

Universidade Federal da Bahia
Escola de Medicina Veterinária
Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos

**ELISA indireto e mkDNA PCR-RFLP para o diagnóstico e
avaliação da infecção por *Leishmania sp.* em reservatórios
domésticos (cães) e silvestres (marsupiais) em Barra do
Pojuca, Camaçari, Bahia.**

ADRIANO COSTA DE ALCÂNTARA

Salvador - Bahia
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ADRIANO COSTA DE ALCÂNTARA

ELISA indireto e mkDNA PCR-RFLP para o diagnóstico e avaliação da infecção por *Leishmania sp.* em reservatórios domésticos (cães) e silvestres (marsupiais) em Barra do Pojuca, Camaçari, Bahia.

Dissertação apresentada a Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Franke

**Salvador - Bahia
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA

- A347 Alcântara, Adriano Costa de
ELISA indireto e mkDNA PCR-RFLP para o diagnóstico e avaliação da infecção por *Leishmania sp.* em reservatórios domésticos (cães) e silvestres (marsupiais) em Barra do Pojuca, Camaçari, Bahia./Adriano Costa de Alcântara. - Salvador (BA), 28 de agosto de 2006.
126 f.: il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, 2006.
- Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Franke.
1. Leishmaniose. 2. ELISA. 3. mkDNA PCR-RFLP. 4. Cão. 5. Marsupial.
I. Franke, Carlos Roberto. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.
- CDU: 576.8:616.993.161

TERMO DE APROVAÇÃO**ADRIANO COSTA DE ALCÂNTARA**

ELISA indireto e mkDNA PCR-RFLP para o diagnóstico e avaliação da infecção por *Leishmania sp.* em reservatórios domésticos (cães) e silvestres (marsupiais) em Barra do Pojuca, Camaçari, Bahia.

Dissertação defendida e aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Roberto Franke (Orientador) _____
Prof. Associado I da Escola de Medicina Veterinária – UFBA.

Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento _____
Prof. Associado I do Instituto de Ciências da Saúde – UFBA.

Prof^a Dr^a Stella Maria Barrouin Melo _____
Prof^a. Adjunto II da Escola de Medicina Veterinária – UFBA.

Salvador, 28 de agosto de 2006.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que me ajudaram a perceber e a ampliar o meu anseio pelo saber e a vontade de percorrer o fascinante caminho da pesquisa científica, buscando aumentar o horizonte do conhecimento e, assim, ser capaz de contribuir para o engrandecimento do ser humano.

AGRADECIMENTOS

O número de pessoas que teria que listar para fazer jus a todos os que me estimularam a tomar a decisão de seguir a carreira acadêmica e científica seria demasiado grande, passando por minha família (pais, irmãos, e familiares), professores, amigos, funcionários e colegas do Instituto de Biologia (Ibio), do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), da Escola de Medicina Veterinária (EMEV) da UFBA e dos diversos laboratórios destas instituições e do CpqGM – FIOCRUZ com os quais trabalhei ao longo dos anos.

Apesar disto, sinto-me compelido a ressaltar alguns nomes importantes para minha caminhada:

Professor Roberto José Meyer Nascimento, agradeço-lhe por ter sido o mestre que foi durante a minha iniciação científica e ter permitido que o início da minha caminhada nesta área tenha sido cheia de mecanismos tão fascinantes quanto a imunologia, a apoptose e a oncologia. Muito obrigado por ser este exemplo de pesquisador, professor, amigo e, principalmente, ser humano.

Ao Professor Carlos Roberto Franke, meu orientador, amigo e grande exemplo, sem o qual não poderia chegar onde estou. Obrigado pela confiança e pela chance de lhe ajudar e acompanhar na direção de alcançar objetivos tão interessantes e cheios de paixão. Você é outra pessoa especial que aprendi a admirar.

Aos professores Stella Maria Barrouin Melo e Paulo Henrique Palis Aguiar pela confiança e apoio quando eu me encontrava sem um objetivo claro e preciso. Obrigado por terem me dado a oportunidade e a direção certa para alcançar um grande objetivo, este mestrado.

Ao meu mais novo amigo, Andreas Stöcker, grande ser humano. Alemão de nascimento, mas “brasileiro”, no belo sentido de que somos uma nação rica de coração e não superiores a outros povos. Você é uma daquelas pessoas que vieram ao mundo para mostrar do que somos feitos e você, meu amigo, certamente, é de matéria nobre. Obrigado pelo apoio incomensurável durante estes últimos meses de mestrado. Novos trabalhos virão! Conto com você!

Sintam-se, todos, felizes por saberem que vocês fizeram e farão sempre parte desta minha estrada que está apenas começando.

Espero que vocês continuem torcendo por nossa vitória em busca de mais conhecimento.

EPÍGRAFE

“Never let the future disturb you.
You will meet it, if you have to,
with the same weapons of reason
which today arm you against the present”.

Tradução livre:

Nunca deixe o futuro lhe perturbar.
Você o encontrará, se você tiver que,
com as mesmas armas da razão
que hoje lhe armam contra o presente.

Marcus Aurelius Antoninus (121-180 A.D.)

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	09
LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO	12
SUMMARY	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES	16
2.1.1 Agente etiológico	16
2.1.2 Vetores, modo de Transmissão e distribuição geográfica	18
2.1.3 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose humana	21
2.1.4 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose nos animais	24
2.2 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE	26
2.2.1 Técnicas Parasitológicas	29
2.2.2 Técnicas Sorológicas	30
2.2.2.1 Teste de Aglutinação Direta (“DAT”) e Teste Rápido de Detecção da Aglutinação (“FAST”)	31
2.2.2.2 Teste Rápido Anticorpo para <i>L. donovani</i> (TRALd)	32
2.2.2.3 Imunofluorescência Indireta (IFI)	34
2.2.2.4 Ensaio de Imunoadsorção Ligado à Enzima (ELISA)	35
2.2.2.5 “Western Blotting” ou “Immunoblotting”	38
2.2.3 Intradermo Reação ou Reação de Montenegro	41
2.2.4 Eletroforese de Isoenzimas	42
2.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	44
2.3 Significado do Diagnóstico de Leishmaniose Visceral em Animais Silvestres para a Adequação das Medidas do PCLV	50
2.4 Objetivos	55
3 ARTIGOS	57
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
6 Autorização para comutação	126

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Classificação taxonômica dos complexos de <i>Leishmania</i> em seus subgêneros	16
Tabela 2 – Tabela 1 - Comparação entre os testes ELISA indireto e mkDNA PCR para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral dos cães de Barra do Pojuca, Camaçari, Bahia, Brasil	64
Tabela 3 – Tabela 1 – Comparação entre os testes ELISA indireto e mkDNA-PCR para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral dos marsupiais de Barra do Pojuca, Camaçari, Bahia, Brasil.....	81

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Ciclo biológico e de transmissão das espécies de <i>Leishmania</i>	21
Figura 2 – Figura 1 – Gel de agarose a 2% representando a detecção da mkDNA de <i>Leishmania sp.</i> em amostras caninas	64
Figura 3 – Figura 2 – PAGE a 10% representando o perfil RFLP dos amplicons das cepas de referência de <i>Leishmania sp.</i> e das amostras de cães	65
Figura 4 – Figura 1. Gel de agarose a 2% representando os amplicons de mkDNA de <i>Leishmania sp.</i> em amostras de marsupiais	80
Figura 5 – Figura 2. PAGE a 10% representando o perfil RFLP dos amplicons das cepas de referência de <i>Leishmania sp.</i> e das amostras de marsupiais	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Ácido desoxiribonucléico – DNA (“DesoxyriboNucleic Acid”)
- Ácido RiboNucléico – RNA (“RiboNucleic Acid”)
- Antígeno específico de Leishmania – LAgs (“Leishmanial Antigens-specific”)
- Antígeno solúvel de leishmania – SLA (“Soluble-Leishmania Antigen”)
- Dinucleotídeos Trifosfato – dNTPs (“diNucleotid TriPhosphate”)
- DiAdenosinucleotídeo Trifosfato – dATP (“diAdenosineNucleotid TriPhosphate”)
- DiCitosinucleotídeo Trifosfato – dCTP (“diCytosineNucleotid TriPhosphate”)
- DiGuanosinucleotídeo Trifosfato – dGTP (“diGuanosineNucleotid TriPhosphate”)
- DiInosinucleotídeo Trifosfato – dITP (“diInosineNucleotid TriPhosphate”)
- DNA Polimórfico Amplificado aleatoriamente – “Random Amplified Polymorphic DNA PCR” – (RAPD-PCR)
- Dodecilsulfato de sódio – SDS (“Sodium Dodecyl Sulphate”)
- DiTiminucleotídeo Trifosfato – dTTP (“diTimineNucleotid TriPhosphate”)
- Diuracilnucleotídeo Trifosfato – dUTP (“diUracylNucleotid TriPhosphate”)
- Eletroforese em gel de poliacrilamida – PAGE (“PolyAcrylamide Gel Electrophoresis”)
- Eletroforese multilocular de enzimas – MLEE (“MultiLocus Enzyme Electrophoresis”)
- Ensaio de Imunoadsorção ligado à Enzima (EIE) – ELISA (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”)
- Espaçador Transcrito Interno – ITS (“Internal Transcribed Spacer”)
- Fator Ativador de Macrófagos – MAF (“Macrophage Activating Factor”)
- Fator de Necrose Tumoral – TNF- α (“Tumor Necrosis Factor-alfa”)
- Fator de Necrose Tumoral – TNF- β (“Tumor Necrosis Factor-beta”)
- Fator inibidor de Macrófagos – MIF (“Macrophage-Inhibition Factor”)
- Fator quimiotático de Macrófagos – MCF (“Macrophage Chemotatic Factor”)
- fluoreto de polivinilideno – PVDF (“PolyVinylidene Fluoride”)
- Hematoxilina e Eosina – H&E
- ImunoFluorescência Indireta – IFI (“ImmunoFluorescence Antibody Test – IFAT”)

Imunoglobulina da classe G – IgG

Imunoglobulina da classe M – IgM

Intensidade Total do Poço – TLI (“Total Lane Intensity”)

Interferon-gama – IFN- γ (“Interferon-gamma”)

Interleucina 2 – IL-2 (“Interleukin-2”)

Leishmania – L.

Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar – PKDL (“Post Kalazar Dermal Leishmaniasis”)

Leishmania infantum excreted/secreted antigen protein - LiESAp

Leishmaniose Visceral Canina – LVC

Ligante da Fucose – Manose – FML (“Fucose-Mannose Ligand”)

Lipofosfoglicanos – LPG (“Lipophosphoglycans”)

Meio Novy, MacNeal e Nicolle – NNN

microlitro – μ L

mililitro – mL

milímetro – mm

National Center for Biotechnology Information – NCBI

Organização Mundial de Saúde – OMS (“World Health Organization – WHO”)

Programa de Controle da Leishmaniose Visceral – PCLV

Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (“Polymerase Chain Reaction”)

Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa ou em Tempo Real – qPCR (“Quantitative PCR”)

soro fetal bovino – SFB (“Fetal Bovine Serum”)

Teste de Aglutinação Direta – DAT (“Direct Agglutination Test”)

Teste de Avaliação Rápida da Aglutinação – FAST (“Fast Agglutination Screening Test”)

Teste Rápido Anticorpo para Leishmania donovani ou “dipstick” – TRALd

Vírus da Imunodeficiência humana – HIV (“Human Immunodeficiency Virus”)

“Western Blotting” ou “Immunoblotting” – WB

RESUMO

DE ALCÂNTARA, A. C. **ELISA indireto e mkDNA PCR-RFLP para o diagnóstico e avaliação da infecção por *Leishmania sp.* em reservatórios domésticos (cães) e silvestres (marsupiais) em Barra do Pojuca, Camaçari, Bahia.** Salvador, Bahia, 2006. 99 p.il. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina veterinária da Universidade Federal da Bahia, 2006.

RESUMO

O teste ELISA indireto para o diagnóstico, inquérito sorológico e vigilância epidemiológica em áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral (LV) é recomendação do Ministério da Saúde brasileiro e integra o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV). Neste estudo, comparou-se os resultados do ELISA indireto, utilizando o antígeno (SLA) de *Leishmania infantum* fenotipada e os conjugados anti-IgG de cão e proteína A-peroxidase, com os resultados da mkDNA-PCR para o diagnóstico da leishmaniose canina e em marsupiais, respectivamente. A soroprevalência canina em Barra do Pojuca foi de 9,5% e 83,3% destes cães foram positivos pela mkDNA PCR. Contudo, 17 (68%) cães soronegativos pelo ELISA e avaliados pela mkDNA-PCR também foram positivos pelo teste molecular. A soroprevalência em marsupiais foi de 73,9% e 64,7% destes marsupiais foram positivos pela mkDNA-PCR. Coincidentemente, 4 (17,4%) marsupiais soronegativos foram positivos pela mkDNA-PCR, indicando, em ambos os casos, uma reduzida sensibilidade da sorologia. A prevalência da infecção canina e de marsupiais, baseada nos dados obtidos pela mkDNA PCR em 49 cães testados foi de 14,6% e em 27 marsupiais 55,6%. Ao excluirmos 4 marsupiais não avaliados pela sorologia, a prevalência alcançou 65,2%. A espécie infectando cães e marsupiais foi a *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*), como demonstrado pelo perfil dos fragmentos de restrição (RFLP), quando comparados aos da cepa de referência (MHOM/BR/1974/PP75). Embora a praticidade, os índices de sensibilidade, especificidade e o menor custo do ELISA indireto indiquem sua utilização diagnóstica, a baixa eficiência do PCLV pode estar relacionada à incapacidade do teste sorológico de reconhecer animais assintomáticos que não produzam resposta de anticorpos. O alto índice de infecções caninas é citado e correlacionado por diversos autores com o aumento da casuística humana em áreas endêmicas, entretanto, a baixa eficácia do controle baseado na eutanásia canina pode ser explicada, em parte, pela existência de outros animais atuando como reservatórios, entre eles os marsupiais. Assim, o presente estudo recomenda a avaliação dos marsupiais e a utilização da mkDNA-PCR no diagnóstico humano, canino e de marsupiais, como ferramentas complementares para o aprimoramento das medidas do PCLV.

Palavras-chave: *L. infantum*; *L. chagasi*; ELISA; mkDNA-PCR; RFLP; Cães; Marsupiais.

SUMMARY

DE ALCÂNTARA, A. C. **indirect ELISA and mkDNA PCR-RFLP for the diagnosis and *Leishmania sp.* infection evaluation of domestic (dogs) and wild (opossum) reservoirs in Barra do Pojuca, Camaçari, Bahia.** Salvador, Bahia, 2006. 99 p.il. Dissertation (Master of Science Program on Animal Sciences at the Tropics) – Veterinary Medicine College of the Federal University of Bahia, 2006.

SUMMARY

Indirect ELISA test for diagnosis, serological survey and epidemiological surveillance of visceral leishmaniasis (VL) in endemic areas is recommended by the Brazilian Health Department and integrates the Visceral Leishmaniasis Control Program (VLCP). Herein, comparative results between mkDNA-PCR and an indirect ELISA, using a soluble phenotyped *Leishmania infantum* promastigote antigen (SLA) and peroxidase-conjugated anti-Dog IgG or protein A for canine and opossum diagnosis of *Leishmania* infection, respectively, are presented. The Barra do Pojuca seroprevalence reached 9.5% and 83.3% of the serologically positive dogs were also positive by mkDNA PCR. However, 17 (68%) seronegative dogs by ELISA were positive when evaluated by mkDNA PCR. Opossum seroprevalence reached 73.9% and 64.7% of these opossums were also positive by mkDNA-PCR. Coincidentally, 4 (17.4%) seronegative opossums by ELISA were positive by mkDNA-PCR, indicating, in both cases, a reduced sensitivity for serology. The canine and opossum infection prevalence, based on mkDNA-PCR evaluation of 49 dogs reached 14.6% and on 27 opossum reached 55.6%. After excluding 4 specimens not evaluated by serology, it raised to 65.2%. The *Leishmania* specie associated to infected dogs and opossums in the endemic area was *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) as determined by the RFLP profile of samples when compared to the MHOM/BR/1974/PP75 reference strain. Although indirect ELISA presents feasibility, high sensitivity and specificity, and a lower cost to be performed, the lower efficacy of the VLCP may be related to the inability of serology to detect asymptomatic animals which are not producing antibodies. The high rate of canine infection has been correlated with increased prevalence of human cases in endemic areas, the low efficacy of canine-culling measure can be partially explained by the existence of other animals acting as reservoirs, among them, opossums. Hence, the present study recommends evaluation of opossums and use of mkDNA-PCR on human, canine and opossum diagnosis as complementary tools for the improvement of VLCP efficacy.

Keywords: *L. infantum*; *L. chagasi*; ELISA; mkDNA-PCR; RFLP; Canine; Opossum.

1. INTRODUÇÃO

Leishmaniose é o termo globalmente utilizado para denominar um conjunto de doenças causadas por diferentes espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, causadores de sintomatologias inespecíficas diversas, incluindo-se, hipergamaglobulinemia, anemia, trombocitopenia, danos vasculares, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, febre, mal-estar, perda de peso, dermatites, nefropatias e disfunções cardíacas, respiratórias e musculares, entre outras, tanto em humanos quanto em canídeos, embora o conjunto de sintomas possa variar entre eles. As leishmanioses são agrupadas nas formas cutâneas (difusa e simples), mucosa, mucocutânea, visceral e dérmica pós-calazar, com diferentes graus de complexidade, tanto para o quadro clínico apresentado pelo paciente, quanto para o tratamento a ser instituído (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004, 2006a,b; BRASIL, 2006a; DA SILVA *et al.*, 2006; DE SOUZA DIAS *et al.*, 2005; SAHA *et al.*, 2005; SALOTRA *et al.*, 2003; SCHALLIG, CANTO-CAVALHEIRO e DA SILVA, 2002; TDR, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a considerar a leishmaniose uma das seis endemias prioritárias para a saúde pública global devido à sua distribuição mundial em 88 países, com maior frequência em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos; ao fato da leishmaniose visceral (LV), quando não tratada, poder ocasionar óbito em até 100% dos indivíduos infectados; e a estimativa de que 350 milhões de indivíduos em todo o mundo estejam sob risco de infecção (OMS, 2006; BRASIL, 2006a; DA SILVA *et al.*, 2006; PASSOS *et al.*, 1999; TDR, 2006).

Desde a descoberta na Tunísia da leishmaniose visceral canina (LVC) causada pela *Leishmania infantum* (Nicolle e Comte, 1908), até a atualidade, muita atenção tem sido dada a relação da doença humana com a canina, incluindo-se canídeos selvagens como a raposa, o cachorro-do-mato e o lobo, devido a estas infecções terem sido detectadas concomitantemente em áreas endêmicas, com altas prevalências. Entretanto, os resultados das ações de controle empregadas pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) no Brasil não têm

sido capazes de confirmar, de forma significativa, a correlação entre a eficácia da eliminação de animais soropositivos deste conhecido reservatório e a redução dos casos de leishmaniose visceral humana (LVH) em áreas endêmicas. Assim, os relatos demonstrando a infecção de outros animais silvestres com *Leishmania sp.* indicam a possibilidade da participação de outros reservatórios no ciclo de transmissão da leishmaniose, explicando a falta de sucesso das ações de controle, no Brasil e, possivelmente, no mundo (ASHFORD *et al.*, 1998; BRASIL, 2006a; CORTADA *et al.*, 2004; DIETZE *et al.*, 1997; KUHLS *et al.*, 2005; MOHEBALI *et al.*, 2005; OMS, 2006; SILVA *et al.*, 2001a).

O Brasil, um dos países com as maiores taxas desta endemia, apresenta uma elevada casuística das diversas formas de leishmaniose e a região nordeste tem sido considerada, desde a detecção dos primeiros casos em 1913 e 1934 por Migone e Pena, respectivamente, a região mais endêmica do Brasil, com aproximadamente 90% dos casos autóctones, até que, nos últimos dez anos, a expansão geográfica para outros estados brasileiros como, por exemplo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Tocantins, vem reduzindo este percentual que, em 2002, já se encontrava em 77% (ALVES e BEVILACQUA, 2004; BRASIL, 2006a; CORTADA *et al.*, 2004; DOS SANTOS *et al.*, 1998; GONTIJO e MELO, 2004; OLIVEIRA e ARAÚJO, 2003).

A expansão do número de áreas endêmicas no Brasil alcançou cerca de 1.600 municípios brasileiros apresentando casos autóctones e surtos epidêmicos, representando 19 das 27 Unidades da Federação. Este fenômeno vem ocorrendo pela dispersão do agente etiológico, através da migração de portadores da infecção entre os municípios e da expansão do nicho ecológico do inseto vetor entre um município endêmico e as áreas circunvizinhas anteriormente indenadas, demonstrando a gravidade da situação para o Sistema Único de Saúde (SUS), para as autoridades das Secretarias de Saúde (SESA) e para os Centros de Controle de Zoonoses (CCZs), além, é claro, da população exposta ao risco (ALVES e BEVILACQUA, 2004; BRASIL, 2006a; DOS SANTOS *et al.*, 1998; GONTIJO e MELO, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA e ARAÚJO, 2003).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

2.1.1 Agente etiológico

Os parasitos do gênero *Leishmania* são membros da ordem *Kinetoplastida* e da família *Trypanosomatidae* que apresentam um ciclo heteroxênico ou digenético (requer a participação de mais de um hospedeiro para completar o ciclo biológico), com duas formas principais: a *promastigota*, flagelada, que se encontra no tubo digestivo do inseto vetor (flebótomo) e a *amastigota*, aflagelada, que se desenvolve intracelularmente nas células fagocíticas mononucleares (macrófagos e monócitos) do hospedeiro vertebrado, seja este um animal selvagem, domesticado ou o ser humano (BRASIL, 2006a; CORRÊA, BRASIL e SOARES, 2005; COUTINHO *et al.*, 2005; DISCH *et al.*, 2004).

Estes parasitas estão divididos em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania* que, atualmente, estão organizados em 10 complexos, como na Tabela 1 a seguir:

Tabela 1 – Classificação taxonômica dos complexos de *Leishmania* em seus subgêneros

Subgênero <i>Leishmania</i> (Ross, 1903)	Complexo <i>L. donovani</i>	<i>L. archibaldi</i> (Castellani & Chalmers, 1919) <i>L. donovani</i> (Laveran & Mesnil, 1903) <i>L. infantum</i> (Nicolle, 1908) <i>L. chagasi</i> (Cunha & Chagas, 1937)
	Complexo <i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> (Nicolle, 1908)
	Complexo <i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i> (Wright, 1903)
	Complexo <i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i> (Bray, Ashford & Bray, 1973)
	Complexo <i>L. major</i>	<i>L. major</i> (Yakimoff & Schokhor, 1914) <i>L. cf. major</i> ou <i>L. major-like</i>
	Complexo <i>L. mexicana</i>	<i>amazonensis</i> (Lainson & Shaw, 1972) <i>enriettii</i> (Muniz & Medina, 1948) <i>L. mexicana</i> (Biagi, 1953) <i>L. pifanoi</i> Medina & Romero, 1959)

Subgênero <i>Viannia</i> (Lainson e Shaw, 1987)	<i>Complexo L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> (Vianna, 1911) <i>L. colombiensis</i> (Kreutzer <i>et al.</i> , 1991) <i>L. equatorensis</i> (Grimaldi Jr <i>et al.</i> , 1992) <i>L. peruviana</i> (Velez, 1913)
	<i>Complexo L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> (Floch, 1954) <i>L. panamensis</i> (Lainson & Shaw, 1972) <i>L. shawi</i> (Lainson <i>et al.</i> , 1989)
	<i>Complexo L. naiffi</i>	<i>L. naiffi</i> (Lainson & Shaw, 1989)
	<i>Complexo L. lainsoni</i>	<i>L. lainsoni</i> (Silveira <i>et al.</i> , 1987)

Fonte: Adaptado dos dados apresentados pelo Centro Nacional de Informação em Biotecnologia – NCBI (USA, 2006) e da classificação simplificada de Rioux e colaboradores (1990) *apud* MILES e colaboradores (2006).

Estes diferentes complexos, embora discussões sobre suas posições taxonômicas ainda existam com base nos dados imunológicos e moleculares (anticorpos monoclonais; zimodemas; esquizodemas; RAPD, PCR-RFLP; hibridização; e sequenciamento de DNA), albergam os agentes etiológicos envolvidos no acometimento das formas cutânea (simples ou difusa), mucosa, mucocutânea e visceral, esta última podendo, em 10 a 50% dos casos pós-cura na Índia e no Sudão, sofrer relapso e desenvolver a leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL) em humanos. Relatos de infecção, natural ou experimental, com as diversas formas de leishmaniose em outras espécies animais estão descritos na literatura mundial (KUHLS *et al.*, 2005; MILES *et al.*, 2006; NCBI, 2006; OMS, 2006; SAHA *et al.*, 2005; SALOTRA *et al.*, 2003; SERIN *et al.*, 2005; TDR, 2006; ZEMANOVÁ *et al.*, 2004).

Aproximadamente vinte espécies deste parasito estão atualmente envolvidas na patogenia humana em todo o mundo e a espécie *Leishmania chagasi*, ou *Leishmania infantum* como é denominada no velho mundo, é a principal envolvida na doença visceral humana e canina (BRASIL, 2006a; CORTES *et al.*, 2004; OMS, 2006; PASSOS *et al.*, 1999). No Brasil, apenas seis espécies dos dois subgêneros, *Vianna* e *Leishmania*, têm sido detectadas infectando humanos, são elas: *L. (V.) braziliensis*; *L. (V.) guyanensis*; *L. (V.) lainsoni*; *L. (V.) naiffi*; *L. (V.) shawii*; e *L. (L.) amazonensis* (PASSOS *et al.*, 1999). Quanto aos cães, a maior parte das infecções se deve a *L. (L.) infantum* (*syn. L. (L.) chagasi*), muito embora relatos de infecções por outras espécies, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) tropica*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana* existam (ASHFORD *et al.*, 1998; CORTADA *et al.*, 2004; PASSOS *et al.*, 1999).

Esta ampla diversidade de espécies é preocupante no tocante as ações de controle epidemiológico e para o sistema de saúde de qualquer um dos países acometidos pela doença (ALVES e BEVILACQUA, 2004; BRASIL, 2006a; GONTIJO e MELO, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA e ARAÚJO, 2003).

Nos últimos anos, muita controvérsia tem sido gerada a respeito da divisão taxonômica das espécies deste parasito, principalmente sobre a divisão do complexo *donovani*, onde se encontram a *Leishmania archibaldi*, *Leishmania chagasi*, a *Leishmania donovani* e a *Leishmania infantum*. Os artigos publicados por Isabel Maurício e colaboradores, nos últimos sete anos, utilizando as mais diversas técnicas moleculares de caracterização genotípica (hibridização de DNA genômico das espécies com as sondas Lmet2 e Lmet9; sequenciamento do gene da gp63; e RAPD-PCR, entre outras), apresentam os primeiros dados genéticos concretos de que *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum* devam ser tratadas como a mesma espécie e, sendo a segunda a denominação mais antiga, esta deve ser adotada nas comunicações científicas (EL TAI *et al.*, 2001; GONTIJO e MELO, 2004; MAURÍCIO *et al.*, 1999, 2000; KUHLS *et al.*, 2005; ZEMANOVÁ *et al.*, 2004). Contudo, autores como Shaw (1994), Palatnik e colaboradores (1990), Ellis e Crampton (1991) e Gramiccia e colaboradores (1992) discordam e defendem a manutenção da *Leishmania chagasi* como espécie, com base em dados provenientes de outras técnicas, como a eletroforese de enzimas multiloculares (MLEE) e os polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP).

2.1.2 Vetores, modo de Transmissão e distribuição geográfica

Quinhentas espécies de flebotomíneos (*Diptera: Psychodidae: Phlebotominae*) são agrupadas nos gêneros *Brumptomyia*, *Lutzomyia*, *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Warileya*. Aproximadamente 30 insetos vetores, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, foram associados à transmissão das diversas formas de leishmaniose. No Brasil, a espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) é a mais bem estudada e associada com a transmissão da *Leishmania infantum*, de acordo com a literatura nacional, sendo popularmente

conhecida como “mosquito palha”, “tatuquira” e “birigui”, entre outras denominações, nas diversas regiões do país (BRASIL, 2006a; NCBI, 2006; OMS, 2006; SOARES e TURCO, 2003).

Uma outra espécie que tem sido incriminada na transmissão do agente etiológico da leishmaniose visceral no Brasil é a *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938). A *Lutzomyia longipalpis* foi detectada desde a descoberta da doença visceral no Brasil por Penna e, posteriormente, Evandro Chagas e Aristides Marques da Cunha, ambos na década de 30, enquanto a segunda foi descrita e incriminada, mais recentemente, durante um surto da doença no Mato Grosso do Sul. A distribuição geográfica da espécie *L. longipalpis* se encontra em expansão no Brasil, podendo ser encontrada nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-oeste, excetuando-se apenas a região Sul, sendo que os registros de ocorrência da espécie são mais frequentes nos estados da região Norte e Nordeste do país (ALVES e BEVILACQUA, 2004; BRASIL, 2006a; DOS SANTOS *et al.*, 1998; GONTIJO e MELO, 2004; OLIVEIRA e ARAÚJO, 2003; SOARES e TURCO, 2003).

Diversos aspectos da biologia destes insetos, entre eles, a morfologia, a reprodução, o comportamento e o habitat vêm sendo pesquisados, visando auxiliar as medidas de controle vetorial. Contudo, os estudos entomológicos ainda são insuficientes para proporcionar o aprimoramento do controle vetorial que integra as medidas gerais de controle da leishmaniose (MIRANDA *et al.*, 2002; SOARES e TURCO, 2003; XIMENES, SOUZA, CASTELLÓN, 1999).

Desta forma, os aspectos da morfologia mais bem delimitados são, por exemplo, o tamanho diminuto do inseto (1 – 3 mm), dificultando sua detecção no ambiente; um revestimento piloso por todo o seu corpo; e sua coloração com um tom castanho-claro de palha (amarelo claro ou caramelo) que são utilizados como ferramentas iniciais para a confirmação de sua presença nos ambientes avaliados. Além disto, dois aspectos comportamentais são importantes e facilitam o reconhecimento do inseto: um vôo curto em pequenos saltos; e,

aonde pousa, o faz de asas abertas (BRASIL, 2006a; SOARES E TURCO, 2003).

Outro aspecto importante é que estes insetos, embora considerados responsáveis pela transmissão, nem sempre são encontrados nas diferentes áreas endêmicas, indicando assim, a possibilidade da participação de outros vetores, ainda desconhecidos, no ciclo de transmissão do parasito. Um exemplo recente é o carrapato marrom comum do cão (*Rhipicephalus sanguineus*). A biologia destes aracnídeos como vetores na leishmaniose foi muito pouco elucidada pela ciência ao longo do último século, preservando diversas lacunas que não permitiram incluí-lo, ainda, nas medidas de controle desta doença (BRASIL, 2006a; COUTINHO *et al.*, 2005; DOS SANTOS *et al.*, 1998; NCBI, 2006; SOARES e TURCO, 2003; XIMENES, SOUZA E CASTELLÓN, 1999).

Nos últimos anos, estudos visando avaliar o papel do carrapato marrom comum dos cães, o *Rhipicephalus sanguineus* (*Acari:Ixodidea*), na transmissão da leishmaniose têm sido desenvolvidos. Coutinho e colaboradores (2005) demonstraram que estes artrópodos albergam o agente etiológico da leishmaniose visceral e podem contribuir para a sua transmissão, tornando ainda mais complexa a epidemiologia e o controle desta zoonose, demandando a implantação de novas linhas de pesquisa voltadas para a ampliação do conhecimento acerca da biologia do parasito neste novo vetor.

O ciclo heteroxênico (ou digenético) de transmissão da leishmaniose clássica ocorre durante o repasto sanguíneo das fêmeas dos flebótomos em animais infectados, permitindo que as mesmas absorvam células mononucleares fagocíticas a partir do sangue periférico que podem estar infectadas com as formas amastigotas do parasito. Estas células, no sistema digestivo do inseto, serão lisadas e permitirão o acesso do parasito ao ambiente extracelular, onde sofrerão o ataque das enzimas digestivas, desencadeando uma metaciclogênese e transformando-os nas formas promastigotas metacíclicas (resistentes a ação do sistema complemento), infectivas, que serão, posteriormente, regurgitadas através da probóscide do vetor, durante um próximo repasto sanguíneo, possibilitando a infecção de um novo hospedeiro (BRASIL, 2006a;

SOARES E TURCO, 2003; TDR, 2006). A figura 1 abaixo esquematiza o ciclo de transmissão e uma ampla revisão da biologia deste vetor pode ser obtida na revisão de Soares e Turco (2003).



Figura 1 – Ciclo biológico e de transmissão das espécies de *Leishmania* (Fonte: TDR, 2006).

O papel de outras espécies de animais e de vetores na epidemiologia da leishmaniose precisa ser amplamente avaliado, bem como a participação do homem como reservatório do parasito, para que sejam efetuados os aperfeiçoamentos necessários às medidas de controle desta zoonose (ALEXANDER *et al.*, 2002; ASHFORD *et al.*, 1998; CERQUEIRA *et al.*, 2003; COUTINHO *et al.*, 2005; DIETZE *et al.*, 1997; GONTIJO e MELO, 2004; GRAMICCIA e GRADONI, 2005; MORAES-SILVA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA e ARAÚJO, 2003; SAHA *et al.*, 2005; SALOTRA *et al.*, 2006; SILVA, A.V. *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2001a; TRAVI *et al.*, 1998; XIMENES, SOUZA E CASTELLÓN, 1999; ZERPA *et al.*, 2002).

2.1.3 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose humana

A OMS relata dados alarmantes, confirmando a presença da doença em 88 países do mundo (22 países do “Novo Mundo” e 66 países do “Velho Mundo”), estimando que 350 milhões de indivíduos (homens, mulheres e crianças) se encontram sob risco de infecção. A prevalência

global da leishmaniose atinge 12 milhões de pessoas e a incidência anual é estimada em cerca de 2 milhões de casos, sendo 1,5 milhão de leishmaniose cutânea e 500.000 de leishmaniose visceral. Embora estes dados indiquem que a leishmaniose esteja amplamente distribuída pelo mundo, cerca de dez países dominam a casuística. Assim, aproximadamente, 90% dos casos de leishmaniose cutânea são encontrados em seis países (Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru); 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem em três países da América do Sul (Bolívia, Brasil e Peru); e 90% dos casos de leishmaniose visceral são registrados em quatro países – Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (GRAMICCIA e GRADONI, 2005; OMS, 2006; OPAS, 2006; SALOTRA *et al.*, 2006; TDR, 2006).

Atualmente, os Estados Unidos da América e o Canadá, áreas anteriormente *indenes* ou livres da doença, estão em estado de alerta face à recente detecção, em cães da raça foxhound, de prevalências variando de 13,4 – 33,1%, entre os anos de 2000 a 2003, em 18 estados americanos e em 2 províncias do Canadá (DUPREY *et al.*, 2006; GRAMICCIA e GRADONI, 2005; SCHANTZ *et al.*, 2006; TRAVI *et al.*, 2002). Atualmente, existem relatos da doença desde o Sul do Canadá até o norte da Argentina (DOS SANTOS *et al.*, 1998; DUJARDIN *et al.*, 2002; DUPREY *et al.*, 2006; TRAVI *et al.*, 1998, 2002; WORTMANN *et al.*, 2004; ZERPA *et al.*, 2002).

No Brasil, a incidência humana é de aproximadamente 1,80 casos para cada 100.000 habitantes e as incidências por unidade da federação variam de 0,02 – 12,04 casos para cada 100.000 habitantes. Estes valores baseiam-se, principalmente, na coleta passiva de dados, provenientes da notificação compulsória pelos serviços de saúde, seus profissionais e da busca ativa feita, com pouca periodicidade, pelos Centros de Controle de Zoonoses e Secretárias de Saúde Municipais, contribuindo para a subnotificação dos casos (BRASIL, 2006a, 2006b; GONTIJO e MELO, 2004; OLIVEIRA e ARAÚJO, 2003; SILVA, A.V. *et al.*, 2005).

A doença humana, desde sua descoberta em 1908 na Tunísia até os primeiros relatos brasileiros por Penna em 1934, Chagas em 1936 e Cunha e Chagas em 1937, era detectada

principalmente em ambientes rurais. Contudo, na década de 80, iniciou-se a expansão para áreas urbanas, anteriormente indenes, ampliando a casuística nas diversas regiões do Brasil. A partir da década de 90, a presença de casos autóctones em 19 dos 27 estados brasileiros demonstra a ampla expansão desta zoonose, com especial destaque para a crescente notificação dos casos em regiões litorâneas, próximas a centros urbanos e, até mesmo, sua disseminação em áreas urbanas de grandes cidades brasileiras nos estados do Pará e Tocantins (região norte), Mato Grosso do Sul (região Centro-oeste) e Minas Gerais e São Paulo (região sudeste), aumentando o risco de infecção humana (ALVES e BEVILACQUA, 2004; BRASIL, 2006a, 2006b; CORTADA *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2006; DOS SANTOS *et al.*, 1998; GONTIJO e MELO, 2004; OLIVEIRA e ARAÚJO, 2003; SILVA, A.V. *et al.*, 2005).

As formas clínicas das leishmanioses podem ser divididas em tegumentar, subdividida em cutânea (simples ou difusa) e mucocutânea; e em visceral, todas elas, sendo causadas pelas diferentes *Leishmania sp.*, embora superposições dos nichos biológicos destes agentes e, portanto, das infecções, sejam relatadas. Os prognósticos são muito variáveis, desde a auto-cura nos casos de leishmaniose cutânea; a destruição tissular desfigurante nos casos de leishmaniose mucocutânea; e à morte nos casos de leishmaniose visceral não tratada (BRASIL, 2006a; CUERVO *et al.*, 2004; DE ANDRADE *et al.*, 2006; HSIA e WANG, 2006; TDR, 2006; VOLPINI *et al.*, 2004).

O tratamento desta enfermidade utiliza principalmente medicamentos antiparasitários e uma droga antineoplásica, entre elas, os antimoniais pentavalentes (Glucantime®), as Pentamidinas (Pentam-300®), a anfotericina B (AmBisome®) e a miltefosine, respectivamente, de uso, eficácia e dosagens distintas (HSIA e WANG, 2006; TDR, 2006).

A associação da Leishmaniose, tanto com pacientes co-infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) quanto nos pertencentes à parcela mais carente da população, aumenta a dificuldade do controle, uma vez que, na primeira, a resposta imune celular

requerida para o combate à infecção por *Leishmania* é justamente aquela eliminada pela co-infecção e, na segunda, os indivíduos destas populações tendem a tratar as manifestações clínicas iniciais das doenças que os afligem de forma autônoma e a buscar pelo diagnóstico e tratamento médico apenas quando a doença já se encontra avançada e, portanto, propensa a reduzida eficácia, piorando o prognóstico (ALVES e BEVILACQUA, 2004; GONTIJO e MELO, 2004; GRAMICCIA e GRADONI, 2005; GUERIN *et al.*, 2002; MARQUES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2001a).

2.1.4 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose nos animais

São raros os estudos de incidência da leishmaniose canina, sendo conduzidos geralmente em poucas áreas endêmicas, com base em soroprevalências anuais e reavaliação dos animais em alguns poucos anos consecutivos no âmbito de um trabalho de pesquisa. Este fato demonstra a necessidade urgente da avaliação da incidência da leishmaniose canina como ferramenta para a avaliação da correlação das casuísticas caninas com as humanas, para vigilância epidemiológica e para a prevenção de possíveis surtos em áreas endêmicas e em áreas ainda silenciosas, muito embora esta correlação seja desconsiderada por outros autores (CABRERA *et al.*, 2003; CORTADA *et al.*, 2004; COURTENAY *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2006; DIETZE *et al.*, 1997; MOREIRA *et al.*, 2004; OLIVEIRA e ARAÚJO, 2003; SILVA *et al.*, 2001a).

Os canídeos, principalmente o cão doméstico, o cachorro-do-mato e a raposa, são considerados os principais reservatórios urbanos, periurbanos, silvestres e rurais do parasito e, por isso, a eutanásia de animais soropositivos faz parte das medidas preconizadas pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) no Brasil. Alguns estudos têm avaliado o impacto desta medida na diminuição da incidência e prevalência da leishmaniose em cães e em humanos de áreas endêmicas, demonstrado a sua eficácia, ou ineficácia, como medida solitária, ou integrada ao tratamento humano e ao controle vetorial (ALVES e BEVILACQUA, 2004; ASHFORD *et al.*, 1998; DIETZE *et al.*, 1997; GONTIJO e MELO,

2004; LASRI *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2004; OLIVEIRA e ARAÚJO, 2003; PALATINIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001).

A identificação de animais selvagens, silvestres e domésticos associados ao ciclo biológico de uma ampla diversidade de espécies de protozoários, inclusive do gênero *Leishmania*, tem estimulado os pesquisadores a ampliar o conhecimento ecoepidemiológico sobre estas relações através de trabalhos que identifiquem possíveis reservatórios, bem como, as tendências de expansão da doença, a superposição dos nichos ecológicos destes animais com aqueles dos flebótomos, o potencial sinantrópico das espécies de vetores e hospedeiros e o incremento de risco de infecção para as populações humanas advindo desta aproximação, especialmente, quando ela se dá nas imediações de grandes centros urbanos. Estes estudos trarão nova luz ao conhecimento epidemiológico da doença e auxiliarão no desenvolvimento de novas metodologias de controle (CABRERA *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2006; GONTIJO e MELO, 2004; MORAES-SILVA *et al.*, 2006; OLIVEIRA e ARAÚJO, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Dentre as espécies de animais mencionadas na literatura com registros de espécimes naturalmente infectados, ou que foram experimentalmente infectados, com *Leishmania sp.* podemos citar as raposas das espécies *Dusicyon thous* (ou *Cerdocyon thous*) e *Lycalopex vetulus* (ou *Pseudalopex vetulus*) (ALEXANDER *et al.*, 2002; ASHFORD *et al.*, 1998; PALATINIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001); lobos, raposas e chacais das espécies *Canis lupus*, *Vulpes vulpes* e *Canis aureus*, respectivamente (MOHEBALI *et al.*, 2005); primatas da espécie *Callithrix jacchus* (XIMENES, SOUZA E CASTELLÓN, 1999) e *Macaca mulatta* (AMARAL *et al.*, 1996, 2000; PORROZZI *et al.*, 2006), roedores das espécies *Rattus rattus*, *Sigmodon hispidus*, *Neotoma micropus* e *Thrichomys apereoides* (ALEXANDER *et al.*, 2002; ASHFORD *et al.*, 1998; KERR, McHUGH e DRONEN, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2005; XIMENES, SOUZA E CASTELLÓN, 1999; ZERPA *et al.*, 2002), aves da espécie *Gallus gallus* (ALEXANDER *et al.*, 2002), porcos (MORAES-SILVA *et al.*, 2006), preguiças dos gêneros *Bradypus sp.* e *Choloepus sp.* e esquilos (KATAKURA *et al.*, 2003), equinos das

espécies *Equus caballus* e *Equus asinus* (CERQUEIRA *et al.*, 2003) e sariguês ou saruês das espécies *Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis* (ALEXANDER *et al.*, 2002; ASHFORD *et al.*, 1998; SHERLOCK, 1996; SHERLOCK *et al.*, 1984, 1988; TRAVI *et al.*, 1994, 1998; XIMENES, SOUZA E CASTELLÓN, 1999; ZERPA *et al.*, 2002), entre outros, descritos pela bibliografia mundial.

Os sariguês ou saruês, marsupiais das espécies *Didelphis marsupialis*, *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*, têm sido apontados como reservatórios silvestres das leishmanioses (visceral e tegumentar), além de outras zoonoses, devido a seus hábitos sinantrópicos, sendo identificados como um risco à saúde humana por diversos autores. Registros de marsupiais naturalmente infectados ou utilizados em infecções experimentais por *Leishmania sp.* são encontrados em trabalhos realizados, principalmente, nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, muito embora outras regiões também apresentem relatos (ARIAS e NAIFF, 1981; CABRERA *et al.*, 2003; GRIMALDI Jr *et al.*, 1991; SHERLOCK, 1996; SHERLOCK *et al.*, 1984, 1988; YOSHIDA *et al.*, 1985).

Relatos da infecção por *Leishmania sp.* em *Didelphis sp.* de outros países das Américas Central e do Sul (LAINSON e RANGEL, 2005) são freqüentes e Travi e colaboradores (1998), na Colômbia, demonstraram a viabilidade da infecção experimental de *D. marsupialis*, utilizando uma fêmea jovem e seus filhotes recém-desmamados como cobaias, comprovando posteriormente por xenodiagnóstico, PCR e cultura de baço, fígado, linfonodo e sangue, diferentemente de Sherlock e colaboradores (1988), no Brasil, que consideraram a tarefa de difícil execução. O trabalho de Travi e colaboradores (1998) evidenciou o papel de reservatório destes animais, confirmando sua participação no ciclo de transmissão da leishmaniose.

2.2 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE

A capacidade de confirmar, de forma precisa e confiável, as infecções por patógenos é uma

necessidade da área médica humana e veterinária, pois, embora a clínica seja soberana, o diagnóstico clínico de doenças com sintomatologias inespecíficas é extremamente difícil, podendo levar o paciente a um tratamento inapropriado, ineficaz, longo, dispendioso e, em doenças de evolução rápida e letal, à morte. No tocante as leishmanioses, as técnicas diagnósticas são diversas, abrangendo métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares, apresentando sensibilidades, especificidades, valores preditivos positivos e negativos variados mas, ainda assim, com uma maior acurácia do que o diagnóstico clínico (ALVES e BEVILACQUA, 2003; DA SILVA *et al.*, 2006; GONTIJO e MELO, 2004; OLIVEIRA e ARAÚJO, 2003; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR e RAI, 2002; VOLPINI *et al.*, 2004).

A técnica parasitológica tem sido considerada o padrão-ouro (“Gold Standard”), pois demonstra a presença do parasito na amostra colhida, quer seja pela observação microscópica em esfregaços, pela observação após o cultivo em meio de cultura ou pela infecção experimental de hamsters (*Mesocricetus spp.*) em laboratório. Muito embora seja a forma diagnóstica mais elucidativa e específica, possui um conjunto de desvantagens que serão discutidas posteriormente (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004; BRASIL, 2006a; GONTIJO e MELO, 2004; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; XAVIER *et al.*, 2006).

As técnicas sorológicas demonstram principalmente a presença de anticorpos reativos contra o parasito, muito embora também possam ser desenvolvidos para a detecção de antígenos circulantes nas amostras dos animais avaliados, e, por estes se encontrarem no soro (fração solúvel do sangue periférico extraído após a coagulação), permitem o diagnóstico a partir da venopunção, amostra colhida de forma pouco invasiva, simples e segura (ZIJLSTRA *et al.*, 2001). Estas técnicas, muito embora sejam amplamente utilizadas para a avaliação diagnóstica das mais diversas doenças, possuem baixo poder de discriminação entre infecção e cura, assim como um menor poder discriminatório entre infecções agudas e crônicas, devido à permanência da produção de anticorpos após a eliminação do agente infeccioso (“memória imunológica”). Além disto, reações cruzadas com outros patógenos expressando antígenos

com epítomos semelhantes aos de *Leishmania* (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; CORTADA *et al.*, 2004; COURTENAY *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004; DE SOUZA DIAS *et al.*, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2001a, 2001b), o período da “janela imunológica” (MARQUES *et al.*, 2006), o estado subclínico e a imunossupressão da resposta imunológica também diminuem o valor desta técnica diagnóstica (ATTA *et al.*, 2004; CABRERA *et al.*, 2003; COURTENAY *et al.*, 2002; DE ANDRADE *et al.*, 2001; GONTIJO e MELO, 2004; MATHIS e DEPLAZES, 1995; SALOTRA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2001b; SILVA, A.V. *et al.*, 2005).

Testes sorológicos que detectem antígenos circulantes possuiriam maior valor diagnóstico, pois detectariam os antígenos específicos produzidos pelos patógenos na presença da infecção, mas estes não são muito freqüentes na bibliografia devido à pequena quantidade de antígenos circulantes, sua degradação no ambiente extracelular e por estarem geralmente associados aos anticorpos, formando imunocomplexos que são eliminados pelo sistema fagocítico mononuclear dificultando a sua detecção (AZAZY *et al.*, 2003, 2004; AZAZY, DEVANEY e CHANCE, 1994; MALLA *et al.*, 2003; SENALDI *et al.*, 1996).

As técnicas moleculares, baseadas na detecção do material genético (DNA ou RNA) do parasito, permitem um diagnóstico mais preciso a partir de diversas amostras colhidas dos possíveis hospedeiros avaliados, alcançando níveis de sensibilidade e especificidade iguais ou superiores ao da técnica parasitológica (“gold standard”), demonstrando assim que, tão logo os custos sejam minimizados, estas técnicas serão utilizadas para confirmação dos testes parasitológicos e imunológicos, ou os substituirão. Algumas dificuldades nas etapas de extração do material genético, no controle da contaminação com produtos de PCR e, portanto, na padronização e execução desta técnica, têm impedido sua aplicação direta para o estudo das leishmanioses de maneira definitiva. Além do que já foi dito, um laboratório com controle de áreas específicas para cada etapa do teste se faz necessário na atual forma do teste e isto inviabiliza sua execução a campo (PIRMEZ *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2001b; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR e RAI, 2002; VOLPINI *et al.*, 2004).

2.2.1 Técnicas Parasitológicas

O exame parasitológico para o diagnóstico das leishmanioses e, portanto, da leishmaniose visceral canina (LVC), pode ser executado, a partir de biópsias aspirativas esplênicas, medulares, hepáticas e linfonodais, preferencialmente nesta ordem, de uma das três formas a seguir: 1ª) exame direto dos aspirados em lâminas de vidro analisados por microscopia ótica; 2ª) análise microscópica do cultivo *in vitro* dos aspirados; e 3ª) pela inoculação e acompanhamento da infecção de animais de laboratório, usualmente hamsters (*Mesocricetus spp.*), até que os sintomas apareçam nos animais e a detecção do parasito possa ser feita a partir de seus órgãos infectados (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004; BRASIL, 2006a; GONTIJO e MELO, 2004; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; XAVIER *et al.*, 2006).

Na primeira forma, esfregaços ou impressões das amostras de órgãos específicos (baço, medula óssea, fígado ou linfonodos) são confeccionados em lâminas, fixados em solução de álcool metílico, corados por uma das colorações de rotina (H&E, Giemsa, Wright, Leishman e panótico) e avaliados quanto à presença de *Leishmania sp.* nas células do sistema monocítico fagocitário – macrófagos e monócitos – por um microscopista treinado na observação deste parasito, em pelo menos 200 campos por lâmina, onde a ausência da forma amastigota indica negatividade e a presença, positividade (BRASIL, 2006a; OPAS, 2006).

Na segunda forma, biópsias aspirativas ou fragmentos de órgãos são inoculados em meio sólido de cultivo monofásico (meio de inseto de Schneider; M199; ou meio de Grace) ou, preferencialmente, em meio bifásico (meio NNN – Novy, MacNeal e Nicolle; meio de Tobies) modificado pelo acréscimo de agar sangue e cobertos com um meio líquido (RPMI 1640; meio de inseto de Schneider) contendo entre 10 – 30% de soro fetal bovino (SFB) e cultivados por 4 a 5 semanas, a 22-28°C, até que as promastigotas de *Leishmania spp.* possam ser visualizadas por microscopia invertida ou ótica (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004, 2006a,b; BRASIL, 2006a; OPAS, 2006; SCHUSTER e SULLIVAN, 2002; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR e RAI, 2002).

A terceira forma, conhecida como inoculação laboratorial em hamsters, não possui valor diagnóstico por requerer um tempo consideravelmente mais longo para o desenvolvimento da sintomatologia e, portanto, para a confirmação diagnóstica, o que possibilitaria o agravamento do quadro (BRASIL, 2006a).

Assim, a principal forma de exame parasitológico para o diagnóstico da LVC baseia-se na punção de um dos órgãos acometidos durante a infecção (baço, medula óssea, fígado e linfonodos) que é então submetido ao cultivo para avaliação diagnóstica em laboratório equipado para cultivo celular (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004, 2006a,b; BRASIL, 2006a). Desta forma, as principais desvantagens desta técnica diagnóstica, são: 1) a coleta de amostras invasivas através da punção de órgãos internos dos pacientes; 2) o tempo de avaliação que pode durar até cinco semanas; 3) a necessidade de modificações dos meios de cultivo para cada espécie de *Leishmania*; 4) a possibilidade de contaminação pela manipulação da amostra, desde a coleta até as etapas do cultivo; e 5) o fato da execução deste teste só poder ser feita em ambientes especializados, o que requer o transporte das amostras do local da punção até o laboratório, procedimento que pode diminuir a sensibilidade do teste (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2004; MATHIS e DEPLAZES, 1995; OLIVEIRA, BRAZIL e PACHECO, 2005; PIRMEZ *et al.*, 1999).

2.2.2 Técnicas Sorológicas

Os testes sorológicos baseiam-se na interação antígeno-anticorpo e na capacidade do sistema imune produzir uma resposta humoral secundária (adquirida), com altos níveis de anticorpos ou imunoglobulinas, mono ou policlonais, com especificidades diversas contra os antígenos expressos pelo parasito. A resposta, durante a fase aguda, na grande maioria dos animais, é mediada por imunoglobulinas da classe M (IgM) e, posteriormente, com a instalação da doença e avanço para a cronicidade, existe uma modificação da expressão gênica (“switch” de classe) que culmina, por exemplo, mas não exclusivamente, na mudança de classe de

imunoglobulinas da classe M (IgM) para G (IgG) que serão expressas por longos períodos de tempo, inclusive após a cura, e durante reinfecções devido a “memória imunológica” (GOLDSBY *et al.*, 2003).

A detecção destas imunoglobulinas por testes sorológicos, como o teste de aglutinação direta (DAT); o teste de avaliação rápida da aglutinação (FAST); Teste Rápido Anticorpo para *Leishmania donovani* (dipstick ou TRALd); IFAT (Immuno Fluorescent Antibody Test – IFAT); ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay); e “Western Blotting” ou “immunoblotting” permitem avaliar, de forma indireta, a infecção e, no último teste, reside a possibilidade de diferenciação das infecções agudas das crônicas, passadas das atuais e das reações cruzadas com outros patógenos que compartilhem epítomos conservados filogeneticamente (SINGH e SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR e RAI, 2002).

Cada um dos testes supracitados será apresentado quanto a sua execução técnica, resultados encontrados, com seus níveis de sensibilidade e especificidade, e suas principais vantagens e desvantagens.

2.2.2.1. Teste de Aglutinação Direta (“DAT”) e Teste Rápido de Detecção da Aglutinação (“FAST”)

O teste de aglutinação direta ou DAT (“Direct Agglutination Test”) vem sendo desenvolvido, desde a década de 80, pelas pesquisas do grupo de El-Harith no KIT (“Koninklijk Instituut voor de Tropen”) Biomedical Research (Países Baixos) e baseia-se na capacidade dos anticorpos dos soros dos pacientes reconhecerem epítomos expostos em promastigotas de *L. donovani* da linhagem 1S em microplaca de poliestireno de fundo em V e aglutinarem, formando um produto visual de fácil detecção, eliminando a necessidade de equipamentos específicos (estereoscópios ou microscópios) para a sua leitura (EL-HARITH *et al.*, 1987, 1988; SUNDAR e RAI, 2002). O teste é feito com 11 diluições seriais de cada soro teste e, a recíproca da maior diluição onde o fenômeno de aglutinação ainda pode ser detectado, é lida

após 18 horas de incubação, determinando a positividade do animal testado e seu título, com sensibilidade variando de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100% (ALVES e BEVILACQUA, 2004; GONTIJO e MELO, 2004; MOHEBALI *et al.*, 2005; SUNDAR e RAI, 2002; ZIJLSTRA *et al.*, 2001).

Uma modificação do DAT para um teste com resultado em apenas 3 horas e menos laborioso, executado com apenas uma diluição, foi denominado de teste de avaliação rápida da aglutinação ou FAST (“Fast Agglutination Screening Test”) e encontra-se em desenvolvimento e avaliação, apresentando sensibilidade e especificidade semelhantes ao DAT, e as vantagens operacionais já citadas (BOELAERT *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005; ZIJLSTRA *et al.*, 2001).

As desvantagens de ambos os testes (DAT e FAST) estão diretamente relacionadas ao fato dos testes sorológicos dependerem da 1) reação antígeno-anticorpo que não detecta o parasito, mas sim, os anticorpos produzidos pelo hospedeiro, capazes de reconhecer epítomos expressos pelo parasito e sofrerem aglutinação, formando uma “malha” ou “trama” de alto peso molecular, detectável visualmente quando as concentrações de antígeno e anticorpo estão em equilíbrio (resultado verdadeiro-positivo) e, quando em desequilíbrio, levam a ausência de reação (falso-negativo); 2) reatividade a presença de epítomos compartilhados em patógenos filogeneticamente relacionados, ou mesmo com outros não-relacionados, levando a resultados falso-positivos; e 3) reatividade ocasionada pela conservação da resposta de anticorpos nos pacientes (“memória imunológica”), mantendo assim, a soropositividade por longos períodos, impedindo o uso destes exames para avaliação prognóstica da doença (ALVES e BEVILACQUA, 2004; GONTIJO e MELO, 2004; SUNDAR e RAI, 2002; ZIJLSTRA *et al.*, 2001).

2.2.2.2. **Teste Rápido Anticorpo para *L. donovani* (TRALd)**

O Teste Rápido Anticorpo para *L. donovani*, ou simplesmente TRALd, baseia-se na adsorção

de uma ou mais proteínas do parasito a uma tira de papel de nitrocelulose e impregnação, em outra posição da mesma tira, da proteína A associada a ouro coloidal que, pelo processo de migração capilar, permite a posterior reação antígeno-anticorpo que, ao se desenvolver, produz um precipitado colorido visível que identifica a positividade do teste (BRAZ *et al.*, 2002; CERQUEIRA *et al.*, 2003; GONTIJO e MELO, 2004; ZIJLSTRA *et al.*, 2001).

Este teste imunocromatográfico, em seu primeiro formato, utilizou-se da proteína recombinante rK39 para a detecção de anticorpos no soro dos animais avaliados, apresentando, no Brasil, sensibilidade de 92% e especificidade de 99,5%, muito embora não tenha detectado, como positivos, animais identificados pela técnica de IFI com títulos de 1:40 a 1:320. Em outros países, sob condições ambientais e de execução diferentes, a sensibilidade variou entre 67 – 100%, no Sudão e na Índia, respectivamente, e 98% de especificidade foi detectada na Índia (GONTIJO e MELO, 2004; ZIJLSTRA *et al.*, 2001). Atualmente, outra proteína recombinante, a rK26, está sendo adicionada ao teste TRALd. As primeiras avaliações deste novo formato em pacientes imunocomprometidos pela co-infecção HIV/Leishmania, naqueles infectados por *Leishmania sp.* que reagem com a rK39 e em cães assintomáticos que não são reagentes apresentaram reatividade contra a rK26, indicando que o novo teste terá sua sensibilidade e especificidade ampliada e, devido a redução nos títulos de anticorpos detectados em pacientes durante o tratamento para leishmaniose, um importante papel prognóstico nesta enfermidade (BRAZ *et al.*, 2002; GONTIJO e MELO, 2004).

A principal desvantagem deste teste é a baixa detecção que ele tem apresentado em suas primeiras avaliações a campo quando comparado a outros testes como, por exemplo o DAT (67% de sensibilidade em relação a 90%, respectivamente), principalmente, devido a alterações na temperatura em ambientes desfavoráveis (altas temperaturas e baixa umidade relativa), levando a desnaturação dos anticorpos e a migração incompleta das moléculas no papel filtro durante o exame, fato causado pela rápida evaporação do líquido no papel, ocasionando resultados falso-negativos. Outra desvantagem é a leitura subjetiva, permitindo que resultados duvidosos (bandas pouco visíveis) sejam definidos como positivos ou

negativos de forma arbitrária (ZIJLSTRA *et al.*, 2001).

2.2.2.3. Imunofluorescência Indireta (IFI)

A Imunofluorescência Indireta (IFI), teste com anticorpo imunofluorescente (“Immuno Fluorescent Antibody Test – IFAT”), ou IIF (“Indirect ImmunoFluorescence”), é feita em lâmina de vidro com poços individualizados que são sensibilizados com quantidades definidas de células inteiras (promastigotas ou amastigotas de *Leishmania sp.*) de uma cepa de referência, ou fenotipada, que funcionará como antígeno. Posteriormente, a lâmina será exposta ao soro do paciente a ser avaliado, em diluições seriadas, e ao anticorpo conjugado a um fluorocromo (FITC - “Fluorescein IsoThioCyanate” ou Isotiocianato de fluoresceína), contracorada com azul de Evans a 0,0005% e analisada por microscopia de epifluorescência (luz ultravioleta com comprimento de onda menor incide sobre o fluorocromo que emite um comprimento de onda maior, visualizado como uma cor verde fluorescente). O resultado, de forma semelhante aos outros testes sorológicos supracitados, é dado pela recíproca da mais alta diluição do soro na qual ainda se pode detectar a positividade da amostra analisada (BRASIL, 2006a).

A IFI, segundo Singh e Sivakumar (2003), apresenta uma das melhores características diagnósticas da sorologia atual para a leishmaniose, possuindo sensibilidade variando de 55 – 96% e a especificidade entre 70 – 98%, dados próximos dos anteriormente descritos por Sundar e Rai (2002) que atribuíam valores um pouco menores de sensibilidade (55 – 70%) e especificidade (70 – 89%). Mettler e colaboradores (2005), discordam e apresentam em seu trabalho uma alta especificidade para o IFAT (100%), mas uma sensibilidade de 90% em cães sintomáticos e apenas 29,4% quando os cães avaliados são assintomáticos.

O kit brasileiro, produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (BioManguinhos – FIOCRUZ), utiliza-se de promastigotas de *Leishmania*, apresentando 90% de sensibilidade e 80% de especificidade, com ponto de corte de 1:40 para determinação da positividade

(FIOCRUZ, 2006). Na Índia, títulos reativos a partir de 1:20 são considerados significantes e títulos de 1:128 são considerados diagnósticos para leishmaniose. O uso da forma amastigota, em substituição a forma promastigota, tem demonstrado um aumento da sensibilidade (96%) e da especificidade (98%), além de ter sido capaz de eliminar a reatividade cruzada com antígenos de outros tripanossomatídeos que não *Leishmania sp.* em testes feitos na Índia (SINGH e SIVAKUMAR, 2003).

As principais desvantagens deste teste estão relacionadas ao número de exames que podem ser feitos por lâmina (10 – 12 amostras diminuindo os poços para os controles positivo e negativo); a reatividade cruzada com outros patógenos; a ocorrência de falso-positivos e falso-negativos não pode ser desconsiderada, devido aos valores de sensibilidade e especificidade alcançados pelo teste, impedindo que seu resultado seja acatado de forma exclusiva para o diagnóstico da doença; o protocolo deste teste é consideravelmente trabalhoso no laboratório e inexecutável a campo; e a ausência de reatividade não exclui a infecção do animal avaliado (ALVES e BEVILACQUA, 2004; GONTIJO e MELO, 2004; LEONTIDES *et al.*, 2002; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR e RAI, 2002).

2.2.2.4. Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima (ELISA)

O ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA – “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”), ensaio imunoenzimático (EIE) ou imunoensaio enzimático (EIA – “Enzyme ImmunoAssay”), utiliza-se de placas comerciais de poliestireno com 96 poços que são preenchidos ou sensibilizados com os mais diversos antígenos brutos, purificados ou recombinantes em concentrações que variam de 100ng até 5µg por poço da placa (ATTA *et al.*, 2004; BARROUIN-MELO *et al.*, 2006a, 2006b; CABRERA *et al.*, 1999; INIESTA *et al.*, 2002; LEMESRE *et al.*, 2005; METTLER *et al.*, 2005; MORAES-SILVA *et al.*, 2006; SAHA *et al.*, 2005; SALOTRA *et al.*, 2003; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001, 2003; TALMI-FRANK *et al.*, 2006; VERCAMMEN *et al.*, 2002; ZARAGOZA *et al.*, 2003). Quantidades diferentes, menores do que as citadas anteriormente, foram relatadas em vários trabalhos,

principalmente, com antígenos purificados ou recombinantes (BRAZ *et al.*, 2002; METTLER *et al.*, 2005; ZERPA *et al.*, 2002; ZIJLSTRA *et al.*, 2001).

Existem algumas variações deste ensaio (direto, indireto, “sandwich”, captura, inibição, celular, etc) mas, para o diagnóstico da leishmaniose visceral, o mais amplamente utilizado é o indireto, permitindo a avaliação do soro do animal infectado, mediante utilização de um sistema enzimático. Assim, uma diluição do soro suspeito é adicionada a placa após a sua sensibilização e bloqueio dos sítios inespecíficos para, posteriormente, adicionar-se um anticorpo conjugado a uma enzima, peroxidase ou fosfatase alcalina (as mais comumente usadas), um cromógeno e um substrato capaz de oxidá-lo, permitindo a leitura da placa de forma subjetiva (leitura visual) ou objetiva, com o apoio de um espectrofotômetro, também conhecido como leitor de ELISA, com filtros específicos para o cromógeno utilizado (CROWTHER, 2001; GIBBS, 2006).

Diversos antígenos, compostos de extratos “brutos” ou “crus”, como o SLA (antígeno solúvel de leishmania – “Soluble-Leishmania Antigen”), extraídos por ciclos de congelamento e descongelamento e posterior aplicação de ultra-som em células de promastigotas ou amastigotas de *Leishmania sp.*, embora sejam os mais amplamente utilizados para sensibilizar as placas, apresentam reações cruzadas com outras *Leishmania spp.* e com organismos filogeneticamente relacionados (outros tripanossomatídeos, por exemplo o *Trypanosoma cruzi*) ou, até mesmo, com outros mais distantes, como os agentes causadores da tuberculose, toxoplasmose, neosporose, babesiose, hepatozoonose, erliquiose e babesiose (ALVES e BEVILACQUA, 2004; BARROUIN-MELO *et al.*, 2006a; GONTIJO e MELO, 2004; METTLER *et al.*, 2005; SUNDAR e RAI, 2002).

Antígenos semipurificados, como a fração antigênica secretada/excretada em sobrenadante de cultura de *Leishmania infantum* – LiESAp (LEMESRE *et al.*, 2005), a fração LAgs (“Leishmanial Antigens-specific”), apresentando sensibilidade de 100% e especificidade de 96,7% (SAHA *et al.*, 2005), além de antígenos purificados, como a glicoproteína ligante da

fucose manose de 36kDa (“Fucose-Mannose Ligand – FML”), relatada por Cabrera e colaboradores (1999), apresentando sensibilidade de 100% e especificidade de 96% e os lipofosfoglicanos (“lipophosphoglycans – LPG”) com sensibilidade e especificidade de 92% vêm sendo utilizados e, embora possuam valores de sensibilidade e especificidade equivalentes a outros antígenos atualmente utilizados, ainda apresentam reações cruzadas, incapacidade de distinção entre infecção atual, prévia ou cura e baixo valor prognóstico durante o tratamento (DE SOUZA DIAS *et al.*, 2005; MAALEJ *et al.*, 2003; SAHA *et al.*, 2005; SUNDAR e RAI, 2002).

Vários antígenos recombinantes, construídos em vetores de expressão, vêm sendo utilizados em testes sorológicos com resultados promissores, entre eles, as proteínas gp63 e gp70 (LASRI *et al.*, 2003; RHALEM *et al.*, 1999); rk39 (BRAZ *et al.*, 2002; METTLER *et al.*, 2005; RHALEM *et al.*, 1999; SALOTRA *et al.*, 2006; ZERPA *et al.*, 2002; ZIJLSTRA *et al.*, 2001); rk26, rLdcccys1, rGBP, rLACK, rP20, rPSA-2, H2A, H2B e A2 (DE SOUZA DIAS *et al.*, 2005; MAALEJ *et al.*, 2003) mas, embora alguns deles apresentem alta sensibilidade e especificidade para animais sintomáticos, a avaliação em animais assintomáticos não tem sido equivalente (METTLER *et al.*, 2005; RHALEM *et al.*, 1999; ZERPA *et al.*, 2002; ZIJLSTRA *et al.*, 1998), discordando dos achados de Zijlstra e colaboradores (2001) e Braz e colaboradores (2002) que não encontraram reação cruzada utilizando o antígeno rk39, por exemplo.

A detecção de antígenos de *Leishmania sp.* ou anticorpos anti-*Leishmania* na urina de pacientes tem sido relatada por alguns autores e, a primeira, tem sido dificultada pela baixa quantidade produzida e pelo fato destes estarem normalmente associados aos anticorpos, formando os imunocomplexos, enquanto a segunda parece estar associada a dano renal e, assim, sua detecção surge somente quando o paciente já se encontra em um quadro patológico renal avançado (SOLANO-GALLEGU *et al.*, 2003; ZARAGOZA *et al.*, 2003).

A utilização das frações solúveis do antígeno bruto de promastigotas (SLA) ou amastigotas de

Leishmania sp. são recomendadas para a avaliação epidemiológica de animais em áreas endêmicas, incluindo o homem, devido aos seus bons índices de sensibilidade e especificidade, detectando animais sintomáticos e assintomáticos com maior frequência do que antígenos recombinantes, especificamente o antígeno rK39, e com um custo associado bem menor. Estes resultados foram relatados em um amplo estudo sorológico feito por Mettler e colaboradores (2005) que consideraram ainda a facilidade de execução do teste ELISA quando comparado com técnicas mais laboriosas como o PCR, fato citado anteriormente por Sreenivas e colaboradores (2002).

Os dados apresentados no trabalho de Mettler e colaboradores (2005) indicam, de forma bastante esclarecedora, que associações entre testes ELISA com antígeno solúvel de promastigotas ou amastigotas de *Leishmania sp.*, com um antígeno recombinante mais específico, como o rk39, ampliariam o valor diagnóstico dos testes sorológicos para um patamar de excelência, o que também está literalmente afirmado por Maalej e colaboradores (2003).

2.2.2.5. “Western Blotting” ou “Immunoblotting”

Esta técnica baseia-se na separação eletroforética de proteínas em um gel nativo ou desnaturante de poli(acrilamida) (“PAGE” ou “SDS-PAGE” – “Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrilamide Gel Electrophoresis”) que é transferido para uma folha de papel de nitrocelulose ou fluoreto de polivinilideno (“PVDF” – “PolyVinylidene Fluoride”). Posteriormente, o papel é submetido a incubação com anticorpos do soro do paciente a ser avaliado e revelado com anticorpos conjugados a uma enzima, capazes de detectar as imunoglobulinas do soro do paciente, as quais se encontram fixadas as proteínas (antígenos) do papel (HARLOW e LANE, 1988). Esta técnica de separação eletroforética em gel desnaturante de poli(acrilamida) tem sido amplamente testada como técnica diagnóstica sorológica, mais sensível e específica, para a detecção de soros positivos para leishmaniose (ATTA *et al.*, 2004; DE SOUZA DIAS *et al.*, 2005; INIESTA *et al.*, 2002; GONÇALVES *et*

al., 2002; LASRI *et al.*, 2003; LEMESRE *et al.*, 2005; MORAES-SILVA *et al.*, 2006; SAHA *et al.*, 2005; SILVA, A.V. *et al.*, 2005; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2003; VERCAMMEN *et al.*, 2002; ZARAGOZA *et al.*, 2003).

A técnica descrita por Laemli em 1970, modificada da apresentada por Ornstein e Davies na década de 60, está baseada na eliminação das diferentes cargas das proteínas (positivas, negativas ou neutras), diretamente relacionadas as cargas dos aminoácidos que a constituem, negativando-as através da ação de um sistema tampão contendo SDS. Posteriormente, as proteínas são submetidas a migração em um campo elétrico gerado ao longo do gel de poliacrilamida, com concentração adequada do polímero para capacitá-lo a criar uma trama molecular cruzada, parecida com uma peneira, tornando o movimento das moléculas de interesse (proteínas), dependente, única e exclusivamente, do peso molecular ou, por assim dizer, do tamanho físico das mesmas (AMERSHAM AMERSHAM BIOSCIENCES INC., 2006; HARLOW e LANE, 1988; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR e RAI, 2002).

Posteriormente, o produto da migração no gel é transferido, também em campo elétrico, para uma membrana de nitrocelulose ou de fluoreto de polivinilideno (“PVDF” ou “PolyVinyliDene Fluoride”) para posterior reação com o soro do paciente e detecção da reação antígeno-anticorpo, por um anticorpo específico contra as imunoglobulinas presentes no soro, ou uma proteína com reatividade pelo Fc do anticorpo, como a proteína A (extraída de *Staphylococcus aureus*) ou a proteína G (extraída de *Streptococcus sp.*), conjugado a uma enzima que, por sua vez oxida um substrato específico, gerando um produto colorido que precipita no local da reação (AMERSHAM AMERSHAM BIOSCIENCES INC., 2006; HARLOW e LANE, 1988; LASRI *et al.*, 2003; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2003).

A sensibilidade e maior especificidade do “Western blotting” ou “Immunoblotting” está relacionada ao fato de que o antígeno, normalmente o extrato “cru” de promastigotas ou amastigotas, muito embora antígenos semipurificados, purificados ou recombinantes também possam ser utilizados, possui uma grande diversidade de frações, permitindo que os vários

anticorpos presentes no soro, possam reconhecê-los, específica e individualmente, gerando uma maior discriminação do perfil antigênico, possibilitando a confirmação e a diferenciação diagnóstica da infecção, o monitoramento, o prognóstico do paciente e a detecção de reações cruzadas, como demonstrado nas revisões de Sundar e Rai (2002), Singh e Sivakumar (2003) e nos trabalhos de Atta (2004), Gonçalves (2002), Iniesta (2002), Lasri (2003), Saha (2005), Vercammen (2002), Zaragoza (2003) e seus colaboradores.

Outro tipo de amostra que apresenta a presença de anticorpos, a urina, também tem sido utilizada, demonstrando padrões diagnósticos e associações com o prognóstico de doenças renais em humanos e em cães infectados por *Leishmania sp.* A desvantagem deste sistema é que a detecção de anticorpos parece ocorrer apenas quando a doença renal já se encontra instalada, diminuindo seu valor para o controle da doença (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2003; ZARAGOZA *et al.*, 2003).

Alguns antígenos recombinantes vêm sendo utilizados na técnica de “immunoblotting”, entre eles, as proteínas recombinantes gp63, gp70, rk39, rGBP, rLACK, rP20, rPSA-2, H2A, H2B e A2, mas, embora todas elas sejam especificamente reconhecidas no “immunoblotting”, seu valor diagnóstico em animais assintomáticos precisa ser melhor avaliado, devido à ausência relativa de anticorpos nestes animais, quando comparados aos sintomáticos. Por outro lado, a detecção de anticorpos anti-gp63, em animais pós-tratamento ou espontaneamente curados, tem sido associada ao sucesso da medicação utilizada e a cura do animal (LASRI *et al.*, 2003; MAALEJ *et al.*, 2003).

Talmi-Frank e colaboradores (2006) demonstraram o valor diagnóstico do “immunoblotting” nas diferentes fases da infecção (prévia, durante e posterior) de cães da raça Beagle, usando antígenos brutos de promastigotas e amastigotas, além dos antígenos recombinantes rk39 e HSP70. A avaliação das frações antigênicas, nas diferentes fases, permitiu diferenciar as respostas dos animais ao tratamento com allopurinol, levando a considerar que a continuidade da detecção dos antígenos de 14, 24 e 29KDa indica um prognóstico desfavorável;

diagnosticar os animais rapidamente, no início da infecção (4 a 6 semanas), através da detecção das bandas de 12 a 68KDa; diferenciar e diagnosticar animais sintomáticos (29, 50, 67KDa) de assintomáticos (28, 46 e 68KDa); indicar prognóstico pós-tratamento da doença com base em um novo parâmetro, denominado de TLI (“Total Lane Intensity” ou Intensidade Total do Poço), que é a soma computadorizada de todas as marcações do “immunoblotting”, índice que demonstrou alta sensibilidade diagnóstica, muito embora ainda requeira avaliações mais amplas.

As principais desvantagens desta técnica diagnóstica estão na dificuldade de sua execução, dependendo de pessoal treinado e equipamentos específicos, no fato dos antígenos utilizados, quando são proteínas totais extraídas de promastigotas ou amastigotas de *Leishmania sp.*, precisarem ser cultivados, levando ao aumento acentuado do tempo necessário para o diagnóstico e, além disso, dependendo da fase da infecção (aguda ou crônica) ou da ausência de resposta (imunossupressão), os animais podem não apresentar resposta humoral (ausência de soroconversão) e, assim, apresentarem-se falsos-negativos no immunoblotting como em outras técnicas sorológicas (MATHIS e DEPLAZES, 1995; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR e RAI, 2002).

2.2.3 Intradermo Reação ou Reação de Montenegro

A intradermo reação, reação de Montenegro, hipersensibilidade tardia do tipo IV ou DTH (“Delayed-Type Hypersensitivity”), detecta a resposta imune celular adquirida que se desenvolve pela ativação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ sensibilizados. Os linfócitos T CD4⁺, após serem apresentados ao antígeno pelas células de Langerhans, por exemplo, são estimulados, tornando-se ativados e respondendo ao estímulo com produção de citocinas (IL-2, IFN- γ , TNF- α , TNF- β , entre outras) e quimiocinas (“MIF – Macrophage-Inhibition Factor”, “MIP-1 – Monocyte Chemoattractant Protein – 1” e MAF - “Macrophage Activating Factor”) que mediam a atração para o sítio de inoculação e, posteriormente, ativam macrófagos, monócitos e linfócitos. As células ativadas, entre elas os macrófagos, se

acumulam causando inchaço e eritema local. O processo inflamatório instaurado induz os macrófagos e os linfócitos a liberarem enzimas, causando destruição tissular que pode ser detectada e medida após 24 – 72 horas da inoculação do antígeno. Assim, na reação de Montenegro, são inoculados 100 a 500 μ L de uma solução contendo de 5×10^6 – 4×10^8 .mL⁻¹ células de promastigotas de *Leishmania sp.* mortas, em solução veicular de salina com fenol em um braço e apenas a solução veicular no outro, que produzirão, após 24 – 72 horas, uma reação com diâmetro maior ou igual a 5mm ou, em alguns relatos, 10mm (BRAZ *et al.*, 2002; GONTIJO *et al.*, 2002; GOLDSBY *et al.*, 2003; MARQUES *et al.*, 2006; OPAS, 2006; ZERPA *et al.*, 2002).

Esta reação é normalmente encontrada em pacientes com leishmaniose cutânea e mucocutânea sendo, geralmente, ausentes ou discretas em pacientes acometidos pela forma visceral da doença. Sua presença nos indivíduos com as formas cutânea e mucocutânea indica, em pacientes sintomáticos de área endêmica, a presença da infecção. Por outro lado, pacientes com a forma visceral não apresentam reatividade e, quando pacientes de todas as formas são testados pós-tratamento, a positividade parece ter valor prognóstico positivo, indicando a cura (BRAZ *et al.*, 2002; GONTIJO *et al.*, 2002; MARQUES *et al.*, 2006; SINGH e SIVAKUMAR, 2003).

As maiores desvantagens deste teste são: 1) a inexistência de um antígeno padronizado; 2) a reatividade cruzada com lepra lepromatosa e tuberculose glandular; e 3) a falta de estudos rigorosos a campo para a validação do seu uso diagnóstico e determinação dos valores de sensibilidade, especificidade, assim como, os valores preditivos positivos e negativos (BRASIL, 2006; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR e RAI, 2002).

2.2.4 Eletroforese de Isoenzimas

Enzimas que catalisam as mesmas reações metabólicas, mas são produtos de genes distintos, são denominadas de *isoenzimas* e apresentam diferentes isoformas, enquanto alelos distintos,

de um mesmo *locus* gênico (produto de um mesmo gene), codificantes para enzimas homólogas que, portanto, catalisam o mesmo produto em uma reação semelhante, são denominadas de *aloenzimas* e, atualmente, estas duas denominações são usadas de forma intercambiável (SELANDER *et al.*, 1986; BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2006). Assim, a eletroforese de isoenzimas, também denominada de eletroforese multilocular de enzimas ou MLEE (“MultiLocus Enzyme Electrophoresis”), para determinação de correlação taxonômica (convergência ou divergência genética) entre organismos, tem sido empregada na avaliação e posicionamento taxonômico de cepas de *Leishmania sp.* nos diversos complexos existentes (GONTIJO *et al.*, 2002; MARTINEZ *et al.*, 1999; SELANDER *et al.*, 1986).

A técnica MLEE utiliza-se de um suporte físico (gel de acetato de celulose, amido, poliacrilamida ou agarose) para a migração eletroforética das enzimas em solução aquosa. Os padrões eletroforéticos de separação são denominados *eletromorfos* e, o conjunto desses padrões – *zimodema*, caracteriza as diferentes *Leishmania sp.* (BAÑULS *et al.*, 1999; GONTIJO *et al.*, 2002; MARTINEZ *et al.*, 1999; SELANDER *et al.*, 1986).

As enzimas utilizadas na MLEE são os produtos de genes de importância metabólica vital para a célula e são transcritos, normalmente, ao nível basal, durante toda a sua vida (genes “housekeeping”). Ao menos 11 enzimas, refletindo as variações de seus *loci*, embora relatos com números maiores e menores de enzimas sejam descritos na bibliografia científica (CHICHARRO *et al.*, 2002; SELANDER *et al.*, 1986), são utilizadas como, por exemplo, as que se seguem: malato desidrogenase NADP^+ ou enzima málica – MDH; malato desidrogenase NAD^+ ou enzima málica – ME; glicose-6-fosfato desidrogenase – G6PDH; 6-fosfogluconato desidrogenase – 6PGDH; isocitrato desidrogenase – IDH; purina nucleosídeo fosforilase – NP1 ou NP2; fosfoglucomutase – PGM; diaforase – DIA; glutamato oxaloacetato transaminase – GOT1 e GOT2; manose-fosfato isomerase – MPI; glicose fosfato isomerase – GPI; fumarato hidratase – FH; glutamato desidrogenase – GLUD; nucleosídeo hidrolase deoxiinosina – NH; peptidase d – PEP-D; alanina aminotransferase – ALAT; e aconitase – ACON, entre outras (BAÑULS *et al.*, 1999; CHICHARRO *et al.*, 2002;

GONTIJO *et al.*, 2002; MARTINEZ *et al.*, 1999; SELANDER *et al.*, 1986).

Estas enzimas podem apresentar migração diferenciada devido à modificação de uma única base de DNA que determine a codificação de um aminoácido diferente do expresso pelo alelo homólogo de outra cepa de *Leishmania sp.*, modificando a carga elétrica da enzima, alterando a sua migração eletroforética e, assim, permitindo a caracterização das diferentes cepas (ZAIDI, KONSTANTINOU e ZERVOS, 2003).

As principais desvantagens desta técnica estão relacionadas a avaliação indireta destes genes, através da migração eletroforética de seus produtos (proteínas, enzimas), o que não permite que códons, com diferentes arranjos de suas bases mas codificantes para o mesmo aminoácido, já que o código genético é degenerado (apresenta diferentes códons que, quando traduzidos, codificam o mesmo aminoácido), sejam detectados (BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2006; ZAIDI, KONSTANTINOU e ZERVOS, 2003; ZEMANOVÁ *et al.* 2004). Muito embora a técnica tenha sido o padrão-ouro da tipagem das cepas de *Leishmania sp.*, dados interlaboratoriais, quando comparados, apresentam resultados conflitantes, impedindo a confirmação dos resultados de forma mais ampla e requisitando uma confirmação posterior por métodos diretos de biologia molecular, como o sequenciamento de DNA, técnicas de hibridização ou PCR. Além disto, a técnica requer o cultivo das cepas teste e controle para análise comparativa dos resultados, aumentando a complexidade do trabalho e o tempo necessário para o diagnóstico, além de não possuir valor prognóstico na avaliação e diferenciação entre recidivas e reinfecções (EL TAI *et al.*, 2001; MORALES *et al.*, 2001; ZAIDI, KONSTANTINOU e ZERVOS, 2003).

2.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O desenvolvimento, em 1985, da PCR (“Polymerase Chain Reaction”), ou Reação em Cadeia

da Polimerase, por Kary Mullis (ganhador do prêmio Nobel de química juntamente com Michael Smith, em 1993) e outros pesquisadores da Corporação Cetus de biotecnologia, revolucionou a paisagem científica moderna, desde sua criação até os nossos dias, pois, muito embora outras tecnologias, como a análise e interpretação do polimorfismo de tamanho de cromossomas; a variação de tamanho dos cromossomas; cariotipagem; rearranjo gênico; hibridização de DNA/DNA e DNA/RNA; e a utilização de enzimas de restrição para produzir padrões de fragmentos já existissem, estas técnicas dependiam de amostras contendo grandes quantidades de DNA ou RNA e, assim, de células do parasito. Logo, a possibilidade de ampliar, de forma eficaz, quantidades de material genético anteriormente indetectáveis pelas outras técnicas disponíveis, transformou a PCR em uma das ferramentas diagnósticas mais preciosas e poderosas de nossa era (DUJARDIN *et al.*, 2002; GLICK e PASTERNAK, 1998; MARFURT *et al.*, 2003a,b; SUNDAR e RAI, 2002; ZAIDI KONSTANTINOU e ZERVOS, 2003).

Thomas Brock e Hudson Freeze descobriram, no Parque Nacional de Yellowstone (USA), em 1969, bactérias que viviam em águas termais e, portanto, possuíam enzimas capazes de manterem sua estabilidade e atividade a altas temperaturas (50° a 80°C). Este fenômeno levou Kary B. Mullis a avaliar a possibilidade de usar uma destas enzimas, a Taq DNA polimerase, extraída da bactéria *Thermus aquaticus* (Brock e Freeze, 1969), no processo de amplificação de seqüências de DNA flanqueadas por oligonucleotídeos *in vitro*, utilizando uma Taq DNA polimerase que precisava ser adicionada novamente, após cada etapa, por ser degradada durante a desnaturação. Desta forma, a técnica de PCR foi desenvolvida, baseada no efeito desnaturante de temperaturas altas sobre o DNA e na capacidade de resistir a altas temperaturas, pelo tempo necessário para completar a síntese de DNA, desta nova Taq polimerase (GLICK e PASTERNAK, 1998; INNIS, 1989; ZAIDI KONSTANTINOU e ZERVOS, 2003).

A técnica utiliza-se, em média, de seqüências de 18 a 24 pares de bases (“primers” ou iniciadores) produzidas para serem complementares as seqüências-alvo na amostra de material

genético a ser avaliada (DNA molde), na presença de nucleotídeos livres (conjuntos de dNTPs contendo dATP, dCTP, dGTP e dTTP e, em alguns casos especiais, outras bases menos comuns, como o dUTP e o dITP); a enzima Taq DNA polimerase; um cofator necessário para a atividade da enzima, o íon divalente magnésio (Mg^{++}), proveniente do acréscimo de $MgCl_2$ ou $MgSO_4$ em concentrações variadas (1 – 4mM); em uma solução tampão contendo Tris-HCl (10-50mM, pH=8,3 – 8,8) e até 50mM de KCl, embora formulações diferentes dos limites citados sejam conhecidas e descritas (INNIS, 1989).

A reação é conduzida em termociclador ou máquina de PCR, capaz de alterar as temperaturas rapidamente, variando de 4°C até 100°C, passando pelo espectro de temperaturas de *desnaturação*, 94 – 97°C; *anelamento*, 55 – 65°C; e *extensão*, geralmente, 72°C, embora outras temperaturas e ciclos com apenas duas etapas, desnaturação e extensão, também sejam citadas. Durante a *desnaturação*, a dupla fita de DNA é separada em fitas simples; no *anelamento*, o pareamento entre os iniciadores e a seqüência de DNA-alvo torna-se possível e estável; e, na *extensão*, a síntese de DNA é executada pela Taq DNA polimerase. Estas mudanças de temperatura são feitas em ciclos que variam de 20 – 40 para alcançar um produto visível que, após ser separado eletroforeticamente, é visualizado através da coloração com brometo de etídio ou “SYBR green”, agentes que intercalam o DNA e sofrem excitação com luz ultravioleta (UV), em ambos os casos, ou azul, no caso da solução de SYBR, gerando um produto que emite uma cor alaranjada ou verde, respectivamente (HOWELL, JOBS e BROOKES, 2006; INNIS, 1989).

A utilização das diversas variantes da técnica de PCR (PCR-RFLP; PCR-SSCP; NESTED-PCR; Multiplex-PCR, Real Time-qPCR, entre outras) na avaliação da diversidade genética se torna um aspecto crucial em campos como a taxonomia, o diagnóstico, a avaliação epidemiológica, a genotipagem e a genética de populações dos agentes causadores das leishmanioses, assim como em outras doenças, e vem sendo amplamente difundida e utilizada, com resultados que apresentam alta sensibilidade e especificidade, além de excelente repetibilidade e eficácia (CORTES *et al.*, 2004; EL TAI *et al.*, 2001; FERROGLIO

et al., 2005; HARRIS *et al.*, 1998; KUHLS *et al.*, 2005; ROTUREAU *et al.*, 2006; ZAIDI KONSTANTINO e ZERVOS, 2003).

Entre as moléculas de DNA-alvo estão as seqüências codificante e não-codificante do gene *gp63* (BENSOUSSAN *et al.*, 2006; MAURÍCIO *et al.*, 1999; MAURÍCIO, STOTHARD e MILES, 2000), as regiões intergênicas ribossomais como o Espaçador Interno Transcrito – ITS (CUERVO *et al.*, 2004; EL TAI *et al.*, 2001; INIESTA *et al.* 2002; KUHLS *et al.*, 2005; ROTUREAU *et al.*, 2006; TALMI-FRANK *et al.*, 2006); os mini-exons (BENSOUSSAN *et al.*, 2006; MARFURT *et al.*, 2003a,b; SERIN *et al.*, 2005), os genes das diferentes subunidades do rRNA (BENSOUSSAN *et al.*, 2006; LEONTIDES *et al.*, 2002; MATHIS e DEPLAZES, 1995; ROTUREAU *et al.*, 2006; WORTMANN *et al.*, 2004), as regiões conservadas ou variáveis do minicírculo do kDNA (BENSAID *et al.*, 2005; BENSOUSSAN *et al.*, 2006; CORTES *et al.*, 2004; COUTINHO *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2004; DE ANDRADE *et al.*, 2001; DE ANDRADE *et al.*, 2006; DISCH *et al.*, 2004; FERROGLIO *et al.*, 2005; FRANCINO *et al.*, 2006; GONTIJO *et al.*, 2002; MARQUES *et al.*, 2006; MIRANDA *et al.*, 2002; MORAES-SILVA *et al.*, 2006; MORALES *et al.*, 2001; NOGUEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; PASSOS *et al.*, 1999; PIRMEZ *et al.*, 1999; SALOTRA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2001a,b; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; VOLPINI *et al.*, 2004, 2006), o DNA genômico completo do parasito (CHICHARRO *et al.*, 2002; CUERVO *et al.*, 2004; GLICK e PASTERNAK, 1998; ZEMANOVÁ *et al.*, 2004), entre outras, que podem ser analisadas diretamente, ou submetidas a posterior restrição enzimática, permitindo a detecção, em gel de agarose ou poliacrilamida, de padrões de fragmentos restritivos específicos, capazes de diferenciar as espécies envolvidas, sendo visualizados pela coloração com brometo de etídio, SYBR green, ou pela solução de nitrato de prata, com suas diferentes sensibilidades.

Esses diferentes alvos de DNA e as diferentes técnicas de PCR escolhidas para o diagnóstico das leishmanioses têm demonstrado sua aplicabilidade nos diversos estudos listados acima e vêm substituindo ou somando-se as técnicas diagnósticas clássicas (parasitológicas e

sorológicas). Este fato tem permitido a avaliação comparativa de amostras provenientes das diversas espécies e cepas de *Leishmania sp.* das áreas endêmicas com aquelas cultivadas em laboratório, distinguindo e classificando-as por comparação com cepas de referência ou pela utilização da técnica de sequenciamento de DNA, visando estabelecer protocolos mais novos e precisos de confirmação da posição taxonômica das cepas nos complexos e identificar as características associadas a virulência, de forma a ampliar o conhecimento acerca da fisiopatologia das leishmanioses (EL TAI *et al.*, 2001; KUHLS *et al.*, 2005; MAURÍCIO *et al.*, 1999; MAURÍCIO, STOTHARD e MILES, 2000; ZEMANOVÁ *et al.*, 2004).

A avaliação desses métodos, de forma conjunta, quanto aos seus valores intrínsecos de especificidade e sensibilidade, as taxas de confiabilidade taxonômica, a capacidade de detecção de polimorfismos intra-específicos e sua aplicabilidade em amostras clínicas ainda não estão determinadas e, portanto, seu uso como uma técnica global e definitiva só poderá ser amplamente aceita, após a confirmação dos resultados encontrados de forma inequívoca (BENSOUSSAN *et al.*, 2006; ROTUREAU *et al.*, 2006).

O limite de sensibilidade desta técnica está diretamente associada a quantidade de DNA-alvo presente na amostra coletada para a análise e, portanto, genes ou seqüências de DNA que possuem múltiplas cópias, influenciam, favoravelmente, este parâmetro do teste. Enquanto isso, a especificidade correlaciona-se com os demais aspectos da tecnologia (concentração dos reagentes envolvidos na reação) e, principalmente, com a seqüência de pares de bases que compõem os iniciadores (“primers”) da reação. Assim, a quantidade de pares de bases que compõem a seqüência dos iniciadores deve ser a mais próxima do limite superior recomendado para se produzir um iniciador e a complementaridade desta seqüência nos genomas das espécies analisadas deve ser mínima ou ausente, aumentando, consideravelmente, a especificidade do teste (BENSOUSSAN *et al.*, 2006; INNIS, 1989).

Ao longo dos anos, embora os diferentes genes estudados tenham demonstrado boas características diagnósticas, a superioridade quantitativa da sensibilidade da PCR utilizando o

kDNA de *Leishmania sp.* vem se destacando, tornando-se clara, frente às outras moléculas-alvo de DNA. O relato de Bensoussan e colaboradores (2006) indica uma baixa especificidade da kDNA – PCR (57,1%) quando comparada a PCR da região ITS1 (100%), contudo, confirma a superioridade da sensibilidade da primeira (98,7%), em relação a segunda (91%), indicando o uso desta quando a confirmação da espécie do parasito não se fizer necessária, o que é corroborado pelas conclusões de Dujardin e colaboradores (2002). Entretanto, outros autores como Cortes (2004), de Andrade (2006) e Salotra (2006) e seus colaboradores detectaram sensibilidades variando de 50 – 96% e especificidades de 56 – 100% ao avaliarem as mais diversas amostras e estas variações estão relacionadas com o uso de técnicas com baixa sensibilidade (parasitológico, microscopia e IFAT) com o padrão-ouro para avaliar e comparar o valor diagnóstico da PCR. Especificamente no estudo de Salotra e colaboradores (2006), as amostras provenientes de 25 pacientes humanos portadores de PKDL, 10 portadores de lepra lepromatosa e 15 pacientes saudáveis, embora pequena, apresentou 96% de sensibilidade e 100% de especificidade, discordando dos achados de Bensoussan e colaboradores (2006).

A utilização de enzimas de restrição para clivar o produto da kDNA-PCR e, assim, produzir diferentes padrões de restrição – *esquizodemas*, capazes de distinguir as diferentes espécies de leishmania tem sido demonstrada por um grupo de pesquisadores brasileiros (DE ANDRADE *et al.*, 2006; VOLPINI *et al.*, 2004, 2006) e internacionais (CHICHARRO *et al.*, 2002; FERROGLIO *et al.*, 2005; MORALES *et al.*, 2001), possibilitando a ampliação da técnica para o diagnóstico específico da doença.

Diversos autores apresentam a utilização da mkDNA-PCR, associada ou não à RFLP, a hibridização com sondas específicas e a qPCR, como a técnica de escolha para a detecção das leishmanioses, principalmente, onde as demais formas diagnósticas (parasitológica, sorológica, ou ambas), apresentem-se negativas ou possuam um menor valor diagnóstico como, por exemplo, nos casos de leishmaniose cutânea e mucocutânea (BENSAID *et al.*, 2005; CHICHARRO *et al.*, 2002; CORTES *et al.*, 2004; COUTINHO *et al.*, 2005; DA

SILVA *et al.*, 2004; DISCH *et al.*, 2004; DUJARDIN *et al.*, 2002; FERROGLIO *et al.*, 2005; FRANCINO *et al.*, 2006; GONTIJO *et al.*, 2002; MARQUES *et al.*, 2006; MORALES *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2005; SALOTRA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2001a,b; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001).

2.3 Significado do diagnóstico de leishmaniose visceral em animais silvestres para a adequação das medidas do PCLV

As medidas empregadas pelo atual Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) contra o avanço desta zoonose no Brasil, desde a década de 50, estão baseadas em: 1) tratamento dos casos humanos; 2) no controle do vetor, através do uso de inseticidas com ação residual, colares e mosquiteiros impregnados com substâncias repelentes para os insetos (inseticidas piretróides, como a deltametrina); e 3) na avaliação diagnóstica e eutanásia dos cães soropositivos (ALVES e BEVILACQUA, 2004; BRASIL, 2006a; GONTIJO e MELO, 2004; OLIVEIRA e ARAÚJO, 2003).

A rápida expansão geográfica das leishmanioses, observada ao longo das últimas décadas, deixa clara a insuficiência destas medidas de controle, as quais contribuem apenas para uma redução temporária da incidência da doença nas áreas atingidas (SHERLOCK, 1996; FRANKE *et al.*, 2002).

O controle do reservatório canino tem sido um dos temas mais estudados e controversos quanto à sua contribuição na redução da incidência da LV humana e canina, apesar das evidências deporem mais a favor do que contra sua utilização como medida de controle da doença, por questões éticas e técnicas (ALVES e BEVILACQUA, 2004; ASHFORD *et al.*, 1998; DIETZE *et al.*, 1997; GONTIJO e MELO, 2004; LASRI *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2004; OLIVEIRA e ARAÚJO, 2003; PALATINIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001).

Entre os fatores técnicos que contribuem para a baixa eficácia do controle podemos citar a baixa sensibilidade do teste de imunofluorescência indireto, agravada pela ampla utilização de

papel-filtro na colheita de sangue nos inquéritos sorológicos caninos, o que reduz a sensibilidade do teste sorológico, bem como a demora, tanto no fornecimento do resultado diagnóstico quanto na eutanásia dos cães soropositivos. Estes fatores têm sido apontadas como causas do desempenho insatisfatório desta medida no controle da doença, uma vez que prolongam a permanência na área de cães infectados, sustentando a continuidade do ciclo de transmissão do parasito (ALMEIDA *et al.*, 2005; COURTENAY *et al.*, 2002a,b; LIRA *et al.*, 2006; PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001, 2004).

Além destes fatores limitantes da eficácia no controle do reservatório canino relacionados, direta ou indiretamente, à área diagnóstica, o enfoque sobre o envolvimento de espécies de animais sinantrópicos e silvestres na epidemiologia da leishmaniose visceral tem crescido, muito embora ainda seja insuficiente para garantir que sua inserção no programa de controle desta zoonose aumente sua eficiência. Entretanto, a literatura mundial acerca das espécies de animais domésticos e selvagens envolvidas na epidemiologia das leishmanioses, na América Latina e em outras regiões, seja ampla e tenha sido discutida nesta revisão.

Desde o fim da década de 70, com o primeiro relato de Yoshida e colaboradores (1979) sobre a infecção natural de um marsupial com *Leishmania sp.* em São Paulo, diversos estudos disponíveis na literatura mundial têm avaliado canídeos, felinos, primatas, roedores, suínos, equinos e marsupiais, relatando casos de infecção natural em exemplares de todos estes grupos. Estes dados, quando avaliados à luz da reduzida eficácia da medida de controle baseada na eliminação de cães soropositivos em áreas endêmicas, indica de forma bastante inequívoca, a participação destes animais, quando presentes, como reservatórios e, portanto, como agentes envolvidos no ciclo de transmissão enzoótico da leishmaniose, visceral ou tegumentar, para outros animais, incluindo o homem (ALEXANDER *et al.*, 2002; AMARAL *et al.*, 1996, 2000; ASHFORD *et al.*, 1998; CERQUEIRA *et al.*, 2003; DE SOUZA *et al.*, 2005; KATAKURA *et al.*, 2003; KERR, McHUGH e DRONEN, 1995; MOHEBALI *et al.*, 2005; MORAES-SILVA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2005; PALATINIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001; PORROZZI *et al.*, 2006; SHERLOCK *et al.*, 1984, 1988; TRAVI *et al.*, 1994,

1998; XIMENES, SOUZA E CASTELLÓN, 1999; ZERPA *et al.*, 2002).

Entre os animais estudados, os marsupiais das espécies *Didelphis marsupialis*, *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita* têm sido apontados como reservatórios silvestres das leishmanioses (visceral e tegumentar), além de outras zoonoses, e, devido a seus hábitos sinantrópicos, maior atenção tem sido dada à sua avaliação. Registros de marsupiais, naturalmente ou experimentalmente, infectados com cepas das mais diversas espécies de *Leishmania* são encontrados em trabalhos realizados no Brasil (ARIAS e NAIFF, 1981; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; CABRERA *et al.*, 2003; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; GRIMALDI Jr *et al.*, 1991; LAINSON *et al.*, 1981; SHERLOCK *et al.*, 1984; e SHERLOCK *et al.*, 1988; YOSHIDA *et al.*, 1985) e em outros países da América Latina (CORREDOR *et al.*, 1989a,b; LAINSON e RANGEL, 2005; LLANOS-CUENTAS *et al.*, 1999).

Travi e colaboradores (1998), na Colômbia, infectaram experimentalmente espécimes de *D. marsupialis*, demonstrando assim, que seu envolvimento no ciclo de transmissão da leishmaniose em ambientes naturais deva ser tratado atualmente como um fato.

Desta forma, alguns exemplos da literatura serão citados a seguir, visando fundamentar a necessidade da avaliação diagnóstica e da inclusão de animais sinantrópicos, selvagens ou silvestres, nas medidas de controle implementadas pelos Centros de Controle de Zoonoses (CCZs) municipais, de acordo com as medidas indicadas pelo PCLV do Ministério da Saúde do Brasil, para o aprimoramento da eficácia do controle da leishmaniose no Brasil.

O aumento constante de relatos do envolvimento dos marsupiais no ciclo de transmissão da leishmaniose em áreas endêmicas pode ser avaliado na literatura por diversos trabalhos, entre eles, o de Barra do Guaratiba (Rio de Janeiro), uma localidade onde a casuística humana alcançou 8 casos entre 1995 e 1996 e a soroprevalência canina na região permaneceu alta (25%), mesmo após a eliminação maciça de cães (CABRERA *et al.*, 2003; SILVA, A.V. *et*

al., 2005). Na região do estudo, a proximidade com áreas de mata e a presença de marsupiais nas proximidades das residências foram detectadas e consideradas fatores de risco à infecção por *Leishmania chagasi*, tanto para cães quanto para humanos. Esta afirmação é amplamente fundamentada pelos estudos clássicos de Yoshida e colaboradores (1979, 1985), Sherlock e colaboradores (1984, 1988), Arias e Naiff (1981) e, assim como, em avaliações mais recentes como as de Grimaldi Jr (1991), na revisão de Sherlock (1996) e nos trabalhos de Travi e colaboradores (1994, 1998), Ashford e colaboradores (1998), Ximenes, Souza e Castellón (1999), Alexander (2002) e Zerpa (2002), entre outras.

Na cidade de Campo Grande (Mato Grosso do Sul), pesquisadores relataram a detecção de um gato infectado por *Leishmania amazonensis* apresentando úlceras no focinho, nas orelhas e na extremidade das patas, as quais continham inúmeras formas amastigotas e promastigotas, visualizadas em esfregaços e em meio de cultivo respectivamente, confirmando a transmissão do agente etiológico da leishmaniose tegumentar para este animal, indicando a inclusão e a necessidade de maiores estudos para a avaliação do papel de reservatório em felinos de áreas endêmicas associadas a remanescentes de matas que contenham o inseto vetor (DE SOUZA *et al.*, 2005).

Oliveira e colaboradores (2005), visando avaliar a influência dos roedores na transmissão da leishmaniose (visceral e cutânea) e o papel de alguns espécimes como reservatórios na área endêmica de Araçuaí, Minas Gerais, utilizou-se da técnica de PCR, seguida de hibridização, para detectar as regiões conservadas e variáveis específicas do mkDNA dos complexos *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania donovani*, detectando os parasitos homônimos, a exceção da *Leishmania chagasi* para o último complexo, encontrando três espécies (*Rattus rattus*, *Thrichomys apereoides* e *Oryzomys subflavus*) infectadas com os parasitos dos dois subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*), reforçando os dados da literatura e confirmando a participação dos roedores na transmissão das leishmanioses no estado.

Moraes-Silva e colaboradores (2006), avaliando a possibilidade de porcos (*Sus scrofa*

domesticus) participarem, como reservatórios, do ciclo de transmissão da *Leishmania infantum* em uma das mais antigas áreas endêmicas do país, detectaram altos níveis de anticorpos na sorologia mas não foram capazes de demonstrar a presença do parasito em nenhum animal infectado, natural ou experimentalmente, portanto, considerando-os resistentes à infecção e discordando dos achados de Brazil e colaboradores (1987) que detectaram inúmeras formas amastigotas em um porco da ilha de São Luiz, Maranhão. Assim, novos estudos, acerca do papel destes animais, utilizando técnicas mais sensíveis deverão por fim a dúvida quanto a sua participação na transmissão da doença.

Moheballi e colaboradores (2005), na República Islâmica do Irã, avaliaram canídeos domésticos e selvagens, detectando, pela primeira vez nesta região, a infecção por *Leishmania infantum* e *Leishmania tropica* em lobo e cão doméstico, envolvendo estes animais no ciclo de transmissão do agente etiológico da leishmaniose no Oriente Médio.

O trabalho de Alexander e colaboradores (1998) levantou, através da técnica de PCR seguida de hibridização com sondas dirigidas para o complexo *L. braziliensis*, a infecção em seis espécies, incluindo marsupiais, como *Micoureus demerarae* e *Didelphis marsupialis*, e roedores, como *Melanomys caliginosus*, *Microryzomys minutus*, *Rattus rattus* e um coelho, *Sylvilagus brasiliensis*, indicando a possibilidade destes atuarem com reservatórios em cafezais no sudoeste da Colômbia. Zulueta e colaboradores (1999), na Venezuela, também encontraram espécimes de *Rattus rattus* e de *Didelphis marsupialis* infectados por parasitos do complexo *L. donovani* e os incluíram como possíveis reservatórios da leishmaniose na região endêmica de Anzoátegui, corroborando com os demais achados citados nesta revisão.

O significado do diagnóstico da leishmaniose, com base nos dados da literatura e nos achados do presente estudo, parece bastante claro e indicativo da necessidade da inclusão de animais sinantrópicos silvestres e selvagens em estudos confirmatórios que avaliem a sua participação no ciclo de transmissão da leishmaniose, ampliando e possibilitando um maior e mais claro entendimento das causas da contínua expansão da leishmaniose no Brasil e, possivelmente, no

mundo, capacitando a reformulação das medidas de controle do PCLV com o intuito de ampliar sua eficácia e torná-lo efetivo no combate a esta zoonose.

Os diferentes índices de prevalência encontrados nas diferentes regiões dos estudos existentes sobre a participação de animais silvestres e selvagens na transmissão das diversas formas de leishmaniose estão relacionados às: 1) diferenças nas cepas; 2) na distribuição geográfica; 3) em aspectos nutricionais; 4) da resposta imune do hospedeiro e do reservatório, mas, certamente também, aos 5) testes diagnósticos aplicados. Atualmente, embora um teste diagnóstico único (padrão-ouro) continue sendo inexistente para a determinação do parasitismo e da infectividade do animal avaliado, incluindo o homem, as técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) parecem ser as mais adequadas para o diagnóstico preciso da infecção e das medidas terapêuticas a serem aplicadas. Assim, sua utilização, ao menos em casos duvidosos, aumentaria a eficácia das medidas de controle.

A inclusão da análise de outros animais, além do cão, nas medidas indicadas pelo Ministério da Saúde para o controle desta endemia, através das ações dos Centros de Controle de Zoonoses (CCZs) no Brasil, aumentarão, sensivelmente, o conhecimento acerca da biologia do parasito e permitirão um controle mais eficaz da sua transmissão, com um alto custo inicial para os cofres públicos, que seria reduzido, em longo prazo, com a otimização dos alvos da cadeia a serem controlados, a redução do ônus no orçamento com o tratamento longo e dispendioso dos casos humanos das áreas endêmicas causados por parasitos do gênero *Leishmania* e o desenvolvimento de metodologias diagnósticas mais baratas e precisas do que as atualmente utilizadas.

2.4 Objetivos

Avaliar a população de cães e marsupiais da área endêmica de Barra do Pojuca (Camaçari,

Bahia) quanto a infecção por *Leishmania sp.* utilizando um ELISA indireto com antígeno fenotipado por comparação com uma cepa brasileira de referência (WDCM731 CLIIOC – FIOCRUZ);

Avaliar a mkDNA-PCR como ferramenta molecular para o diagnóstico da infecção por *Leishmania sp.* e confirmar a casuística detectada pela sorologia nos cães e marsupiais;

Determinar a espécie do parasito responsável pela casuística da área endêmica utilizando o perfil de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) com as enzimas ApaI e HaeIII;

Propor, com base nos dados relatados pela literatura e pelos achados deste estudo, condutas que auxiliem o aprimoramento das medidas de controle indicadas pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV).

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Avaliação sorológica e molecular de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* na área endêmica de Barra do Pojuca – Camaçari, Bahia, Brasil

Autores: de Alcântara, Adriano Costa²; Gomes-Neto, Cyro de Moraes Barbosa²; Bittencourt, Diana Velloso Vianna²; Stöcker, Andreas²; Barrouin-Melo, Stella Maria¹; Aguiar, Paulo Henrique Palis¹; Franke, Carlos Roberto²

¹Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE). Departamento de Patologia e Clínicas. Escola de Medicina Veterinária. Universidade Federal da Bahia. ²Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE). Departamento de Produção Animal. Escola de Medicina veterinária. Universidade Federal da Bahia. Avenida Adhemar de Barros, 500 – Ondina CEP: 40.170-110 Salvador, Bahia, Brasil. franke@ufba.br

RESUMO

A utilização do teste ELISA indireto para o diagnóstico, inquérito sorológico e vigilância epidemiológica em áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma recomendação do Ministério da Saúde brasileiro e é parte integrante do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV). Neste estudo, comparamos os resultados de um ELISA indireto, utilizando antígeno bruto solúvel de promastigotas (SLA) de *Leishmania infantum* fenotipada, com os resultados da mkDNA PCR. A soroprevalência da região de Barra do Pojuca foi de 9,5% e 83,3% destes cães foram positivos pela mkDNA PCR. Contudo, 17 (68%) cães soronegativos pelo ELISA e avaliados pela mkDNA PCR apresentaram positividade, demonstrando assim, a reduzida sensibilidade da sorologia. A prevalência da infecção canina, baseada nos dados obtidos pela mkDNA PCR em 49 cães testados foi de 14,6%. A espécie associada à infecção canina nesta área endêmica foi a *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*), como determinado pelo perfil dos polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), quando comparados ao da cepa de referência (MHOM/BR/1974/PP75). Embora a praticidade, os índices de sensibilidade e especificidade e o menor custo do ELISA indireto indiquem sua utilização diagnóstica, a baixa eficiência do PCLV pode ser explicada, em parte, pela incapacidade do teste sorológico em reconhecer animais assintomáticos que não produzam resposta de anticorpos. Assim, o presente estudo recomenda a utilização da mkDNA PCR como ferramenta complementar.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*; *Leishmania chagasi*; ELISA; mkDNA PCR; RFLP.

Serology and molecular evaluation of *Leishmania infantum* naturally-infected dogs in the endemic área of Barra do Pojuca – Camaçari, Bahia, Brasil

Autores: de Alcântara, Adriano Costa²; Gomes-Neto, Cyro de Moraes Barbosa²; Bittencourt, Diana Velloso Vianna²; Stöcker, Andreas²; Barrouin-Melo, Stella Maria¹; Aguiar, Paulo Henrique Palis¹; Franke, Carlos Roberto²

¹Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE). Departamento de Patologia e Clínicas. Escola de Medicina Veterinária. Universidade Federal da Bahia. ²Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE). Departamento de Produção Animal. Escola de Medicina veterinária. Universidade Federal da Bahia. Avenida Adhemar de Barros, 500 – Ondina CEP: 40.170-110 Salvador, Bahia, Brasil. franke@ufba.br

SUMMARY

The use of indirect ELISA test for the diagnosis, serological survey and epidemiological surveillance of canine visceral leishmaniasis (CVL) in endemic areas is recommended by the Brazilian health department and it is a part of the Visceral Leishmaniasis Control Program (VLCP). Herein, comparative results of an indirect ELISA, using as antigen a phenotyped soluble *Leishmania infantum* promastigote antigen (SLA), and mkDNA PCR are presented. The Barra do Pojuca seroprevalence reached 9.5% and 83.3% of the serologically positive dogs were also positive by mkDNA PCR. However, 17 (68%) seronegative dogs by ELISA were positive when evaluated by mkDNA PCR, indicating a reduced sensitivity for serology. The canine infection prevalence, based on the evaluation of 49 dogs by mkDNA PCR, reached 14.6%. The *Leishmania* species infecting dogs in this endemic area was *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) as determined by restriction fragment length polymorphisms (RFLP), when the fragments were compared with those of the reference strain (MHOM/BR/1974/PP75). Although indirect ELISA presents feasibility, high sensitivity and specificity, and a lower cost to be performed, the lower efficacy of the VLCP may be explained, at least in part, by the inability of serology to detect asymptomatic animals which are not producing antibodies. Therefore, the authors recommend mkDNA PCR as a complementary tool for diagnostic purposes.

KEYWORDS: *Leishmania infantum*; *Leishmania chagasi*; ELISA; mkDNA PCR; RFLP.

INTRODUÇÃO

O termo leishmaniose é aplicado a um conjunto de doenças, causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, distribuídas em 88 países do mundo e em franca expansão no território brasileiro (ARIAS, MONTEIRO e ZICKER, 1996; BRASIL, 2006; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; FRANKE *et al.*, 2002; OMS, 2006). Entre as diferentes formas desta doença, a Leishmaniose Visceral (LV) é causada pelo parasito *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*), sendo transmitida pela picada das fêmeas de um inseto vetor, cujo principal representante é da ordem *Diptera* e da família *Psychodidea*, o *Lutzomyia longipalpis* (GRAMICCIA e GRADONI, 2005; MAURICIO *et al.*, 1999; MAURICIO, STOTHARD, MILES, 2000; OMS, 2006; SOARES e TURCO, 2003). Assim, a infecção de animais silvestres sinantrópicos possui grande relevância para a saúde pública, pois os mesmos tornam-se importantes reservatórios do parasito, *Leishmania infantum*, podendo explicar a manutenção e o aumento do índice de transmissão desta patologia para as populações humanas das áreas endêmicas (BRASIL, 2006; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; OMS, 2006).

Os animais mais amplamente citados como reservatórios do agente etiológico da LV são os canídeos (cães, lobos e raposas), embora roedores, marsupiais, galos, porcos, preguiças, entre outros animais, já tenham sido avaliados e descritos pela bibliografia mundial (ALEXANDER *et al.*, 2002; ASHFORD *et al.*, 1998; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; KATAKURA *et al.*, 2003; MOHEBALI *et al.*, 2005; MORAES-SILVA *et al.*, 2006; e MOREIRA *et al.*, 2004). Contudo, devido à proximidade com os seres humanos, os cães recebem uma atenção especial e a detecção da infecção dos mesmos por espécies de *Leishmania*, principalmente a *Leishmania infantum*, em diversos países do mundo e em áreas endêmicas brasileiras, ocasionou a inclusão destes no Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2006; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; GRAMICCIA e GRADONI, 2005; PALATINIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001).

As medidas de controle estabelecidas pelo PCLV estão baseadas 1) no tratamento dos casos humanos com os medicamentos disponíveis; 2) no inquérito sorológico humano e canino; 3) no controle das populações do inseto vetor; 4) em atividades de educação em saúde; e 5) na eutanásia dos cães soropositivos (ASHFORD *et al.*, 1998; BRASIL, 2006). Esta última medida tem sido questionada, principalmente, devido aos dados conflitantes da literatura no que se refere, tanto à eficácia da medida, quanto a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos aplicados para o diagnóstico, muito embora sua utilização continue sendo indicada para a contenção da expansão desta endemia (COURTENAY *et al.*, 2002; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; DIETZE *et al.*, 1997; MATHIS e DEPLAZES, 1995; MOREIRA *et al.*, 2004; PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001; e SOLANO-GALEGO *et al.*, 2001). Desta forma, o inquérito soroepidemiológico canino é utilizado como medida indireta na avaliação do risco de infecção humana em áreas endêmicas,

considerando-se o aumento dos casos caninos um evento prévio à elevação da casuística humana (ASHFORD *et al.*, 1998; CORTADA *et al.*, 2004; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; DUPREY *et al.*, 2006; GRAMICCIA e GRADONI, 2005; INIESTA *et al.*, 2002; e SHERLOCK, 1996).

Dois exames amplamente utilizados para avaliar a infecção canina são o teste de ImunoFluorescência Indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Contudo, a confiabilidade de seus resultados são limitadas pelas reações cruzadas com outros patógenos que apresentem antígenos conservados filogeneticamente, podendo ocasionar falso-positivos, ou devido à possibilidade de ausência de resposta do hospedeiro frente aos diferentes antígenos (purificados ou recombinantes) utilizados nestes testes, podendo ocasionar falso-negativos (MAALEJ *et al.*, 2003; METTLER *et al.*, 2005; ROSÁRIO *et al.*, 2005; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR e RAI, 2002).

Técnicas mais sensíveis e específicas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes, capazes de detectar o material genético do parasito, vêm sendo utilizadas na confirmação do diagnóstico sorológico e têm demonstrado índices de sensibilidade e especificidade que superam os das técnicas sorológicas. Além disso, diversos protocolos atuais permitem a distinção das diferentes espécies envolvidas na patologia estudada (MARFURT *et al.*, 2003; MARQUES *et al.*, 2006; PASSOS *et al.*, 1996; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; VOLPINI *et al.*, 2004).

Assim, o presente estudo visou avaliar os resultados da análise sorológica de cães da área endêmica de Barra do Pojuca, município de Camaçari, utilizando um ELISA indireto com um antígeno solúvel de cepa de *Leishmania infantum*, fenotipada por comparação com uma cepa brasileira de referência WDCM731 (CLIOC – FIOCRUZ); confirmar os achados sorológicos pela detecção da região conservada do minicírculo do DNA de cinetoplasto (mkDNA) do parasito, utilizando a mkDNA PCR; identificar as espécies do parasito envolvidas nesta área endêmica pelos polimorfismos de comprimentos de fragmentos de restrição (RFLP); e, por último, com base nestes resultados, avaliar e propor condutas que aumentem a eficácia do PCLV.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo – A região de Barra do Pojuca, localidade do município de Camaçari, está localizada nas coordenadas geográficas de 12° 35' 709" Sul e 38° 02' 595" Oeste do estado da Bahia, Brasil, próximo à cidade de Salvador (capital do estado da Bahia) a qual é considerada indene ou livre de leishmaniose.

Coleta das amostras – sangue canino foi coletado em tubos com e sem anticoagulante (EDTA), por punção da veia cefálica do membro torácico. Todas as amostras foram coletadas por um veterinário experiente, seguindo as determinações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a permissão assinada do dono do animal. Duzentas e cinquenta e três amostras foram coletadas, aliquotadas e armazenadas a -20°C ou submetidas à centrifugação para a separação do soro ($500\times g$, por 10 minutos a temperatura ambiente), identificadas e, posteriormente, armazenadas a -20°C no Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE) da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Teste ELISA indireto – Microplacas de ELISA Corning Costar 3590 (Corning, USA) foram sensibilizadas com $5\mu\text{g/mL}$ de antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), como descrito por Paranhos-Silva e colaboradores (1996), em tampão carbonato-bicarbonato ($0,05\text{M}$, $\text{pH}=9,6$), à 4°C , por 16 horas (“overnight”) em câmara úmida. PBS-M-T (Tampão fosfato $0,01\text{M}$ e salina $0,15\text{M}$, $\text{pH}=7,4$ contendo 5% de leite desnatado e 0,05% de Tween 20) foi utilizado como solução de bloqueio por uma hora, à temperatura ambiente. Os soros testados, assim como os controles positivos e negativos, foram diluídos 1:500 em PBS-M-T e $100\mu\text{L}$ foram aplicados nos poços, em duplicata, por uma hora, à temperatura ambiente. O anticorpo conjugado à enzima peroxidase utilizado foi uma anti-IgG de cão produzida em coelho (A9042, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) diluída 1:25.000 em PBS-M-T e $100\mu\text{L}$ foram aplicados por poço, por uma hora, à temperatura ambiente. Os soros foram detectados pela adição de $100\mu\text{L}$ de uma solução contendo peróxido de hidrogênio a 0,015% e $0,4\text{mg/mL}$ de OPD (P9029, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) em tampão citrato-fosfato ($0,1\text{M}$ e $0,2\text{M}$, respectivamente, $\text{pH}=5,1$). As leituras das densidades óticas (DO) e seus registros foram feitas no Leitor de ELISA Anthos 2010 (Eugendorf, Áustria), com o filtro de 492nm , após a adição de $50\mu\text{L}$ de ácido sulfúrico 4N.

Extração de DNA – $500\mu\text{L}$ de sangue total foram submetidos à três lavagens com um tampão de lise de eritrócitos TLE (155mM de NH_4Cl ; 10mM de KHCO_3 ; $0,1\text{mM}$ de EDTA, $\text{pH}=7,4$) e centrifugado à $500\times g$, por 10 minutos, à temperatura ambiente, ressuspenso em TE (Tris 10mM e EDTA 1mM), contendo 1% de SDS e $100\mu\text{g/mL}$ de proteinase K, e submetido a uma temperatura de 56°C , por 16 horas (“overnight”). As amostras foram então aquecidas a 100°C , por 15 minutos para inativar a proteinase K e quebrar os concatêmeros de DNA. Estas amostras foram submetidas à extração com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e posterior lavagem com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) por 2 vezes para limpar as amostras de resíduos de fenol. O DNA foi então precipitado com dois volumes de etanol 100% e 1/10 de acetato de sódio 3M ($\text{pH}=5,2$), a uma temperatura de -20°C (“overnight”), e lavados duas vezes em etanol a 70%. Posteriormente, o DNA foi ressuspenso em $50\mu\text{L}$ de TE ou água para PCR (SAMBROOK, MACCALLUM e RUSSELL, 2001).

mkDNA PCR – A reação baseou-se nos “primers” degenerados 150: 5' –

GGGKAGGGGCGTTCTSCGAA – 3' e 152: 5' – SSSWCTATWTTACACCAACCCC – 3' os quais foram desenhados e utilizados por outros pesquisadores (DEGRAVE *et al.*, 1994; MARQUES *et al.*, 2006; PASSOS *et al.*, 1996; RODGERS, POPPER e WIRTH, 1990; VOLPINI *et al.*, 2004). A reação foi desenvolvida em tubos de PCR de 0,2mL (Axygen, USA) adicionando-se 1µM de cada “primer” (IDT Technologies, USA); 200µM dNTPs (AmershamBiosciences, USA); 1.5mM MgCl₂; e 1U de Taq DNA Polymerase (NEB, USA) em tampão 1X (20mM Tris-HCl; 50mM KCl; 10mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Triton X-100; pH=8,8), como recomendado pelo fabricante (NEB, USA), adicionando-se 1 à 3µL de DNA molde em um volume final de 10µL. Os tubos foram então colocados no termociclador T1 (WHATMAN/BIOMETRA, Germany) e programado para desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Polimorfismos de Comprimentos de Fragmentos de Restrição (“RFLP”) – Os produtos de PCR foram submetidos à restrição enzimática utilizando-se 1U das enzimas HaeIII e ApaLI, ambas da New England Biolabs (USA), em reações individuais, por 3 horas, à 37°C no tampão recomendado pelo fabricante.

Análise em gel de agarose – As análises dos produtos de PCR foram feitas em gel de agarose a 2%, aplicando-se os 10µL da amostra adicionado de 2µL de SYBR green (Molecular Probes, Invitrogen, USA) diluído 1:100 e 2µL de tampão de amostra por poço do gel sendo, posteriormente, submetido a eletroforese em TBE 0,5X (Tris base/ácido bórico 45mM e EDTA 1mM, pH=8,3) com uma corrente constante aplicada de 100V por, aproximadamente, 1 hora e meia. A imagem do gel foi registrada pelo sistema BioDocAnalyze (Biometra, Germany) e a presença do amplicon de 120 pares de bases determinou a positividade da amostra.

DNA-PAGE e coloração pela prata – Os produtos de restrição foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10%, aplicando-se uma amperagem constante de 40mA e, posteriormente, corados pela reação com nitrato de prata (AgNO₃). Resumidamente, o gel foi fixado por 10 minutos em uma solução contendo 10% de etanol, 0,5% de ácido acético glacial em água destilada. Posteriormente, o gel foi submerso em uma solução a 0,2% de nitrato de prata (AgNO₃) e mantido sob agitação por 10 minutos. Após a impregnação pela prata, o gel foi lavado em água deionizada por 2 minutos e submetido à revelação em uma solução reveladora contendo 0,75M de NaOH e 0,1M de formaldeído, diluídos em água, pelo tempo necessário para a visualização das bandas (aproximadamente 20 minutos). Posteriormente, a reação era bloqueada, substituindo-se a solução reveladora pela fixadora. A preservação do gel foi feita entre folhas de papel celofane sobre uma superfície rígida (placa de vidro) e a imagem digitalizada utilizando-se um scanner.

Análise estatística – Todas as análises foram feitas utilizando-se o Pacote Estatístico para as Ciências Sociais (SPSS - “Statistical Package for the Social Sciences”), versão 12. A Curva ROC (“Receiver Operating Characteristics”), com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), foi aplicada de forma a determinar o ponto de corte (0,143) para o teste ELISA indireto, apresentando sensibilidade de 100% e especificidade de 90% com base em soros controles positivos e negativos confirmados por cultura e sorologia prévia. Esta análise e o fator de correção interplacas foram calculados segundo Frey, Di Canzio e Zurakowski (1998). O Teste Exato de Fisher foi utilizado para comparar os resultados dos testes ELISA indireto e mkDNA, devido à presença de valores esperados menores do que cinco em uma das quatro células da tabela 2X2, sendo considerado significativo com um valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A soroprevalência canina na região de Barra do Pojuca (Camaçari, Bahia) foi de 9,5%, de acordo com o teste ELISA indireto, detectando 24 animais soropositivos entre os 253 avaliados, com valores de densidades óticas (DO) médias das duplicatas soropositivas variando entre 0,164 e 1,323, enquanto os 229 soros restantes foram negativos, apresentando valores menores do que o ponto de corte, com sensibilidade de 100% e especificidade de 90%.

Os vinte e quatro animais positivos pelo ELISA indireto foram avaliados pela mkDNA PCR (Fig. 1) e o resultado indicou a presença da banda de 120pb em 20 (83,3%) e sua ausência nas outras quatro (16,7%) amostras. Além dos animais soropositivos, 25 animais escolhidos aleatoriamente entre os soronegativos foram submetidos a mkDNA PCR, permitindo a detecção de mais dezessete cães (68%) positivos e oito (32%) negativos. A detecção geral, utilizando a mkDNA PCR em 49 amostras estudadas da região endêmica, revelou 37 (75,5%) amostras positivas e 12 (24,5%) negativas (Tabela 1), com um baixo índice de concordância, sem significância estatística, entre os testes ELISA indireto e mkDNA PCR (Teste Exato de Fisher bi caudal, $p = 0,321$, IC=95%).

Amostras aleatórias de cães positivos pela mkDNA PCR, ou em ambos os testes executados (ELISA indireto e mkDNA PCR), foram submetidos a análise por enzimas de restrição e posterior separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 10% e, todas as amostras avaliadas, apresentaram o perfil de clivagem característico da cepa de referência MHOM/BR/1974/PP75 de *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*), mantidas no CLIOC – Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz (WDCM731) e gentilmente cedida pelas Dr^{as}. Elisa Cupolillo e Ângela C. Volpini do Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz e do Centro de pesquisas René Rachou, respectivamente (Figura 2).



Figura 1. Gel de agarose a 2% representando a detecção da mkDNA de *Leishmania sp.* em amostras caninas. Lane 1 – 25bp DNA ladder (Promega, USA); Lane 2 – Controle positivo de *Leishmania infantum*; Lane 3 – Controle negativo sem DNA; Lane 4 – amostra canina negativa; Lane 5 – amostra canina positiva; Lane 6 – amostra canina positiva; Lane 7 – amostra canina negativa; Lane 8 – amostra canina negativa; Lane 9 – amostra canina positiva; Lane 10 – 100bp DNA ladder (Amersham, USA).

Tabela 1. Comparação entre os testes ELISA indireto e mkDNA PCR para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral dos cães de Barra do Pojuca, Camaçari, Bahia, Brasil.

		PCR		TOTAL
		POS	NEG	
ELISA	POS	20 (40,8%)	4 (8,2%)	24(49%)
	NEG	17 (34,7%)	8 (16,3%)	25 (51%)
TOTAL		37 (75,5%)	12 (24,5%)	49 (100%)

Teste Exato de Fisher bi caudal ($p=0,321$, IC=95%).

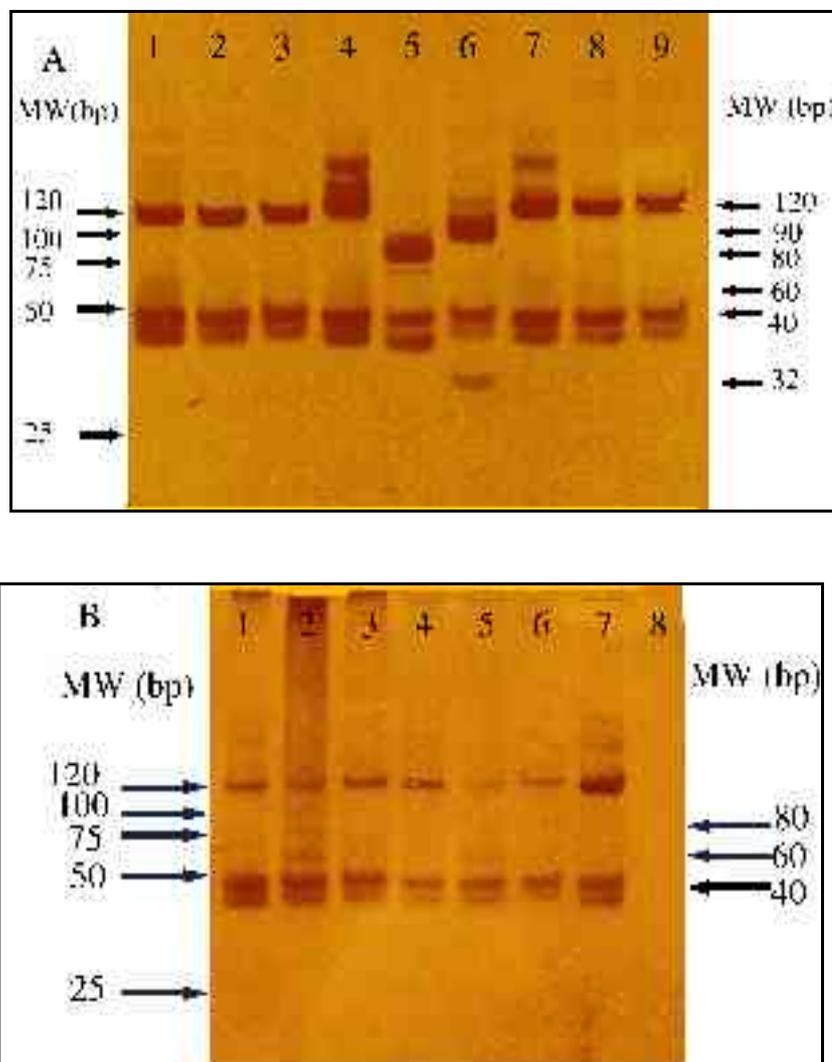


Figura 2. PAGE a 10% representando o perfil RFLP dos amplicons das cepas de referência de *Leishmania* sp. e das amostras de cães. A) Lane 1 – *L. amazonensis*; Lane 2 – *L. amazonensis* + HaeIII; Lane 3 – *L. amazonensis* + ApaLI; Lane 4 – *L. braziliensis*; Lane 5 – *L. braziliensis* + HaeIII; Lane 6 – *L. braziliensis* + ApaLI; Lane 7 – *L. infantum*; Lane 8 – *L. infantum* + HaeIII; Lane 9 – *L. infantum* + ApaLI. B) Lane 1 – cão 1; Lane 2 – cão 1 + HaeIII; Lane 3 – cão 1 + ApaLI; Lane 4 – cão 2; Lane 5 – cão 2 + HaeIII; Lane 6 – cão 2 + ApaLI; Lane 7 – Controle positivo; Lane 8 – Controle negativo. As enzimas utilizadas foram da New England Biolabs (NEB, USA) e a marcação dos pesos moleculares foi feita com base no marcador utilizado, 25bp DNA ladder (Promega, USA).

DISCUSSÃO

O uso de testes sorológicos para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp. tem sido recomendado pelo Ministério da Saúde (MS) brasileiro desde a década de 80, inicialmente utilizando-se a IFI e, posteriormente, adicionando-se o teste ELISA, com base em suas boas performances, medidas pelos índices de sensibilidade e especificidade, custo, o número de

amostras avaliadas e a facilidade de execução destas técnicas, quando comparadas com as moleculares e o cultivo (BRASIL, 2006; BRAZ *et al.*, 2002; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR e RAI, 2002).

No presente estudo, a soroprevalência canina alcançou o percentual de 9,5% na região de Barra do Pojuca (Camaçari, Bahia), uma taxa próxima aos valores inferiores detectados em outras áreas endêmicas como as regiões da Bacia do Mediterrâneo, Ilha de Margarida (Venezuela) e em Jacobina, no próprio estado da Bahia, que apresentaram soroprevalências variando entre 10 e 37% (ASHFORD *et al.*, 1998; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; ZERPA *et al.*, 2002).

Embora a importância da soroprevalência em estudos epidemiológicos seja amplamente reconhecida, alguns problemas são comuns nas áreas endêmicas do Brasil, entre eles, os resultados falso-positivos, devido às reações cruzadas entre Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Cutânea Americana (LCA), Malária, Doença de Chagas, Esquistossomose, Tuberculose e Lepra, entre outras; e a possibilidade de falso-negativos, devido à ausência de níveis detectáveis das imunoglobulinas testadas, quando os soros foram coletados em um momento prévio a produção da classe de imunoglobulina avaliada, fenômeno conhecido como “Janela imunológica ou sorológica”, ou à imunossupressão da resposta dos animais na fase crônica (CORTADA *et al.*, 2004; DE SOUZA DIAS *et al.*, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2001).

A positividade em 20 (83,3%) das 24 amostras dos soros testados pelo ELISA indireto quando avaliados pela mkDNA PCR confirma, embora sem significância estatística (Teste Exato de Fisher bi caudal $p=0,321$, IC=95%), a especificidade do teste ELISA indireto, utilizando o antígeno bruto (SLA), quando os animais avaliados são responsivos, ou seja, apresentam ativação da resposta humoral com produção de anticorpos. Por outro lado, a ausência de positividade em 17 (68%) dos 25 animais soronegativos pelo teste ELISA indireto, apresentando positividade pela mkDNA PCR, demonstra que a sorologia tem uma menor sensibilidade em animais oligossintomáticos e assintomáticos (ou não responsivos), permitindo um significativo número de falso-negativos, comprometendo o controle desta endemia (INIESTA *et al.*, 2002; LEONTIDES *et al.*, 2002; e METTLER *et al.*, 2005).

A utilização, neste estudo, dos “primers” degenerados 150 e 152, capazes de reconhecer a região conservada da seqüência do minicírculo de DNA do cinetoplasto (mkDNA) das diferentes espécies de *Leishmania* contendo, aproximadamente, 10.000 cópias por parasito, aumenta consideravelmente a sensibilidade desta técnica, indicando que a casuística baseada na sorologia é menor do que a realmente existente em áreas endêmicas (ROGERS e WIRTH, 1987; DE ANDRADE *et al.*, 2006; FERROGLIO *et al.*, 2005). Considerando-se apenas as amostras avaliadas pela mkDNA PCR (n=49), a casuística aumentaria para 37 (14,6%) casos

confirmados dos 253 animais coletados, podendo ser ainda maior com a avaliação de todos os 253 cães da área endêmica.

A aplicação da técnica de RFLP, utilizando-se as enzimas HaeIII e ApaLI, permitiu a caracterização da espécie *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) como o agente etiológico responsável pelas infecções caninas na área endêmica após comparação do perfil de clivagem enzimática com a cepa de referência, onde ambas apresentaram os fragmentos de 120, 80, 60 e 40 pares de bases, como descrito por outros autores (DE ANDRADE *et al.*, 2006; MARQUES *et al.*, 2006; VOLPINI *et al.*, 2004).

Embora não nos pareça provável, devido ao uso de boas técnicas laboratoriais (ponteiras com filtro barreira, uso de áreas distintas para o preparo das soluções de PCR e para a extração do DNA, entre outras medidas), não podemos excluir totalmente a possibilidade de contaminação, já que a técnica utilizada é sensível, detectando quantidades do DNA-alvo na ordem de fentograma (DE ANDRADE *et al.*, 2006; MARQUES *et al.*, 2006; VOLPINI *et al.*, 2004).

CONCLUSÃO

Os resultados, neste estudo, da aplicação do teste ELISA indireto utilizando o antígeno SLA, demonstram a sua eficácia como método de vigilância epidemiológica para a população canina sororeativa. Contudo, soros de animais infectados que ainda não tenham soroconvertido, ou sejam imunossuprimidos, serão considerados negativos pelo teste ELISA indireto e, portanto, permanecerão e desempenharão seu papel de reservatório na área endêmica, possibilitando a permanência do agente etiológico e sua transmissão pelo inseto vetor, implicando em uma menor eficiência do sistema de controle associado ao PCLV.

A mkDNA PCR foi capaz de confirmar a infecção por *Leishmania sp.*, tanto em amostras sorologicamente positivas quanto nas negativas, comprovando assim sua superioridade, no que se refere aos parâmetros de sensibilidade e especificidade, para o diagnóstico da doença canina. Estes dados indicam ainda uma baixa sensibilidade do teste ELISA indireto utilizando o antígeno SLA para o diagnóstico da LV canina, corroborando na justificativa da reduzida eficácia do PCLV.

A aplicação da RFLP nas amostras positivas pela mkDNA PCR permitiu identificar o agente etiológico dos casos caninos nesta área endêmica e demonstrar tratar-se do parasito *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*).

A soroprevalência da região de Barra do Pojuca (Camaçari, BA) foi de 9,5%, com base nos dados sorológicos, e 14,6% com os dados da mkDNA PCR, indicando o uso da segunda como ferramenta diagnóstica mais sensível e permitindo considerar que os índices apresentados podem ser ainda maiores em estudos que avaliem todas as amostras utilizando-se desta técnica molecular.

A utilização de técnicas mais sensíveis e específicas, como a mkDNA PCR, capaz de detectar os casos assintomáticos, agudos (antes da soroconversão) e crônicos (imunossuprimidos), aumentará o controle dos animais infectados e, desta forma, do agente etiológico, podendo somar-se para reduzir a taxa de transmissão em áreas endêmicas, auxiliando no controle desta endemia e maximizando as ações de controle do PCLV.

O alto custo da PCR no Brasil, a necessidade de equipamentos especiais e pessoal treinado são alguns dos fatores que impedem a aplicação e a utilização desta técnica diagnóstica pelos órgãos de saúde, laboratórios e clínicas veterinárias em geral. Ainda assim, recomendamos a utilização desta técnica (mkDNA PCR) nas áreas endêmicas para confirmar casos onde o diagnóstico seja conflitante e, esporadicamente, como mecanismo de vigilância das espécies do parasito que estão ativamente sendo transmitidas nestas áreas. A avaliação de casos sintomáticos mas soronegativos e de uma parte da população soronegativa e assintomática, permitiria a verificação da taxa de infecção nestes grupos, o que de outra forma passaria despercebida. Esta medida certamente contará favoravelmente para o aumento da eficácia do PCLV.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Fundação Alexander von Humboldt pelo apoio de número III-ERSX-BRA/1067633 cedido ao Prof. Dr. Carlos Roberto Franke; ao apoio financeiro número 478702/2003-5 do CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico; a FAPESB – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia pela bolsa de DTR-3 número 19.571.216.3383 cedida ao autor, Adriano Costa de Alcântara; ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Camaçari, Bahia, Brasil; As mestrandas Caroline de Carvalho Urpia e Fabiana Maia Moura Costa do Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP/CpqGM/FIOCRUZ/BA) pelo apoio com os géis de poliacrilamida e coloração pela prata; e a todos os estudantes envolvidos nesta pesquisa na Universidade Federal da Bahia. Entre eles e, especialmente, a mestranda Bárbara Maria Paraná da Silva Souza; Danielle Custódio Leal; Antônio Eduardo Araújo Barbosa; **Débora Cristina Portela Medina Barbosa**; e Lídia Silva de Oliveira, sem os quais este trabalho não poderia ter sido feito.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, B.; DE CARVALHO, R.L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M.H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg Infect Dis.** v. 8, n. 12, p. 1480-5, Dez. 2002.

ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg Infect Dis.** v.2, n. 2, p. 145-146, Apr-Jun. 1996.

ASHFORD, D.A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M.C.; SAMPAIO, D.P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** v. 59, n. 1, p. 53-7, Jul. 1998.

BRASIL. 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.

BRAZ, R.F., NASCIMENTO, E.T., MARTINS, D.R., WILSON, M.E., PEARSON, R.D., REED, S.G., JERONIMO, S.M. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **Am J Trop Med Hyg.** v. 67, n.4, p. 344-8, Out. 2002.

CORTADA, V.M.; DOVAL, M.E.; SOUZA LIMA, M.A.; OSHIRO, E.T.; MENESES, C.R.; ABREU-SILVA, A.L.; CUPOLILO, E.; SOUZA, C.S.; CARDOSO, F.O.; ZAVERUCHA DO VALLE, T.; BRAZIL, R.P.; CALABRESE, K.S.; GONCALVES DA COSTA, S.C. Canine visceral leishmaniosis in Anastacio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Vet Res Commun.** v. 28, n. 5, p. 365-74, Jul. 2004.

COURTENAY, O., QUINNELL, R.J., GARCEZ, L.M., SHAW, J.J., DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J Infect Dis.** v. 186, n. 9, p. 1314-20, Nov. 2002.

DANTAS-TORRES F. e BRANDÃO-FILHO S.P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v. 48, n. 3, p. 151-6, May-Jun. 2006.

DE ANDRADE, H.M.; REIS, A.B.; DOS SANTOS, S.L.; VOLPINI, A.C.; MARQUES, M.J.; ROMANHA, A.J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Vet Parasitol.** v. 140, n. 3-4, p. 231-8, Set. 2006.

DE SOUZA DIAS, S.; DA COSTA PINHEIRO, P.H.; KATZ, S.; DOS SANTOS, M.R.; BARBIERI, C.L. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* suitable for serodiagnosis of American visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** v. 72, n. 2, p. 126-32, Fev. 2005.

DEGRAVE, W., FERNANDES, O., CAMPBELL, D., BOZZA, M., LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 89, n. 3, p. 463-9, Jul-Set. 1994.

DIETZE, R., BARROS, G.B., TEIXEIRA, L., HARRIS, J., MICHELSON, K., FALQUETO, A., COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin Infect Dis.** v. 25, n. 5, p. 1240-2, Nov. 1997.

DUPREY, Z.H.; STEURER, F.J.; ROONEY, J.A.; KIRCHHOFF, L.V.; JACKSON, J.E.; ROWTON, E.D.; SCHANTZ, P.M. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. **Emerg Infect Dis.** v. 12, n. 3, p. 440-6, Mar. 2006.

FERROGLIO, E.; ROMANO, A.; TRISCIUOGLIO, A.; POGGI, M.; GHIGGI, E.; SACCHI, P.; BIGLINO, A. Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 100, n. 7, p. 636-41, Jul. 2005.

FRANKE, C.R., STAUBACH, C., ZILLER, M., SCHLUTER, H. Trends in the temporal and spatial distribution of visceral and cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, from 1985 to 1999. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 96, n. 3, p. 236-41, Mai-Jun. 2002.

FREY, A.; DI CANZIO, J. e ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **J Immunol Methods.** 1998 Dec 1;221(1-2):35-41.

GONÇALVES, C.C.; REICHE, E.M.; DE ABREU FILHO, B.A.; SILVEIRA, T.G.; FELIZARDO, T.C.; MAIA, K.R.; COSTACURTA, R.; PADOVESI, E.J.; DIAS FILHO, B.P.; JANKEVICIUS, S.I.; JANKEVICIUS, J.V. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a Western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** v. 66, n. 1, p. 91-102, Jan. 2002.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int J Parasitol.** v. 35, n. 11-12, p. 1169-80, Out. 2005.

INIESTA, L.; FERNANDEZ-BARREDO, S.; BULLE, B.; GOMEZ, M.T.; PIARROUX, R.; GALLEGO, M.; ALUNDA, J.M.; PORTUS, M. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. **Clin Diagn Lab Immunol.** v. 9, n. 5, p. 1137-41, Set. 2002.

KATAKURA, K.; MIMORI, T.; FURUYA, M.; UEZATO, H.; NONAKA, S.; OKAMOTO, M.; GOMEZ, L.E.A.; HASHIGUCHI, Y. Identification of endotrypanum species from a

sloth, a squirrel and *Lutzomyia* sandflies in Ecuador by PCR amplification and sequencing of the mini-exon gene. **J Vet Med Sci.** v. 65, n. 5, p. 649-53, Maio 2003.

LEONTIDES, L.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A.F.; GALATOS, A.D.; MYLONAKIS, M.E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Vet Parasitol.** v. 109, n. 1-2, p. 19-27, Out. 2002.

MAALEJ, I.A., CHENIK, M., LOUZIR, H., BEN SALAH, A., BAHLOUL, C., AMRI, F., DELLAGI, K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** v.68, n. 3, p. 312-20, Mar. 2003.

MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I.; JAFFE, C.L.; BECK, H.P.; FELGER, I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. **J Clin Microbiol.** v. 41, n. 7, p. 3147-53, Jul. 2003.

MARQUES, M.J.; VOLPINI, A.C.; MACHADO-COELHO, G.L.; MACHADO-PINTO, J.; DA COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; ROMANHA, A.J. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 54, n. 1, p. 37-43, Jan. 2006.

MATHIS, A.; DEPLAZES, P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. **J Clin Microbiol.** v. 33, n. 5, p. 1145-9, Maio 1995.

MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology.** v. 119, n. 3, p. 237-46, Set. 1999.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today.** v. 16, n. 5, p. 188-9, Maio 2000.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **J Clin Microbiol.** v. 43, n. 11, p. 5515-9, Nov. 2005.

MOHEBALI, M.; HAJJARAN, H.; HAMZAVI, Y.; MOBEDI, I.; ARSHI, S.; ZAREI, Z.; AKHOUNDI, B.; NAEINI, K.M.; AVIZEH, R.; FAKHAR, M. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. **Vet Parasitol.** v. 129, n. 3-4, p. 243-51, Maio 2005.

MORAES-SILVA, E.; ANTUNES, F.R.; RODRIGUES, M.S.; DA SILVA JULIAO, F.; DIAS-LIMA, A.G.; LEMOS-DE-SOUSA, V.; DE ALCANTARA, A.C.; REIS, E.A.; NAKATANI, M.; BADARÓ, R.; REIS, M.G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; FRANKE, C.R. Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. infantum* infection. **Acta Trop.** v. 98, n. 2, p. 176-82, Maio 2006.

MOREIRA, E.D. JR.; MENDES DE SOUZA, V.M.; SREENIVASAN, M.; NASCIMENTO, E.G.; PONTES DE CARVALHO, L. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine Leishmania transmission. **Vet Parasitol.** v. 122, n. 4, p. 254-52, Ago. 2004.

OMS (Organização Mundial de Saúde). Health topics: **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>> Acesso em: 06 de setembro de 2006.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., DOS SANTOS, W.R., FRANCA-SILVA, J.C., DA COSTA, R.T., REIS, A.B., PALATNIK, M., MAYRINK, W., GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** v. 65, n. 5, p. 510-7, Nov. 2001.

PARANHOS-SILVA, M., FREITAS, L.A., SANTOS, W.C., GRIMALDI, G. JUNIOR, PONTES-DE-CARVALHO, L.C., OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg.** V. 55, n. 1, pp. 39-44, Jul 1996.

PASSOS, V.M., LASMAR, E.B., GONTIJO, C.M., FERNANDES, O., DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 91, n. 1, p. 19-20, Jan-Fev. 1996.

RODGERS, M.R., POPPER, S.J., WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp Parasitol.** v. 71, n. 3, p. 267-75, Out. 1990.

ROGERS, W.O. e WIRTH, D.F. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 84, n. 2, p. 565-9, Jan. 1987.

ROSÁRIO, E.Y., GENARO, O., FRANCA-SILVA, J.C., DA COSTA, R.T., MAYRINK, W., REIS, A.B., CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 100, n. 2, p. 197-203, Abr. 2005.

SAMBROOK, J.; MACCALLUM, P; RUSSEL, D. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3^a. ed. Cold Spring Harbor, NY, USA: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001. 2.344 p. il.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil.

Mem Inst Oswaldo Cruz. v. 91, n. 6, p. 671-83, Nov-Dez. 1996.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R.P. Short report: detection of Leishmania DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**. v. 65, n. 6, p. 896-8, Dez. 2001.

SINGH, S. e SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **J Postgrad Med**. v. 49, n. 1, p. 55-60, Jan-Mar. 2003.

SOARES, R.P. e TURCO, S.J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **An Acad Bras Cienc**. v. 75, n. 3, p. 301-30, Set 2003.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol**. v.39, n. 2, p. 560-3, Fev. 2001.

SUNDAR, S. e RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**. v.9, n. 5, p. 951-8, Sep. 2002.

VOLPINI, A.C.; PASSOS, V.M.; OLIVEIRA, G.C.; ROMANHA, A.J. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop**. v. 90, n. 1, p. 31-7, Mar. 2004.

ZERPA, O.; ULRICH, M.; BENITEZ, M.; AVILA, C.; RODRIGUEZ, V.; CENTENO, M.; BELIZARIO, D.; REED, S.G.; CONVIT, J. Epidemiological and immunological aspects of human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 8, p. 1079-83, Dez. 2002.

Avaliação sorológica e molecular de marsupiais (*Didelphis albiventris*, Lund, 1840) naturalmente infectados por *Leishmania infantum* na área endêmica de Barra do Pojuca – Camaçari, Bahia, Brasil

Autores: de Alcântara, Adriano Costa²; Gomes-Neto, Cyro de Moraes Barbosa²; Bittencourt, Diana Velloso Vianna²; Stöcker, Andreas²; Barrouin-Melo, Stella Maria¹; Aguiar, Paulo Henrique Palis¹; Franke, Carlos Roberto²

¹Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE). Departamento de Patologia e Clínicas. Escola de Medicina Veterinária. Universidade Federal da Bahia. ²Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE). Departamento de Produção Animal. Escola de Medicina veterinária. Universidade Federal da Bahia. Avenida Adhemar de Barros, 500 – Ondina CEP: 40.170-110 Salvador, Bahia, Brasil. franke@ufba.br

RESUMO

O teste ELISA indireto para o diagnóstico, inquérito sorológico e vigilância epidemiológica em áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral (LV) é recomendação do Ministério da Saúde brasileiro e integra o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV). Neste estudo, comparou-se os resultados do ELISA indireto, utilizando o antígeno (SLA) de *Leishmania infantum* fenotipada e um conjugado proteína A-peroxidase, com os resultados da mkDNA-PCR para o diagnóstico da leishmaniose em marsupiais. A soroprevalência de Barra do Pojuca foi 73,9% e 64,7% destes marsupiais foram positivos pela mkDNA-PCR. Contudo, 4 (17,4%) marsupiais soronegativos foram positivos pela mkDNA-PCR, indicando uma reduzida sensibilidade da sorologia. A prevalência dos 27 marsupiais, baseada na mkDNA-PCR, foi 55,6% e, ao excluirmos 4 animais não avaliados pela sorologia, alcançou 65,2%. A espécie infectando os marsupiais foi a *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*), como demonstrado pelo perfil dos fragmentos de restrição (RFLP), quando comparados aos da cepa de referência (MHOM/BR/1974/PP75). Embora o alto índice de infecções caninas seja amplamente correlacionado com o aumento da casuística humana em áreas endêmicas, a baixa eficácia do controle baseado na eutanásia canina pode ser explicada, em parte, pela existência de outros animais atuando como reservatórios. Assim, o presente estudo recomenda a avaliação dos marsupiais e a utilização da mkDNA-PCR como ferramentas complementares para o aprimoramento das medidas do PCLV.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*; *Leishmania chagasi*; ELISA; mkDNA PCR; RFLP.

Serological and molecular evaluation of *Leishmania infantum* naturally-infected opossum (*Didelphis albiventris*, Lund, 1840) in the endemic área of Barra do Pojuca – Camaçari, Bahia, Brasil

Autores: de Alcântara, Adriano Costa²; Gomes-Neto, Cyro de Moraes Barbosa²; Bittencourt, Diana Velloso Vianna²; Stöcker, Andreas²; Barrouin-Melo, Stella Maria¹; Aguiar, Paulo Henrique Palis¹; Franke, Carlos Roberto²

¹Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE). Departamento de Patologia e Clínicas. Escola de Medicina Veterinária. Universidade Federal da Bahia. ²Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE). Departamento de Produção Animal. Escola de Medicina veterinária. Universidade Federal da Bahia. Avenida Adhemar de Barros, 500 – Ondina CEP: 40.170-110 Salvador, Bahia, Brasil. franke@ufba.br

SUMMARY

Indirect ELISA test for diagnosis, serological survey and epidemiological surveillance of visceral leishmaniasis (VL) in endemic areas is recommended by the Brazilian Health Department and integrates the Visceral Leishmaniasis Control Program (VLCP). Herein, comparative results between an mkDNA-PCR and an indirect ELISA, using a soluble phenotyped *Leishmania infantum* promastigotes antigen (SLA) and a peroxidase conjugated protein A, for leishmaniasis diagnostics are presented. Seroprevalence in Barra do Pojuca reached 73.9% and 64.7% of these opossums were positive by mkDNA-PCR. However, 4 (17.4%) seronegative opossums by ELISA were positive by mkDNA-PCR, indicating a reduced sensitivity for serology. The prevalence for the 27 opossum, based on mkDNA-PCR, reached 55.6% and, after excluding 4 specimens not evaluated by serology, it raised to 65.2%. The *Leishmania* specie associated to infected opossums in the endemic area was *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) as determined by the RFLP profile of samples when compared to the MHOM/BR/1974/PP75 reference strain. Although the high rate of canine infection has been correlated with increased prevalence of human cases in endemic areas, the low efficacy of canine-culling measure can be partially explained by the existence of other animals acting as reservoirs. Hence, the present study recommends evaluation of opossums and use of mkDNA-PCR as complementary tools for the improvement of VLCP efficacy.

KEYWORDS: *Leishmania infantum*; *Leishmania chagasi*; ELISA; mkDNA PCR; RFLP.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença re-emergente que compreende um conjunto complexo de formas (cutânea, mucocutânea, visceral e dérmica pós-kalazar), causadas por diferentes agentes etiológicos do gênero *Leishmania*. Países como o Afeganistão, a Arábia Saudita, Bangladesh, Brasil, Índia, Irã, Peru, Síria e Sudão, somam, aproximadamente, 90% de todos os casos mundiais das formas da doença e o Brasil tem sofrido um aumento significativo da casuística em áreas anteriormente consideradas livres ou indenes, caracterizando o processo de expansão desta endemia (BRASIL, 2006; DOS SANTOS *et al.*, 1998; FRANKE *et al.*, 2002; MORAES-SILVA *et al.* 2006; OMS, 2006).

Entre as diferentes formas da doença, a Leishmaniose Visceral (LV) é a que possui os maiores índices de mortalidade e morbidade, sendo causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani* (*L. archibaldi*, *L. chagasi*, *L. donovani* e *L. infantum*). A *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) possui como vetor mais amplamente relatado no Brasil, a fêmea do inseto (*Diptera:Psychodidea*) *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912), muito embora outros representantes do mesmo gênero estejam sendo incriminados, por exemplo, o *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) na região central do Brasil (DOS SANTOS *et al.*, 1998; MAURICIO, STOTHARD, MILES, 2000; SOARES e TURCO, 2003; OMS, 2006).

Após a descoberta concomitante do agente etiológico da leishmaniose visceral na Tunísia, por Leishman e Donovan em 1903; a inclusão da participação canina por Nicolle e Comte em 1908; e a detecção dos primeiros casos de leishmaniose no Brasil, por Penna em 1934, Chagas em 1936 e Cunha e Chagas em 1937, o reservatório canino tem sido incriminado e submetido às medidas de controle baseadas na eliminação de animais soropositivos desenvolvidas pelos órgãos de saúde municipais ao longo das últimas décadas. Contudo, os dados conflitantes sobre sua eficácia e a detecção de outros animais naturalmente infectados nas áreas endêmicas avaliadas, embasam a conclusão de que outros reservatórios participem do ciclo de transmissão da leishmaniose (ASHFORD *et al.*, 1998; BRASIL, 2006; COURTENAY *et al.*, 2002; DIETZE *et al.* 1997; MOREIRA *et al.*, 2004; OMS, 2006).

Assim, desde o início dos estudos sobre esta doença parasitária, outros reservatórios (incluindo animais silvestres e domésticos) são procurados e, ao serem detectados, são propostos para tentar explicar: 1) o ciclo de transmissão do parasito; 2) a manutenção do agente etiológico em áreas endêmicas, após a aplicação das medidas de controle; 3) a expansão da endemia na direção de áreas indenes; e 4) a baixa eficácia do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) no Brasil (ASHFORD *et al.* 1998; BRASIL, 2006; COURTENAY *et al.*, 2002; DIETZE *et al.* 1997; MOREIRA *et al.* 2004). Embora os canídeos sejam certamente um elo da cadeia de manutenção e transmissão desta endemia em áreas endêmicas e, portanto, tenham sido incluídos no PCLV, diversas espécies de roedores, marsupiais, suínos, edentados, entre outros animais, também foram citados e avaliados pela literatura científica recente, tanto em áreas rurais e suburbanas quanto em urbanas, fundamentando as explicações para a expansão desta endemia (ALEXANDER *et al.* 2002;

ASHFORD *et al.* 1998; BRASIL, 2006; DIETZE *et al.* 1997; KATAKURA *et al.* 2003; MOHEBALI *et al.* 2005; MORAES-SILVA *et al.* 2006; e MOREIRA *et al.* 2004).

A participação destes animais, entre eles, os marsupiais *Didelphis albiventris* (Lund, 1840), *Didelphis marsupialis* (Linnaeus, 1758) e *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826), é de grande relevância para a saúde pública, devido a sua dispersão em áreas endêmicas e seu alto grau de sinantropia, influenciando no delineamento das medidas de controle empregadas pelo PCLV, pois, a presença dos mesmos em áreas de assentamento humanas, pode torná-los importantes reservatórios da *Leishmania infantum*, aumentando as chances de transmissão desta patologia para as populações humanas e caninas das áreas endêmicas (ARIAS *et al.*, 1981; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; BRASIL, 2006; CABRERA *et al.*, 2003; LAINSON *et al.*, 1981; OMS, 2006; SHERLOCK, 1996; SHERLOCK *et al.*, 1984; YOSHIDA *et al.*, 1985).

O presente estudo visou avaliar os resultados da análise sorológica de marsupiais (*Didelphis albiventris*, Lund, 1840) naturalmente infectados por *Leishmania sp.*, utilizando um ELISA indireto, com antígeno solúvel de *Leishmania infantum* fenotipada por comparação com a cepa de referência (WDCM731), utilizando como conjugado uma proteína A-peroxidase, e confirmar esses achados sorológicos pela detecção da região conservada do minicírculo do DNA de cinetoplasto (mkDNA) do parasito, utilizando a técnica mkDNA-PCR. Por último, com base nestes resultados, propor condutas que aumentem a eficácia do PCLV.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo – A região de Barra do Pojuca, localidade do município de Camaçari, está localizada nas coordenadas geográficas de 12° 35' 709" Sul e 38° 02' 595" Oeste do estado da Bahia, Brasil, próximo à cidade de Salvador (capital do estado da Bahia) a qual é considerada indene ou livre de leishmaniose.

Coleta das amostras – sangue de marsupiais foi coletado em tubos com e sem anticoagulante (EDTA), por punção venosa. Todas as amostras foram coletadas por um veterinário experiente, seguindo as determinações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a permissão do IBAMA processo n° 2006.001284/04-70. Vinte e sete amostras foram coletadas e armazenadas a -20°C ou centrifugadas para a separação do soro (500xg, por 10 minutos a temperatura ambiente), identificadas e, posteriormente, armazenadas a -20°C no Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE) da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Teste ELISA indireto – Microplacas de ELISA Corning Costar 3590 (Corning, USA) foram sensibilizadas com 5µg/mL de antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), como descrito por Paranhos-Silva e colaboradores (1996), em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH=9,6), a 4°C, por 16 horas (“overnight”) em câmara úmida. PBS-M-T (Tampão fosfato 0,01M e salina

0,15M, pH=7,4 contendo 5% de leite desnatado e 0,05% de Tween 20) foi utilizado como solução de bloqueio por uma hora, à temperatura ambiente. Os soros testados, assim como os controles positivos e negativos (gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera, IOC/FIOCRUZ), foram diluídos 1:20 em PBS-M-T e 100µL foram aplicados nos poços em duplicata, por uma hora a temperatura ambiente. O conjugado à enzima peroxidase utilizado foi a proteína A (10-1023, ZYMED, INVITROGEN, Califórnia, USA) diluída 1:8.000 em PBS-M-T e 100µL foram aplicados por poço, por uma hora, à temperatura ambiente. Os soros foram detectados pela adição de 100µL de uma solução contendo peróxido de hidrogênio a 0,03% e 0,4mg/mL de OPD (P9029, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) em tampão citrato-fosfato (0,1M e 0,2M, respectivamente, pH=5,1). As leituras das densidades óticas (DO) e seus registros foram feitas no Leitor de ELISA Anthos 2010 (Eugendorf, Áustria), com o filtro de 492nm, após a adição de 50µL de ácido sulfúrico 4N.

Extração de DNA – 500µL de sangue total foram submetidos à três lavagens com um tampão de lise de eritrócitos TLE (155mM de NH₄Cl; 10mM de KHCO₃; 0,1mM de EDTA, pH=7,4) e centrifugado à 500xg, por 10 minutos, à temperatura ambiente, ressuspensão em TE (Tris 10mM e EDTA 1mM), contendo 1% de SDS e 100µg/mL de proteinase K, e submetido a uma temperatura de 56°C, por 16 horas (“overnight”). As amostras foram então aquecidas a 100°C, por 15 minutos para inativar a proteinase K e quebrar os concatêmeros de DNA. Estas amostras foram submetidas à extração com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e posterior lavagem com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) por 2 vezes para limpar as amostras de resíduos de fenol. O DNA foi então precipitado com dois volumes de etanol 100% e 1/10 de acetato de sódio 3M (pH=5,2), a uma temperatura de -20°C (“overnight”), e lavados duas vezes em etanol a 70%. Posteriormente, o DNA foi ressuspensão em 50µL de TE ou água para PCR (SAMBROOK, MACCALLUM e RUSSELL, 2001).

mkDNA-PCR – A reação baseou-se nos “primers” degenerados 150: 5' – GGGKAGGGGCGTTCTSCGAA – 3' e 152: 5' – SSSWCTATWTTACACCAACCCC – 3' os quais foram desenhados e utilizados por outros pesquisadores (DE ANDRADE *et al.*, 2006; DEGRAVE *et al.*, 1994; MARQUES *et al.*, 2006; RODGERS, POPPER e WIRTH, 1990; VOLPINI *et al.*, 2004, 2006). A reação foi desenvolvida em tubos de PCR de 0,2mL (Axygen, USA) adicionando-se 1µM de cada “primer” (IDT Technologies, USA); 200µM dNTPs (AmershamBiosciences, USA); 1,5mM MgCl₂; e 1U de Taq DNA Polymerase (NEB, USA) em tampão 1X (20mM Tris-HCl; 50mM KCl; 10mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Triton X-100; pH=8,8), como recomendado pelo fabricante (NEB, USA), adicionando-se 1 à 3µL de DNA molde em um volume final de 10µL. Os tubos foram então colocados no termociclador T1 (WHATMAN/BIOMETRA, Germany) e programado para desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Polimorfismos de Comprimentos de Fragmentos de Restrição (“RFLP”) – Os produtos de PCR foram submetidos à restrição enzimática utilizando-se 1U das enzimas HaeIII e ApaLI, ambas da New England Biolabs (USA), em reações individuais, por 3 horas, à 37°C no

tampão recomendado pelo fabricante.

Análise em gel de agarose – As análises dos produtos de PCR foram feitas em gel de agarose a 2%, aplicando-se os 10 μ L da amostra adicionado de 2 μ L de SYBR green (Molecular Probes, Invitrogen, USA) diluído 1:100 e 2 μ L de tampão de amostra por poço do gel sendo, posteriormente, submetido a eletroforese em TBE 0,5X (Tris base/ácido bórico 45mM e EDTA 1mM, pH=8,3) com uma corrente constante aplicada de 100V por, aproximadamente, 1 hora e meia. A imagem do gel foi registrada pelo sistema BioDocAnalyze (Biometra, Germany) e a presença do amplicon de 120 pares de bases determinou a positividade da amostra.

DNA-PAGE e coloração pela prata – Os produtos de restrição foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10%, aplicando-se uma amperagem constante de 40mA e, posteriormente, corados pela reação com nitrato de prata (AgNO₃). Resumidamente, o gel foi fixado por 10 minutos em uma solução contendo 10% de etanol, 0,5% de ácido acético glacial em água destilada. Posteriormente, o gel foi submerso em uma solução a 0,2% de nitrato de prata (AgNO₃) e mantido sob agitação por 10 minutos. Após a impregnação pela prata, o gel foi lavado em água deionizada por 2 minutos e submetido à revelação em uma solução reveladora contendo 0,75M de NaOH e 0,1M de formaldeído, diluídos em água, pelo tempo necessário para a visualização das bandas (aproximadamente 20 minutos). Posteriormente, a reação era bloqueada, substituindo-se a solução reveladora pela fixadora. A preservação do gel foi feita entre folhas de papel celofane sobre uma superfície rígida (placa de vidro) e a imagem digitalizada utilizando-se um scanner.

Análise estatística – Todas as análises foram feitas utilizando-se o Pacote Estatístico para as Ciências Sociais (SPSS - “Statistical Package for the Social Sciences”), versão 12. A Curva ROC (“Receiver Operating Characteristics”) com intervalo de confiança de 95% (p<0,05) foi aplicada de forma a determinar o ponto de corte (0,167) para o teste ELISA indireto, apresentando sensibilidade de 100% e especificidade de 100% com base em soros controle positivo e negativo confirmados por cultura e sorologia prévia (gentilmente cedidos pelo Prof. Heitor Miraglia Herrera, IOC/FIOCRUZ) segundo Frey, Di Canzio e Zurakowski (1998). O Teste Exato de Fisher foi utilizado para comparar os resultados dos testes ELISA indireto e mkDNA, devido à presença de valores esperados menores do que cinco em duas células da tabela 2X2, sendo considerado significativo com um valor de p<0,05.

RESULTADOS

A soroprevalência nas amostras de marsupiais da região de Barra do Pojuca, Camaçari (BA) foi de 73,9% (17/23), utilizando-se o teste ELISA indireto, com sensibilidade e especificidade

de 100%. A média dos valores de densidade ótica (DO) das duplicatas reativas variou entre 0,167 e 0,500. Os outros 6 soros avaliados foram negativos pelo teste ELISA indireto, com valores de DO menores do que 0,167, e outros quatro soros foram perdidos durante o transporte.

Ao avaliarmos as 27 amostras de marsupiais submetidas a mkDNA-PCR, 15 amostras (55,6%) apresentaram a banda de 120bp (Fig. 1), característica da presença de mkDNA de *Leishmania sp.*, valor que aumentou para 65,2% ao excluirmos as quatro amostras perdidas que não foram analisadas sorologicamente. Ao compararmos os resultados das 23 amostras analisadas pelos dois testes (ELISA indireto e mkDNA-PCR), encontramos 11 amostras (47,8%) positivas em ambos os testes; 6 amostras (26,1%) positivas sorologicamente e negativas pela mkDNA-PCR; 4 amostras (17,4%) positivas pela mkDNA-PCR e negativas pela sorologia; e 2 amostras (8,7%) negativas em ambos os testes, como apresentado na tabela 1, sem significância estatística (Teste Exato de Fisher bi caudal $p=1,000$, IC=95%). Ao avaliarmos a frequência de soros positivos que foram confirmados pela mkDNA-PCR, encontramos 11 amostras (64,7%) positivas entre as 17 soropositivas.



Figura 1. Gel de agarose a 2% representando os amplicons de mkDNA de *Leishmania sp.* em amostras de marsupiais. Lane 1 – 25bp DNA ladder (Promega, USA); Lane 2 – Controle positivo de *Leishmania infantum*; Lane 3 – Controle negativo sem DNA; Lane 4 – amostra de marsupial negativa; Lane 5 – amostra de marsupial positiva; Lane 6 – amostra de marsupial positiva; Lane 7 – amostra de marsupial negativa; Lane 8 – amostra de marsupial negativa; Lane 9 – amostra de marsupial positiva; Lane 10 – 100bp DNA ladder (Amersham, USA).

Amostras aleatórias de marsupiais positivos pela mkDNA-PCR, ou em ambos os testes executados (ELISA indireto e mkDNA PCR), foram submetidas a análise por enzimas de restrição e posterior separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 10% e todas as amostras avaliadas apresentaram o perfil de clivagem característico da cepa de referência MHOM/BR/1974/PP75 de *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*), mantidas no CLIOC – Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (WDCM731) e gentilmente cedida pelas Dr^a. Elisa Cupolillo e Ângela Cristina Volpini do Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz e do Centro de pesquisas René Rachou, respectivamente (Fig. 2).

Tabela 1. Comparação entre os testes ELISA indireto e mkDNA-PCR para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral dos marsupiais de Barra do Pojuca, Camaçari, Bahia, Brasil.

		PCR		TOTAL
		POS	NEG	
ELISA	POS	11 (47,8%)	6 (26,1%)	17 (73,9%)
	NEG	4 (17,4%)	2 (8,7%)	6 (26,1%)
TOTAL		15 (65,2%)	8 (34,8%)	23 (100%)

Teste Exato de Fisher bicaudal ($p=1,000$, IC=95%).

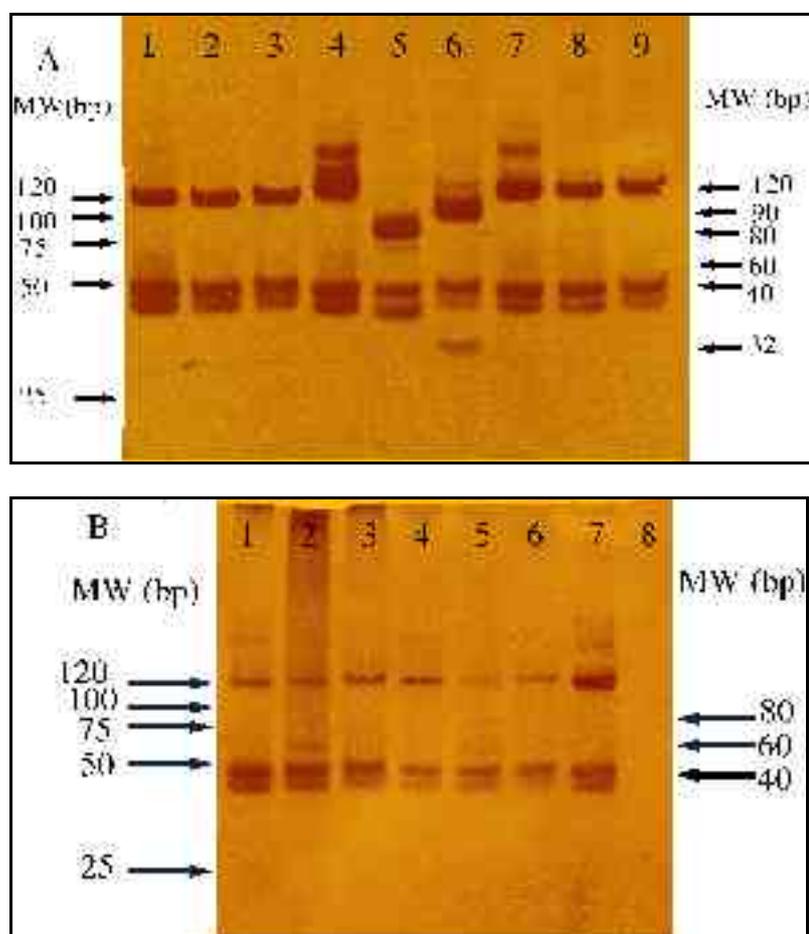


Figura 2. PAGE a 10% representando o perfil RFLP dos amplicons das cepas de referência de *Leishmania sp.* e das amostras de marsupiais. A) Lane 1 – (La) *L. amazonensis*; Lane 2 – (La) + HaeIII; Lane 3 – (La) + ApaLI; Lane 4 – (Lb) *L. braziliensis*; Lane 5 – (Lb) + HaeIII; Lane 6 – (Lb) + ApaLI; Lane 7 – (Li) *L. infantum*; Lane 8 – (Li) + HaeIII; Lane 9 – (Li) + ApaLI. B) Lane 1 – (M1) marsupial 1; Lane 2 – (M1) + HaeIII; Lane 3 – (M1) + ApaLI; Lane 4 – (M2) marsupial 2; Lane 5 – (M2) + HaeIII; Lane 6 – (M2) + ApaLI; Lane 7 – Controle positivo; Lane 8 – Controle negativo. A marcação dos pesos moleculares foi baseada no marcador 25bp DNA ladder da Promega (USA).

DISCUSSÃO

Diversos artigos apontam as possíveis falhas que induzem a manutenção do ciclo de transmissão da leishmaniose em áreas onde as medidas de controle do PCLV foram empregadas (CABRERA *et al.*, 2003; COURTENAY *et al.*, 2002; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; LAINSON e RANGEL, 2005; MOREIRA *et al.*, 2004; PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001, 2004). Uma delas, o possível papel de outros animais como reservatórios, além dos canídeos domésticos e selvagens, tem sido amplamente avaliada e se encontra relatada pela bibliografia mundial recente sobre leishmaniose (ALEXANDER *et al.*, 2002; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; KATAKURA *et al.*, 2003; MOHEBALI *et al.*, 2005; e MORAES-SILVA *et al.*, 2006).

Desta forma, o interesse em avaliar marsupiais está diretamente relacionado com o pequeno número de estudos publicados, desde o fim da década de 60, e a crescente frequência de citações destes espécimes naturalmente infectados em áreas endêmicas para a leishmaniose, nas quais a prevalência foi obtida, principalmente, a partir dos resultados de testes parasitológicos (esfregaço, cultivo e inoculação em animais de laboratório) que possuem baixas sensibilidades quando comparados a testes sorológicos e moleculares (CORREDOR *et al.*, 1989a, 1989b; LAINSON e SHAW, 1969; SHERLOCK, 1996; SHERLOCK *et al.*, 1984, 1988; TRAVI *et al.*, 1998, 2002; WHITE *et al.*, 1989; YOSHIDA *et al.*, 1985).

Assim, o recente interesse científico na avaliação de marsupiais está associado, ainda, a alguns fatores intrínsecos, como, por exemplo, a ampla distribuição destes animais em áreas endêmicas associadas às matas antropizadas das Américas; a detecção do parasito em espécimes, naturalmente ou experimentalmente, infectados; e a capacidade de transmissão do agente etiológico, avaliada em estudos onde o xenodiagnóstico foi utilizado, possibilitando a inclusão dos marsupiais no ciclo de transmissão da leishmaniose (CABRERA *et al.*, 2003; LLANOS-CUENTAS *et al.*, 1999; SHERLOCK, 1996; SHERLOCK *et al.*, 1984, 1988; TRAVI *et al.*, 1998, 2002; YOSHIDA *et al.*, 1985).

A aplicação de testes sorológicos, entre eles a IFI e o teste ELISA indireto, vem sendo indicada desde a década de 80 pelo Ministério da Saúde do Brasil e, portanto, o presente estudo avaliou os soros de marsupiais utilizando-se de um teste ELISA indireto, com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), visando a detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* circulantes nestes animais (BRASIL, 2006; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001). A utilização do antígeno SLA, embora possibilite reações cruzadas, fato amplamente descrito pela literatura científica (DE SOUZA DIAS *et al.*, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2002; SCHALLIG, CANTO-CAVALHEIRO e SILVA, 2002; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR e RAI, 2002), é considerada eficaz devido a sua fácil produção, baixo custo e bons índices de sensibilidade e especificidade, quando aplicadas

em testes imunológicos por outros autores, tanto na detecção de animais sintomáticos quanto, principalmente, na avaliação de animais oligo e assintomáticos em relação aos antígenos recombinantes existentes (MAALEJ *et al.*, 2003; METTLER *et al.*, 2005; ROSÁRIO *et al.*, 2005).

Anticorpos conjugados, comercialmente disponíveis e com alta especificidade para as imunoglobulinas de marsupiais não foram encontrados, indicando a utilização da proteína A-peroxidase (Zymed, Invitrogen, USA), uma proteína extraída da parede celular de *Staphylococcus aureus* (cepa Cowan I) capaz de se ligar, com alta afinidade e especificidade, ao Fc de imunoglobulinas, notadamente às IgGs de mamíferos, ao invés de um conjugado clássico – uma imunoglobulina anti-IgG de marsupial conjugada a peroxidase (DUBOIS-DALCQ, MCFARLAND e MCFARLIN, 1977; INIESTA *et al.*, 2002; JANEWAY *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2005).

A bibliografia acerca da utilização desta proteína em testes imunológicos é vasta e demonstra sua ampla reatividade com as imunoglobulinas de diversas espécies animais (humana, primata, canina, murina, etc) e, assim, muito embora estudos prévios comprovando a eficácia deste conjugado no reconhecimento das imunoglobulinas de marsupiais fosse, pelo menos para os autores deste estudo, ausentes, sua aplicação baseou-se em estudos que a utilizaram para detectar, separar e recuperar as frações de gamaglobulinas de diversos animais (BIANCIFIORI E CARDARAS, 1983; FISA *et al.*, 1997; INIESTA *et al.*, 2002; KELLY *et al.*, 1993; LASRI *et al.*, 2003; MADORE e BAUMGARTEN, 1979; MEBATSION, FROST e KRAUSS, 1989; RIVERA *et al.*, 1994; SHEARER *et al.*, 1999; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2003). Contudo, antes da indicação definitiva de seu uso no diagnóstico imunológico da leishmaniose em marsupiais, a avaliação direta da ligação entre a proteína A-peroxidase e o Fc das imunoglobulinas destes animais, faz-se necessária.

A soroprevalência encontrada no presente estudo (73,9%) foi mais alta do que as citadas por outros autores que, utilizando-se principalmente de técnicas parasitológicas, detectaram índices variando entre 0 e 62,5%, tanto na infecção natural quanto na experimental (CORREDOR *et al.*, 1989a, 1989b; LAINSON e SHAW, 1969; SHERLOCK, 1996; SHERLOCK *et al.*, 1984, 1988; TRAVI *et al.*, 1998, 2002; WHITE *et al.*, 1989; YOSHIDA *et al.*, 1985). Embora os resultados encontrados não permitam excluir a possibilidade de reação cruzada das imunoglobulinas de marsupiais com epítomos filogeneticamente relacionados de outros patógenos (DE SOUZA DIAS *et al.*, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2002; SCHALLIG, CANTO-CAVALHEIRO e SILVA, 2002; SINGH e SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR e RAI, 2002), devido a utilização do antígeno solúvel de leishmania e da ausência inequívoca da comprovação parasitológica, a utilização do teste ELISA indireto, com o antígeno SLA e a proteína A-peroxidase, demonstrou a capacidade de distinguir soros negativos de positivos.

A eficácia do teste sorológico empregado neste estudo pode ser concluída com base nos resultados encontrados e na frequência de concordância dos dados sorológicos com os da mkDNA-PCR, confirmando 11 (64,7%) dos 17 animais soropositivos, muito embora sem significância estatística (Teste Exato de Fisher bi caudal, $p=1,000$, $IC=95\%$), possivelmente, devido ao pequeno número de animais avaliados na amostra estudada. A possibilidade de interações entre o conjugado, proteína A-peroxidase, e as diferentes classes e subclasses de imunoglobulinas dos marsupiais, assim como a baixa diluição do soro (1:20) utilizada, poderiam permitir a reatividade inespecífica dos mesmos nos testes imunológicos e, desta forma, a ocorrência de falsos-positivos. Embora não seja possível excluir totalmente esta possibilidade, a confirmação das amostras soropositivas pela mkDNA-PCR e a detecção de dois (8,7%) animais negativos em ambos os testes parece fundamentar o resultado sorológico.

A detecção de 15 (65,2%) dos 23 marsupiais apresentando a banda de 120bp, diagnóstica da presença do mkDNA de *Leishmania sp.* nas amostras, confirmou a presença do agente etiológico da leishmaniose nestes animais. Muito embora a presença do mkDNA possa estar relacionada com debris celulares do parasito na amostra estudada, questão levantada por alguns autores (DA SILVA *et al.*, 2004; DISCH *et al.*, 2004; FRANCINO *et al.*, 2006; XAVIER *et al.*, 2006), outros demonstraram que animais infectados apresentam o parasito na pele e a capacidade de transmissão, mesmo quando são assintomáticos (LEMESRE *et al.*, 2005; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; TRAVI *et al.*, 1998).

A utilização da RFLP nos produtos da mkDNA-PCR, de acordo com outros autores (DE ANDRADE *et al.*, 2006; VOLPINI *et al.*, 2004, 2006), possibilitou a identificação do parasito, *Leishmania infantum*, como única espécie de *Leishmania* presente nas amostras estudadas da população de marsupiais da região de Barra do Pojuca.

Os dados relatados indicam a possibilidade do surgimento de surtos epidêmicos nesta área endêmica, tanto à curto quanto à longo prazo, caso os fatores ambientais associados à proliferação do inseto vetor sejam propícios e estes insetos se alimentem dos marsupiais infectados, possibilitando a disseminação do agente etiológico, *L. infantum*, para a população humana e canina da região, mantendo o ciclo de transmissão ativo.

CONCLUSÃO

O teste ELISA indireto empregado neste estudo demonstrou a capacidade de avaliar a resposta imune humoral anti-*Leishmania sp.* em amostras de soro de marsupiais (*Didelphis albiventris* LUND, 1840) de áreas endêmicas para a Leishmaniose Visceral (LV), com base nas densidades óticas encontradas para os soros controle utilizados e para as amostras testadas, muito embora estudos acerca do reconhecimento das imunoglobulinas de marsupiais pela

proteína A se façam necessários para subsidiar a indicação deste teste.

A alta soroprevalência (73,9%) encontrada para os marsupiais naturalmente infectados, capturados na área endêmica de Barra do Pojuca (Camaçari, Bahia), foi próxima da taxa de 62,5% encontrada por White e colaboradores (1989) em animais experimentalmente infectados, podendo indicar que os marsupiais desta região estão, ou estiveram, em amplo contato com o agente etiológico da Leishmaniose Visceral (LV), apresentando resposta humoral detectável por testes sorológicos.

A avaliação molecular, aplicando-se a mkDNA-PCR para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral (LV) em marsupiais, demonstrou a capacidade de detectar o DNA de minicírculo de *Leishmania infantum* em amostras sanguíneas destes animais.

A utilização das enzimas de restrição HaeIII e ApaLI, capazes de clivar a seqüência conservada do DNA de minicírculo amplificada pela mkDNA-PCR, criando perfis eletroforéticos para as diferentes cepas de *Leishmania sp.*, permitiram identificar o agente etiológico, na área endêmica de Barra do Pojuca, como *Leishmania infantum* (*syn. Leishmania chagasi*).

A prevalência de 65,2% encontrada pela mkDNA-PCR foi próxima dos 73,9% encontrados pela sorologia neste estudo e dos 62,5% encontrados por White e colaboradores (1989) em animais experimentalmente infectados, corroborando para a confirmação dos resultados sorológicos e a integração dos marsupiais, tanto no ciclo de transmissão da leishmaniose, quanto nas medidas de controle propostas pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) do Ministério da saúde do Brasil (MS).

A baixa eficácia das medidas de controle, indicadas pelo Ministério da saúde e empregadas pelos órgãos de vigilância epidemiológica regionais, com base nos dados aqui apresentados, parece estar relacionada, pelo menos parcialmente, com a participação dos marsupiais, como reservatórios, na manutenção do ciclo de transmissão do agente etiológico da leishmaniose em áreas endêmicas como Barra do Pojuca (Camaçari, Bahia).

Por último, indicamos a inclusão da avaliação sorológica dos marsupiais em áreas endêmicas para a Leishmaniose Visceral (LV) e a utilização da mkDNA-PCR para avaliar casos ambíguos e animais soronegativos, o que poderá somar para o aumento da eficácia das medidas de controle do PCLV.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Fundação Alexander von Humboldt pelo apoio de número III-ERSX-BRA/1067633 cedido ao Prof. Dr. Carlos Roberto Franke; ao apoio financeiro número 478702/2003-5 do CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico; a FAPESB – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia pela bolsa de DTR-3 número 19.571.216.3383 cedida ao autor, Adriano Costa de Alcântara; ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Camaçari, Bahia, Brasil; Ao Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera (IOC/FIOCRUZ) pela doação dos soros controle positivo e negativo de marsupiais. As mestrandas Carol Urpia e Fabiana Moura Costa pelo apoio com os géis de poliacrilamida e a coloração pela prata; e a todos os estudantes envolvidos nesta pesquisa na Universidade Federal da Bahia. Entre eles e, especialmente, a Bárbara Maria Paraná da Silva Souza; Danielle Custódio Leal; Antônio Eduardo Araújo Barbosa; Débora Cristina Portela Medina Barbosa; e Lídia Silva de Oliveira sem os quais este trabalho não poderia ter sido feito.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, B; DE CARVALHO, R.L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M.H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg Infect Dis.** v. 8, n. 12, p. 1480-5, Dez. 2002.

ARIAS, J.R., NAIF, R.D., MILES, M.A., DE SOUZA, A.A. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 75, n. 4, p. 537-41, 1981.

ASHFORD, D.A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M.C.; SAMPAIO, D.P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** v. 59, n. 1, p. 53-7, Jul. 1998.

BIANCIFIORI, F. e CARDARAS, P. Enzyme-linked immunoassay in the diagnosis of leptospirosis in domestic animals using peroxidase-conjugated protein-A. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** v. 6, n. 1, p. 57-65, 1983.

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. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 97, n. 3, p. 291-6, Mai-Jun. 2003.

BRASIL. 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.

CABRERA, M.A., PAULA, A.A., CAMACHO, L.A., MARZOCHI, M.C., XAVIER, S.C., DA SILVA, A.V., JANSEN, A.M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 45, n. 2, p. 79-83, Mar-Abr. 2003.

CORREDOR, A., GALLEGO, J.F., TESH, R.B., PELAEZ, D., DIAZ, A., MONTILLA, M., PALAU, M.T. Didelphis marsupialis, an apparent wild reservoir of Leishmania donovani chagasi in Colombia, South America. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 83, n. 2, p. 195, Mar-Abr. 1989a.

CORREDOR, A., GALLEGO, J.F., TESH, R.B., MORALES, A., DE CARRASQUILLA, C.F., YOUNG, D.G., KREUTZER, R.D., BOSHELL, J., PALAU, M.T., CACERES, E., PELAEZ, D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. **Am J Trop Med Hyg**. v. 40, n. 5, p. 480-6, Maio 1989b.

COURTENAY, O., QUINNELL, R.J., GARCEZ, L.M., SHAW, J.J., DYE, C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis*. v. 186, n. 9, p. 1314-20, Nov. 2002.

DA SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.; PACHECO, R. da S.; BRAZIL, R.P. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genet Mol Res*. v. 3, n. 2, p. 251-7, Jun. 2004.

DANTAS-TORRES F. e BRANDÃO-FILHO S.P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 48, n. 3, p. 151-6, May-Jun. 2006.

DE SOUZA DIAS, S.; DA COSTA PINHEIRO, P.H.; KATZ, S.; DOS SANTOS, M.R.; BARBIERI, C.L. A recombinant cysteine proteinase from Leishmania (Leishmania) chagasi suitable for serodiagnosis of American visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**. v. 72, n. 2, p. 126-32, Fev. 2005.

DEGRAVE W, FERNANDES O, CAMPBELL D, BOZZA M, LOPES U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of Leishmania--a mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 89, n. 3, p. 463-9, Jul-Set. 1994.

DIETZE R, BARROS GB, TEIXEIRA L, HARRIS J, MICHELSON K, FALQUETO A, COREY R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin Infect Dis**. v. 25, n. 5, p. 1240-2, Nov. 1997.

DOS SANTOS, S.O., ARIAS, J., RIBEIRO, A.A., DE PAIVA HOFFMANN, M., DE FREITAS, R.A., MALACCO, M.A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol.** v. 12, n. 3, p. 315-7, Jul. 1998.

DUBOIS-DALCQ, M., MCFARLAND, H., MCFARLIN, D. Protein A-peroxidase: a valuable tool for the localization of antigens. **J Histochem Cytochem.** v. 25, n. 11, p. 1201-6, Nov. 1977.

FISA, R., GALLEGU, M., RIERA, C., AISA, M.J., VALLS, D., SERRA, T., DE COLMENARES, M., CASTILLEJO, S., PORTUS, M. Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. **J Vet Diagn Invest.** v.9, n. 1, p. 50-5, Jan. 1997.

FRANCINO, O., ALTET, L., SANCHEZ-ROBERT, E., RODRIGUEZ, A., SOLANO-GALLEGU, L., ALBEROLA, J., FERRER, L., SANCHEZ, A., ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol.** v. 137, n. 3-4, p. 214-21, Abr. 2006.

FRANKE, C.R., STAUBACH, C., ZILLER, M., SCHLUTER, H. Trends in the temporal and spatial distribution of visceral and cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, from 1985 to 1999. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 96, n. 3, p. 236-41, Mai-Jun. 2002.

FREY, A.; DI CANZIO, J. e ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **J Immunol Methods.** v. 221, n. 1-2, p. 35-41, Dez. 1998.

GONÇALVES, C.C.; REICHE, E.M.; DE ABREU FILHO, B.A.; SILVEIRA, T.G.; FELIZARDO, T.C.; MAIA, K.R.; COSTACURTA, R.; PADOVESI, E.J.; DIAS FILHO, B.P.; JANKEVICIUS, S.I.; JANKEVICIUS, J.V. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a Western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** v. 66, n. 1, p. 91-102, Jan. 2002.

INIESTA, L.; FERNANDEZ-BARREDO, S.; BULLE, B.; GOMEZ, M.T.; PIARROUX, R.; GALLEGU, M.; ALUNDA, J.M.; PORTUS, M. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. **Clin Diagn Lab Immunol.** v. 9, n. 5, p. 1137-41, Set. 2002.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SCHLOMCHIK, M. Immunobiology: the immune system in health and disease. 5ª. ed. New York: **Garland Publishing**, 2001. 600 p. il.

KATAKURA, K.; MIMORI, T.; FURUYA, M.; UEZATO, H.; NONAKA, S.; OKAMOTO, M.; GOMEZ, L.E.A.; HASHIGUCHI, Y. Identification of endotrypanum species from a sloth, a squirrel and *Lutzomyia* sandflies in Ecuador by PCR amplification and sequencing of the mini-exon gene. **J Vet Med Sci.** v. 65, n. 5, p. 649-53, Maio 2003.

KELLY, P.J., TAGWIRA, M., MATTHEWMAN, L., MASON, P.R., WRIGHT, E.P. Reactions of sera from laboratory, domestic and wild animals in Africa with protein A and a recombinant chimeric protein AG. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** v. 16, n. 4, p. 299-305, Out. 1993.

KRONVALL, G., SEAL, U.S., SVENSSON, S., WILLIAMS, R.C. JR. Phylogenetic aspects of staphylococcal protein A-reactive serum globulins in birds and mammals. **Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol.** v. 82, n. 1, p. 12-8, Fev. 1974.

LAINSON, R., SHAW, J.J., READY, P.D., MILES, M.A., PÓVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 75, n. 4, p. 530-6. 1981.

LAINSON, R. e RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 100, n. 8, p. 811-27, Dez. 2005.

LAINSON, R. e SHAW, J.J. Leishmaniasis in Brazil. 3. Cutaneous leishmaniasis in an opossum, *Marmosa murina* (Marsupialia, Didelphidae) from the lower Amazon region. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 63, n. 6, p. 738-40, 1969.

LASRI, S., SAHIBI, H., NATAMI, A., RHALEM, A. Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 91, n. 1, p. 13-8, 10 de Janeiro de 2003.

LLANOS-CUENTAS, E.A., RONCAL, N., VILLASECA, P., PAZ, L., OGUSUKU, E., PEREZ, J.E., CACERES, A. e DAVIES, C.R. Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 93, n. 1, p. 15-20, Jan-Fev., 1999.

LEMESRE, J.L., HOLZMULLER, P., CAVALEYRA, M., GONCALVES, R.B., HOTTIN, G., PAPIEROK, G. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. **Vaccine.** v. 23, n. 22, p. 2825-40, Abr. 2005.

MAALEJ, I.A., CHENIK, M., LOUZIR, H., BEN SALAH, A., BAHLOUL, C., AMRI, F., DELLAGI, K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** v.68, n. 3, p. 312-20, Mar. 2003.

MADORE, H.P. E BAUMGARTEN, A. Enzyme-linked protein A: an enzyme-linked immunosorbent assay reagent for detection of human immunoglobulin G and virus-specific

antibody. **J Clin Microbiol.** v. 10, n. 4, p. 529-32, Out. 1979.

MARQUES, M.J.; VOLPINI, A.C.; MACHADO-COELHO, G.L.; MACHADO-PINTO, J.; DA COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; ROMANHA, A.J. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 54, n. 1, p. 37-43, Jan. 2006.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today.** v. 16, n. 5, p. 188-9, Maio 2000.

MEBATION, T., FROST, J.W., KRAUSS, H. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using staphylococcal protein A for the measurement of rabies antibody in various species. **Zentralbl Veterinarmed B.** v. 36, n. 7, p. 532-6, Set. 1989.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **J Clin Microbiol.** v. 43, n. 11, p. 5515-9, Nov. 2005.

MOHEBALI, M.; HAJJARAN, H.; HAMZAVI, Y.; MOBEDI, I.; ARSHI, S.; ZAREI, Z.; AKHOUNDI, B.; NAEINI, K.M.; AVIZEH, R.; FAKHAR, M. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. **Vet Parasitol.** v. 129, n. 3-4, p. 243-51, Maio 2005.

MORAES-SILVA, E.; ANTUNES, F.R.; RODRIGUES, M.S.; DA SILVA JULIAO, F.; DIAS-LIMA, A.G.; LEMOS-DE-SOUSA, V.; DE ALCANTARA, A.C.; REIS, E.A.; NAKATANI, M.; BADARÓ, R.; REIS, M.G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; FRANKE, C.R. Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. infantum* infection. **Acta Trop.** v. 98, n. 2, p. 176-82, Maio 2006.

MOREIRA, E.D. JR.; MENDES DE SOUZA, V.M.; SREENIVASAN, M.; NASCIMENTO, E.G.; PONTES DE CARVALHO, L. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Vet Parasitol.** v. 122, n. 4, p. 254-52, Ago. 2004.

OMS (Organização Mundial de Saúde). Health topics: **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>> Acesso em: 06 de setembro de 2006.

PALATNIK-DE-SOUSA CB, DOS SANTOS WR, FRANCA-SILVA JC, DA COSTA RT, REIS AB, PALATNIK M, MAYRINK W, GENARO O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** v.

65, n. 5, p. 510-7, Nov. 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., BATISTA-DE-MELO, L.M., BORJA-CABRERA, G.P., PALATNIK, M., LAVOR, C.C. Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. **An Acad Bras Cienc.** v. 76, n. 3, p. 583-93, Set. 2004.

PARANHOS-SILVA M, FREITAS LA, SANTOS WC, GRIMALDI G JUNIOR, PONTES-DE-CARVALHO LC, OLIVEIRA-DOS-SANTOS AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg.** V. 55, n. 1, pp. 39-44, Jul 1996.

RIVERA, E., JACKERT-JERNBERGER, M., MEJERLAND, T., KARLSSON, K.A. Evaluation of protein A and protein G as indicator system in an ELISA for detecting antibodies in mink to *Pseudomonas aeruginosa*. **Vet Microbiol.** v. 42, n. 4, p. 265-71, Dez. 1994.

RODGERS, M.R., POPPER, S.J., WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp Parasitol.** v. 71, n. 3, p. 267-75, Out. 1990.

ROGERS, W.O. e WIRTH, D.F. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 84, n. 2, p. 565-9, Jan. 1987.

ROSÁRIO, E.Y., GENARO, O., FRANCA-SILVA, J.C., DA COSTA, R.T., MAYRINK, W., REIS, A.B., CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 100, n. 2, p. 197-203, Abr. 2005.

SAMBROOK, J.; MACCALLUM, P; RUSSEL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3^a. ed. Cold Spring Harbor, NY, USA: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001. 2.344 p. il.

SCHALLIG, H.D.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; e DA SILVA, E.S. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 97, n. 7, p. 1015-8, Oct. 2002.

SHEARER, M.H., DARK, R.D., CHODOSH, J., KENNEDY, R.C. Comparison and characterization of immunoglobulin G subclasses among primate species. **Clin Diagn Lab Immunol.** v. 6, n. 6, p. 953-8, Nov. 1999.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 91, n. 6, p. 671-83, Nov-Dez. 1996.

SHERLOCK, I.A., MIRANDA, J.C., SADIGURSKY, M., GRIMALDI JUNIOR, G. Natural

infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 79, n. 4, p. 511, Out-Dez. 1984.

SHERLOCK, I.A., MIRANDA, J.C., SADIGURSKY, M., GRIMALDI JUNIOR, G. Experimental infection of the opossum *Didelphis Albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 83, n. 1, p. 141, Jan-Mar. 1988.

SILVA, D.A., VITALIANO, S.N., MINEO, T.W., FERREIRA, R.A., BEVILACQUA, E., MINEO JR. Evaluation of homologous, heterologous, and affinity conjugates for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **J Parasitol.** v. 91, n. 5, p. 1212-6, Out. 2005.

SINGH, S. e SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **J Postgrad Med.** v. 49, n. 1, p. 55-60, Jan-Mar. 2003.

SOARES, R.P. e TURCO, S.J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **An Acad Bras Cienc.** v. 75, n. 3, p. 301-30, Set 2003.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol.** v.39, n. 2, p. 560-3, Fev. 2001.

SOLANO-GALLEGO, L., RODRIGUEZ, A., INIESTA, L., ARBOIX, M., PORTUS, M., ALBEROLA, J. Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol.** v. 10, n. 5, p. 849-55, Set. 2003.

SUNDAR, S. e RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol.** v.9, n. 5, p. 951-8, Set. 2002.

TRAVI, B.L., OSORIO, Y., GUARIN, N., CADENA, H. *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. **Exp Parasitol.** v. 88, n. 1, p. 73-5, Jan. 1998.

VOLPINI, A.C.; PASSOS, V.M.; OLIVEIRA, G.C.; ROMANHA, A.J. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L.* (*Leishmania*) *amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.** v. 90, n. 1, p. 31-7, Mar. 2004.

VOLPINI, A.C., MARQUES, M.J., LOPES DOS SANTOS, S., MACHADO-COELHO, G.L., MAYRINK, W., ROMANHA, A.J. *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. **Clin Microbiol Infect.** v. 12, n. 8, p. 815-8, Ago. 2006.

WHITE, M.R., CHAPMAN, W.L. JR., HANSON, W.L., LATIMER, K.S., GREENE, C.E. Experimental visceral leishmaniasis in the opossum. **Vet Pathol.** v. 26, n. 4, p. 314-21, Jul. 1989.

XAVIER, S.C., DE ANDRADE, H.M., MONTE, S.J., CHIARELLI, I.M., LIMA, W.G., MICHALICK, M.S., TAFURI, W.L., TAFURI, W.L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Vet Res.** v. 2, p. 1-7, Jun. 2006.

YOSHIDA, E.L., CORREA, F.M., PACHECO, R.S., MOMEN, H., GRIMALDI, JUNIOR G. Leishmania mexicana in Didelphis marsupialis aurita in Sao Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v. 27, n. 4, p. 172, Jul-Ago. 1985.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As medidas indicadas pelo PCL – Programa de Controle da Leishmaniose, visceral e tegumentar, vêm sendo aplicadas no Brasil, há cerca de 50 anos, com reduzida eficácia. A presença da infecção por parasitos do gênero *Leishmania* em 88 países do mundo, a expansão da doença em diversas áreas, anteriormente livres, do mundo e a ausência de um tratamento 100% efetivo para esta enfermidade, tem aumentado o interesse no desenvolvimento de uma vacina profilática eficaz para as diferentes formas da leishmaniose, como mecanismo de controle da doença, infelizmente, sem o apoio e o interesse das grandes empresas farmacêuticas.

Diversas formulações têm sido testadas e, até o presente momento, nenhuma vacina humana se encontra disponível. A vacina canina brasileira, Leishmune®, vem sendo comercializada nos últimos anos e, embora tenha a permissão do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, seu uso ainda é considerado controverso na medicina veterinária. De fato, animais vacinados soroconvertem e apresentam altos títulos, quando avaliados pelos métodos diagnósticos (IFI e ELISA indireto) recomendados pelo PCL e, portanto, permitem o questionamento das medidas de controle empregadas pelos órgãos de saúde, mais precisamente, a aplicação da medida de eliminação dos animais soropositivos, pelos proprietários, médicos veterinários e a sociedade em geral.

Um outro fator amplamente discutido na bibliografia mundial é a inexistência de um teste diagnóstico laboratorial padrão-ouro (“gold standard”) que possa ser utilizado como uma ferramenta precisa nas ações de vigilância em áreas endêmicas e silenciosas, impedindo a expansão e permitindo a detecção eficaz desta endemia e a previsão de surtos e epidemias. A diversidade de testes diagnósticos disponíveis (parasitológicos, sorológicos e moleculares) e suas performances abaixo do ótimo (níveis de sensibilidade e especificidade) dificultam a determinação e indicação de um teste único para a avaliação da infecção. A simplicidade de utilização, os bons índices e a recomendação dos testes sorológicos, IFI e ELISA indireto pelo

Ministério da Saúde, tornou-lhes os testes de escolha para a vigilância epidemiológica. Contudo, a grande quantidade de resultados falsos-positivos e falsos-negativos, devido à reação cruzada ou a uma resposta imune humoral incompleta ou ausente, descritos na literatura mundial, indicam que estes testes precisam ser complementados ou substituídos por um teste que apresente índices superiores.

Os testes moleculares geralmente alcançam níveis semelhantes ou superiores aos testes sorológicos e apresentam menor número de falsos-negativos quando comparado aos parasitológicos. A aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificando seqüências de DNA de genes multi-cópia, permite avaliar quantidades diminutas das amostras, as quais seriam negativas por outras técnicas diagnósticas, possibilitando a detecção do DNA do parasito e a confirmação diagnóstica, com sensibilidade e especificidade superiores. Neste estudo, a utilização da mkDNA-PCR permite indicar sua utilização para o aprimoramento do diagnóstico da infecção e, portanto, das medidas de controle do PCL, complementando ou substituindo a IFI e o ELISA indireto.

As detecções de infecções humanas e de altas prevalências caninas em diversas áreas endêmicas onde as ações do PCL, principalmente a eliminação de cães soropositivos, foram implantadas, associadas aos dados da bibliografia demonstrando a infecção natural e experimental de diversos animais, entre eles, ratos e marsupiais, fundamentam a participação destes e a indicação da avaliação de outros animais como reservatórios da leishmaniose. As altas prevalências aqui apresentadas, tanto com o ELISA indireto quanto com a mkDNA-PCR, corroboram estudos prévios e permitem propor a inclusão destes animais nos inquéritos epidemiológicos de áreas endêmicas e silenciosas. Esta medida deverá ser capaz de elevar a eficácia do controle exercido pelos órgãos de saúde e, possivelmente, atuar como um mecanismo de redução da infecção, seguida da eliminação, de um grande número de cães de área endêmica que se encontram sob risco de infecção, devido à presença de outros reservatórios nas áreas endêmicas, como os marsupiais.

Deste modo, indicamos a utilização do teste ELISA indireto na vigilância epidemiológica como método de triagem rápida e de menor custo, tanto em cães quanto em marsupiais, a avaliação de outros reservatórios sinantrópicos e a aplicação do teste mkDNA-PCR, seguido ou não da RFLP, em 1) amostras com resultados sorológicos duvidosos; 2) em pacientes humanos e em animais oligossintomáticos soronegativos; e 3) em uma parcela das amostras negativas, visando detectar humanos e animais que sejam resistentes à infecção ou estejam atuando como reservatórios silenciosos do parasito.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, B., LOZANO, C., BARKER, D.C., MCCANN, S.H., ADLER, G.H. Detection of Leishmania (Viannia) braziliensis complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. **Acta Trop.** v. 69, n. 1, p. 41-50, Mar. 1998.

ALEXANDER, B., DE CARVALHO, R.L., MCCALLUM, H., PEREIRA, M.H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg Infect Dis.** v. 8, n. 12, p. 1480-5, Dez. 2002.

ALMEIDA, M.A., JESUS, E.E., SOUSA-ATTA, M.L., ALVES, L.C., BERNE, M.E., ATTA, A.M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet Parasitol.** v. 127, n. 3-4, p. 227-32, Fev. 2005a.

ALMEIDA, M.A., JESUS, E.E., SOUSA-ATTA, M.L., ALVES, L.C., BERNE, M.E., ATTA, A.M. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 106, n. 1-2, p. 151-8, Jun. 2005b.

ALVES, W.A., BEVILACQUA, P.D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993 – 1997. **Cad. Saúde Pública.** Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, jan-fev. 2004.

AMARAL, V.F., RANSATTO, V.A., CONCEICAO-SILVA, F., MOLINARO, E., FERREIRA, V., COUTINHO, S.G., MCMAHON-PRATT, D., GRIMALDI, G. JR. *Leishmania amazonensis*: the Asian rhesus macaques (*Macaca mulatta*) as an experimental model for study of cutaneous leishmaniasis. **Exp Parasitol.** v. 82, n. 1, p. 34-44, Jan. 1996.

AMARAL, V., PIRMEZ, C., GONCALVES, A., FERREIRA, V., GRIMALDI, G. JR. Cell populations in lesions of cutaneous leishmaniasis of *Leishmania (L.) amazonensis*-infected rhesus macaques, *Macaca mulatta*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 95, n. 2, p. 209-16, Mar-Abr. 2000.

AMERSHAM BIOSCIENCES INC. **Protein Electrophoresis**: technical manual. USA, 2006. Disponível em: <<http://www.chromatography.amershambiosciences.com/apatrix/upp00919.nsf/content/441122C35FCD058AC1256EB40044A89C?OpenDocument>> Acesso em: 29 de setembro de 2006.

ARIAS, J.R., NAIFF, R.D. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 76, n. 3, p. 279-86, Jul-Set. 1981.

ARIAS, J.R., NAIF, R.D., MILES, M.A., DE SOUZA, A.A. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 75, n. 4, p. 537-41, 1981.

ARIAS, J.R., MONTEIRO, P.S., ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg Infect Dis**. v.2, n. 2, p. 145-146, Apr-Jun. 1996.

ASHFORD, D.A., DAVID, J.R., FREIRE, M., DAVID, R., SHERLOCK, I., EULALIO, M.C., SAMPAIO, D.P., BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**. v. 59, n. 1, p. 53-7, Jul. 1998.

ATTA, A.M., COLOSSI, R., SOUSA-ATTA, M.L., JERONIMO, S.M., NASCIMENTO, M.D., BEZERRA, G.F., ORGE, G., CARVALHO, E.M. Antileishmanial IgG and IgE

antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 99, n. 5, p. 525-30, Ago. 2004.

AZAZY, A.A., DEVANEY, E., CHANCE, M.L. A PEG-ELISA for the detection of *Leishmania donovani* antigen in circulating immune complexes. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 88, n. 1, p. 62-6, Jan-Fev. 1994.

AZAZY, A.A., NASHER, S.T., ISHAQ, A., BIN-MUHANNA, M., CHANCE, M.L. Detection of antileishmanial IgG antibodies and *Leishmania*-specific antigens in sera from Yemeni patients with visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol.** v. 97, n. 7, p. 689-95, Out. 2003.

AZAZY, A.A. Detection of circulating antigens in sera from visceral leishmaniasis patients using dot-ELISA. **J Egypt Soc Parasitol.** v. 34, n. 1, p. 35-43, Abr. 2004.

BAÑULS, A.L., BRISSE, S., SIDIBE, I., NOEL, S., TIBAYRENC, M. A phylogenetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting of the *Leishmania* genome project Friedlin reference strain. **Folia Parasitol (Praha).** v. 46, n. 1, p. 10-4, 1999.

BARROUIN-MELO, S.M., LARANGEIRA, D.F., TRIGO, J., AGUIAR, P.H., DOS-SANTOS, W.L., PONTES-DE-CARVALHO, L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 99, n. 2, p. 195-7, Mar. 2004.

BARROUIN-MELO, S.M., LARANGEIRA, D.F., DE ANDRADE FILHO, F.A., TRIGO, J., JULIAO, F.S., FRANKE, C.R., PALIS AGUIAR, P.H., CONRADO DOS-SANTOS, W.L., PONTES-DE-CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic

animals. **Vet J.** v. 171, n. 2, p. 331-9, Mar. 2006a.

BARROUIN-MELO, S.M., LARANGEIRA, D.F., SANTOS, S.O., CHAGAS-JUNIOR, A.D., PAIXAO, M., AGUIAR, P.H., DOS-SANTOS, W.L., PONTES-DE-CARVALHO, L. A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 111, n. 3-4, p. 251-61, Jun. 2006b.

BENSAID, M., GUERBOUJ, S., SAGHROUNI, F., FATHALLAH-MILI, A., GUIZANI, I. Occurrence of *Leishmania infantum* cutaneous leishmaniasis in central Tunisia. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 100, n. 6, p. 521-6, Jun. 2006.

BENSOUSSAN, E., NASEREDDIN, A., JONAS, F., SCHNUR, L.F., JAFFE, C.L. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **J Clin Microbiol.** v. 44, n. 4, p. 1435-9, Abr. 2006.

BERG, J.M., TYMOCZKO, J.L., STRYER, L. Biochemistry. 6th edition. International Edition. **W.H. Freeman Company**, New York, 2006. 1120 p. il.

BIANCIFIORI, F. e CARDARAS, P. Enzyme-linked immunoassay in the diagnosis of leptospirosis in domestic animals using peroxidase-conjugated protein-A. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** v. 6, n. 1, p. 57-65, 1983.

BOELAERT, M., RIJAL, S., REGMI, S., SINGH, R., KARKI, B., JACQUET, D., CHAPPUIS, F., CAMPINO, L., DESJEUX, P., LE RAY, D., KOIRALA, S., VAN DER STUYFT, P. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** v. 70, n. 1, p. 72-7, Jan. 2004.

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. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 97, n. 3, p. 291-6, Mai-Jun. 2003.

BRASIL. 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, 2006a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. Informações de Saúde. Indicadores de morbidade e fatores de risco: **D.2.5 Taxa de incidência da leishmaniose visceral**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2005/d0205.def>> Acesso em: 22 de agosto de 2006b.

BRAZ, R.F., NASCIMENTO, E.T., MARTINS, D.R., WILSON, M.E., PEARSON, R.D., REED, S.G., JERONIMO, S.M. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **Am J Trop Med Hyg.** v. 67, n. 4, p. 344-8, Out. 2002.

BRAZIL, R.P., DESTERRO, M.D., NASCIMENTO, S.B., MACAU, R.P. Natural infection of a pig (*Sus scrofa*) by *Leishmania* in a recent focus of cutaneous leishmaniasis on the Island of Sao Luis, Maranhao. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 82, n. 1, p. 145, Jan-Mar. 1987.

CABRERA, G.P., DA SILVA, V.O., DA COSTA, R.T., REIS, A.B., MAYRINK, W., GENARO, O., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** v. 61, n. 2, p. 296-301, Ago. 1999.

CABRERA, M.A., PAULA, A.A., CAMACHO, L.A., MARZOCHI, M.C., XAVIER, S.C., DA SILVA, A.V., JANSEN, A.M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 45, n. 2, p. 79-83, Mar-Abr. 2003.

CERQUEIRA, E.J., SHERLOCK, I., GUSMAO, A., BARBOSA JUNIOR, A. DE A., NAKATANI, M. Experimental infection of *Equus asinus* with *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 36, n. 6, p. 695-701, Nov-Dez. 2003.

CHANG, K.P., MCGWIRE, B.S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Kinetoplastid Biol Dis**. v. 1, n. 1, p. 1-7, Maio 2002.

CHIARAMONTE, M.G., FRANK, F.M., FURER, G.M., TARANTO, N.J., MARGNI, R.A., MALCHIODI, E.L. Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. **Acta Trop**. v. 72, n. 3, p. 295-308, Abr. 1999.

CHICHARRO, C., MORALES, M.A., SERRA, T., ARES, M., SALAS, A., ALVAR, J. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 96, p. 93-9, Abr. 2002. Suplemento 1.

CORREA, J.R., BRAZIL, R.P., SOARES, M.J. *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus--a mini review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 100, n. 6, p. 587-92, Out. 2005.

CORREDOR, A., GALLEGU, J.F., TESH, R.B., PELAEZ, D., DIAZ, A., MONTILLA, M., PALAU, M.T. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 83, n. 2, p. 195, Mar-

Abr. 1989a.

CORREDOR, A., GALLEGO, J.F., TESH, R.B., MORALES, A., DE CARRASQUILLA, C.F., YOUNG, D.G., KREUTZER, R.D., BOSHELL, J., PALAU, M.T., CACERES, E., PELAEZ, D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. **Am J Trop Med Hyg.** v. 40, n. 5, p. 480-6, Maio 1989b.

CORTADA, V.M., DOVAL, M.E., SOUZA LIMA, M.A., OSHIRO, E.T., MENESES, C.R., ABREU-SILVA, A.L., CUPOLILO, E., SOUZA, C.S., CARDOSO, F.O., ZAVERUCHA DO VALLE, T., BRAZIL, R.P., CALABRESE, K.S., GONCALVES DA COSTA, S.C. Canine visceral leishmaniosis in Anastacio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Vet Res Commun.** v. 28, n. 5, p. 365-74, Jul. 2004.

CORTES, S., ROLÃO, N., RAMADA, J., CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 98, n. 1, p. 12-7, Jan. 2004.

COURTENAY, O., QUINNELL, R.J., GARCEZ, L.M., SHAW, J.J., DYE, C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J Infect Dis.** v. 186, n. 9, p. 1314-20, Nov. 2002a.

COURTENAY, O., QUINNELL, R.J., GARCEZ, L.M., DYE, C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. **Parasitology.** v. 125, n. 5, p. 407-14, Nov. 2002b.

COUTINHO, M.T., BUENO, L.L., STERZIK, A., FUJIWARA, R.T., BOTELHO, J.R., DE MARIA, M., GENARO, O., LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol.** v. 128, n. 1-2, p. 149-55, Mar. 2005.

CROWTHER, J.R. **The ELISA Guidebook: Theory and practice.** 2ª Edição. New Jersey: Humana Press, Jan 2001. 426p. (Série Methods in Molecular Biology , v. 149).

CUERVO, P., CUPOLILLO, E., NEHME, N., HERNANDEZ, V., SARAVIA, N., FERNANDES, O. Leishmania (Viannia): genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. **Exp Parasitol.** v. 108, n. 1-2, p. 59-66, Set-Out. 2004.

DA SILVA, E.S., GONTIJO, C.M., PACHECO, R. da S., BRAZIL, R.P. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. **Genet Mol Res.** v. 3, n. 2, p. 251-7, Jun. 2004.

DA SILVA, E.S., VAN DER MEIDE, W.F., SCHOONE, G.J., GONTIJO, C.M., SCHALLIG, H.D., BRAZIL, R.P. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. **Vet Res Commun.** v. 30, n. 6, p. 637-43, Ago. 2006.

DANTAS-TORRES, F. e BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v. 48, n. 3, p. 151-6, May-Jun. 2006.

DE ANDRADE, A.S., GOMES, R.F., FERNANDES, O., DE MELO, M.N. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. **Acta Trop.** v. 78, n. 3, p. 261-7, Mar. 2001.

DE ANDRADE, H.M., REIS, A.B., DOS SANTOS, S.L., VOLPINI, A.C., MARQUES, M.J., ROMANHA, A.J. Use of PCR-RFLP to identify Leishmania species in naturally-infected dogs. **Vet Parasitol.** v. 140, n. 3-4, p. 231-8, Set. 2006.

DE OLIVEIRA, S.S., DE ARAUJO, T.M. Evaluation of control measures for visceral leishmaniasis (kala azar) in an endemic area in Bahia, Brazil (1995-2000). **Cad Saude Publica**. v. 19, n. 6, p. 1681-90, Nov-Dez. 2003.

DE SOUZA, A.I., BARROS, E.M., ISHIKAWA, E., ILHA, I.M., MARIN, G.R., NUNES, V.L. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Vet Parasitol**. v. 128, n. 1-2, p. 41-5, Mar. 2005.

DE SOUZA DIAS, S., DA COSTA PINHEIRO, P.H., KATZ, S., DOS SANTOS, M.R., BARBIERI, C.L. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* suitable for serodiagnosis of American visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**. v. 72, n. 2, p. 126-32, Fev. 2005.

DEGRAVE, W., FERNANDES, O., CAMPBELL, D., BOZZA, M., LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 89, n. 3, p. 463-9, Jul-Set. 1994.

DIETZE R, BARROS GB, TEIXEIRA L, HARRIS J, MICHELSON K, FALQUETO A, COREY R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin Infect Dis**. v. 25, n. 5, p. 1240-2, Nov. 1997.

DOS SANTOS, S.O., ARIAS, J., RIBEIRO, A.A., DE PAIVA HOFFMANN, M., DE FREITAS, R.A., MALACCO, M.A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol**. v. 12, n. 3, p. 315-7, Jul. 1998.

DUBOIS-DALCQ, M., MCFARLAND, H., MCFARLIN, D. Protein A-peroxidase: a valuable tool for the localization of antigens. **J Histochem Cytochem**. v. 25, n. 11, p. 1201-6, Nov. 1977.

DUJARDIN, J.C., VICTOIR, K., DE DONCKER, S., GUERBOUJ, S., ARÉVALO, J., LE RAY, D. Molecular epidemiology and diagnosis of Leishmania: what have we learnt from genome structure, dynamics and function? **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 96, p. 81-6, Abr. 2002. Suplemento 1.

DUPREY, Z.H., STEURER, F.J., ROONEY, J.A., KIRCHHOFF, L.V., JACKSON, J.E., ROWTON, E.D., SCHANTZ, P.M. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. **Emerg Infect Dis.** v. 12, n. 3, p. 440-6, Mar. 2006.

EL HARITH, A., LAARMAN, J.J., MINTER-GOEDBLOED, E., KAGER, P.A., KOLK, A.H. Trypsin-treated and coomassie blue-stained epimastigote antigen in a microagglutination test for Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg.** v. 37, n. 1, p. 66-71, Jul. 1987.

EL HARITH, A., KOLK, A.H., LEEUWENBURG, J., MUIGAI, R., HUIGEN, E., JELSMA, T., KAGER, P.A. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. **J Clin Microbiol.** v. 26, n. 7, p. 1321-5, Jul. 1988.

EL TAI, N.O., EL FARI, M., MAURICIO, I., MILES, M.A., OSKAM, L., EL SAFI, S.H., PRESBER, W.H., SCHONIAN, G. Leishmania donovani: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. **Exp Parasitol.** v. 97, n. 1, p. 35-44, Jan. 2001.

ELLIS, J.T. e CRAMPTON, J.M. Differences between Leishmania (Leishmania) chagasi, L. (L.) infantum and L. (L.) donovani as shown by DNA fingerprinting. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 86, n. 4, p. 479-81, Out-Dez. 1991.

FERROGLIO, E., ROMANO, A., TRISCIUOGLIO, A., POGGI, M., GHIGGI, E., SACCHI, P., BIGLINO, A. Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 100, n. 7, p. 636-41, Jul. 2005.

FIOCRUZ – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Biomanguinhos). **Kit IFI Leishmaniose Canina.** Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/interna/reativos_leishmania.htm> Acesso em: 11 de setembro de 2006.

FISA, R., GALLEGU, M., RIERA, C., AISA, M.J., VALLS, D., SERRA, T., DE COLMENARES, M., CASTILLEJO, S., PORTUS, M. Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. **J Vet Diagn Invest.** v.9, n. 1, p. 50-5, Jan. 1997.

FRANCINO, O., ALTET, L., SANCHEZ-ROBERT, E., RODRIGUEZ, A., SOLANO-GALLEGU, L., ALBEROLA, J., FERRER, L., SANCHEZ, A., ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol.** v. 137, n. 3-4, p. 214-21, Abr. 2006.

FRANKE, C.R., STAUBACH, C., ZILLER, M., SCHLUTER, H. Trends in the temporal and spatial distribution of visceral and cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, from 1985 to 1999. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 96, n. 3, p. 236-41, Mai-Jun. 2002a.

FRANKE CR, ZILLER M, STAUBACH C, LATIF M. Impact of the El Nino/Southern Oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil. **Emerg Infect Dis.** v. 8, n. 9, p. 914-7, Set. 2002b.

FREY, A., DI CANZIO, J. e ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **J Immunol Methods.** v. 221, n. 1-2, p. 35-41, Dez.

1998.

GIBBS, J. Corning Home. Life Sciences. **ELISA Technical Bulletin**. USA, 2006. Disponível em: <http://www.corning.com/Lifesciences/technical_information/techDocs/elisa1.asp?region=na&language=EN> Acesso em: 11 de setembro de 2006.

GLICK, B.R., PASTERNAK, J.J. Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA. 2.ed. Washington, DC, USA: **American Society for Microbiology**, 1998. 683p.

GOLDSBY, R.A., KINDT, T. J., OSBORNE, B.A., KUBY, J. **Immunology**. 5ª Edição W.H. Freeman and Company, New York, New York, 2003. 603 p. il.

GONÇALVES, C.C., REICHE, E.M., DE ABREU FILHO, B.A., SILVEIRA, T.G., FELIZARDO, T.C., MAIA, K.R., COSTACURTA, R., PADOVESI, E.J., DIAS FILHO, B.P., JANKEVICIUS, S.I., JANKEVICIUS, J.V. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a Western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**. v. 66, n. 1, p. 91-102, Jan. 2002.

GONTIJO, C.M., MELO, M.N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev. Bras. Epidemiol**. v. 7, n. 3, p. 338-49, Set. 2004.

GONTIJO, C.M., DA SILVA, E.S., DE FUCCIO, M.B., DE SOUSA, M.C., PACHECO, R.S., DIAS, E.S., ANDRADE FILHO, J.D., BRAZIL, R.P., MELO, M.N. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Trop**. v. 81, n. 2, p. 143-50, Fev. 2002.

GRAMICCIA, M. e GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int J Parasitol**. v. 35, n. 11-12, p. 1169-80, Out. 2005.

GRAMICCIA, M., SMITH, D.F., ANGELICI, M.C., READY, P.D., GRADONI, L. A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. **Parasitology**. v. 105, p. 29-34, Ago. 1992.

GRIMALDI, G. JR., MOMEN, H., NAIFF, R.D., MCMAHON-PRATT, D., BARRETT, T.V. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. **Am J Trop Med Hyg**. v. 44, n. 6, p. 645-61, Jun. 1991.

GRIMALDI, JUNIOR. G., KREUTZER, R.D., HASHIGUCHI, Y., GOMEZ, E.A., MIMORY, T., TESH, R.B. Description of *Leishmania equatorensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 87, n. 2, p. 221-8, Abr- Jun. 1992.

GUERIN, P.J., OLLIARO, P., SUNDAR, S., BOELAERT, M., CROFT, S.L., DESJEUX, P., WASUNNA, M.K., BRYCESON, A.D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect Dis**. v. 2, n. 8, p. 494-501, Ago. 2002.

HARLOW, E., LANE, D. **Antibodies: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. 726 p.il.

HARRIS, E., KROPP, G., BELLI, A., RODRIGUEZ, B., AGABIAN, N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. **J Clin Microbiol**. v. 36, n. 7, p. 1989-95, Jul. 1998.

HOWELL, W.M., JOBS, M., BROOKES, A.J. iFRET: an improved fluorescence system for DNA-melting analysis. **Genome Res**. v. 12, n. 9, p. 1401-7, Set. 2002.

HSIA, R, WANG, N.E. eMedicine Specialties. Emergency medicine. Infectious disease. **Leishmaniasis**. USA, 2005. Disponível em: <<http://www.emedicine.com/EMERG/topic296.htm>> Acesso em: 19 de outubro de 2006.

INIESTA, L., FERNANDEZ-BARREDO, S., BULLE, B., GOMEZ, M.T., PIARROUX, R., GALLEGO, M., ALUNDA, J.M., PORTUS, M. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. **Clin Diagn Lab Immunol**. v. 9, n. 5, p. 1137-41, Set. 2002.

INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. London: Academic Press, 1989. 482 p.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SCHLOMCHIK, M. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. 5^a. ed. New York: Garland Publishing, 2001. 600 p. il.

JEREMY, B., TYMOCZKO, J.T., STRYER, L. **Biochemistry**. New York: W. H. Freeman and Co., 2002. 1.120 p. il.

KATAKURA, K., MIMORI, T., FURUYA, M., UEZATO, H., NONAKA, S., OKAMOTO, M., GOMEZ, L.E.A., HASHIGUCHI, Y. Identification of endotrypanum species from a sloth, a squirrel and Lutzomyia sandflies in ecuador by PCR amplification and sequencing of the mini-exon gene. **J Vet Med Sci**. v. 65, n. 5, p. 649-53, Maio 2003.

KELLY, P.J., TAGWIRA, M., MATTHEWMAN, L., MASON, P.R., WRIGHT, E.P. Reactions of sera from laboratory, domestic and wild animals in Africa with protein A and a recombinant chimeric protein AG. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. v. 16, n. 4, p. 299-305, Out. 1993.

KERR, S.F., MCHUGH, C.P., DRONEN, N.O. JR. Leishmaniasis in Texas: prevalence and seasonal transmission of *Leishmania mexicana* in *Neotoma micropus*. **Am J Trop Med Hyg.** v. 53, n. 1, p. 73-7, Jul. 1995.

KREUTZER, R.D., CORREDOR, A., GRIMALDI, G. JR., GROGL, M., ROWTON, E.D., YOUNG, D.G., MORALES, A., MCMAHON-PRATT, D., GUZMAN, H., TESH, R.B. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. **Am J Trop Med Hyg.** v. 44, n. 6, p. 662-75, Jun. 1991.

KRONVALL, G., SEAL, U.S., SVENSSON, S., WILLIAMS, R.C. JR. Phylogenetic aspects of staphylococcal protein A-reactive serum globulins in birds and mammals. **Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol.** v. 82, n. 1, p. 12-8, Fev. 1974.

KROPF, P., HERATH, S., TEWARI, R., SYED, N., KLEMENZ, R., MULLER, I. Identification of two distinct subpopulations of *Leishmania major*-specific T helper 2 cells. **Infect Immun.** v. 70, n. 10, p. 5512-20, Out. 2002.

KUHLS, K., MAURICIO, I.L., PRATLONG, F., PRESBER, W., SCHONIAN, G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes Infect.** v. 7, n. 11-12, p. 1224-34, Ago-Set. 2005.

LAINSON, R., RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 100, n. 8, p. 811-27, Dez. 2005.

LAINSON, R. e SHAW, J.J. Leishmaniasis in Brazil. 3. Cutaneous leishmaniasis in an opossum, *Marmosa murina* (Marsupialia, Didelphidae) from the lower Amazon region. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 63, n. 6, p. 738-40, 1969.

LAINSON, R., SHAW, J.J., READY, P.D., MILES, M.A., PÓVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of Leishmania species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 75, n. 4, p. 530-6. 1981.

LASRI, S., SAHIBI, H., NATAMI, A., RHALEM, A. Western blot analysis of Leishmania infantum antigens using sera from pentamidine-treated dogs. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 91, n. 1, p. 13-8, Jan. 2003.

LEMESRE, J.L., HOLZMULLER, P., CAVALEYRA, M., GONCALVES, R.B., HOTTIN, G., PAPIEROK, G. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of Leishmania infantum promastigotes. **Vaccine.** v. 23, n. 22, p. 2825-40, Abr. 2005.

LEONTIDES, L.S., SARIDOMICHELAKIS, M.N., BILLINIS, C., KONTOS, V., KOUTINAS, A.F., GALATOS, A.D., MYLONAKIS, M.E. A cross-sectional study of Leishmania spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Vet Parasitol.** v. 109, n. 1-2, p. 19-27, Out. 2002.

LIRA, R.A., CAVALCANTI, M.P., NAKAZAWA, M., FERREIRA, A.G., SILVA, E.D., ABATH, F.G., ALVES, L.C., SOUZA, W.V., GOMES, Y.M. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Vet Parasitol.** v. 137, n. 1-2, p. 11-6, Abr. 2006.

LLANOS-CUENTAS, E.A., RONCAL, N., VILLASECA, P., PAZ, L., OGUSUKU, E., PEREZ, J.E., CACERES, A. e DAVIES, C.R. Natural infections of Leishmania peruviana in

animals in the Peruvian Andes. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 93, n. 1, p. 15-20, Jan-Fev., 1999.

MAALEJ, I.A., CHENIK, M., LOUZIR, H., BEN SALAH, A., BAHLOUL, C., AMRI, F., DELLAGI, K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** v. 68, n. 3, p. 312-20, Mar. 2003.

MADORE, H.P. E BAUMGARTEN, A. Enzyme-linked protein A: an enzyme-linked immunosorbent assay reagent for detection of human immunoglobulin G and virus-specific antibody. **J Clin Microbiol.** v. 10, n. 4, p. 529-32, Out. 1979.

MALLA, N., SENGUPTA, C., DUBEY, M.L., SUD, A., ANSARI, N.A., SALOTRA, P. Antigenaemia and antibody response to *Leishmania donovani* stage-specific antigens and rk39 antigen in human immunodeficiency virus-infected patients. **Br J Biomed Sci.** v. 60, n. 4, p. 210-6, 2003.

MARFURT, J., NIEDERWIESER, I., MAKIA, N.D., BECK, H.P., FELGER, I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 46, n. 2, p. 115-24, Jun. 2003a.

MARFURT, J., NASEREDDIN, A., NIEDERWIESER, I., JAFFE, C.L., BECK, H.P., FELGER, I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. **J Clin Microbiol.** v. 41, n. 7, p. 3147-53, Jul. 2003b.

MARQUES, M.J., VOLPINI, A.C., MACHADO-COELHO, G.L., MACHADO-PINTO, J., DA COSTA, C.A., MAYRINK, W., GENARO, O., ROMANHA, A.J. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American

cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction.

Diagn Microbiol Infect Dis. v. 54, n. 1, p. 37-43, Jan. 2006.

MARTINEZ, E., LE PONT, F., TORREZ, M., TELLERIA, J., VARGAS, F., DUJARDIN, J.C., DUJARDIN, J.P. *Lutzomyia nuneztovari* anglesi (Le pont & Desjeux, 1984) as a vector of *Leishmania amazonensis* in a sub-Andean leishmaniasis focus of Bolivia. **Am J Trop Med Hyg.** v. 61, n. 5, p. 846-9, Nov. 1999.

MATHIS, A., DEPLAZES, P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. **J Clin Microbiol.** v. 33, n. 5, p. 1145-9, Maio 1995.

MAURICIO, I.L., HOWARD, M.K., STOTHARD, J.R., MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology.** v. 119, n. 3, p. 237-46, Set. 1999.

MAURICIO, I.L., STOTHARD, J.R., MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today.** v. 16, n. 5, p. 188-9, Maio 2000.

MEBATSION, T., FROST, J.W., KRAUSS, H. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using staphylococcal protein A for the measurement of rabies antibody in various species. **Zentralbl Veterinarmed B.** v. 36, n. 7, p. 532-6, Set. 1989.

METTLER, M., GRIMM, F., CAPELLI, G., CAMP, H., DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **J Clin Microbiol.** v. 43, n. 11, p. 5515-9, Nov. 2005.

MILES, M., DUJARDIN, J.C., SCHÖNIAN, G., LUKES, J., CAMPINO, L., ALVAR, J.,

DEDET, J.P., SOTERIADOAU, K. **European Project Leish DOMUS: Diagnostic and epidemiological markers for tracking of endemic and resurgent European leishmaniasis.** Disponível em: <<http://www.leishdomus.org/leish.htm>> Acesso em: 11 de setembro de 2006.

MOHEBALI, M., HAJJARAN, H., HAMZAVI, Y., MOBEDI, I., ARSHI, S., ZAREI, Z., AKHOUNDI, B., NAEINI, K.M., AVIZEH, R., FAKHAR, M. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. **Vet Parasitol.** v. 129, n. 3-4, p. 243-51, Maio 2005.

MORAES-SILVA, E., ANTUNES, F.R., RODRIGUES, M.S., DA SILVA JULIAO, F., DIAS-LIMA, A.G., LEMOS-DE-SOUSA, V., DE ALCANTARA, A.C., REIS, E.A., NAKATANI, M., BADARÓ, R., REIS, M.G., PONTES-DE-CARVALHO, L., FRANKE, C.R. Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. infantum* infection. **Acta Trop.** v. 98, n. 2, p. 176-82, Maio 2006.

MORALES, M.A., CHICHARRO, C., ARES, M., CANAVATE, C., BARKER, D.C., ALVAR, J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 95, n. 1, p. 104-7, Jan – Fev. 2001.

MOREIRA, E.D. JR., MENDES DE SOUZA, V.M., SREENIVASAN, M., NASCIMENTO, E.G., PONTES DE CARVALHO, L. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Vet Parasitol.** v. 122, n. 4, p. 254-52, Ago. 2004.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. **Taxonomy Browser:** *Leishmania*. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>> Acesso em: 09 de setembro de 2006.

NOGUEIRA, F.S., MOREIRA, M.A., BORJA-CABRERA, G.P., SANTOS, F.N., MENZ, I., PARRA, L.E., XU, Z., CHU, H.J., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., LUVIZOTTO, M.C. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**. v. 23, n. 40, p. 4805-10, Set. 2005.

OLIVEIRA, S.S., ARAÚJO, T.M. Evaluation of control measures for visceral leishmaniasis (kala azar) in an endemic area in Bahia, Brazil (1995-2000). **Cad. Saúde Pública**. v. 19, n. 6, p.1681-1690, Nov-Dez. 2003.

OLIVEIRA, F.S., BRAZIL, R.P., PACHECO, R.S. Response to Silva *et al.*: Usefulness of PCR-based methods for screening *Leishmania* in epidemiological studies. **Trends Parasitol**. v.21, n. 12, p. 552-3, Dez. 2005.

OLIVEIRA, F.S., PIRMEZ, C., PIRES, M.Q., BRAZIL, R.P., PACHECO, R.S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet Parasitol**. v. 129, n. 3-4, p. 219-27, Maio 2005.

OMS (Organização Mundial de Saúde). Health topics: **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>> Acesso em: 06 de setembro de 2006.

OPAS (Organização Panamericana de Saúde). **Manual de Controle da leishmaniose Visceral**. Disponível em: <<http://www.paho.org/Portuguese/AD/DPC/CD/leishmaniasis-manual.htm>> Acesso em: 06 de setembro de 2006.

PALATNIK, C.B., PREVIATO, J.O., MENDONCA-PREVIATO, L., BOROJEVIC, R. A new approach to the phylogeny of Leishmania: species specificity of glycoconjugate ligands for promastigote internalization into murine macrophages. **Parasitol Res.** v. 76, n.4, p. 289-93, 1990.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., DOS SANTOS, W.R., FRANCA-SILVA, J.C., DA COSTA, R.T., REIS, A.B., PALATNIK, M., MAYRINK, W., GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** v. 65, n. 5, p. 510-7, Nov. 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA CB, SANTOS WR, CASAS CP, PARAGUAI DE SOUZA E, TINOCO LW, DA SILVA BP, PALATNIK M, PARENTE JP. Protective vaccination against murine visceral leishmaniasis using aldehyde-containing Quillaja saponaria saponins. **Vaccine.** v. 22, n. 19, p. 2470-9, Jun. 2004.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., BATISTA-DE-MELO, L.M., BORJA-CABRERA, G.P., PALATNIK, M., LAVOR, C.C. Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. **An Acad Bras Cienc.** v. 76, n. 3, p. 583-93, Set. 2004.

PARANHOS-SILVA, M., FREITAS. L.A., SANTOS. W.C., GRIMALDI, G. JUNIOR, PONTES-DE-CARVALHO, L.C., OLIVEIRA-DOS-SANTOS. A.J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to Leishmania chagasi. **Am J Trop Med Hyg.** V. 55, n. 1, pp. 39–44, Jul 1996.

PASSOS, V.M., LASMAR, E.B., GONTIJO, C.M., FERNANDES, O., DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (Felis domesticus) with Leishmania (Viannia) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 91, n. 1, p. 19-20, Jan-Fev. 1996.

PASSOS VM, FERNANDES O, LACERDA PA, VOLPINI AC, GONTIJO CM, DEGRAVE W, ROMANHA AJ. Leishmania (Viannia) braziliensis is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. **Acta Trop.** v. 72, n. 3, p. 251-8, Abr. 1999.

PORROZZI, R., PEREIRA, M.S., TEVA, A., VOLPINI, A.C., PINTO, M.A., MARCHEVSKY, R.S., BARBOSA, A.A. JR., GRIMALDI G JR. Leishmania infantum-induced primary and challenge infections in rhesus monkeys (Macaca mulatta): a primate model for visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 100, n. 10, p. 926-37, Out. 2006.

RHALEM, A., SAHIBI, H., GUESSOUS-IDRISSI, N., LASRI, S., NATAMI, A., RIYAD, M., BERRAG, B. Immune response against Leishmania antigens in dogs naturally and experimentally infected with Leishmania infantum. **Vet Parasitol.** v. 81, n. 3, p. 173-84, Mar. 1999.

RIVERA, E., JACKERT-JERNBERGER, M., MEJERLAND, T., KARLSSON, K.A. Evaluation of protein A and protein G as indicator system in an ELISA for detecting antibodies in mink to Pseudomonas aeruginosa. **Vet Microbiol.** v. 42, n. 4, p. 265-71, Dez. 1994.

RODGERS, M.R., POPPER, S.J., WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. **Exp Parasitol.** v. 71, n. 3, p. 267-75, Out. 1990.

ROGERS, W.O. e WIRTH, D.F. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 84, n. 2, p. 565-9, Jan. 1987.

ROSÁRIO, E.Y., GENARO, O., FRANCA-SILVA, J.C., DA COSTA, R.T., MAYRINK, W.,

REIS, A.B., CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude Leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 100, n. 2, p. 197-203, Abr. 2005.

ROTUREAU, B., RAVEL, C., COUPPIE, P., PRATLONG, F., NACHER, M., DEDET, J.P., CARME, B. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world Leishmania species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. **J Clin Microbiol.** v. 44, n. 2, p. 459-67, Fev. 2006.

SAHA, S., MAZUMDAR, T., ANAM, K., RAVINDRAN, R., BAIRAGI, B., SAHA, B., GOSWAMI, R., PRAMANIK, N., GUHA, S.K., KAR, S., BANERJEE, D., ALI, N. Leishmania promastigote membrane antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting for differential diagnosis of Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis. **J Clin Microbiol.** v. 43, n. 3, p. 1269-77, Mar. 2005.

SALOTRA, P., SREENIVAS, G., BEENA, K.R., MUKHERJEE, A., RAMESH, V. Parasite detection in patients with post kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular and immunological methods. **J Clin Pathol.** v. 56, n. 11, p. 840-3, Nov. 2003.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3^a. ed. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2.344 p. il.

SARAIVA, E.M., DE FIGUEIREDO BARBOSA, A., SANTOS, F.N., BORJA-CABRERA, G.P., NICO, D., SOUZA, L.O., DE OLIVEIRA MENDES-AGUIAR, C., DE SOUZA, E.P., FAMPA, P., PARRA, L.E., MENZ, I., DIAS, J.G. JR., DE OLIVEIRA, S.M., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. **Vaccine.** v. 24, n. 13, p. 2423-31, Mar. 2006.

SCHALLIG, H.D., CANTO-CAVALHEIRO, M., DA SILVA, E.S. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 97, n. 7, p. 1015-8, Out. 2002.

SCHUSTER, F.L., SULLIVAN, J.J. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. **Clin Microbiol Rev.** v. 15, n. 3, p. 374-89, Jul. 2002.

SCHANTZ, P.M., STEURER, F.J., DUPREY, Z.H., KURPEL, K.P., BARR, S.C., JACKSON, J.E., BREITSCHWERDT, E.B., LEVY, M.G., FOX, J.C. Autochthonous visceral leishmaniasis in dogs in North America. **J Am Vet Med Assoc.** v. 226, n. 8, p. 1316-22, Abr. 2005.

SENALDI, G., XIAO-SU, H., HOESSLI, D.C., BORDIER, C. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by a dot-enzyme immunoassay for the detection of a *Leishmania donovani*-related circulating antigen. **J Immunol Methods.** v. 193, n. 1, p. 9-15, Jun. 1996.

SERIN, M.S., DAGLIOGLU, K., BAGIROVA, M., ALLAHVERDIYEV, A., UZUN, S., VURAL, Z., KAYAR, B., TEZCAN, S., YETKIN, M., ASLAN, G., EMEKDAS, G., KOKSAL, F. Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of miniexon region. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 53, n. 3, p. 209-14, Nov. 2005.

SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 89, n. 3, p. 471-8, Jul-Set. 1994.

SHEARER, M.H., DARK, R.D., CHODOSH, J., KENNEDY, R.C. Comparison and characterization of immunoglobulin G subclasses among primate species. **Clin Diagn Lab Immunol.** v. 6, n. 6, p. 953-8, Nov. 1999.

SHERLOCK, I.A., MIRANDA, J.C., SADIGURSKY, M., GRIMALDI JUNIOR, G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 79, n. 4, p. 511, Out-Dez. 1984.

SHERLOCK, I.A., MIRANDA, J.C., SADIGURSKY, M., GRIMALDI JUNIOR, G. Experimental infection of the opossum *Didelphis Albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 83, n. 1, p. 141, Jan-Mar. 1988.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 91, n. 6, p. 671-83, Nov-Dez. 1996.

SILVA, A.V., PAULA, A.A., CABRERA, M.A., CARREIRA, J.C. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. **Cad Saude Publica.** v. 21, n. 1, p. 324-8, Jan-Fev. 2005.

SILVA, D.A., VITALIANO, S.N., MINEO, T.W., FERREIRA, R.A., BEVILACQUA, E., MINEO JR. Evaluation of homologous, heterologous, and affinity conjugates for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **J Parasitol.** v. 91, n. 5, p. 1212-6, Out. 2005.

SILVA, E.S., GONTIJO, C.M., PACHECO, R.S., FIUZA, V.O., BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 96, n. 3, p. 285-91, Abr. 2001a.

SILVA, E.S., GONTIJO, C.M., PIRMEZ, C., FERNANDES, O., BRAZIL, R.P. Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** v. 65, n. 6, p. 896-8, Dez. 2001b.

SILVA, E.S., SCHOONE, G.J., GONTIJO, C.M., BRAZIL, R.P., PACHECO, R.S., SCHALLIG, H.D. Application of direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. **Kinetoplastid Biol Dis.** v. 4, n. 4, Jun. 2005.

SINGH, S., SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **J Postgrad Med.** v. 49, n. 1, p. 55-60, Jan-Mar. 2003.

SOARES, R.P., TURCO, S.J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **An Acad Bras Cienc.** v.75, n. 3, p. 301-30, Set. 2003.

SOLANO-GALLEGO, L., MORELL, P., ARBOIX, M., ALBEROLA, J., FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol.** v.39, n. 2, p. 560-3, Fev. 2001.

SOLANO-GALLEGO, L., RODRIGUEZ, A., INIESTA, L., ARBOIX, M., PORTUS, M., ALBEROLA, J. Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol.** v.10, n. 5, p. 849-55, Set. 2003.

SREENIVAS, G., ANSARI, N.A., SINGH, R., SUBBA RAJU, B.V., BHATHEJA, R., NEGI, N.S., SALOTRA, R. Diagnosis of visceral leishmaniasis: comparative potential of amastigote antigen, recombinant antigen and PCR. **Br J Biomed Sci.** v. 59, n. 4, p. 218-22, 2002.

SUNDAR, S., RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol.** v. 9, n. 5, p. 951-8, Set. 2002.

TALMI-FRANK, D., STRAUSS-AYALI, D., JAFFE, C.L., BANETH, G. Kinetics and

diagnostic and prognostic potential of quantitative Western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol.** v. 13, n. 2, p. 271-6, Fev. 2006.

TANNER, C.E. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Clin Immunol Immunopathol.** v. 78, n. 2, p. 105-11, Fev. 1996.

TDR - The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. **Leishmaniasis: Disease Information.** Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>> Acesso em: 09 de setembro de 2006.

TRAVI, B.L., OSORIO, Y., GUARIN, N., CADENA, H. Leishmania (Leishmania) chagasi: clinical and parasitological observations in experimentally infected Didelphis marsupialis, reservoir of New World visceral leishmaniasis. **Exp Parasitol.** v. 88, n. 1, p. 73-5, Jan. 1998.

TRAVI, B.L., FERRO, C., CADENA, H., MONTOYA-LERMA, J., ADLER, G.H. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. **Res Vet Sci.** v. 72, n. 1, p. 83-6, Fev. 2002.

VERCAMMEN, F., FERNANDEZ-PEREZ, F.J., DEL AMO, C., ALUNDA, J.M. Follow-up of Leishmania infantum naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. **Acta Trop.** v. 84, n. 3, p. 175-81, Dez. 2002.

VOLPINI, A.C., PASSOS, V.M., OLIVEIRA, G.C., ROMANHA, A.J. PCR-RFLP to identify Leishmania (Viannia) braziliensis and L. (Leishmania) amazonensis causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.** v. 90, n. 1, p. 31-7, Mar. 2004.

VOLPINI, A.C., MARQUES, M.J., LOPES DOS SANTOS, S., MACHADO-COELHO, G.L., MAYRINK, W., ROMANHA, A.J. Leishmania identification by PCR of Giemsa-

stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. **Clin Microbiol Infect.** v. 12, n. 8, p. 815-8, Ago. 2006.

WHITE, M.R., CHAPMAN, W.L. JR., HANSON, W.L., LATIMER, K.S., GREENE, C.E. Experimental visceral leishmaniasis in the opossum. **Vet Pathol.** v. 26, n. 4, p. 314-21, Jul. 1989.

XAVIER, S.C., DE ANDRADE, H.M., MONTE, S.J., CHIARELLI, I.M., LIMA, W.G., MICHALICK, M.S., TAFURI, W.L., TAFURI, W.L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Vet Res.** v. 2, p. 1-7, Jun. 2006.

XIMENES, M.F.F.M., SOUZA, M.F., CASTELLÓN, E.G. Density of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in Domestic and Wild Animal Shelters in an Area of Visceral Leishmaniasis in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 94, n. 4, p. 427-32, Jul. 1999.

YOSHIDA, E.L., CORREA, F.M., PACHECO, R.S., MOMEN, H., GRIMALDI, JUNIOR G. Leishmania mexicana in Didelphis marsupialis aurita in Sao Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v. 27, n. 4, p. 172, Jul-Ago. 1985.

ZAIDI, N., KONSTANTINOOU, K., ZERVOS, M. The role of molecular biology and nucleic Acid technology in the study of human infection and epidemiology. **Arch Pathol Lab Med.** v. 127, n. 9, p. 1098-105, Set. 2003.

ZARAGOZA, C., BARRERA, R., CENTENO, F., TAPIA, J.A., DURAN, E., GONZALEZ, M., MANE, M.C. SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. **Vet Res.** v. 34, n. 2, p. 137-51, Mar-Abr. 2003.

ZEMANOVA, E., JIRKU, M., MAURICIO, I.L., MILES, M.A., LUKES, J. Genetic polymorphism within the leishmania donovani complex: correlation with geographic origin. **Am J Trop Med Hyg.** v. 70, n. 6, p. 613-7, Jun. 2004.

ZERPA, O., ULRICH, M., BENITEZ, M., AVILA, C., RODRIGUEZ, V., CENTENO, M., BELIZARIO, D., REED, S.G., CONVIT, J. Epidemiological and immunological aspects of human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 97, n. 8, p. 1079-83, Dez. 2002.

ZIJLSTRA, E.E., NUR, Y., DESJEUX, P., KHALIL, E.A., EL-HASSAN, A.M., GROEN, J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. **Trop Med Int Health.** v. 6, n. 2, p. 108-13, Fev. 2001.

ZIJLSTRA, E.E., DAIFALLA, N.S., KAGER, P.A., KHALIL, E.A., EL-HASSAN, A.M., REED, S.G., GHALIB, H.W. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Leishmania donovani infection. **Clin Diagn Lab Immunol.** v.5, n. 5, p. 717-20, Set. 1998.

AUTORIZAÇÃO PARA COMUTAÇÃO

DE ALCÂNTARA, A. C. ELISA indireto e mkDNA PCR-RFLP para o diagnóstico e avaliação da infecção por *Leishmania sp.* em reservatórios domésticos (cães) e silvestres (marsupiais) em Barra do Pojuca, Camaçari, Bahia. Salvador, Bahia, 2006. 126 p.il. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina veterinária da Universidade Federal da Bahia, 2006.

Autorizo a reprodução (parcial ou total) deste trabalho para fins de comutação bibliográfica.

Salvador, 28 de agosto de 2006

Adriano Costa de Alcântara

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)