilidade em amostras de sangue de cães sintomáticos do que cães assintomáticos (REINTHINGER *et al.*, 2003).

No que se refere ao teste sorológico de IFI, os valores encontrados, são devido ao tempo de infecção e a reações cruzadas com outros protozoários (tripanosomatídeos), que podem ocorrer.

REINTHINGER *et al.* (2003) encontraram cães com PCR de amostras de sangue positiva e ELISA negativa, atribuíram o resultado de ELISA, ao fato destes cães ainda não terem desenvolvido resposta imune.

Em outro estudo realizado por RYAN *et al.* (2003) em 100 cães de área endêmica para *Leishmania*, constatou-se que a resposta humoral nos hospedeiros vertebrados pode ser extremamente variável, dependendo da resposta modulada pelo parasito e também do estado imunológico do hospedeiro.

CONCLUSÕES

- Em Bela Vista do Paraíso, a entrada recente da *Leishmania*, resultou em altas taxas sorológicas em cães assintomáticos, tornando esta espécie de animais sinalizadores da LTA, pois a população humana não apresentava resposta imunológica.
- O uso de diferentes técnicas de diagnóstico (sorológica e molecular) revelou uma maior probabilidade de detecção da infecção em amostras de sangue nos cães avaliados e o esclarecimento mais preciso quanto à verdadeira situação epidemiológica na região pesquisada.
- Embora ocorram desvantagens em relação aos testes sorológicos, estes ainda permanecerão sendo os testes mais utilizados do diagnóstico da *Leishmania*, pois permitem analisar um grande número de amostras com custo reduzido em comparação aos testes moleculares.
- Através deste estudo, a metodologia molecular (PCR) demonstrou eficácia na detecção de DNA do parasito e deve ser utilizada sempre que possível, associada aos métodos de rotina (sorologia e cultivo in vitro).
- Os resultados positivos da PCR em amostras de sangue demonstraram a disseminação hematogênica do parasito em cães.
- Assim, estudos futuros quanto à presença de *Leishmania* em órgãos internos deverão ser realizados, contribuindo, desta forma, na elucidação do papel do cão na manutenção do ciclo da Leishmaniose Tegumentar Americana.

REFERÊNCIAS

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. **J Parasitol**, v.77,p. 557-561, 1991.

ACEDO-SÁNCHEZ, C.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; VÉLEZ-BERNAL, I.D.; SANCHÍS-MARÍN, M.C.; LOUASSINI, M.; MALDONADO, J.A.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region. **Int J Parasitol**, v. 25, p. 303-310, 1996.

ACEDO-SÁNCHEZ, C.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F.; SANCHÍS-MARÍN, M.C.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J. Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. **Vet Parasitol**, v. 75, p. 1-8, 1998.

AFONSO CARDOSO, S. R.; MACHADO, M.; COSTA-CRUZ, J. M.; GONÇALVES, M. D. R. F.; STUTZ, W. I. H. Leishmaniose tegumentar canina no Município de Uberlândia, Minas Gerais, Diagnóstico clínico e sorológico de cães naturalmente infectados. Revista Científica de Ciências Biomédicas da Universidade de Uberlândia, Uberlândia, v. 5, p. 14-21, 1989.

AGUILAR. C. M.; RANGEL, E. F.; GARCIA, L.; FERNANDEZ, E. MAMEN, H.; GRIMALDI, J. R.; G & VARGAS, Z. DE. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 19-28, 1989.

ALMEIDA, A. B. P. F.; FARIA, R. P.; PIMENTEL, M. F. A.; DAHROUG, M. A. A.; TURBINO, N. C. M. R.; SOUSA, V. R. F. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.,156-159, 2009.

AMELA, C.; MENDEZ, I.; TORCAL, J.M.; MEDINA, G.; PACHÓN, I.; CAÑAVATE, C.; ALVAR, J. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. **Eur J Epidemiol**, v. 11, p. 157-161, 1995.

BARBOSA, G. M. S.; MARZOCHI, M. C. A.; MASSARD, C. L.; LIMA, G. P. S.; CONFORT, E. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em cães, no Município de Paraty, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 15, n. 3, p.641-646, 1999.

BENSOUSSAN, E.; NASEREDDIN, A.; JONAS, F.; SCHNUR, L. F.; JAFFE, C. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis, **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1435-1439, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana / Organização: Gerência Técnica de Doenças Transmitidos por Vetores e Antropozoonoses. Coordenação de Vigilância Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiologia. Fundação Nacional de Saúde. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2000. 62 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007. 180 p. (Serie A. Normas e Manuais Técnicos)

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNASA. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2008. Brasília, 2009.

BUCK A. A.; GART J. J. Comparasion of a screening test and a reference test in epidemilogic studies. I. Indices of agreement and their relation to prevalence. **Am. J. Epidemiol.**, v. 83, p.586-592, 1966.

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

CAMERA, P. O.; JUNGER, J.; PIRES, F. E. S. S.; MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; FERNANDES, O.; PIRMEZ, C. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene**, v.100, p.1112-1117, 2006.

CAMPINO, L.; CAPELA, M.J.R.; MAURÍCIO, I.L.; ÖZENSOY, S.; ABRANCHES, P. O KALA-AZAREM PORTUGAL. IX. A região do Algarve: inquérito epidemiológico sobre o reservatóriocanino no concelho de Loulé. **Rev Port Doen Infecç**, v. 18, p. 189-194, 1995.

CARVALHO, M.L.R.; ANDRADE, A.S.R.; FONTES, C.J.F.; HUEB, M.; SILVA, S.O.; MELO, M.N. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazyl. **Acta Tropica**, v. 98, p.277-285, 2006.

CASTRO, E. A. **Papel do Cão na Manutenção do Ciclo de *Leishmania*, Freqüência de Enzootia através de Estudos Soro-Epidemiológico**. Curitiba, 2001a. 192 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AUGUIR, C. Standardization of ELISA (Enzyme Linked Immunsorbent Assay) and Indirect Fluorescente Antibody Test (IFAT) techniques for canine cutaneous leishmaniasis. In **International Conference**

on **New Horizons in Biotechnology**, 2001. Trivandrum, India, *Abstract*, Trivandrum, p. 228, 2001 b.

CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MEMBRIVE, N.; ASSIS, N.; LUZ, E. Estudos das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar americana notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.35, p.445- 452, 2002.

CASTRO E. A.; LUZ, E.; TELLES, F. Q. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Parana state, Brazil. **Acta Tropica**, n.93, p.141–149, 2005.

CASTRO, E.; THOMAZ-SOCCOL, V. AUGUR, C.; LUZ, E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). **Experimental Parasitology**, v.117, p. 13-21, 2007.

DEAN, A. G.; DEAN, J. A.; COULOMBIER, D.; BRENDEL, K. A.; SMITH, D. C.; BURTON, A. H.; DICHER, R. C.; SULLIVEAN, K. M.; FAGAN, R. F.; ARNER, T. G. Epi Info, Version 6: a word processing database, and statistic program for epidemiology on microcomputers. Atlanta: Center for Diseases Control and Prevention, 1004.

DYE, C.; KILLICK-KENDRICK, R.; VITUTIA, M.M.; WALTON, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; HARITH, A.E.; GUY, M.W.; CAÑAVATE, M.-C.; HASIBEDER, G. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. **Parasitology**, v. 105, p. 35-41, 1992.

ENCINAS-GRANDES, A.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; MARTÍN-NOVO, M.; SÍMON-MARTÍN, S. Leishmaniasis in the province of Salamanca, Spain. Prevalence in dogs and seasonal dynamics of vectors. **Ann Parasitol Hum Comp**, v. 63, p. 387-397, 1988.

FALQUETO, A.; COURA, J.R.; BARROS, G. C.; GRIMALDI FILHO, G.; SESSA, P. A.; CARIAS, R. D. C.; JESUS, A. C.; ALENCAR, J. T. A. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose Tegumentar n município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2. P. 155-163, 1986.

FOLLADOR, I.; ARAÚJO, M. A.; TAVARES-NETO, J.; BARRAL, A.; MIRANDA, J. C.; BITTENCOURT, A.; CARVALHO, E. M. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 497-503, 1999.

FRANK, F.M; FERNÁNDEZ, M.M.; TARANTO, N. J.; CAJAL, S. P.; MARGNI, R. A.; CASTRO, E.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MALCHIODI, E. L. Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response,

double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. **Parasitology**, v.126, n. 1, p. 31-9, 2003.

GUIMARÃES, M. C.; COUTINHO, S. G.; ANTUNES, C. M. F. Normas para a sorologia de moléstias parasitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 1, p. 55-58, 1987.

GRADONI, L.; PIZZUTI, R.; SCALONE, A.; RUSSO, M.; GRAMICCIA, M.; DI MARTINO, L.; PEMPINELLO, R.; GAETA, G.B. Recrudescence of visceral leishmaniasis unrelated to HIV infection in the Campania region of Italy. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 90, p. 234-235, 1996.

GOMES, A. DE C.; COUTINHO, S. G.; PAIM, G. V.; OLIVEIRA, S. M. O. DE; GALATI, E. A. B.; NUNES, M. P.; CAPINZIKI, A. N.; YAMAMOTO, Y. I.; ROTTER, P. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. Avaliação da atividade enzoótica de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* em ambiente florestal e peridomiciliar, região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, p. 105-115, 1990.

GOMES, A.H.S.; FERREIRA, I.M.R.; LIMA, M.L.S.R., CUNHA, E.A.; GARCIA, A.S.G.; ARAÚJO, M.F.L.; CHIOCCOLA, V.L.P. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, vol. 144, p.234-241, 2007.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, censo de 2000 e 2005.

JESUS, J. R.; ARAÚJO, F. A. P.; SPALDING, S.; TIECHER, F. Avaliação sorológica de anticorpos para *Leishmania spp.* na população canina em região de foco de leishmaniose tegumentar americana na Lomba do Pinheiro, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Parasitol Latinoam**, v.61, p.121-125, 2006.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K.G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 35, p. 376-383, 1999.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **Leishmaniases in Biology and Medicine**. Academic Press: London, v.1, p. 1-120, 1987.

LE PONT, F.; MOLLINEDO, S.; MOUCHET, J.; DESJEUX, P. Leishmaniose en Bolivie. IV Le chien dans les cycles des leishmanioses en Bolivie. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.84, p. 417-421, 1989.

LONARDONI, M.V.C. *et al.* Nota sobre leishmaniose canina no noroeste do Estado do Paraná, sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 27, p. 378-9, 1993.

LONARDONI, M. V. C. et al Leishmaniose tegumentar humana e canina no Município de Mariluz, Estado do Paraná, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.22, n. 12, p. 2713-2716, 2006.

LUZ, E, N. MEMBRIVE, E.A. CASTRO, J. DEREURE, J. PRATLONG, A DEDET, A PANDEY & V. THOMAZ-SOCCOL.. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná State, Southern Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.94, p.623-631, 2000.

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

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. C. ; SABROZA, P. C.; SOUZA, W. J. S. Reação de Imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudos comparativos dos resultados observados em 1974 e 1978. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 22, p.149-155, 1980.

MASSUNARI, G. K.; VOLTARELLI, E. M.; SANTOS, D. R.; SANTOS, A. R.; POIANI, L. P.; OLIVEIRA, O.; VIOLATO, R. J.; MATSUO, R.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V. A serological and molecular investigation of American cutaneous leishmaniasis in dogs, three years after na outbreak in the Northwest of Paraná State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 1, p. 97-104, 2009.

MAYWALD, P. G.; MACHADO, M. I.; CRUZ, J. M. C.; OLIVEIRA, M. G.; PIRES, M. R. F. G. Leishmaniose Tegumentar Canina: Inquérito Soroepidemiológico em Áreas Rural e Urbana no Município de Uberlândia, Minas Gerais. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 30, n.1, p. 25-29, 1993.

MENDONÇA, S. C. F.; SOUZA, W. J. S. D.; NUNES, M. P.; MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G. Indirect immunofluorescence test in New World: serological and clinical relationship. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, p. 347-355, 1988.

MIRANDA, R. N.; SCHWEIDSON, J. A. Leishmaniose Tegumentar no Paraná. **Revista Médica do Paraná**, v. 24, p. 5-6, 1955.

MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 15, p. 245-252, 2007.

MORILLAS, F.; SÁNCHEZ-RABASCO, F.; OCAÑA, J.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; OCAÑA-WIHELMI, J.; ACEDO, C.; SANCHÍS-MARÍN, M.C. Leishmaniose in the

focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. **Parasitol Res**, v. 82, p. 569-570, 1996.

NEITZKE, H C; SCODRO, R B; CASTRO, KR R; SVERSUTTI, AD.; SILVEIRA, TGV; TEODORO, U. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**;41(1):17-22,. 2008.

NIETO, C.G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S. Seroprevalence of canine leishmaniasis around Cáceres, Spain. **Prev Vet Med**, v.13, p. 173-178, 1992.

NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDI, F. P.; PAULA, H. B. DE; AZEVEDO, M. A. A. DE; LIMA, V. M. F. DE; GARCIA, J. F. Avaliação da Reação em Cadeia pela Polimerase para Diagnóstico da Leishmaniose Visceral em Sangue de Cães. **Ver. Bras. Parasitol. Vet.**, v.16, n. 1, p.5-9, 2007.

PADILHA, A. M.; MARCO, J. D.; DIOSQUE, P.; SEGURA, M. A.; MORA, M. C.; FERNÁNDEZ, M. M.; MALCHIODI, E. L.; BASOMBRIÓ, M. A.; Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina, **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 1-10, 2002.

PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E. G.; MELRO, M. C. B. F.; OLIVEIRA, G. G. S. ;SANTOS, W. L. C.; PONTES-DE-CARVALO, OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. Cohort study on canine emigration and *leishmania* infection in na endemic área for american visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. **Acta Tropica**, v.69, p. 75-83, 1998.

RAJASEKARIAH, G. H. R.; CARDOSO, L.; DOGCIO, D. A.; MARTIN, S. K.; SMITHYMAN, A. M. A Novel Exo-antigen-based ELISA for Detection of Canine Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.78, n.4, p. 616-623, 2008.

REIS, H. R. **Soroprevalência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) Canina, pelas técnicas de IFI e Elisa, do Município de Bela Vista do Paraíso-PR.** Londrina, 2004. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina.

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J. C.; COUTENAY, O.; DAVIES, C. R. Evaluation of PCR as diagnosis mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). **J Clin Microbiol**, v.41, p.1486-1493, 2003.

REY, L. As Bases de Parasitologia Médica. In: **Parasitologia**. 2ª Ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RYAN, R. P.; ARANA, B. A.; RYAN, J. R.; WIRTZ, R. A.; WORTMANN, G. W.; RIZZO, N. R. The domestic dog, a potencial reservoir for *Leishmania* in the Peten region of Guatemala. **Veterinary Parasitology**, n. 115, p. 1-7, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. and MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p. ISBN 0-87969-309-6.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ. 2007.

SANTOS, G. P. L.; SANAVRIA, A.; MARZOCHIM, C. A.; SANTOS, E. G. O. B.; PACHECO, R. S.; MOURA-CONFORT, E.; ESPÍNDOLA, C. B.; SOUZA, M. B.; PONTE, C. S.; CONCEIÇÃO, N. F.; ANDRADE, M. V. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 161-166, 2005.

SAVANI, E. S. M.; GALATI, E. A. B.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N.; DAMACENO, J. T.; BALDUINO, S. A. Inquérito sorológico sobre leishmaniose tegumentar americana em cães erantes no Estado de São Paulo, Brasil. **Ver. Saúde Pública**, v. 33, n. 6, p. 629-631, 1999.

SIDERIS, V.; KARAGOUNI, E.; PAPADOPOULOU, G.; GARIFALLOU, A.; DOTSIKA, E. Canine visceral leishmaniasis in the Great Athens area, Greece. **Parasite**, v. 3, p. 125-130, 1996.

SILVA, A. C. T.; CUPOLILLO, E.; VOLPINI, A. C.; ALMEIDA.; ROMERO, G. A. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Tropical Medicine and International Healthn**, v. 2, n. 9, p.1388-1398, 2006.

SILVA, A M.; CAMARGO, N J.; SANTOS, D. R.; MASSAFERA, R.; FERREIRA, A C; POSTAI, C; CRISTÓVÃO, E C; KONOLSAISEN, J F; BISETTO A.; PERINAZO, R; TEODORO, U; GALATI, E A. B. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. **Neotrop. entomol**; 37(2):209-225. 2008.

SILVEIRA, T.G. V.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; GUILHERME, A. L. F.; TOLEDO, M. J. O.; RAMOS, M.; ARRAES, S. M. A. A.; BERTOLINI, D. A.; SPINOZA, R. P.; BARBOSA, O. C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado Paraná, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.12, n.2, p. 141-147, 1996.

SILVEIRA, T. G. V.; ARRAES, S. M. A. A.; BERTOLINI, D. A.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; ROBERTO, A. C. B. S.; RAMOS, M.; SOBRINHO, A. N.; ISHIKAWA, E.; SHAW, J. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Parná, sul do Brasil. **Revista da Soiedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 413-423, 1999.

SILVEIRA, T. G. V.; TEODORO, U.; Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado do Paraná, Brasil (1996) .

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet Parasitol**, v. 90, p. 37-45, 2000.

TOLEZANO, J.E.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. M. F. L.; BISUGO, M. C.; CUNHA, E. A.; ELIAS, C. R.; LAROSA, R. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. II Utilização de antígeno particulado de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em inquéritos canino em regiões endêmicas. *Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo*, v. 57, p. 65-71, 1998.

THOMAZ-SOCCOL V.; CASTRO, E. A.; SCHUHLI, G. S. E.; CARVALHO, Y.; Marques E.; PEREIRA, E.; LUZ, E. A new focus of cutaneous leishmaniasis in the central area of Parana State, southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 111, p. 308-315, 2009.

VENAZZI, E. A. S.; ROBERTO, A. C. B. S. ; BARBOSA-TESSMANN, I. P.; ZANZARINI, P. D.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V. Detection of *Leishmania (Viannia)* DNA in blood from patients with American cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 4, p. 399-402, 2007.

VELASQUEZ, L. G.; MEMBRIVE, N.; MEMBRIVE, U.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; TESSMAN, I. P. B.; SILVEIRA, T. G. V. PCR in the investigation of canine American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. **Cad.Saúde Pública**, v. 22, n. 3,p. 571-578, 2006.

WHO (World Health Organization), 1990. **Control of the Leishmaniases**. WHO Technical Report Series 793. Geneva: WHO.

WHO. Report of a WHO Expert Committee, Technical Report Rey, L. Parasitologia. Rio de Janeiro: **Editores Guanabara Koogan**, 2001. (Gilda Barbosa 1999).

ZANZARINI, P. D.; SANTOS, D. R.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L. P.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V. Leishmaniose tegumentar americana canina em município do norte do Estado do Paraná, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1957-1961, 2005.

CAPÍTULO III

**LEISHMANIOSE E O PAPEL DO CÃO NA MANUTENÇÃO DO CICLO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DO PARANÁ,
BRASIL.**

LEISHMANIOSE E O PAPEL DO CÃO NA MANUTENÇÃO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

Resumo: Investigamos através de métodos parasitológico, sorológicos e moleculares a presença de *Leishmania* em diferentes tecidos (lesão cutânea, pele íntegra, baço, fígado, linfonodo, medula óssea e sangue periférico) de cães naturalmente infectados com o objetivo de elucidar o papel do cão na manutenção do ciclo do parasito. Para tanto, 48 amostras de cães naturalmente infectados com lesões sugestivas de LTA foram avaliadas. Vinte e oito animais (58,3%) apresentaram positividade tanto na sorologia quanto no isolamento *in vitro* do parasito. Oito cães, com diagnóstico parasitológico positivo e provenientes de um criadouro, foram eutanasiados por medidas de controle pela Vigilância Sanitária. Na necropsia foram colhidos sangue e diferentes tecidos para pesquisa do parasito por cultura e por PCR. Cem por cento dos animais eutanasiados tiveram o parasito isolado de úlcera cutânea. A identificação do parasito por RAPD-PCR mostrou que a espécie era *L.(Viannia) braziliensis*. No teste sorológico por IFI 87,5% dos animais foram sororeativos. Na técnica de PCR quando foi pesquisado DNA do parasito em tecido de lesão, sete (87,5%) animais tiveram fragmentos de 70 pb amplificados e na pesquisa de DNA em sangue total quatro (50%) foram positivos. Todos os cães apresentaram positividade em mais de um fragmento de tecido, inclusive tecido de pele íntegra. Os fragmentos de DNA amplificados foram seqüenciados, os quais, apresentaram 100% de similaridade com o complexo *Viannia*, corroborando com os dados obtidos pela PCR. Este estudo revelou que o cão pode ser considerado um hospedeiro-reservatório, sendo uma fonte de infecção em potencial de *Leishmania* para o vetor, ou outro hospedeiro, como o homem, comprovado pelo encontro de DNA de parasitos em região de pele íntegra e outros órgãos.

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar americana, hospedeiro-reservatório, cão, epidemiologia

CANINE LEISHMANIASIS AND THE ROLE OF THE DOG IN THE TRANSMISSION OF AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN PARANÁ STATE, BRAZIL.

Abstract: The role of dogs as reservoirs of *L. infantum* is confirmed, but that does not apply to other species such as *L. (V.) braziliensis*, which occupies the largest geographical area in Brazil. We investigated by parasitological, serological and molecular methods, the presence of *Leishmania* in different tissues (skin lesion, intact skin, spleen, liver, lymph nodes, bone marrow and peripheral blood) from naturally infected dogs in order to elucidate the role of dogs in the maintenance cycle of the parasite. Forty-eight samples from dogs naturally infected with lesions suggestive of ATL were evaluated. Twenty-eight animals (58.3%) were positive for the serology and *in vitro* isolation of the parasite. Eight dogs with positive parasitologic diagnosis and from an area dog breeder were euthanized for control measures for surveillance. At necropsy blood was collected, different tissues were search for the parasite by culture and PCR. One hundred percent of the animals were euthanized and had the parasite isolated from skin ulcers. The identification of the parasite by RAPD-PCR showed that the species was *L. (Viannia) braziliensis*. On the serological test for IFI, 87.5% of the animals were seroreactive. In the PCR, when the parasite's DNA was searched in the lesion sample, seven (87.5%) animals had 70 pb amplified fragments and DNA detection in whole blood four (50%) were positive. All dogs were positive in more than a piece of tissue, including tissue of healthy skin. The amplified fragments were subjected to methods of sequencing, which showed 100% similarity with the *Viannia* complex, confirming the PCR results. This study revealed that the dog may be considered a reservoir host, as a potential source of infection for the vector of *Leishmania*, or another host, like man, evidenced by the finding of parasite DNA in a region of healthy skin and other organs .

Key words: cutaneous leishmaniasis, reservoir host, dog, epidemiology

1. INTRODUÇÃO

O papel do cão como reservatório de *L. infantum* está confirmado, mas o mesmo não acontece com as outras espécies como *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana* (DESJEUX, 1992; ASHFORD, 2000; DEREURE *et al.*, 2003), que em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar Americana na América Central e do Sul, têm sido apontados como mantenedores da infecção (HERRER e CHRISTENSEN, 1976; REITHINGER e DAVIES, 1999).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990), para definir um indivíduo como hospedeiro-reservatório, é preciso demonstrar a necessidade que a população de parasitos tem, em particular de um mamífero, para a sua manutenção.

Para definir este hospedeiro-reservatório alguns critérios devem ser evidenciados: o hospedeiro-reservatório deve ser suficientemente abundante e ter uma sobrevivência longa para fornecer uma fonte de alimento significativa aos flebotomíneos; ter um contato intenso com os vetores; a proporção de espécimes que se tornam infectantes durante a sua vida deve ser considerável e exceder 20%; o curso da infecção no hospedeiro-reservatório deve ser longo e relativamente não patogênica, os parasitos devem estar viáveis na pele ou no sangue em número suficiente para serem sugados pelos flebotomíneos; os parasitos do hospedeiro-reservatório devem ser identificados e indistinguíveis dos humanos.

Existem relatos de leishmaniose tegumentar americana canina nas mesmas regiões onde ocorre leishmaniose humana, devido a este fato, suspeita-se que o cão também possa ser o hospedeiro reservatório da LTA (DAVIES *et al.*, 2000). MADEIRA *et al.* (2003) relataram a ocorrência de clínica similar entre humanos e cães que desenvolveram infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no Estado do Rio de Janeiro.

Desde a década de 80, os cães vêm sendo incriminados, tanto como hospedeiros reservatório primário como secundário. Esta provém de duas observações: isolados de cepas de *Leishmania* de cães e humanos são indistinguíveis e o risco de infecção de LTA em cães está correlacionado com o risco de infecção de LTA em humanos (REITHINGER e DAVIES, 1999).

No entanto o encontro do parasito em cães não permite distinguir se estes atuam como hospedeiro reservatório ou acidental. Soma-se a isso o relato coincidente de casos humanos de LTA e a presença de cães infectados coabitando, o que evidencia o fato de que humanos e cães estão expostos da mesma forma aos flebotomíneos, porém, isto não incrimina o cão como reservatório da doença (REITHINGER e DAVIES, 1999).

SILVA *et al.*(2005) sugerem que a ocorrência do parasita em cães, cavalos e mulas poderia indicar o papel de reservatório secundário. O desenvolvimento de lesões de pele sem isolamento em tecido, entretanto, sugere que estes animais, em adição aos humanos, seriam hospedeiros acidentais e ao mesmo tempo vítimas da doença (CASTRO *et al.*, 2007).

MARZOCHI *et al.* (1992) acredita que tanto o homem quanto os animais domésticos teriam papel relevante como fonte de infecção e atribui aos animais silvestres papel secundário na manutenção do parasito.

Cães de ambos os sexos, de quase todas as idades e de muitas raças já foram identificados com infecção por espécies de *Leishmania* causadora da forma cutânea. DEREURE *et al.* (2003) relataram sobre diferentes espécies de *Leishmania* (*L. archibaldi*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. infantum* (= *L. chagasi*), *L. major*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. tropica*) identificadas em cães de diversas partes do mundo.

Na LTA pouco se sabe sobre o curso natural da infecção e o potencial infeccioso que cães com doença ativa possam exercer para o inseto vetor. A distribuição sistêmica dos parasitas observados em cães com *L. chagasi* contrasta com a aparente restrição de *L. braziliensis* nas lesões cutâneas (MADEIRA *et al.*, 2005).

A presença de cães no domicílio tem sido relatada como fator de risco na LTA. O desequilíbrio ambiental desencadeado pelo desmatamento e pela expansão de áreas agricultáveis em meio silvestre podem conduzir a alterações da densidade de vetores e a possíveis reservatórios da doença. A prevenção da LTA no extradomicílio na área periurbana, tem-se constituído num problema difícil de resolução, seja pela amplitude dos espaços a serem atuados e pela insuficiência de conhecimentos sobre as reais condições de transmissão (SANGIONE *et al.*, 2007).

O melhor entendimento sobre este aspecto pode contribuir para o esclarecimento do papel do cão no ciclo na manutenção da LTA. Para este fim, neste trabalho, investigamos através de métodos parasitológico, imunológico e molecular, a presença de anticorpos e DNA de *Leishmania* em diferentes tecidos (lesão cutânea, pele íntegra, baço, fígado, linfonodo, medula óssea e sangue periférico) de cães provenientes de região endêmica para LTA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Sessenta cães, provenientes da região norte do estado do Paraná, região esta considerada endêmica pra LTA, passaram por avaliação clínica realizada por veterinários, onde se constatou a presença de lesão cutânea sugestiva de leishmaniose tegumentar americana (LTA).

Os animais portadores de lesão compatíveis com LTA foram submetidos a biopsias, após assepsia, tranquilização com acepromazina (0,1-0,2 mg/kg) e quetamina (10 mg/kg), e anestesia local com lidocaína 2%. Os fragmentos de lesão foram colhidos e acondicionados em meio de cultura McNeal, Novy e Nicolle (NNN) e Tobie & Evans, contendo solução salina (0,9%) acrescidos de 1000 UI de penicilina e 200 µg/ml de estreptomicina.

Em adição, amostras de sangue periférico foram colhidas em tubos à vacum por venopunção com e sem anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA) e acondicionadas em isopor e gelo para posterior análise parasitológica, imunológica e molecular.

A relação do número de cães avaliados e a metodologia diagnóstica aplicada estão apresentadas na TABELA 01.

TABELA 01: NÚMERO DE ANIMAIS E METODOLOGIA DIAGNÓSTICA APLICADA AOS CÃES SUSPEITOS DE LTA DA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

N° cães avaliados e metodologia diagnóstica	Método Diagnóstico			
	N° Animais	IFI	Isolamento	PCR
N° de total de animais	60	60	60	-
N° de animais excluídos	12	-	12	-
IFI + Isolamento	48	48	48	-
IFI + isolamento	28	28	28	28
N° de animais excluídos	-	-	-	5
IFI + isolamento + PCR sangue	23	23	23	23
IFI + isolamento (lesão cutânea) + isolamento (órgãos) + PCR (lesão cutânea) + PCR (órgãos) + PCR (sangue)	8	8	8	8

Nº cães = Número de Cães; (%) = Percentagem; IFI = Imunofluorescência Indireta, PCR = Reação em Cadeia pela Polimerase

tiopental sódico. Após a eutanásia, foram colhidos de forma asséptica, fragmentos do baço, fígado, medula óssea, linfonodos, lesão de pele e pele íntegra de cada animal. Os fragmentos de tecidos foram acondicionados conforme descrição acima. Além dos fragmentos também foi colhido sangue total dos oito animais.

Todo material foi enviado ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Paraná para o seu processamento.

2.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO PARASITO

2.2.1 Cultivo

O isolamento do parasito a partir do sangue e dos diversos fragmentos de tecidos foram inoculados, seis tubos em meio de cultura (NNN, Tobbie e Evans) e mantidos em estufa a 24°C. Do quinto ao sétimo dia de inoculação, as culturas eram avaliadas em microscopia óptica no aumento de 400x em busca de formas promastigotas e repicadas a cada sete dias para novos tubos. Após a quarta repicagem o material permanecia por mais 15 dias em estufa e nova leitura era efetuada. Caso o resultado fosse considerado negativo, a cultura era descartada. Quando o parasito foi isolado, os mesmos foram criopreservados no banco de cepas de *Leishmania* do laboratório de Parasitologia Molecular/UFPR (LPM/UFPR), catalogadas sob a sigla CUR (**C**uritiba) seguida de numeração correspondente a ordem de entrada. Para a identificação, por biologia molecular, (RAPD-PCR), após o isolamento, foram feitas repicagens em meio RPMI (em garrafa de Roux) para obtenção de cultura em massa para extração de DNA. A coleta das formas promastigotas era feita na fase exponencial.

2.2.2 Identificação dos Isolados por RAPD-PCR

Após cultivos escalonados (50 100 ml). Para recuperação das formas promastigotas passou-se o conteúdo da garrafa para um tubo Falcon de 15

mL e o mesmo foi centrifugado durante 20 min a 5.000 x g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com solução NaCl₂ a 0,3%. Posteriormente, foi transferido o precipitado para microtubo, previamente pesado, usando pipeta Pasteur e centrifugado a 9.000 x g a 4°C, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi pesada e estocada no freezer -20°C até o momento da extração do DNA. As extrações de DNA de todas as amostras foram feitas de acordo com o protocolo proposto por Sambrook, 2001, com algumas modificações.

O DNA foi ressuspendido em 100 µL de água ultra-pura esterilizada, e permaneceu a temperatura de 4°C 12 h. Posteriormente foi mantido a -80°C como solução estoque. As quantificações de DNA tanto das cepas referência bem como dos isolados, foram feitas pela medida de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro (Gene Quant[®]).

2.2.3 Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD)

As reações de amplificações foram feitas em volumes de 25 µL contendo 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (deoxinucleotídeos trifosfatos), 10 pmol iniciador, 10 ng DNA genômico e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Os ciclos de amplificação consistiram de uma desnaturação inicial à temperatura de 94°C por 5 min, desnaturação à temperatura de 94°C por 1 min, anelamento à temperatura de 36°C por 1 min e extensão à temperatura de 72°C por 2 min, por 45 ciclos. E uma extensão final de 72°C por 7 min. O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,6% e visualizadas por luz ultravioleta após coloração com Brometo de Etídio (0,5 µg/mL). Os iniciadores usados para amplificação de fragmentos de DNA foram OPA2 TGCCGAGCTG; OPA3 AGTCAGCCAC; OPA9 GGGTAACGCC e OPA10 GTGATCGCAG. (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Como controles positivos foram utilizadas cepas padrões de *L. amazonensis* (MHOM/AR/98/Cur41), *L. braziliensis* (MCAN/BR/03/Cur237) e *L. infantum* (MCAN/BR/03/Cur 240).

2.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

Para o diagnóstico sorológico de imunofluorescência indireta foram utilizados como antígenos formas promastigotas de *L. (V) braziliensis* cultivadas em meio NNN, soros de cães diluídos em tampão de fosfato (PBS) nas concentrações de 1:16 e 1:32 em primeira instância para triagem, seguidos de diluições para a titulação (1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e 1:1.024) e conjugado anti-IgG canino marcado com fluoresceína na diluição de 1:40. Foram considerados positivos os soros de cães com fluorescência maior ou igual a 1:40.

Neste estudo foi utilizado somente a técnica de IFI para o diagnóstico sorológico. A técnica adotada seguiu o protocolo segundo CASTRO, 2001.

2.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Para a extração de DNA das amostras de sangue e dos diversos fragmentos de tecidos dos animais foi utilizado o método Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK, *et al.*, 1989). As amostras foram centrifugadas (3.500 x g por 15min) e o sedimento lavado com PBS. Após esta fase, foi adicionado ao pellet 500µl de tampão de lise, contendo SDS 10% e RNase (Invitrogen®) e incubadas em banho-maria a 37°C por 2 horas. Em seguida foi adicionado proteinase K e novamente incubadas a 37°C, porém “overnight”. O lisado foi tratado com fenol-clorofórmio e o DNA foi precipitado com etanol, seco e ressuspendido em 10 µl de tampão TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

O par de primer utilizado neste trabalho foram os mesmos usados por LOPEZ *et al.* (1993), os iniciadores MP1L (5' - TACTCCCCGACATGCCTCTG-3') e MP3H (5' - GAACGGGGTTTCTGTATGC-3') que amplificam um fragmento de DNA de 70 pb da região do kDNA do complexo *Leishmania (Viannia), L. braziliensis*.

A reação de PCR consistiu em solução tampão da *Taq* 1x (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,4), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (10 mM), iniciadores MP1L e MP3H, *Taq* DNA polimerase (1U) e DNA, em um volume final de 25 µl.

As amostras foram amplificadas no termociclador (Bio-Rad Icyler) utilizando a etapa de desnaturação de à temperatura de 94°C, por 5 min, seguidos de 30 ciclos à temperatura de 94°C, por 1 min, à temperatura de 58°C, por 1 min e à temperatura de 72°C, por 1 min, com uma extensão final de 72°C por 10min. Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz ultravioleta (Transiluminador GIBCO).

2.5 SEQÜENCIAMENTO

As amostras de isolados positivos foram submetidas à amplificação por PCR e sequenciamento utilizando o Dyanamic ET para MegaBACE (GE Healthcare Life Sciences do Brasil).

Para a reação de seqüenciamento utilizou-se 100 ng do produto de PCR, 3 uL de Dyanamic ET, 1,5 uL do primer [10 pmol/uL] e 1,5uL de água ultra pura. Foram utilizados 25 ciclos à temperatura de 95°C por 20 seg; 50°C por 15 seg e 60°C por 1 minuto. Em seguida foi realizada a precipitação e purificação segundo COSTA-RIBEIRO (2007).

Seqüências consensos foram geradas utilizando o programa EMBOSS GUI (<http://bips.u-strasbg.fr/EMBOSS>) e, submetidas ao Programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmação dos resultados.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o teste McNemar utilizando-se o software BioEstat 5.0. A avaliação e comparação entre as diferentes técnicas de diagnóstico foram realizadas através da análise estatística de acordo com a metodologia proposta por GUIMARÃES (1987) e SAMPAIO (2007). Foi estabelecida

a sensibilidade e especificidade, os valores preditivos positivos e negativos e índice de concordância.

3. RESULTADOS

Dos 60 cães avaliados, 39 (65%) eram machos e 21 (35%) fêmeas, com idade média de 1,6 anos. Todos os animais apresentaram lesões cutâneas avermelhadas, de fundo granuloso ou recobertas por crostas sugestivas de LTA.

Quarenta cães (66,6%; 40/60) foram soropositivos na técnica de IFI para *Leishmania*. Dos 60 animais avaliados, nove animais foram excluídos em decorrência do não envio de amostra de biópsia de lesão cutânea e três foram excluídos em virtude de contaminação fúngica durante o processamento da técnica de cultivo *in vitro*. Ficando, portanto, a amostra constituída de 48 animais para serem avaliados em ambas as técnicas (IFI e isolamento). Destes, 28 cães (58,3%) apresentaram positividade tanto no isolamento quanto na sorologia (TABELA 02).

Destes 28 animais, em 23 deles foi realizada a técnica de PCR em material de sangue e em 11 (47,8%) tiveram o fragmento de DNA de *Leishmania* amplificado (TABELA 02).

TABELA 02: RESULTADOS E METODOLOGIA DIAGNÓSTICA APLICADA AOS CÃES SUSPEITOS DE LTA DA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

N° de cães e metodologia diagnóstica	N° Cães	Método Diagnóstico				
		IFI + (%)	Isolam. LC+ (%)	Isolam. Sg+ (%)	PCR LC+ (%)	PCR Sg + (%)
N° total de animais	60	40 (66,6)	-	-	-	-
N° de animais excluídos	12	12	-	-	-	-
IFI + Isolamento	48	28 (58,3)	28 (58,3)	-	-	-
IFI + isolamento	28	28	28	-	-	-
N° de animais excluídos	5	5	5	-	-	5
IFI + isolamento + PCR sangue	23	17 (73,9)	17 (73,9)	-	-	11 (47,8)
N° de animais excluídos	15	15	15	-	-	15
IFI + isolamento (lesão cutânea) + isolamento (órgãos) + PCR (lesão cutânea) + PCR (órgãos) + PCR (sangue)	8	7 (87,5)	8 (100)	0	8 (100)	4 (50)

N° cães = Número de Cães; (%) = Percentagem; IFI = Imunofluorescência Indireta, Isolam. – Isolamento; LC = Lesão Cutânea; SG = Sangue; PCR = Reação em Cadeia pela Polimerase

Dos 23 cães analisados pela PCR de amostra de sangue, isolamento de lesão cutânea e IFI, sete (7/15; 50%) foram positivos nas três metodologias diagnósticas. Um (1/2; 50%) cão foi positivo na PCR de amostra de sangue, quando o isolamento de lesão cutânea foi positivo e IFI negativo, bem como quando a PCR foi positiva, o isolamento de lesão cutânea foi negativo e a IFI positiva. Dois (2/4; 50%) cães foram negativos em todas as técnicas (PCR de amostra de sangue, isolamento de lesão cutânea e IFI). Não houve diferença estatística quando se comparou as diferentes metodologias, PCR de amostra de sangue versus IFI ($p=0,1094$) e PCR versus isolamento de lesão cutânea ($p=0,1460$) (TABELA 03).

TABELA 03: RESULTADO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) EM SANGUE COMPARADA AO ISOLAMENTO DO PARASITO EM LESÃO CUTÂNEA E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) EM 23 CÃES COM LESÃO SUGESTIVA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

ISOLAMENTO (LC) / IFI	Total de Cães com Lesão (n)	PCR (sangue)	
		Positivos (n)	Positividade (%)
Positivo/Positivo	15	7	50
Positivo/Negativo	2	1	50
Negativo/Positivo	2	1	50
Negativo/Negativo	4	2	50
Total	23	11	47,8

LC – lesão cutânea

n = número de animais analisados

$p= 0,1460$, teste McNemar, PCR versus Isolamento

$p= 0,1094$, teste McNemar, PCR versus IFI

Os oito cães eutanasiados eram provenientes da zona rural do município de Rolândia, cidade pertencente à região norte do Estado do Paraná. A FIGURA 01 demonstra a proximidade da residência dos cães positivos para LTA à mata ciliar. A FIGURA 02 revela o local do sítio onde os cães residiam e a FIGURA 06 mostra um dos cães que foram eutanasiados, ressaltando o bom estado geral do animal.



FIGURA 01 – LOCAL AONDE RESIDIAM OS OITO CÃES EUTANASIADOS PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE ROLÂNDIA, PARANÁ, BRASIL. FONTE: ARQUIVO PESSOAL, 2006.



FIGURA 02 – VISTA DO SÍTIO AONDE RESIDIAM OS OITO CÃES EUTANASIADOS PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE ROLÂNDIA, PARANÁ, BRASIL. FONTE: ARQUIVO PESSOAL, 2006.



FIGURA 03 – COLETA DE AMOSTRA DE LESÃO DE PELE DE BOLSA ESCROTAL EM CÃO SUSPEITO DE LTA, REGIÃO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL. FONTE: ARQUIVO PESSOAL, 2006.



FIGURA 04 – COLETA DE AMOSTRA DE LESÃO DE PELE DE ORELHA EM CÃO SUSPEITO DE LTA, REGIÃO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL. FONTE: ARQUIVO PESSOAL, 2006.



FIGURA 05 – COLETA DE AMOSTRA DE LESÃO DE PELE DE BOLSA ESCROTAL EM CÃO SUSPEITO DE LTA, REGIÃO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL. FONTE: ARQUIVO PESSOAL, 2006.



FIGURA 06 – CÃO POSITIVO PARA LTA EUTANASIADO PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE ROLÂNDIA, PARANÁ, BRASIL. FONTE: ARQUIVO PESSOAL, 2006.

Todos os animais apresentaram lesões sugestivas de LTA distribuídas da seguinte forma, três (37,5%) cães com lesões nas orelhas (FIGURA 04 e 05), dois (25%) cães com lesões no focinho, dois (25%) cães com lesões em bolsa escrotal (FIGURA 03), um (12,5%) cão com lesão na pata e um (12,5%) cão com lesão no lábio (FIGURA 07).

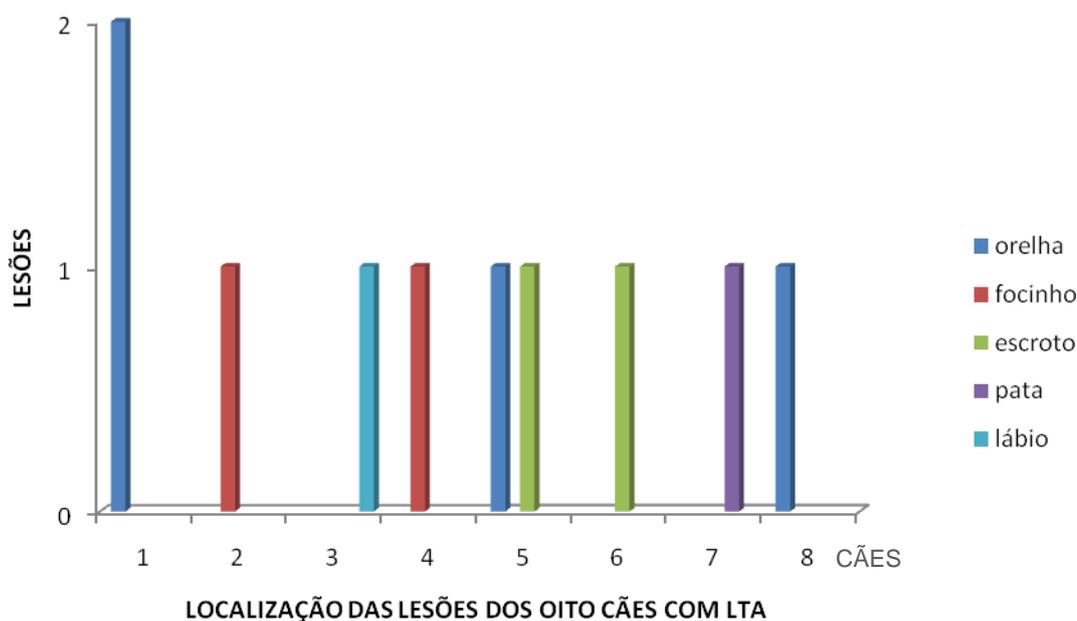


FIGURA 07 – DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES CUTÂNEAS DOS OITO CÃES COM LTA EUTANASIADOS

Dos oito (100%) cães eutanasiados em todos foi isolado o parasito da lesão cutânea e na PCR de tecido de lesão. Sete (87,5%) cães foram sororeagentes na IFI e quatro (50%) foram positivos na PCR de sangue total. Comparando-se as técnicas de isolamento de lesão cutânea, PCR de lesão cutânea, PCR de sangue e IFI, as técnicas que demonstraram maior sensibilidade foram o isolamento de lesão cutânea e a PCR de lesão cutânea, seguido da IFI e PCR de sangue. Estes resultados estão demonstrados no gráfico da FIGURA 08.

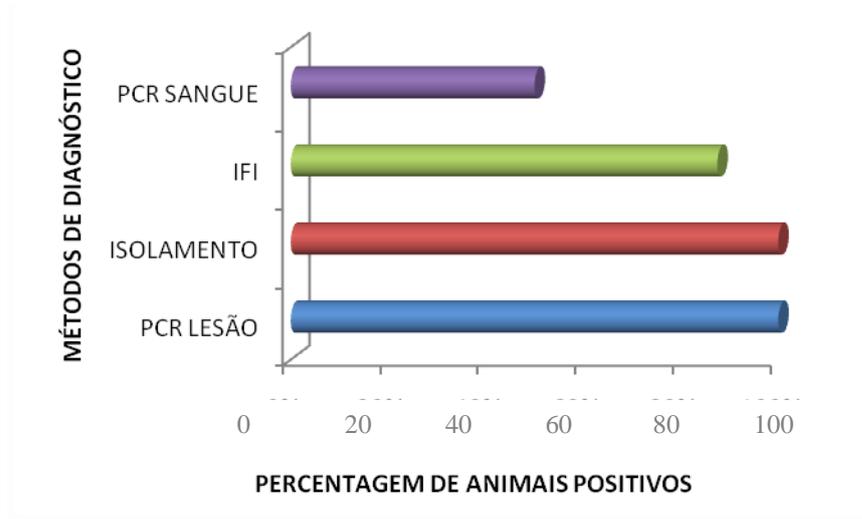


FIGURA 08 – Percentagem de animais positivos para *Leishmania* nas diferentes metodologias diagnósticas nos oito cães eutanasiados.

A identificação dos isolados por PCR- RAPD apresentaram padrões de banda similar à cepa referência de *L. braziliensis*. Nas FIGURAS 09 e 10 está exemplificado o perfil dos produtos de amplificação do DNA para os iniciadores OPA9 e OPA3. Para os iniciadores A9 e A10 verificou-se maior similaridade entre os isolados. Para os iniciadores A3 e A2 constatou-se maior variabilidade entre os isolados.

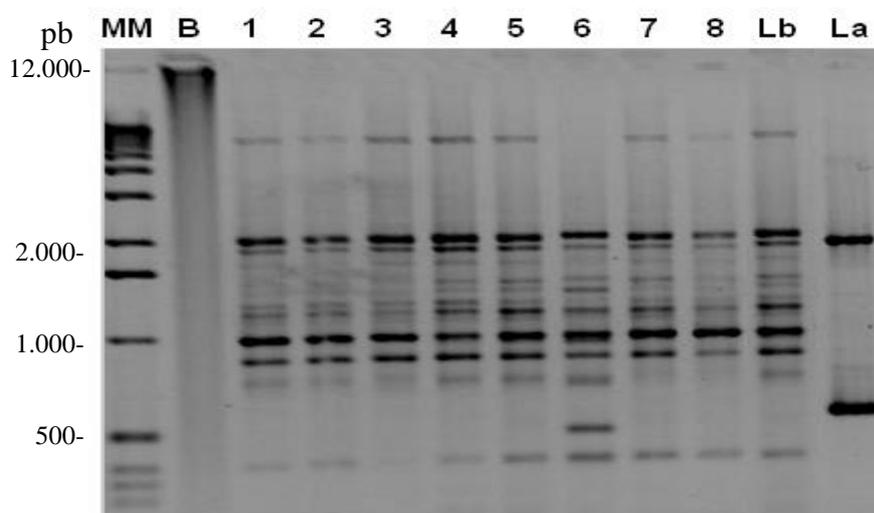


FIGURA 09 - Perfil dos produtos de amplificação do dna pela técnica de rapd dos isolados de *Leishmania* com o iniciador A9 dos cães eutanasiados. Eletroforese em gel de agarose 1,6%. MM – Marcador molecular 1kb (invitrogen®); B-Controle negativo; 1 Bili; 2 Marlon; 3 Major; 4 Malhado; 5 Huck; 6 Fininho; 7 Scooby; 8 Bethoven; Controle positivo - cepa referência (Lb) *Leishmania braziliensis*, (La) *Leishmania amazonensis*.

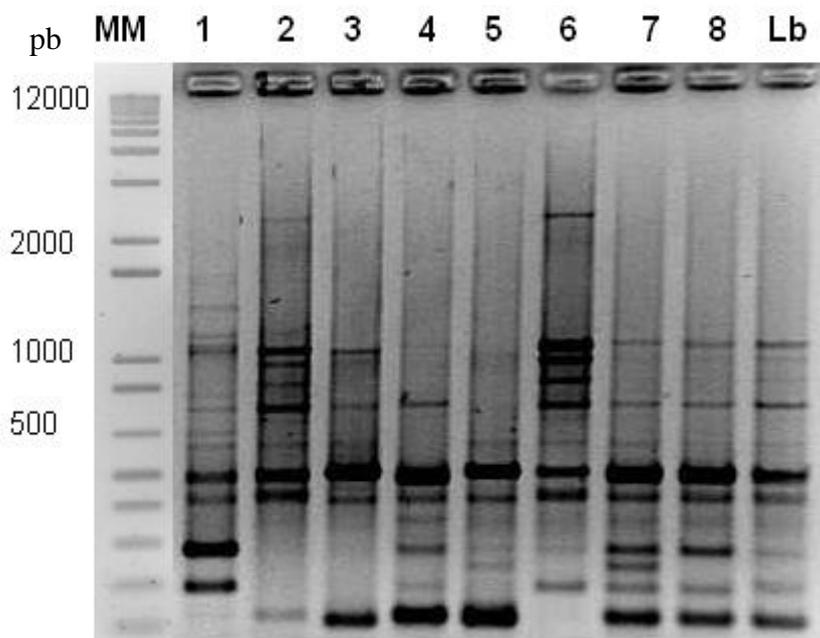


FIGURA 10 - Perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de RAPD dos isolados de *Leishmania* com o iniciador A3 dos cães eutanasiados. Eletroforese em gel de agarose 1,6%. MM – Marcador molecular 1kb (invitrogen®); 1 Bili; 2 Marlon; 3 Major; 4 Malhado; 5 Huck; 6 Fininho; 7 Scooby; 8 Bethoven; (Lb) *Leishmania braziliensis*.

Todos os cães apresentaram positividade em mais de um fragmento de tecido. Oito (100%) cães foram positivos para o isolamento do parasito em cultivo. Para a técnica de PCR em biópsias de lesão de pele os oito animais tiveram fragmentos de DNA amplificados. Sete cães (87,5%) apresentaram DNA do parasito na medula óssea. Cinco (62,5%) cães foram positivos em biópsia de fígado. Cinquenta por cento dos animais tiveram fragmento de DNA de *Leishmania* amplificados no sangue (TABELA 03).

O fragmento de DNA amplificado por PCR e submetido ao sequenciamento apresentou 100% de similaridade com o complexo *Viannia*, corroborando os dados obtidos por PCR e RAPD dos isolados.

TABELA 4: RESULTADO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) EM DIFERENTES ÓRGÃOS EM OITO CÃES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Código Cão com Lesão	RESULTADO DA PCR							
	B	PI	S	F	L	MO	LP	Total
1	-	-	-	-	-	+	+	2/7
2	-	-	-	+	+	+	+	4/7
3	+	-	-	+	+	+	+	5/7
4	+	+	+	-	+	-	+	5/7
5	-	-	+	-	+	+	+	4/7
6	-	+	+	+	-	+	+	5/7
7	+	+	+	+	-	+	+	6/7
8	-	-	-	+	+	+	+	4/7
Total	3/8	3/8	4/8	5/8	5/8	7/8	8/8	

(-) cão negativo para Lb, (+) cão positivo para Lb, B = baço; PI = pele íntegra; S = sangue total; F = fígado; L = linfonodo; MO = medula óssea; LP = lesão de pele; pos = positivo; neg = negativo, PCR = Reação em Cadeia pela Polimerase

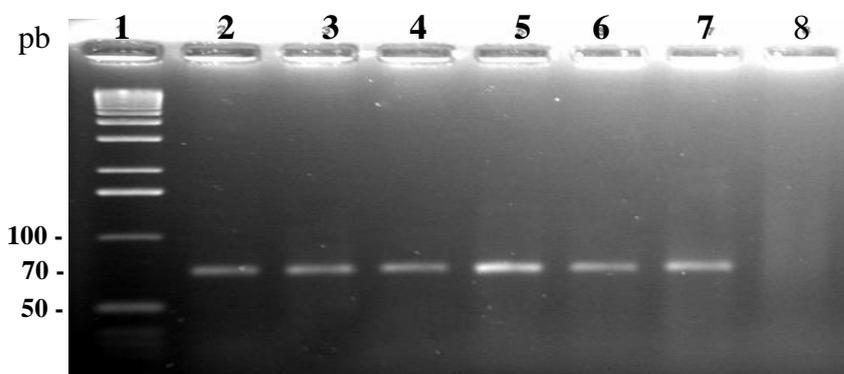


FIGURA 11 – Produto da amplificação do DNA de *leishmania (viannia) braziliensis* (70 pb) pela técnica de PCR de fragmentos de tecidos do cão eutanasiado de nome malhado, proveniente do município de Rolândia, Paraná, Brasil. 1 = Marcador molecular de 50 pb; 2 a 6 - DNA amplificado de *L.(v.) braziliensis* : 2 = Pele íntegra, 3 = Sangue, 4 = Fígado, 5 = Medula óssea e 6 = Lesão cutânea, 7 = Controle positivo (DNA de cepa referência de *L. braziliensis* e 8 = Controle negativo, pb = pares de base.

4. DISCUSSÃO

Um dos fatores que nos incentivou a realização da pesquisa na propriedade rural no município de Rolândia foi o conhecimento de antemão da ocorrência de casos humanos no mesmo local onde o proprietário possuía um criadouro de cães.

Ao observar as características ambientais da região, foi constatada a presença de áreas alteradas pela agricultura, permanecendo apenas resquícios de matas, contribuindo desta forma para o desenvolvimento do ciclo do parasito, propiciando a infecção humana e dos cães domésticos, confirmando o caráter endêmico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) na região.

Para responder os objetivos do presente trabalho que era avaliar o papel do cão na manutenção do ciclo de *L. (V.) braziliensis*, utilizou-se como ferramenta a IFI, isolamento e PCR.

A pesquisa de anticorpos em cães de área endêmica de LTA vem sendo realizada com o uso da técnica de IFI, e títulos significativos de anticorpos têm sido demonstrados em cães portadores de lesões (SILVEIRA, 1996).

Segundo BARBOSA *et al.* (1999) a soropositividade na IFI é um bom indicador de infecção canina. Nesta pesquisa foi verificada uma prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* de 58,3% (28/48) pela técnica sorológica de imunofluorescência indireta.

CASTRO (2001) analisou pelo método de IFI, 371 cães e detectou soropositividade em 21 animais (5,6%). SANTOS *et al.* (2005) num estudo de prevalência em uma população canina revelou positividade de 16,5%, diferentemente de MARQUEZ *et al.* (2010) que detectaram 45,3% de prevalência.

A alta taxa de prevalência encontrada neste estudo indica que os animais analisados apresentavam infecção aguda e não crônica. Porém, ao analisar o estado geral dos cães, verificou-se que estes se apresentavam em ótimo estado geral, apesar da presença de lesões, direcionando a clínica do animal para a forma crônica da doença.

CASTRO *et al.* (2007) relatam que a detecção de títulos de anticorpos em cães, não indicam necessariamente infecção ativa, podendo revelar

apenas que o indivíduo entrou em contato com o parasito, ou devido a reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, que levariam a resultados falso-positivo.

Outra explicação no encontro da elevada taxa, é o tipo de amostragem definida para a população foco do estudo. A amostragem não-probabilística e intencional, que se caracteriza pelo direcionamento dos animais desejados foi a utilizada no estudo. Os cães selecionados para a pesquisa apresentavam lesões e sinais clínicos suspeitos de leishmaniose e se tornaram foco do estudo após o isolamento da *Leishmania (Viannia) braziliensis* em amostras de biópsia de lesão de pele no cultivo *in vitro*.

Outro fator que pode ter contribuído para a elevação da taxa é a possibilidade da ocorrência de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, que levariam a um resultado falso-positivo.

Nas últimas décadas, ocorreu um progresso significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para o diagnóstico de doenças. A PCR aplicada neste estudo para o diagnóstico de *Leishmania* tem sido amplamente utilizada por vários autores na investigação da leishmaniose (GOMES *et al.*, 2008). Portanto, optou-se pela PCR como uma das metodologias diagnóstica.

Uma vez que na região estudada, a maioria dos isolados de *Leishmania* sp foi identificado como *L. (V.) braziliensis* (PEREIRA *et al.*, 2008), foi decidido utilizar os iniciadores MP1L/MP3H descrito por LOPEZ *et al.* (1993), que amplificam um fragmento de 70 pb do minicírculo presente na região do kDNA de *Leishmania (Viannia)* subgênero. Esta metodologia demonstrou ser sensível, pois foi capaz de identificar 1 parasita/ μ l, ou seja 0,34 fg de DNA. Resultado semelhante aos obtidos por LOPEZ *et al* (1993) e VELASQUEZ *et al* (2006).

As diferentes metodologias de diagnóstico (Isolamento, IFI e PCR) não revelaram associação entre si, PCR versus isolamento ($p=0,1460$) e PCR versus IFI ($p=0,1094$). A PCR para a pesquisa de DNA do parasito em sangue teve 50% de positividade nos cães com isolamento e IFI negativos, confirmando a falta de associação entre a sorologia e o isolamento. Isto, deve-se muito provavelmente, a janela imunológica dos animais na LTA, que de acordo com UCHÔA *et al.* (2001) em alguns casos a soroconversão pode ocorrer após vários meses.

Outra evidência que explica estes resultados é a baixa sensibilidade da técnica de cultivo *in vitro* devido ao estágio da lesão (ativa ou curada), ou a

heterogenicidade da amostra, ou seja, a distribuição desigual de amastigotas no tecido lesionado (MATHIS *et al.*, 1995).

A evolução clínica da LTA canina provocada pela *L. braziliensis* manifesta-se normalmente de forma crônica, sem comprometer o estado geral do animal, cujas lesões podem progredir em número e extensão, evoluir para a cura clínica espontânea com reativações posteriores ou, acometer tardiamente a mucosa nasal (MADEIRA *et al.*, 2003).

Isto pôde ser comprovado pelo ótimo estado geral dos animais eutanasiados. Dos oito cães positivos, seis apresentaram uma única lesão (n° 2, 3, 4, 6, 7 e 8), sendo que dois deles apresentaram lesões em regiões menos comuns, lábio e pata (n° 3 e 7). Dois animais apresentaram lesões múltiplas, localizadas em orelha e escroto (n° 1 e 5). Outros autores relataram a prevalência de lesões únicas, como também a multiplicidade de lesões (FALQUETO *et al.*, 1986; PIRMEZ *et al.*, 1988).

Quanto a localização das lesões, também pode-se comprovar o predomínio delas nas orelhas como foi relatado por PIRMEZ *et al.* (1988), ao contrário dos achados de LONARDONI *et al.* (2006), onde o predomínio de lesões ocorreram no focinho. Uma explicação para a prevalência da ocorrência nestas regiões pode ser devido às áreas predominantes serem locais de maior exposição aos insetos vetores.

A frequência de detecção de DNA do parasito foi diferente nas diversas metodologias (IFI, isolamento e PCR). A porcentagem de 50% na PCR de sangue (4/8) sugere que o parasito encontra-se em maior concentração no local da lesão cutânea, realizando nesse período uma discreta disseminação hematogena. O que pôde ser ratificado pela maior porcentagem de parasitos detectados na PCR de lesão cutânea 100% (8/8) e no isolamento de biópsia de lesão cutânea 100% (8/8). A IFI corroborou com os resultados da PCR de lesão cutânea e isolamento, e, demonstrou que a PCR pode ser uma boa alternativa quando a sorologia resultar em negatividade, pela facilidade de execução comparando ao isolamento.

Outro fator a se ressaltar é a importância de se realizar mais de uma metodologia de diagnóstico, pois dos oito cães avaliados, sete (87,5%) foram positivos na IFI, apenas um foi negativo (com todas as técnicas?), revelando a possível variação na resposta imune individual. No futuro, possa ser interessante

correlacionar a parasitemia com o estado imunológico do hospedeiro (MATHIS *et al.*, 1995). ZANZARINE *et al.* (2005) sugerem que seja realizado o acompanhamento periódico, especialmente em cães com lesões crônicas e casos recorrentes, com o objetivo de confirmar o diagnóstico da LTA e avaliar a evolução da doença.

Para caracterizar o cão como hospedeiro-reservatório, é necessário que o mesmo se enquadre nos critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1999). Quais são os critérios? A LTA é uma doença crônica. Existem relatos de que as lesões leishmanióticas em cães apresentam alternância de períodos de cura e recidivas espontâneas em animais não tratados (PIRMEZ *et al.*, 1992), isto comprova que a infecção apresenta um curso longo e de caráter relativamente não patogênico.

Os cães, animais suspeitos de serem hospedeiro-reservatórios, possuem uma estimativa de vida longa, em média 12 anos (MICHEL, 1999). A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera que, em países emergentes, a proporção média da população canina varie de 1:10 a 1:6, ou seja, cerca de 10 a 16,7% da população humana, podendo variar de município para município, podendo atingir valores de até 1:1 (REICHMANN *et al.*, 1999). Estes dados revelam que o cão é suficientemente abundantemente e tem uma sobrevida longa para fornecer alimento aos vetores.

Outro requisito que incrimina o cão como hospedeiro-reservatório é a presença de parasitos viáveis na pele ou sangue. No presente trabalho, foi comprovado que o parasito pode estar presente em pele íntegra, sendo uma fonte de infecção para o vetor. Além disso, através da positividade da PCR de sangue, pôde-se verificar que o parasito realiza disseminação hematogênica, podendo ainda, os parasitos se alojarem em diferentes órgãos, como foi verificado neste estudo, pois houve positividade na PCR de fragmento de diversos tecidos (baço, fígado, linfonodos e medula óssea).

Isto valida um dos postulados da OMS que diz que para incriminar o cão como hospedeiro-reservatório, este necessita apresentar parasitos viáveis em outros locais do organismo e não somente na área onde se encontra a lesão cutânea.

O resultado positivo da PCR principalmente de pele íntegra e do sangue, além dos outros órgãos (baço, fígado, medula óssea, linfonodos e lesão de

pele) revelados neste estudo, valida o postulado da Organização Mundial de Saúde, que diz que o parasito necessita estar viável em outros locais do organismo (pele íntegra e sangue) e não somente na área onde se encontra a lesão cutânea.

CASTRO (2001) tentou comprovar este postulado através do isolamento de pele íntegra, vísceras, linfonodos e sangue de cães com lesões cutâneas, no entanto nenhum animal apresentou parasito com exceção da pele. MADEIRA *et al.* (2005) tentaram evidenciar a disseminação da *Leishmania* através do cultivo de sangue, porém sem sucesso. Foi observado variações nas porcentagens de positividade para *L. braziliensis* nos diferentes órgãos investigados (100% lesão de pele, 87,5% medula óssea, 62,5% fígado, 50% linfonodo e sangue e 37,5% baço e pele íntegra). De acordo com Reithinger *et al.* (2003) após a inoculação da *Leishmania* pelo vetor o parasita se localiza preferencialmente na pele, com a disseminação hematogênica ocorrendo após um intervalo de tempo não determinado, portanto a concentração de parasita circulante é menor, consequentemente, também é menor nos outros órgãos do que no local da lesão cutânea.

O método de RAPD-PCR foi utilizado para identificação do parasito revelando a variabilidade genética intra-específica e o polimorfismo entre os isolados dos cães eutanasiados. No Norte do Paraná, na região analisada foi detectado a presença de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. THOMAZ-SOCCOL *et al.* (2003) ressaltou que no Estado do Paraná, *L. (V.) braziliensis* é a única espécie presente.

Nesta pesquisa, a análise de sequenciamento foi realizada com o objetivo exclusivo de confirmar a análise pela PCR nos diferentes órgãos e, pôde-se concluir com resultados obtidos, que as amostras dos diferentes tecidos avaliados apresentaram similaridade com o complexo *Viannia*, confirmando os dados obtidos por PCR e a identificação do parasito por RAPD-PCR. Também se ressalta que as técnicas moleculares podem ser usadas como ferramentas tanto no diagnóstico como para estudos epidemiológicos da leishmaniose.

Para um animal ser considerado um bom reservatório, a abundância de parasitos e a duração destes é fundamental para a infecção dos insetos vetores. O presente estudo demonstrou a presença de DNA de *Leishmania* em diferentes tecidos nos cães avaliados. Isto demonstra a dispersão do parasito no organismo do

hospedeiro, contribuindo desta forma, como fonte de infecção para o vetor. Este fato sugere que os cães são bons reservatórios para a *L.(V) braziliensis*.

5. CONCLUSÕES

- Não houve associação entre as diferentes metodologias de diagnóstico em virtude da patogenia da doença, revelando que o parasito pode ser encontrado em maior concentração na lesão, mas também pode ser encontrado no sangue, ou em tecidos de diferentes órgãos.
- Este estudo revelou que o cão pode ser considerado um hospedeiro-reservatório, sendo uma fonte de infecção em potencial de *Leishmania* para o vetor, ou outro hospedeiro, como o homem, comprovado pelo encontro de DNA de parasitos em região de pele íntegra e outros órgãos.
- Mediante a detecção de DNA de *Leishmania* em diferentes órgãos, novas abordagens e orientações, tanto para a elucidação da transmissão e patogenia, quanto para o controle e prevenção da leishmaniose poderão ser aplicadas.
- Sabendo-se que a *Leishmania* pode se localizar em outros órgãos além da lesão de pele, estudos quanto ao período em que os parasitos possam permanecer no organismo do hospedeiro e se estes apresentam-se viáveis o suficiente para serem fonte de infecção para os vetores, deverão ser realizados.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. B. P. F.; FARIA, R. P.; PIMENTEL, M. F. A.; DAHROUG, M. A. A.; TURBINO, N. C. M. R.; SOUSA, V. R. F. Inquperito soroeidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 156-159, 2009.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.30, p. 1269-1281, 2000.

BARBOSA, G. M. S.; MARZOCHI, M. C. A.; MASSARD, C. L.; LIMA, G. P. S.; CONFORT, E. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em cães, no Município de Paraty, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 15, n. 3, p.641-646, 1999.

BUCK A. A.; GART J. J. Comparasion of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. I. Indices of agreement and their relation to prevalence. **Am. J. Epidemiol.**, v. 83, p.586-592, 1966.

CAMERA, P. O.; JUNGER, J.; PIRES, F. E. S. S.; MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, M. P. O.; FERNANDES, O.; PIRMEZ, C. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 1112-1117, 2006.

CASTRO, E. A. **Papel do Cão na Manutenção do Ciclo de *Leishmania*, Frequência de Enzootia através de Estudos Soro-Epidemiológico**. Curitiba, 2001.192 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CASTRO E. A.; LUZ, E.; TELLES, F. Q. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Parana state, Brazil. **Acta Tropica**, n.93, p.141–149, 2005.

CASTRO, E.; THOMAZ-SOCCOL, V. AUGUR, C.; LUZ, E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). **Experimental Parasitology**, v.117, p. 13-21, 2007.

COSTA-RIBEIRO, M. C. V.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. B. Low Gene Flow of *Aedes aegypti* between Dengue-Endemic and Dengue-Free Areas in Southeastern and Southern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.77, n.2, p. 303-309, 2007.

DAVIES, C. R.; REINTHINGER, R.; CAMPBELL-LENDRUM, D.; FELICIANGELI, D.; BORGES, R.; RODRIGUEZ, N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries, **Cad. Saúde Pública**, v.16, n.4, p.925-950, 2000.

DEREURE, J.; EL-SAFI, S.H.; BUCHETON, B.; BONI, M.; KHEIR, M.M.; DAVOUST, B.; PRATLONG, F.; FEUGIER, E.; LAMBERT, M.; DESSEIN, A.; DEDET, J.-P. Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. **Microb Infect**, v. 5, p. 1103-1108, 2003.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Stat Q**, v. 45, p. 267-275, 1992.

FALQUETO, A.; COURA, J. R.; BARROS, G. C.; GRIMALDI, G.; SESSA, P.A.; CARIAS, V. R. D.; JESUS, A. C.; ALENCAR, J. T. A. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 155-163, 1986.

FOLLADOR, I.; ARAÚJO, M. A.; TAVARES-NETO, J.; BARRAL, A.; MIRANDA, J. C.; BITTENCOURT, A.; CARVALHO, E. M. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 497-503, 1999.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RDRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, 2006.

GOMES, A. H. S.; FERREIRA, I. M. R.; LIMA, M. L. S. R.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F. L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and controlo f canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.234-241, 2007.

GOMES, A. H. S.; ARMELIN, I. M.; MENN, S. Z.; PEREIRA-CHIOCCOLA. *Leishmania (Vlannia) braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 119, p.319-324, 2008.

HERRER A.; CHRISTENSEN H. A. Natural cutaneous leishmaniasis in dogs in Panama. **Am J Trop Med Hyg**, v. 25, p. 59-63, 1976.

LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; ALVES, W. A.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; MEMBRIVE, U. A.; MEMBRIVE, N. A.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; ZANZARINI, P. D.; ISHIKAWA, E.; TEODORO, U. Leishmaniose tegumentar americana humana e canina no município de Mariluz, Estado do Paraná, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.22, n. 12, p. 2713-2716, 2006.

LOPEZ, M.; INGA, R.; CANGALAYA, M.; ECHEVARRIA, J.; LLANOS-CUENTAS, A.; ORREGO, C.; AREVALO, J. Diagnosis of *Leishmania* using polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. **Am. J. Trop. Med.**, v.49, n.3, p.348-356, 1993.

MADEIRA, M. F.; UCHÔA, C. M. A.; LEAL, C. A.; SILVA, R. M. M.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C. M.; SERRA, C. M. B. *Leishmania (Vlannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n. 5, p. 551-555, 2003.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBAR, T. M. P.; SERRA, C. M. B.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; CONFORT, E. M.; QUINTELLA, L. P.; MARZOCHI, M. C. A. Is *Leishmania(Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? **Parasitol res**, v. 97, p. 73-76, 2005.

MARZOCHI, M. C. A.; BARBOSA-SANTOS, E. G. O. Leishmaniasis diagnosis. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 3, p. 391-392, 1988.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.63, p.82-104, 1992.

MATHIS, A.; DEPLAZES, P. PCR and in Vitro Cultivation for Detection of *Leishmania spp.* In Diagnostic Samples from Humans and Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.5, p.1145-1149, 1995.

MICHEL, A. R. Longevity of British breeds of dog and its relationships with sex, size, cardiovascular variables and disease. **Vet. Rec.**, v. 145, n. 22, p. 625-629, 1999.

PADILHA, A. M.; MARCO, J. D.; DIOSQUE, P.; SEGURA, M. A.; MORA, M. C.; FERNÁNDEZ, M. M.; MALCHIODI, E. L.; BASOMBRI, M. A.; Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina, **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 1-10, 2002.

PEREIRA, E. F. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LIMA, C. H.; THOMAZ-SOCCOL, A.; CASTRO, E. A.; MULINARI-BRENNER, F.; QUEIROZ-TELLES, F.; LUZ, E. Molecular diagnosis of leishmaniasis in the Paraná state of southern Brazil. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1024-1030, 2008.

PIRMEZ, C.; COUTINHO, S. G.; MARZOCHI, M. C. A.; NUNES, M. P.; GRIMALDI, J. G. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.38, p. 52-58, 1988.

PIRMEZ, C. Immunopathology of American cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 87, p. 105-109, 1992.

REICHMANN, M. L. A. B.; PINTO, H. B. F.; NUNES, V. F. P. Manual Técnico do Instituto Pasteur nº 3. **Instituto Pasteur**, v. 3, p. 32, 1999.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.7, p.2352-2356, 2002.

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J. C.; COUTENAY, O.; DAVIES, C. R. Evaluation of PCR as diagnosis mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia) spp.* in domestic dogs (*Canis familiaris*). **J Clin Microbiol**, v.41, p.1486-1493, 2003.

SANGIONE, L. A.; GEBARA, C. M. S.; ARAGÃO. G. M.; BEZERRA, C. A. A.; ALMEIDA, C. C. Busca ativa de casos de leishmaniose cutânea em humanos e cães em área periférica do município de Campo Mourão – PR – Brasil, **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1492-1494, 2007.

SANTOS, G. P. L.; SANAVRIA, A.; MARZOCHIM. C. A.; SANTOS, E. G. O. B.; PACHECO, R. S.; MOURA-CONFORT, E.; ESPÍNDOLA, C. B.; SOUZA, M. B.; PONTE, C. S.; CONCEIÇÃO, N. F.; ANDRADE, M. V. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 161-166, 2005.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R. P. Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **Am. J. trop. Med. Hyg.** , v. 65, n.6, p.896-898, 2001.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. **Trends in Parasitology**, v.21, n. 12, p.550-552, 2005.

SILVEIRA, T. G.V.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; TOLEDDO, M. J. O.; BERTOLINI, D. A.; ARRAES, S. M. A. A.; FILHO, D. V. Investigação sorológica em cães de área endêmica de leishmaniose tegumentar, no Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, v.12, n.1, p.89-93, 1996.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in na Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.2, p.560-563, 2001.

UCHÔA, C. M. A.; SERRA, C. M. B.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C. M.; SILVA, R. THEOPHILO, M. F.; FIGLIUOLO, L. P.; HORTA, F. H.; MADEIRA, M.F. Aspectos sorológicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana canina em Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 563-568, 2001.

VELASQUEZ, L. G.; MEMBRIVE, N.; MEMBRIVE, U.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; TESSMAN, I. P. B.; SILVEIRA, T. G. V. PCR in the investigation of canine American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. **Cad.Saúde Pública**, v. 22, n. 3,p. 571-578, 2006.

WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases. Leishmaniasis – prevention and control. **WHO Library Cataloguing in Publication Data**, World Health Organization technical report series 793, 1990.

ZANZARINI, P. D.; SANTOS, D. R.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L. P.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V. Leishmaniose

Tegumentar Americana canina em município do norte do Estado do Paraná, Brasil.
Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.21, n. 6, p.1957-1961, 2005.