

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA POR TÉCNICAS DIRETAS E
INDIRETAS NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA**

Elisa Maria Rennó Azevedo
Orientador: Guido Fontgalland Coelho Linhares

GOIÂNIA
2009

ELISA MARIA RENNÓ AZEVEDO

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA POR TÉCNICAS DIRETAS E
INDIRETAS NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA**

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal junto à Escola
de Veterinária da Universidade
Federal de Goiás.

Área de Concentração:
Sanidade Animal

Orientador:
Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares
Comitê de Orientação:
Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme
Profa. Dra. Veridiana Maria Brianezi Dignai de Moura

GOIÂNIA
2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

A994c Azevedo, Elisa Maria Rennó
Contribuição ao estudo epidemiológico da Leishmaniose visceral canina por técnicas diretas e indiretas no município de Goiânia [manuscrito] / Elisa Maria Rennó Azevedo. – 2009.
xii, 69 f. : il., figs., tabs., qds.

Orientador: Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares; Co-Orientadores: Profª. Drª Valéria de Sá Jayme, Profª. Drª. Veridiana Maria Brianezi Dignai de Moura.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2009.

Bibliografia: f. 40-50.
Inclui lista de figuras, tabelas.
Anexos.

1. Leishmaniose visceral – Cão 2. Zoonose 3. Calazar 4. Leishmania Chagasi I. Linhares, Guido Fontgalland Coelho. II. Jayme, Valéria de Sá III. Moura, Veridiana Maria Brianezi Dignai de. IV. Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária. V. Título.

CDU: 619:616.993.161:636.7

FOLHA DE APROVAÇÃO

ELISA MARIA RENNÓ AZEVEDO

Dissertação defendida e aprovada em **13/08/2009**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares
(ORIENTADOR (A))



Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado - FCAV/UNESP



Profa. Dra. Andréa Caetano da Silva - IPTSP/UFG

Ao meu marido, Rafael G. R. Mendes, por todo amor, estímulo, compreensão e dedicação durante a realização deste trabalho.

À minha mãe, Ana Maria R. Azevedo, que é um exemplo de mulher, em quem quando me espelhei tomei minhas mais sábias decisões.

Ao meu pai (*in memoriam*), Hércio da S. Azevedo, que me apoiou e sempre se esforçou para que eu e meus irmãos tivéssemos a melhor educação possível.

Aos meus irmãos, Vânia C. R. Azevedo e Guilherme R. Azevedo, que sempre estiveram ao meu lado, nos momentos de alegria ou de tristeza.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que nos guarda, protege e inspira sem o qual nenhum ser vivo existiria e sem o qual a vida não faz sentido.

A minha família por toda a compreensão e apoio constantes e que souberam entender os momentos de ausência e sempre apoiaram meu trabalho com muita amizade e incentivo.

Ao meu marido Rafael Guimarães da Rocha Mendes, por ter compreendido a importância e as dificuldades do desenvolvimento desse trabalho e por estar ao meu lado sempre com muito carinho, me entendendo e apoiando.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, por apoiar o meu aperfeiçoamento profissional.

Ao meu orientador Prof. Guido Fontgalland Coelho Linhares que sempre me auxiliou diretamente, acompanhando esse trabalho em todos os momentos, sempre me instruindo, amparando e incentivando. Saiba que tenho muito orgulho em tê-lo como orientador. Obrigada pela oportunidade de aprendizado, pela amizade e compreensão.

Não poderia deixar de agradecer a grande amiga de pós-graduação Sabrina Castilho Duarte e as co-orientadoras Valéria da Sá Jayme e Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura, que estiveram ao meu lado durante todos os momentos de desenvolvimento deste trabalho. Saibam que vocês são muito importantes para mim.

Quero muito agradecer a colaboração de Hérika Xavier da Costa, Carlos Eduardo F. Alves, Sheila Caputo Oliveira e Alberto Elias Marques, que sempre estavam prontos para ajudar. Vocês foram importantes para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A Profa. Rosângela Zacarias Machado (Universidade Estadual de São Paulo – Campus Jaboticabal) que me recebeu em seu laboratório para treinamento de reações sorológicas e cedeu de forma tão solícita e amiga os controles positivos, negativos e as lâminas de RIFI utilizadas neste trabalho, o apoio e parceria foram essenciais para o estudo.

As Profas. Andréa Caetano da Silva (UFG) e Maria Auxiliadora Andrade (UFG) que cederam de forma amigável reagentes e equipamentos, que sem os quais esse estudo seria impossível de ser concluído.

Agradeço ao Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFG, e a todos os seus funcionários que permitiram que eu pudesse acompanhar os casos suspeitos e coletar os materiais para a pesquisa.

Ao Departamento de Controle de Zoonoses, e a seus funcionários, que se prontificaram desde o início a colaborar.

Muito Obrigada aos meus amigos da Pós Graduação e a todos os demais que convivi durante a realização deste estudo, em especial a grande amiga Andrea Cintra Bastos Tôres.

Ao programa de Pós-Graduação desta Escola por disponibilizar toda a estrutura necessária.

À Universidade Federal de Goiás, especialmente ao Departamento de Medicina Preventiva e todos os seus funcionários.

Enfim, a todos que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

“Se não houver frutos,
valeu a beleza das flores;
se não houver flores,
valeu a sombra das folhas;
se não houver folhas,
valeu a intenção da
semente”.

Henfil

SUMÁRIO

Lista de figuras	viii
Lista de tabela	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivos gerais	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Local e período da experimentação	13
4.2 Animais utilizados na experimentação	13
4.3 Colheita do material	13
4.3.1 Sangue	14
4.3.2 Fragmento de pele	14
4.3.3 Fragmento e punções de linfonodo	15
4.4 Exames laboratoriais	16
4.4.1 Exames indiretos	16
4.4.1.1 Ensaio-imuno-enzimático	16
4.4.1.2 Reação de imunofluorescência indireta	17
4.4.2 Exames diretos	17
4.4.2.1 Parasitológico direto	17
4.4.2.2 Reação em cadeia pela polimerase	18
4.4.2.2.1 Gênero-específico	18
4.4.2.2.2 Espécie-específico	20
4.5 Análise estatística	21
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Alterações clínicas observadas nos animais com LVC. A: conjuntivite (cão n°.39), B: conjuntivite com alopecia periocular (cão n°.115), C: linfadenopatia (cão n°.115), D: onicogribose (cão n°.11), E e F: alterações dermatológicas(E: cão n°.11 e F: cão n°.39).	24
Figura 2	Reação de Imunofluorescência Indireta com antígenos de promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> . Visualização em microscópio equipado com luz fluorescente. A: Controle negativo; B: Reação positiva do cão n° 1.	27
Figura 3	Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> observadas nos exames parasitológicos de pele e linfonodo. A: pele do cão n°.1, B: pele do cão n°.2; C: linfonodo do cão n°. 11 e D: linfonodo do cão n°. 115.	28
Figura 4	Eletroforese de produtos de PCR de 650 pb de <i>Leishmania</i> obtidos a partir de DNA extraído de pele íntegra de cães com suspeita clínica de Calazar, procedentes de Goiânia, Goiás. 1: marcador de 100pb; 2: controle positivo; 3, 4 e 5: resultados positivos referentes às amostras dos cães de números 1, 2 e 115, respectivamente; 6: amostra negativa referente ao cão número 13; 7: DNA de cão livre de infecção; 8: controle negativo.	31
Figura 5	Eletroforese de produtos de PCR de 650 pb de <i>Leishmania</i> obtidos a partir de DNA extraído de linfonodo de cães com suspeita clínica de Calazar, procedentes de Goiânia, Goiás. 1: marcador de 100pb; 2: controle positivo; 3, 5 e 6: resultados positivos referente às amostras dos cães de números 11, 39 e 141, respectivamente; 4: amostra negativa referente ao cão número 230; 7: controle negativo.	32
Figura 6	Eletroforese de produtos de amplificação por PCR com o par de oligonucleotídeos (RV1/RV2) específico para o fragmento de 145 pb dos minicírculos do kDNA de <i>Leishmania chagasi</i> : 1: marcador molecular de 100pb; 2: controle positivo para <i>L. chagasi</i> ; 3 a 9: isolados dos cães de números 01, 02, 11, 39, 115, 141 e 233, respectivamente; 10: controle negativo; 11: DNA de cão livre de infecção.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Casos confirmados de Leishmaniose Visceral Humana (LVH), segundo UF de residência. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2008**.	10
Tabela 2	Interpretações para a intensidade de concordância entre diferentes métodos de diagnóstico em função dos valores obtidos pelo teste Kappa.	22
Tabela 3	Frequência absoluta e relativa de cães positivos, em uma amostra total de 214, dentro de cada grupo avaliado, nos diferentes exames laboratoriais (ELISA, RIFI, Parasitológico direto de pele e linfonodo, PCR gênero e espécie-específico de pele e linfonodo). Goiânia, 2009.	23
Tabela 4	Resultados laboratoriais dos animais positivos em exame direto ou indireto para LVC, conforme o número do animal e os exames laboratoriais (ELISA, RIFI, P.D.Linf. e Pele, PCR Genérico e Específico).	26
Tabela 5	Resultados dos exames diretos (parasitológicos diretos – pele e linfonodo e PCR gênero específico e espécie-específico) em amostras de pele e de linfonodo, colhidas de cães, distribuídos nos diferentes grupos avaliados neste estudo. Goiânia, 2009.	29
Tabela 6	Resultados dos testes indiretos (ELISA e RIFI) realizados em amostras de soro sanguíneo de cães, distribuídos nos diferentes grupos avaliados neste estudo. Goiânia, 2009.	29
Tabela 7	Valores do Kappa entre os diferentes métodos de diagnóstico empregados no estudo	34

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma zoonose crônica causada por um protozoário denominado *Leishmania (Leishmania) chagasi* e possui como vetores, os flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. O cão doméstico é o reservatório mais importante nos meios urbanos, sendo responsável pela manutenção do parasita nos focos endêmicos. Este trabalho investigou laboratorialmente possíveis casos de LVC. Nesta investigação utilizou-se cães atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (HV/EV/UFG) com suspeita clínica da doença e cães errantes sintomáticos e assintomáticos capturados pelo DCZ-GO. Nestes locais foram atendidos 214 cães, classificados em três grupos. Grupo 1 (G1): 33 cães do DCZ com no mínimo três sinais clínicos sugestivos para LVC; Grupo 2 (G2): 141 cães do DCZ clinicamente hígidos e Grupo 3 (G3): 40 cães atendidos no HV/EV/UFG com suspeita clínica de LVC. A frequência de animais classificados como positivos, aos diferentes métodos de diagnóstico empregados neste estudo foram: 5,6% (n=12) pelo ELISA-teste; 9,35% (n=20) à RIFI; 2,80% (n=6) ao exame parasitológico direto de *imprints* de pele; 2,34% (n=5) ao exame parasitológico direto de linfonodo; e 3,17% (n=7) para as reações de PCR. Este trabalho é pioneiro na investigação da Leishmaniose Visceral Canina no município de Goiânia, Goiás. Outros trabalhos devem ser conduzidos continuamente, visando à investigação sistemática da doença neste e em outros municípios do estado. Considerando os resultados alcançados e as condições em que foi realizado o presente estudo, conclui-se que há casuística de LVC para cães sintomáticos ou assintomáticos, os quais buscam atendimento clínico-ambulatorial na cidade de Goiânia; existe ocorrência de portador de infecção por *Leishmania chagasi* entre cães vadios capturados no município de Goiânia; os testes de diagnóstico ELISA e RIFI apresentam resultados apenas moderadamente concordantes para o diagnóstico sorológico da LVC; os exames parasitológicos e PCR conduzidos a partir de amostras de pele e linfonodo apresentam resultados equivalentes para o diagnóstico da LVC.

PALAVRAS-CHAVE: Calazar, *Leishmania chagasi*, PCR, parasitológico direto, RIFI, ELISA.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a chronic zoonosis caused by a protozoan called *Leishmania (Leishmania) chagasi* and has as vectors, the sandflies *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi*. The domestic dog is the most important reservoir in urban areas considering the zoonotic disease form and is responsible for maintaining the parasite in endemic foci. Aiming to assist the Superintendent of Policies for Comprehensive Health Care / Health State Department of Goiás (Spais / SES-GO) and the Department of Zoonosis Control from Goiânia (GO-DCZ) in epidemiological surveillance of the disease, this work investigated possible cases of CVL by using laboratory analysis. For this study, dogs seen at the Veterinary Hospital, School of Veterinary Medicine, Federal University of Goiás (HV / EV / UFG) with clinical suspicion of disease and symptomatic and asymptomatic dogs captured by DCZ-GO were analyzed. A total of 214 dogs were evaluated, and classified into three groups. Group 1 (GI): 33 dogs from DCZ with at least three clinical signs suggestive of LVC, Group 2 (GII): 141 clinically healthy dogs from DCZ and Group 3 (GIII): 40 dogs seen at the HV / EV / UFG with clinical suspicion of LVC. The frequency of animals classified as positive with different methods of diagnosis used in this study were: 5.6% (n = 12) in ELISA test, 9.35% (n = 20) in IFAT, 2.80% (n = 6) in the direct parasitological examination of skin imprints; 2.34% (n = 5) in direct parasitological examination of lymphonode, and 3.17% (n = 7) in PCR reactions of both the gender-specific protocol and the *L. chagasi*-specific. Considering the results and the conditions of the present study, it is concluded that there is casuistry in CVL series of symptomatic or asymptomatic dogs clinically attended in the city of Goiânia. The occurrence of *Leishmania chagasi* bearer dogs captured in the municipality of Goiânia were detected and the symptoms frequently observed in illness dogs carriers of *L. chagasi* in Goiânia are: conjunctivitis, lymphadenopathy, skin changes, cachexia and onychogryphosis.

Keyword: *Calazar*, *Leishmania chagasi*, PCR, Direct parasitological, IFI, ELISA.

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose de evolução crônica muito importante na América do Sul, principalmente no Brasil. Devido a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade.

É causada por um protozoário denominado *Leishmania (Leishmania) chagasi*. No momento, existem divergências sobre o uso do nome específico *chagasi* para o agente etiológico da leishmaniose visceral. Com base nos perfis isoenzimáticos, alguns autores consideram que *Leishmania (Leishmania) chagasi* é igual à *Leishmania (Leishmania) infantum* e por isso, o nome *chagasi* seria sinônimo de *infantum*.

Possui como vetor, no território brasileiro, os flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, popularmente conhecidos como mosquito palha, pólvora, tatuquira, birigui, entre outros.

O cão doméstico (*Canis familiaris*) é o mais importante reservatório nos meios urbanos quando se considera a forma zoonótica da doença, sendo responsável pela manutenção do parasito nos focos endêmicos, quer pela alta prevalência da doença nestes animais, quer pela presença de formas amastigotas na pele, sendo a sua eliminação um dos alvos estratégicos de ação para controle da doença em humanos.

Visando um diagnóstico rápido para a doença, muitos testes sorológicos foram desenvolvidos. Os testes sorológicos são muito sensíveis e específicos, porém alguns pesquisadores observaram reações cruzadas com Leishmaniose Tegumentar, Doença de Chagas, Tripanossomíase, Esquistossomose e até sarna demodécica, sendo, portanto necessária a confirmação por outras metodologias.

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio-Imuno-Enzimático Indireto (ELISA) são as reações sorológicas mais utilizadas. A RIFI é considerada pelo Ministério da Saúde “padrão ouro” no diagnóstico da LVC, porém

ela não é facilmente adaptável para larga escala de reações. Já o ELISA tem mostrado sensibilidade e especificidade semelhante à RIFI e pode ser utilizado em estudos com larga escala de reações.

Os exames diretos como o parasitológico direto de linfonodo, pele, medula óssea, fígado entre outros são seguros quanto à positividade dos casos, porém não tão eficazes para realizar uma cobertura completa dos animais positivos para doença. A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) é o exame mais sensível e específico, sendo possível identificar e ampliar seletivamente um fragmento do DNA do parasito. Infelizmente suas limitações para uso em inquéritos epidemiológicos se baseiam no custo de equipamentos e pouca adaptabilidade ao campo. Para maior precisão no diagnóstico, a associação de pelo menos duas técnicas é a melhor forma de minimizar erros.

Apesar do aumento do número de relato de casos de LV no estado de Goiás nos últimos anos, o município de Goiânia não é considerado área endêmica para a enfermidade. Sendo de grande importância manter intensa vigilância epidemiológica no local, uma vez que de acordo com o Plano de Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde (PCLV-MS), Goiânia se enquadra como “área vulnerável”, tendo em vista o fluxo migratório intenso, fazendo parte de um eixo viário comum de municípios com casos autóctones.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Até o momento, no Brasil, duas espécies estão relacionadas com a transmissão da LV, o *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. São insetos denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, pólvora, tatuquira, birigui, entre outros (SANTOS, 1998; BRASIL, 2006).

Sabe-se que o *L. longipalpis* adapta-se facilmente ao peridomicílio e a variadas temperaturas, podendo ser encontrado no interior de domicílios e em abrigos de animais domésticos. Esses vetores possuem atividade crepuscular e noturna. No intra e peridomicílio, o *L. longipalpis* é encontrado, principalmente, próximo a uma fonte de alimento. Durante o dia estes insetos ficam em repouso, em lugares sombreados e úmidos, protegidos do vento e de predadores naturais (OLIVEIRA et al., 2000; BRASIL, 2005).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, que são hematófagas obrigatoriamente, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas (BRASIL, 2006).

Após este período, as fêmeas infectantes ao realizarem um novo repasto sangüíneo em um hospedeiro vertebrado liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo a liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo,

ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (BRASIL, 2006).

Os reservatórios silvestres identificados e potencialmente envolvidos na transmissão são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). Os cães (*Canis familiaris*) são considerados reservatórios domésticos da *L. L. chagasi* e caracterizados como a principal fonte de infecção para o vetor (BRASIL, 2005).

Os cães são considerados os principais responsáveis pela manutenção do parasito nos focos endêmicos, devido à alta prevalência da doença nestes animais, devido à presença de formas amastigotas na pele e sua proximidade ao homem. Por esta razão estes animais são considerados um dos alvos estratégicos de controle desta enfermidade (OMS, 2006).

O quadro clínico dos animais com a enfermidade é semelhante ao quadro humano da doença. Apresenta um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a um severo estagio final. Na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) se admite um período de incubação e pré-patente de três a seis meses até vários anos. Esta infecção, invariavelmente, evolui para os estados latentes ou patentes que, por sua vez, em períodos variáveis de semanas, meses ou anos, podem evoluir para as formas agudas, subagudas, crônicas ou regressivas. Assim, é possível classificar os quadros clínicos dos cães em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (FEITOSA et al., 2000).

A forma assintomática encontrada em áreas endêmicas é caracterizada por sorologia positiva para leishmaniose sem nenhuma alteração clínica, passando pela forma oligossintomática, caracterizada por sorologia positiva e presença de sinais inespecíficos como febre, linfadenopatia, perda de peso, hepatomegalia e/ou esplenomegalia de pequeno grau, até a forma clássica ou sintomática, que é a doença plenamente manifesta por hepatomegalia, febre intermitente, lesões de pele não pruriginosas, caracterizados por úlceras, nódulos, pústulas locais ou generalizadas, letargia, alopecia, onicogrifose, linfadenomegalia, anorexia, perda de peso, glomerulopatia, lesões oculares (ceratoconjuntivite), epistaxe, com grande

comprometimento do estado geral (FEITOSA et al., 2000; ALMEIDA et al., 2005; LINHARES et al., 2005; BRASIL, 2006).

O diagnóstico da LVC pode ser realizado de várias formas, dentre as quais destacam-se: características clínicas (FEITOSA et al., 2000); exames imunológicos, como Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI); exames parasitológicos diretos com pesquisa do protozoário em esfregaço de material biológico; e mais recentemente, métodos moleculares como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) (BRASIL, 2006).

O diagnóstico clínico da LVC é difícil devido à grande variedade de sintomas clínicos. Alguns sinais podem ocorrer de forma semelhante ou concomitante com outras doenças infecciosas ou linfoproliferativas. A suspeita clínica da infecção é mais facilmente levantada quando o animal apresenta simultaneamente vários sinais, mas quando há envolvimento de apenas um sistema ou quando ocorrem lesões atípicas ou incomuns, o diagnóstico torna-se difícil, daí a necessidade da realização dos testes laboratoriais (AGUIAR et al., 2007).

Os testes imunológicos usam promastigotas ou proteínas solúveis do parasito como fonte de antígeno, o que pode limitar a especificidade do teste e/ou aumentar os problemas com a produção de preparações antigênicas padrões. A sorologia mostra que os animais infectados desenvolvem uma resposta específica de anticorpos, e a proporção de soroconversão entre animais com infecção clínica ou subclínica é desconhecida. Em relação à sorologia, animais saudáveis podem ser soropositivos, e animais infectados ocasionalmente tornam-se soronegativos, dificultando o uso destas técnicas (CABRAL, 2006).

A RIFI e o ELISA são as técnicas recomendadas pelo Ministério da Saúde para a avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários. O ELISA é ainda recomendado para a triagem de cães sorologicamente negativos, e a RIFI para a confirmação dos cães sororreagentes ao teste de ELISA ou como uma técnica diagnóstica de rotina (BRASIL, 2006).

O único kit ELISA comercializado, o ELISA/S7®, tem como base um peptídeo recombinante, produzido por engenharia genética, permitindo, segundo o fabricante, a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção. O emprego

desse antígeno no kit para o diagnóstico da LVC confere aproximadamente 95% especificidade e sensibilidade ao teste (BIOGENE, 2007).

A RIFI tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico de várias doenças parasitárias e é um dos testes recomendados pelo Ministério da Saúde para ser utilizado em inquéritos caninos para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em soros de cães (BIO-MANGUINHOS, 2007). Vantagens como facilidade na execução, rapidez e baixos custos são fatores que reforçam sua utilização nos inquéritos (ALVES & BEVILACQUA, 2004).

Os resultados da RIFI normalmente são expressos em diluições, sendo reagentes os títulos iguais ou superiores a 1:40. A RIFI apesar de ser menos sensível que o ELISA é o método mais utilizado no Brasil, considerado “padrão-ouro” pelo Ministério da Saúde (CABRAL, 2006).

Segundo alguns autores, as principais entidades clínicas que podem ser confundidas na sorologia com a LVC são a Leishmaniose Tegumentar, Doença de Chagas (BRASIL, 2006), Tripanossomíase (TRONCARELLI et al., 2008) e Sarna Demodécica (LIRA, 2005). Em muitas situações, o diagnóstico diferencial só pode ser concluído por provas laboratoriais, já que em algumas áreas do território brasileiro essas doenças se superpõem (BRASIL, 2007).

A demonstração do parasito ou exame parasitológico direto, tanto em esfregaços de material obtido por punções hepáticas, linfáticas, esplênicas e de medula óssea, quanto em biópsia ou escarificação de pele, para realização do *Imprint*, possui 100% de especificidade, uma vez que a presença de uma só amastigota é suficiente para determinar a positividade do exame, o que faz com que seja considerado por TAVARES et al. (2003) como um dos melhores exames a serem utilizados. Já a sensibilidade é dependente do grau de parasitemia, tipo de material biológico colheitado e tempo de leitura da lâmina, estando em torno de 80% para cães sintomáticos e algo menor para cães assintomáticos (BRASIL, 2006).

As lâminas devem estar limpas e desengorduradas. Após secagem, o esfregaço ou *imprint* deve ser fixado em álcool metílico e corado pelo Giemsa ou, alternativamente, Wright, Leishman ou Diff-quick todas elas essencialmente colorações de Romanovsky. O encontro das formas amastigotas do parasito é

diretamente proporcional à qualidade do material, à experiência do microscopista e ao número de campos observados. Portanto é necessário que a lâmina seja exaustivamente examinada, antes de ser considerada negativa (DA SILVA et al., 2005).

O fato de que o exame parasitológico direto está limitado pela baixa sensibilidade, também é inviabilizado pela demora se realizado em grande escala. Além disso, os métodos imunológicos podem falhar na distinção entre infecções passadas ou atuais, sendo inapropriados para avaliar a infecção em pacientes imunocomprometidos e em locais onde algumas doenças que possuem resposta imunológica semelhante se superpõem. Desta forma diversos pesquisadores vêm desenvolvendo métodos moleculares visando à detecção do DNA do parasito e a técnica de PCR tem demonstrado alta sensibilidade acoplada à especificidade (OMS, 2005).

A PCR é uma técnica molecular simples que provou ser mais específica e sensível do que os outros métodos de diagnósticos convencionais. Diversos estudos demonstraram ser possível detectar parasitos algumas semanas antes de aparecerem os sintomas clínicos, além da facilidade de se utilizar qualquer amostra biológica (OTERO et al., 2000; GANNAVARAM et al., 2004; MARTÍN-SANCHES et al., 2004).

Um diagnóstico acurado de LVC pode ser extremamente difícil, e só deve ser estabelecido após cuidadoso exame físico, e uma associação de exames sorológicos, parasitológicos e moleculares (ALVAR et al., 2004; FERRER, 1999). O diagnóstico puramente clínico torna-se impossível, primeiro porque mais de 50% dos animais soropositivos para a doença são assintomáticos, e segundo porque os sinais clínicos, quando presentes, podem ser confundidos com outras doenças (GRADONI, 2002).

A LV é amplamente difundida, ocorrendo na Ásia, na Europa, na África e nas Américas (WHO, 1990). É uma doença endêmica em 65 países, com registro anual de mais de 90% dos 500 mil casos novos concentrados na Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh e Brasil. Nas Américas 90% dos casos humanos de LV têm sido registrados no Brasil (DESJEUX, 2004).

No Brasil, as doenças consideradas prioritárias e cujo controle é realizado na maioria das Unidades da Federação são: malária, doença de Chagas, esquistossomose, leishmaniose e febre amarela. Ainda recebem atenção especial a peste, filariose, bócio endêmico e dengue (PEREIRA, 1995). Segundo o Ministério da Saúde a LV encontra-se entre as endemias prioritárias no mundo, sendo que no período de 1995 a 2002, a média anual de casos no Brasil foi de 3.156 casos, e a incidência de dois casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2006).

A princípio, a LV era uma doença de ambiente silvestre ou rural, no entanto, têm sido observadas alterações nesta característica epidemiológica, fundamentalmente por modificações sócio-ambientais, como o desmatamento, que reduziu a disponibilidade de animais como fonte de alimentação para o vetor biológico, colocando-lhe o cão e o homem como alternativas mais acessíveis. O processo migratório trouxe para a periferia das cidades populações humana e canina originárias de áreas rurais onde a doença é endêmica. Este processo, intensificado desde a década de 80, teve início em meados do século XX, época em que poucos casos foram registrados em área urbana (BRASIL, 2006).

O comportamento epidemiológico da LV é cíclico, com aumento no número de casos a cada cinco anos. No Brasil, a LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função de sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro Oeste e Sudeste. Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos registrados de LV ocorreram na região Nordeste. Inicialmente, esta relativa endemia apresentou um padrão de transmissão eminentemente rural e na medida em que a doença se expandiu para as outras regiões atingiu preferencialmente áreas peri-urbanas, esta situação vem se modificando e a região Nordeste já apresenta 67% dos casos do país (OMS, 2006).

A progressão do processo endêmico-zoonótico vem se fazendo de modo progressivo de cidade a cidade, acompanhando as rodovias, em consequência do aumento da mobilidade das populações, atingindo cidades de porte médio e até grandes metrópoles, inclusive chegando aos bairros bem consolidados dos centros urbanos, constituindo novos circuitos urbanos integrados de produção da doença (OMS, 2006).

A transmissão tem sido descrita em vários municípios de todas as regiões do Brasil, exceto na Região Sul. Inicialmente restrita a ambientes rurais e periurbanos, a LV tem atualmente, incidência em grandes centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), São Luís (MA), Natal (RN), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba, Piracicaba e Bauru (SP), Aracaju (SE), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Jequié (BA), Campo Grande (MS), Montes Claros (MG), Várzea Grande (MT), Fortaleza (CE), Brasília (DF), entre outros (ROCHA et al., 1991; ALVES & BEVILACQUA, 2004; BRASIL, 2006; PBH, 2007; COSTA, 2008).

O conhecimento sobre a distribuição territorial da leishmaniose visceral está ainda centrado na localização dos casos humanos conhecidos, o que certamente é muito insatisfatório para descrever o processo de espacialização de uma zoonose. Em muitas áreas onde não são registrados casos humanos confirmados pode estar ocorrendo problemas com o diagnóstico, por acesso inadequado aos serviços de saúde, por falta de informação da doença ou por dificuldade em se realizar os procedimentos indicados para a confirmação clínico-laboratorial (OMS, 2005).

Tendo em vista as dificuldades de controle da doença, a metodologia proposta para a vigilância e adoção de medidas, baseia-se em uma melhor definição das áreas de transmissão ou de risco. O novo enfoque do Plano de Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde (PCLV-MS) é o de incorporar os estados e municípios silenciosos, ou seja, sem ocorrência de casos humanos ou caninos da doença, nas ações de vigilância da mesma, visando assim evitar ou minimizar os problemas referentes a este agravamento em áreas sem transmissão. Nas áreas com transmissão de LV, após estratificação epidemiológica, as medidas de controle serão distintas e adequadas para cada área a ser trabalhada, entretanto, é de fundamental importância que as medidas usualmente empregadas no controle da doença sejam realizadas de forma integrada, para que possam ser efetivas (BRASIL, 2006).

Segundo dados obtidos do Sistema de Informações de Agravos de Notificação/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (Sinan/SVS/MS), no período de 2000 a 2008, foram notificados 28.792 casos de LVH

no Brasil, sendo 234 destes no estado de Goiás (Tabela 1). É importante ressaltar que são resultados sujeitos à revisão, podendo haver duplicidades de casos (BRASIL, 2009).

TABELA 1 - Casos confirmados de Leishmaniose Visceral Humana (LVH), segundo UF de residência. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2008**.

ANO	N. casos de LVC		
	Brasil*	Goiás*	%
2000	4.858	44	0,90
2001	2.549	18	0,70
2002	2.450	17	0,69
2003	2.971	28	0,94
2004	3.580	28	0,78
2005	3.597	26	0,72
2006	3.651	32	0,87
2007	3.505	23	0,65
2008	1.631	18	1,10
TOTAL	28.792	234	7,35

** banco com duplicidades;

*Dados preliminares sujeito à revisão

FONTE: Sinan/SVS/MS - atualizado em 07/10/08

Em Goiás até o momento, a região do nordeste goiano tinha o maior número de casos, porém, após quatro registros da doença em Pirenópolis-GO, dos quais foram a óbito uma criança de três meses e outra de quatro anos, essa região passou a chamar a atenção. Principalmente porque o número de casos é alto em relação à população. Apesar dos casos, de acordo com a Secretaria de Estado da Saúde (SES) a doença não se caracteriza como epidemia neste estado (BRASIL, 2009).

De acordo com o PCLV-MS a capital do estado de Goiás, Goiânia, não se enquadra como área de transmissão da LV ou LVC. No entanto, a mesma é classificada como “área vulnerável”, tendo em vista o fluxo migratório intenso, fazendo parte de um eixo viário comum de áreas com casos autóctones, como Pirenópolis – GO, Brasília - DF, entre outros (BRASIL, 2006).

No município de Goiânia, o primeiro caso registrado de LVC, com confirmação laboratorial, foi realizado no ano de 2005, em um cão procedente de Fortaleza – CE, onde a doença apresenta caráter endêmico (LINHARES et al., 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo investigar laboratorialmente possíveis casos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em cães errantes, sintomáticos e assintomáticos para a enfermidade, capturados pelo Departamento de Controle de Zoonoses de Goiânia - Goiás (DCZ – GO) e em cães atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (HV/EV/UFG) com suspeitas clínicas da doença e assim auxiliar a Superintendência de Políticas de Atenção Integral a Saúde / Secretaria de Estado da Saúde de Goiás (Spais/SES-GO) e o Departamento de Controle de Zoonoses de Goiânia (DCZ-GO) na vigilância epidemiológica da doença neste município.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a frequência de anticorpos anti-*Leishmania (L.) chagasi* em cães atendidos no HV/EV/UFG com suspeita clínica da doença e cães errantes capturados pelo DCZ-GO, utilizando as técnicas sorológicas (ELISA e RIFI).
- Demonstrar a frequência de cães portadores de infecções cutâneas e linfáticas por *Leishmania (L.) chagasi*, pelas técnicas de detecção direta do parasito (microscopia direta e PCR) em cães errantes capturados pelo DCZ-GO e em cães com suspeita da doença atendidos no HV/ EV/ UFG.
- Comparar qualitativa e quantitativamente os métodos empregados no diagnóstico da LVC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e período da experimentação

Os espécimes clínicos foram obtidos no Departamento de Controle de Zoonoses de Goiânia (DCZ-GO), e no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (HV/ EV/ UFG) no período de 04 de fevereiro a 12 de dezembro de 2008.

As amostras foram processadas no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Parasitárias da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (LDDP/ EV/ UFG).

4.2 Animais utilizados na experimentação

Foram constituídos três grupos: Grupo 1 (GI), composto por 33 cães que apresentavam no mínimo três sinais clínicos sugestivos para LVC, capturados pelo DCZ-GO; Grupo (GII), composto por 141 cães clinicamente hígidos capturados pelo DCZ-GO e Grupo 3 (GIII) formado por 40 cães atendidos no HV/ EV/ UFG com suspeita clínica de LVC.

Os sinais clínicos considerados sugestivos de LVC foram: alopecia, conjuntivite, onicogribose, dermatopatias em geral, edema de membros, linfadenopatia, alteração de mucosa (hipocorada), caquexia, entre outros (BRASIL, 2006; AGUIAR, 2007).

4.3 Colheita do material

Os animais foram submetidos ao exame clínico, constando de inspeção de pele e fâneros além da palpação abdominal e dos gânglios linfáticos regionais e preenchimento de uma ficha pra armazenamento dos dados (Anexo 1). Em seguida, os animais foram contidos com mordança de nylon adequadas para cada porte, para

os procedimentos de colheita dos materiais: sangue, fragmentos de pele auricular íntegra e linfonodos e punções de linfonodos.

4.3.1 Sangue

A colheita de sangue foi realizada por venipunção jugular ou cefálica, utilizando-se solução de álcool iodado para anti-sepsia, agulhas descartáveis (0,70 x 25) e seringas descartáveis de cinco mL.

Foram colheitados, três mL de sangue venoso, e transferidos para tubo estéril, sem EDTA e identificado com ficha clínica do animal. Esses tubos foram estocados em caixas isotérmicas durante o transporte ao LDDP/ EV/ UFG para obtenção do soro no mesmo dia. O soro foi transferido para tubo do tipo *eppendorf*, identificado e armazenado a -20°C até a realização dos exames laboratoriais indiretos: ELISA e RIFI.

4.3.2 Fragmentos de pele

Nos animais atendidos no HV/ EV/ UFG realizou-se anestesia local com lidocaína a dois por cento sem vasoconstritor até a dose máxima de sete mg/Kg. Após a extração do fragmento, a ferida cirúrgica foi cauterizada e embebida em solução de Iodopovidona tópico (PVPI tópico 10%, Vansil).

Nos animais do DCZ-GO, os fragmentos foram obtidos após a eutanásia, a qual era realizada diariamente pela instituição.

Após tricotomia e anti-sepsia com álcool iodado de toda a fenda intertragal, com pele íntegra, utilizando uma lâmina de bisturi e uma pinça dente de rato para cada animal, foram obtidos dois fragmentos de pele com cerca de 0,3 x 0,3 cm. Os fragmentos foram armazenados em tubos do tipo *eppendorf*, estéreis e identificados. Estes foram conservados em caixa térmica com gelo químico durante o transporte ao LDDP/ EV/ UFG. Um tubo foi armazenado a -20°C até a realização da PCR e o outro utilizado na preparação de *imprint* em lâmina de microscopia, identificada, para realização de exame parasitológico direto no mesmo dia.

4.3.3 Fragmentos e punções de linfonodo

Fragmentos de linfonodos foram obtidos apenas dos animais capturados pelo DCZ-GO após eutanásia realizada diariamente pela Instituição.

Após eutanásia, foi realizada tricotomia de toda a região poplítea e anti-sepsia com álcool iodado. Com auxílio de uma pinça dente de rato e lâmina de bisturi, para cada animal, foram obtidos dois fragmentos de linfonodo poplíteo com cerca de 0,5 x 0,3 cm. Estes foram armazenados em tubos do tipo *eppendorf*, identificados e conservados em caixa térmica com gelo químico durante o transporte ao LDDP/ EV/ UFG onde um tubo foi armazenado a -20°C para posterior realização da PCR e o outro tubo utilizado, no mesmo dia, para preparação de *imprint* em lâmina de microscopia identificada para realização do parasitológico direto.

As punções foram realizadas apenas nos animais atendidos no HV/ EV/ UFG com suspeita clínica de um médico veterinário para LVC.

Após tricotomia e anti-sepsia com álcool iodado em toda região poplítea, a área a ser puncionada foi delimitada e fixada manualmente para a realização da citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), que foi executada com uma agulha hipodérmica descartável (0,70 x 25) e uma seringa de 10 mL descartável acoplada (COWELL, 1999). Dessa forma foram realizadas duas punções simultâneas.

Após a agulha ser descartada da seringa, o êmbolo repuxado e a agulha acoplada a seringa, o material da primeira punção era despejado e armazenado em tubo do tipo *eppendorf*, identificado e conservado em caixa isotérmica contendo gelo químico durante o transporte ao LDDP /EV /UFG, onde foi armazenado a -20°C para posterior realização dos exames PCR.

O material da segunda punção foi depositado em lâminas de microscopia desengorduradas e identificadas, e distribuído nesta com ajuda de outra lâmina no formato de *squashes* para realização de exame parasitológico direto.

4.4 Exames laboratoriais

Em todos os animais foram realizados: exames por técnicas indiretas (ELISA e RIFI) e diretas (parasitológico direto de pele e linfonodo). A PCR Gênero-específico foi realizada para todos os animais pertencentes aos grupos GI e GIII e nos animais do GII positivos ou indeterminados em alguns dos exames anteriores. Os animais positivos pela técnica da PCR Gênero-específico foram submetidos à PCR Espécie-específico.

4.4.1 Exames indiretos (ELISA e RIFI)

Em todas as reações foram incluídos soros controles positivos e negativos para *Leishmania* sp. procedentes do Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP-Jaboticabal, gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado.

4.4.1.1 Ensaio Imuno-enzimático (ELISA)

As amostras de soro armazenadas a -20°C foram submetidas ao teste sorológico ELISA, utilizando os “kits” para diagnóstico de leishmaniose canina do laboratório Biogene (ELISA/S7[®], Biogene Indústria e Comércio Ltda – lote: 04/08).

A reação de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é baseada no reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos fixados em um suporte plástico. Este reconhecimento é revelado através de uma proteína conjugada a uma enzima (Peroxidase) permitindo a visualização da reação.

Os testes foram realizados conforme instruções do fabricante (Anexo 2). Foi utilizada leitora da marca BIOTEK ELX800 para leitura das placas.

Foram consideradas positivas as amostras de soro que tiveram as densidades ópticas acima do Ponto de Corte, que foi calculado conforme orientação do fabricante.

4.4.1.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Foram utilizadas lâminas de vidro contendo 12 poços com substrato constituído por promastigotas de *Leishmania chagasi*, procedentes do Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP-Jaboticabal.

O protocolo utilizado foi o preconizado por OLIVEIRA et al. (2008). Os soros foram descongelados e diluídos inicialmente a 1:40. Cerca de 10 µL de cada amostra diluída foi colocada em cada poço da lâmina e esta incubada a 37°C, por 30 minutos. As lâminas foram lavadas três vezes em PBS, secas e incubadas com o conjugado anti-cão (KPL, USA) diluído a 1:30 em PBS contendo 1 mg% de Azul de Evans. Foram novamente lavadas em PBS, montadas com glicerina tamponada e lamínula e observadas em microscópio equipado com luz fluorescente (AXIOVERT 40 CFL, HBO 50/AC, CARL ZEISS).

Para amostras de soros positivos, o parasito exibiu uma luz verde-clara de toda a sua periferia e de seu citoplasma e foram considerados positivos amostras com diluição 1:40 ou maior.

4.4.2 Exames diretos

4.4.2.1 Exame parasitológico direto

Os fragmentos de linfonodos e pele e as punções de linfonodos de todos os animais foram utilizadas para o preparo de *imprints* e *squashes*, visando pesquisa e identificação de macrófagos infectados por formas amastigotas intracitoplasmáticas, com morfologia típica compatível com parasitos do gênero *Leishmania*, conforme descrito por LEVINE (1983). O material confeccionado em lâminas de microscopia foi fixado pelo metanol e corado por 25 minutos em solução corante Giemsa (Merck), diluído em tampão fosfato de Sorensen.

As lâminas foram lidas em microscópio óptico, binocular (Olympus- UBI30-2 JAPAN), utilizando-se a objetiva de imersão. Todo o campo microscópico foi

percorrido em trajeto zig-zag com o objetivo de evidenciar formas amastigostas de *Leishmania*.

4.4.2.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

4.4.2.2.1 Gênero-específico

Realizada no material colheitado dos animais pertencentes ao GI, GIII e naqueles animais do GII que foram positivos em algum exame de triagem previamente descrito.

A extração de DNA foi procedida a partir do fragmento auricular, da punção do linfonodo poplíteo e do fragmento do linfonodo poplíteo de todos os animais dos GI e GIII. Os espécimes clínicos dos animais pertencentes ao GII só foram submetidos ao PCR quando o animal foi positivo ou indeterminado em algum exame laboratorial anterior, conforme sugestão de alguns autores (ASSIS et al., 2008; BRASIL, 2006; DOURADO et al., 2007).

Esses espécimes clínicos foram submetidos ao processo de extração de DNA por meio de *kit* comercial (*GE Healthcare®*). As etapas de extração foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, estabelecendo-se o volume final de 100 µL para a execução do processo em todas as amostras.

O eluato obtido no final da extração foi armazenado a -20°C, em tubos do tipo *ependorf* de 0,2 mL, em alíquotas de 25 µL.

A preparação do *mix* das reações gênero-específicas da PCR e as condições de amplificação foram realizadas conforme BULLE et al. (2002), empregando-se os iniciadores A2/B1 de 650 pb. Foi, portanto, estabelecido o volume de 50 µL para o *mix* de reação, composto por 35,75 µL de água ultra pura (*DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen*), 5 µL de Tampão para PCR 10 X (*PCR buffer 10 X Invitrogen*), 2,0 µL de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) 50 mM (*Invitrogen*); 1 µL de dNTP 10 mM (*Amersham Biosciences*); 0,5 µL (10 pM) do iniciador *foward*, 0,5 µL (10 pM) do iniciador *reverse*, 0,25 µL de Taq 5 U/µL (*Invitrogen*) e 5 µL do DNA genômico da amostra.

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (*Mastercycler Personal, Eppendorf*) programado para um ciclo inicial (*hot start*) de 94 °C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos repetidos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 53°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão). A programação era finalizada com 1 minuto A 72°C para maximizar o processo de extensão.

Nos testes foram incluídos controles positivo e negativo. Como controle de especificidade foram usadas amostras de referência do DNA genômico de *L. chagasi* procedentes do Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP-Jaboticabal e do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG (IPTSP-UFG).

Como controle negativo foi utilizada água ultra pura esterilizada (*DNase/RNase-Free Destilled Water, Invitrogen*).

Os produtos de DNA amplificado (*amplicons*) foram posteriormente inoculados em gel de agarose 1,5% (Agarose NA – *Amersham Biosciences*) em tampão TBE 1x.

Volume de 10 µL dos produtos de PCR, homogeneizados em 2,5 µL de corante de corrida (25% Ficoll 400, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol em 9 partes de glicerol) foram inoculados em cada poço do gel. Como marcador de massa molecular foi empregado o *DNA Ladder 100 pb (Invitrogen)*.

As eletroforeses foram conduzidas em cuba (*Horizon 11.14, Life Technologies*) ligada à fonte (250 EX, *Gibco EBRL*), programada para corrida a 90 V, durante 60 minutos.

Após as corridas os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,4 µgI/mL) por 10 minutos e descorados em água destilada por 5 minutos. A visualização foi feita pela utilização de aparelho transiluminador de UV (*Electronic UV Transilluminator, Ultra-Lum*), em ambiente escuro.

A documentação fotográfica dos resultados das eletroforeses foi efetivada em equipamento fotodocumentador de géis (*Vilber Lourmat*) e as imagens armazenadas em arquivos digitais no formato JPG por meio de *software* processador de imagens (*PhotoCapt, Viber lourmat*).

4.4.2.2 Espécie-específico

Realizada em todas as amostras de animais positivos na reação de PCR Gênero-específico.

A preparação do *mix* das reações espécie-específicos de PCR e as condições de amplificação foram realizadas conforme FICHOUX et al. (1999), empregando-se os iniciadores RV1/RV2 de 145 pb. Foi, portanto, estabelecido o volume de 50 µL para o *mix* de reação, composto por 35,75 µL de água ultra pura (*DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen*), 5 µL de Tampão para PCR 10 X (*PCR buffer 10 X Invitrogen*), 2,0 µL de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) 50 mM (*Invitrogen*); 1 µL de dNTP 10 mM (*Amersham Biosciences*); 0,5 µL (10 pM) do iniciador *forward*, 0,5 µL (10 pM) do iniciador *reverse*, 0,25 µL de Taq 5 U/µL (*Invitrogen*) e 5 µL do DNA genômico da amostra.

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (*Mastercycler Personal, Eppendorf*) programado para um ciclo inicial (*hot start*) de 94°C por 4 minutos, seguido por 40 ciclos repetidos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 59°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão). A programação era finalizada com 10 minutos a 72°C para maximizar o processo de extensão.

Nos testes foram incluídos controles positivo e negativo. Como controle de especificidade foram usadas amostras de referência do DNA genômico de *L. chagasi* procedentes do Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP-Jaboticabal e do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG (IPTSP-UFG).

Como controle negativo foi utilizada água ultra pura esterilizada (*DNase/RNase-Free Destilled Water, Invitrogen*).

Os produtos de DNA amplificado (*amplicons*) foram posteriormente inoculados em gel de agarose 1,5% (Agarose NA – *Amersham Biosciences*) em tampão TBE 1x.

Volume de 10 µL dos produtos de PCR, homogeneizados em 2,5 µL de corante de corrida (25% Ficoll 400, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol

em 9 partes de glicerol) foram inoculados em cada poço do gel. Como marcador de massa molecular foi empregado o *DNA Ladder 100 pb (Invitrogen)*.

As eletroforeses foram conduzidas em cuba (*Horizon 11.14, Life Technologies*) ligada à fonte (*250 EX, Gibco EBRL*), programada para corrida a 90 V, durante 60 minutos.

Após as corridas os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,4 µg/mL) por 10 minutos e descorados em água destilada por 5 minutos. A visualização foi feita pela utilização de aparelho transiluminador de UV (*Electronic UV Transilluminator, Ultra-Lum*), em ambiente escuro.

A documentação fotográfica dos resultados das eletroforeses foi efetivada em equipamento fotodocumentador de géis (*Vilber Lourmat*) e as imagens armazenadas em arquivos digitais no formato JPG por meio de *software* processador de imagens (*PhotoCapt, Viber lourmat*).

4.5 Análise estatística dos resultados

Os resultados dos exames laboratoriais foram organizados em tabelas para serem utilizadas como banco de dados na análise estatística.

A intensidade da concordância entre os diferentes métodos de diagnóstico foi analisada utilizando-se a medida Kappa (SIEGEL & CASTELLAN, 1988) que é baseada no número de resultados concordantes, ou seja, no número de vezes cujo resultado é o mesmo entre os diferentes métodos.

Os resultados obtidos pelos diferentes métodos de diagnóstico (ELISA, RIFI, parasitológico direto de pele, parasitológico direto de linfonodo, PCR genérico de pele e PCR genérico de linfonodo) foram comparados dois a dois para a avaliação da intensidade de concordância, pela ferramenta de cálculo matemático desenvolvido e disponibilizado na internet pelo Laboratório de Epidemiologia e Estatística – LEE da Faculdade de Medicina da USP (<http://www.lee.dante.br/pesquisa/kappa/index.html>).

Os resultados da análise estatística de concordância foram interpretados conforme sugerido por LANDIS & KOCH (1977) (Quadro 2), considerando-se um intervalo de 95% de confiança.

Os resultados classificados como “indeterminados” pelo teste de ELISA foram considerados negativos nesta análise.

TABELA 2 - Interpretações para a intensidade de concordância entre diferentes métodos de diagnóstico em função dos valores obtidos pelo teste Kappa.

Valores de Kappa	Interpretação
< 0	Não há concordância
0 - 0,19	Concordância fraca
0,20 – 0,39	Concordância regular
0,40 – 0,59	Concordância moderada
0,60 – 0,79	Concordância substancial
0,80 – 1,00	Concordância quase perfeita

FONTE: LANDIS & KOCH, G. G. (1977)

Para valores de Kappa iguais a 1,0 adotou-se o termo “concordância perfeita” para sua interpretação.

5. RESULTADOS

Da amostragem total de 214 cães submetidos ao presente estudo 87 animais foram sintomáticos e/ou positivos em pelo menos um dos testes sorológicos (ELISA ou RIFI) ou exame direto.

A frequência de animais classificados como positivos dentre 214 avaliados, aos diferentes métodos de diagnóstico empregados neste estudo foram 5,6% (n=12) ao teste de ELISA; 9,35% (n=20) à RIFI; 2,80% (n=6) ao exame parasitológico direto de *imprints* de pele; 2,34% (n=5) ao exame parasitológico direto de linfonodo; e 3,17% (n=7) para as reações da PCR, tanto pelo protocolo gênero-específico quanto para *L. chagasi*-específico (Tabela 3).

TABELA 3 - Frequência absoluta e relativa de cães positivos, em uma amostra total de 214, dentro de cada grupo avaliado, nos diferentes exames laboratoriais (ELISA, RIFI, Parasitológico direto de pele e linfonodo, PCR gênero e espécie-específico de pele e linfonodo). Goiânia, 2009.

Método de diagnóstico	GI (Nº)	GII (Nº)	GIII (Nº)	Nº. cães positivos	(%)
ELISA	2	5	5	12	5,60
RIFI	4	8	8	20	9,35
Paras. Dir. pele	1	1	4	6	2,80
Paras. Dir. linf.	1	1	3	5	2,34
PCR.G de pele	2	1	4	7	3,27
PCR.G de linf.	2	1	4	7	3,27
PCR.E de pele	2	1	4	7	3,27
PCR.E de linf.	22	1	4	7	3,27

Entre os animais com sorologia positiva para LVC (ELISA e/ou RIFI), sete apresentaram resultado positivo pelo exame direto confirmatório (PCR e/ou parasitológico).

Os principais sinais clínicos observados nos animais positivos para a doença foram conjuntivite, linfadenopatia, alterações dermatológicas (alopecia, descamação, lesões ulcerativas, crostas, formações nodulares ou pustulares), caquexia e onicogrifose (Figura 1).



FIGURA 1 – Alterações clínicas observadas nos animais com LVC.

A: conjuntivite (cão n°.39), B: conjuntivite com alopecia peri-ocular (cão n°.115), C: linfadenopatia (cão n°.115), D: onicogrifose (cão n°.11), E e F: alterações dermatológicas(E: cão n°.11 e F: cão n°.39).

Todas as amostras de DNA destes sete animais (pele e linfonodo) apresentaram resultados positivos aos testes de PCR gênero específico para *Leishmania* sp. e espécie específico para *Leishmania chagasi*. Portanto houve concordância entre os dois protocolos utilizados e os resultados referentes aos ensaios espécie-específicos foram conclusivos para confirmar a identidade molecular de *L. chagasi* nos animais do presente estudo (Tabela 4).

Três destes sete cães correspondiam a animais capturados pela DCZ-GO, sendo dois pertencentes ao GI (animais com pelo menos três sinais clínicos sugestivos da enfermidade) e um ao GII (cl clinicamente hígidos). Os outros quatro casos positivos correspondiam a cães atendidos no HV/EV/UFG, com suspeita clínica da doença (Tabela 4). Destes últimos, dois eram provenientes do município de Caldas Novas - GO (cães de nº. 1 e 2), um do município Novo Brasil- GO (cão de nº. 39) e o outro de Belo Horizonte-MG (cão de nº. 11). Portanto, nenhum dos cães positivos, atendidos no HV/EV/UFG era domiciliado no município de Goiânia.

Desses sete animais positivos ao teste de PCR, três foram positivos no teste de ELISA e os demais tiveram resultados classificados como indeterminados (Tabela 4). Outros nove animais foram igualmente positivos ao ELISA, perfazendo um total de 12/214 (5,6%) reagentes ao teste em toda a população estudada (Tabela 3 e 4).

Todos os animais positivos a PCR (n=7) foram soropositivos à RIFI, com títulos a partir de 1:40 (Tabela 4). A maior titulação observada entre estes animais foi de 1:640 (Figura 2). Por este método sorológico, além destes sete cães, também foram reagentes outros 13 animais, somando assim um total de 20/214 (9,34%) animais na detecção de anticorpos fluorescentes anti-*Leishmania* (Tabela 3 e 4).

TABELA 4 – Resultados laboratoriais dos animais positivos em exame direto ou indireto para LVC, conforme o número do animal e os exames laboratoriais (ELISA, RIFI, P.D.Linf. e Pele, PCR Genérico e Específico).

Grupo	Nº do animal	ELISA	RIFI	P.D.		PCR Genérico		PCR Específico	
				Pele	Linf.	Pele	Linf.	Pele	Linf.
GI	115	Indet.	1:40	+	+	+	+	+	+
GI	161	+	1:40	-	-	-	-	-	-
GI	233	+	1:160	-	-	+	+	+	+
GI	239	+	1:40	-	-	-	-	-	-
GII	130	-	1:40	-	-	-	-	-	-
GII	141	+	1:80	+	+	+	+	+	+
GII	151	+	1:40	-	-	-	-	-	-
GII	152	+	1:40	-	-	-	-	-	-
GII	162	Indet.	1:40	-	-	-	-	-	-
GII	189	+	-	-	-	-	-	-	-
GII	220	-	1:40	-	-	-	-	-	-
GII	241	+	1:40	-	-	-	-	-	-
GII	242	Indet.	1:40	-	-	-	-	-	-
GIII	1	Indet.	1:640	+	+	+	+	+	+
GIII	2	Indet.	1:320	+	+	+	+	+	+
GIII	5	Indet.	1:40	-	-	-	-	-	-
GIII	11	Indet.	1:80	+	+	+	+	+	+
GIII	12	Indet.	1:40	-	-	-	-	-	-
GIII	23	+	-	-	-	-	-	-	-
GIII	32	+	1:40	-	-	-	-	-	-
GIII	35	-	1:40	-	-	-	-	-	-
GIII	38	+	-	-	-	-	-	-	-
GIII	39	+	1:160	+	-	+	+	+	+
Total	---	12	20	6	5	7	7	7	7

+: animal positivo no exame; Indet.: animal indeterminado no exame; -: animal negativo no exame; P.D.: Parasitológico direto

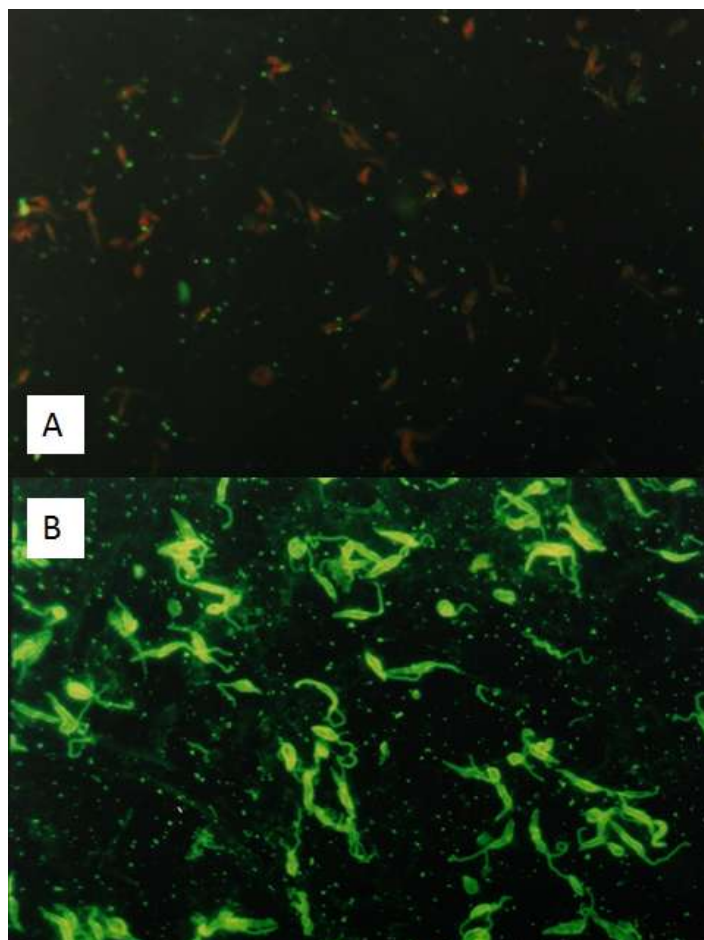


FIGURA 2 – Reação de Imunofluorescência Indireta com antígenos de promastigotas de *Leishmania chagasi*. Visualização em microscópio equipado com luz fluorescente. A: Controle negativo; B: Reação positiva do cão nº 1.

Ao exame parasitológico direto (PD) de “*imprints*” de pele, seis entre os sete animais positivos pela PCR apresentaram formas de amastigotas típicas de *Leishmania*, conforme descritas por LEVINE (1983), observadas tanto no citoplasma de células fagocitárias, como no espaço extracelular. Ainda, por este mesmo método de diagnóstico, em apenas cinco destes animais foram detectadas formas amastigotas quando as amostras analisadas eram de linfonodos (Tabela 4 e Figura 3).

Nenhum resultado de exame parasitológico direto foi positivo em amostras de cães PCR-negativos.

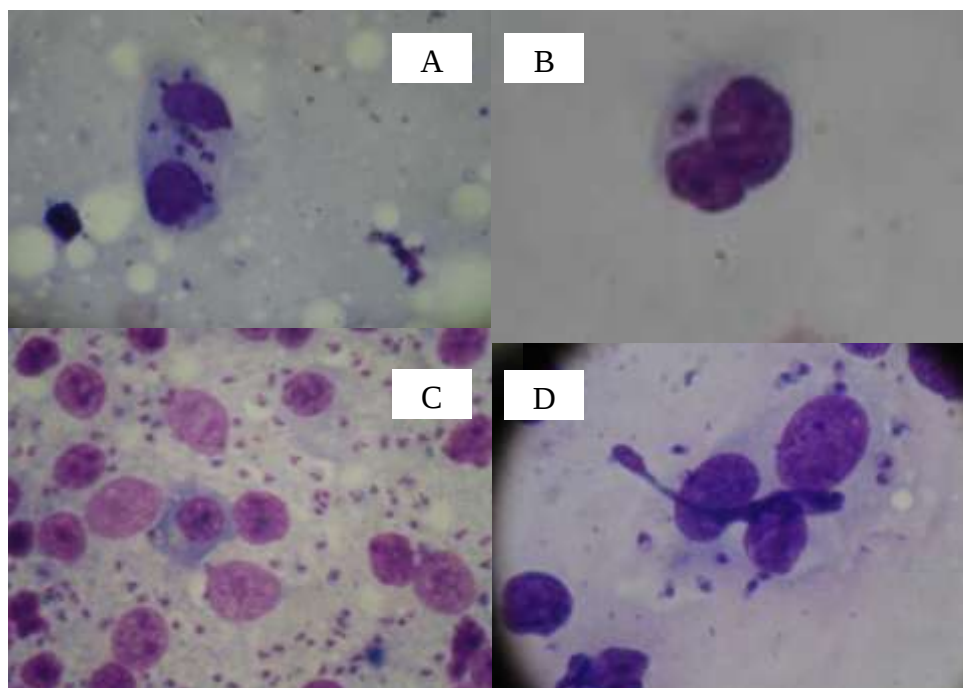


FIGURA 3 - Formas amastigotas de *Leishmania* observadas nos exames parasitológicos de pele e linfonodo. A: pele do cão nº.1, B: pele do cão nº.2; C: linfonodo do cão nº. 11 e D: linfonodo do cão nº. 115.

Do total de 73 animais sintomáticos, apenas seis (8,22%) foram positivos aos testes da PCR, para ambos protocolos empregados (gênero e espécie-específicos). Dentre os 141 animais assintomáticos somente um (0,71%) foi positivo nas PCRs (Tabela 5).

O teste de ELISA reconheceu sete (9,59%) cães positivos entre os 73 sintomáticos e cinco (3,55%) entre os 141 assintomáticos. Os resultados sorológicos realizados pela técnica de RIFI indicaram doze (16,44%) positivos entre os 73 sintomáticos e oito (5,67%) entre os 141 animais assintomáticos (Tabela 6).

Entre os sintomáticos, o exame parasitológico direto detectou amastigotas em amostras de *imprints* de pele de cinco (6,84%) cães e em apenas quatro amostras de linfonodo (5,47%). Com relação aos animais assintomáticos apenas uma (0,7%) amostra de pele e uma de linfonodo foram positivas (Tabela 5).

TABELA 5 - Resultados dos exames diretos (parasitológicos diretos – pele e linfonodo e PCR gênero específico e espécie-específico) em amostras de pele e de linfonodo, colhidas de cães, distribuídos nos diferentes grupos avaliados neste estudo. Goiânia, 2009.

GRUPO	Nº de animais	SC	Pele/PD		Linf./PD		PCR G-E		PCR E-E
			Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
G1	33	S	1	32	1	32	2	31	2
G2	141	A	1	140	1	140	1	13	1
G 3	40	S	4	36	3	37	4	36	4
TOTAL	214	----	6	208	5	209	7	80	7

S.C.: Sinais Clínicos; S: Sintomático; A: Assintomático; PD: exame parasitológico direto; Linf.: linfonodo.

TABELA 6 - Resultados dos testes indiretos (ELISA e RIFI) realizados em amostras de soro sanguíneo de cães, distribuídos nos diferentes grupos avaliados neste estudo. Goiânia, 2009.

GRUPO	S.C.	Nº de animais	ELISA		RIFI	
			Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
GI	S	33	2	31	4	29
GII	A	141	5	136	8	133
G III	S	40	5	35	8	32
TOTAL	----	214	12	202	20	194

S.C.: Sinais Clínicos; S: Sintomático; A: Assintomático

Nas reações da PCR, realizadas com o par de oligonucleotídeos A2/B1 (gênero-específico) foram observadas, tanto com o DNA controle positivo como no DNA das demais amostras positivas, amplificações do fragmento-alvo gênero-específico de 650 pb dos minicírculos do kDNA de *Leishmania* sp., conforme previsto, com base no método de referência empregado (BULLE et al., 2002) (Figuras 4 e 5).

De mesma forma, as amplificações obtidas pelos testes de PCR espécie-específicos, empregando os iniciadores RV1/RV2, geraram os produtos esperados de 145 pb, correspondentes aos minicírculos de kDNA de *L. chagasi*, como previamente descrito por FICHOUX et al. (1999) (Figura 6).

Nenhum produto de amplificação inespecífico foi observado nas PCR (Figuras 4, 5 e 6).

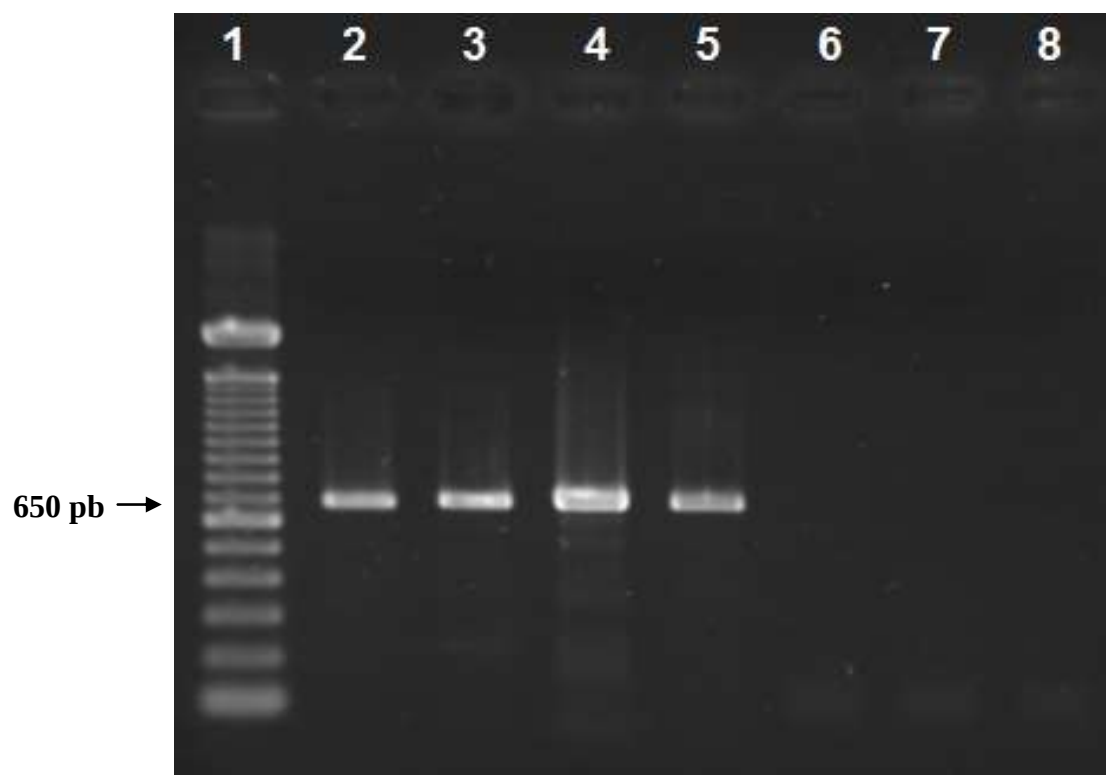


FIGURA 4 - Eletroforese de produtos de PCR de 650 pb de *Leishmania* obtidos a partir de DNA extraído de pele íntegra de cães com suspeita clínica de Calazar, procedentes de Goiânia, Goiás. 1: marcador de 100pb; 2: controle positivo; 3, 4 e 5: resultados positivos referentes às amostras dos cães de números 1, 2 e 115, respectivamente; 6: amostra negativa referente ao cão número 13; 7: DNA de cão livre de infecção; 8: controle negativo.

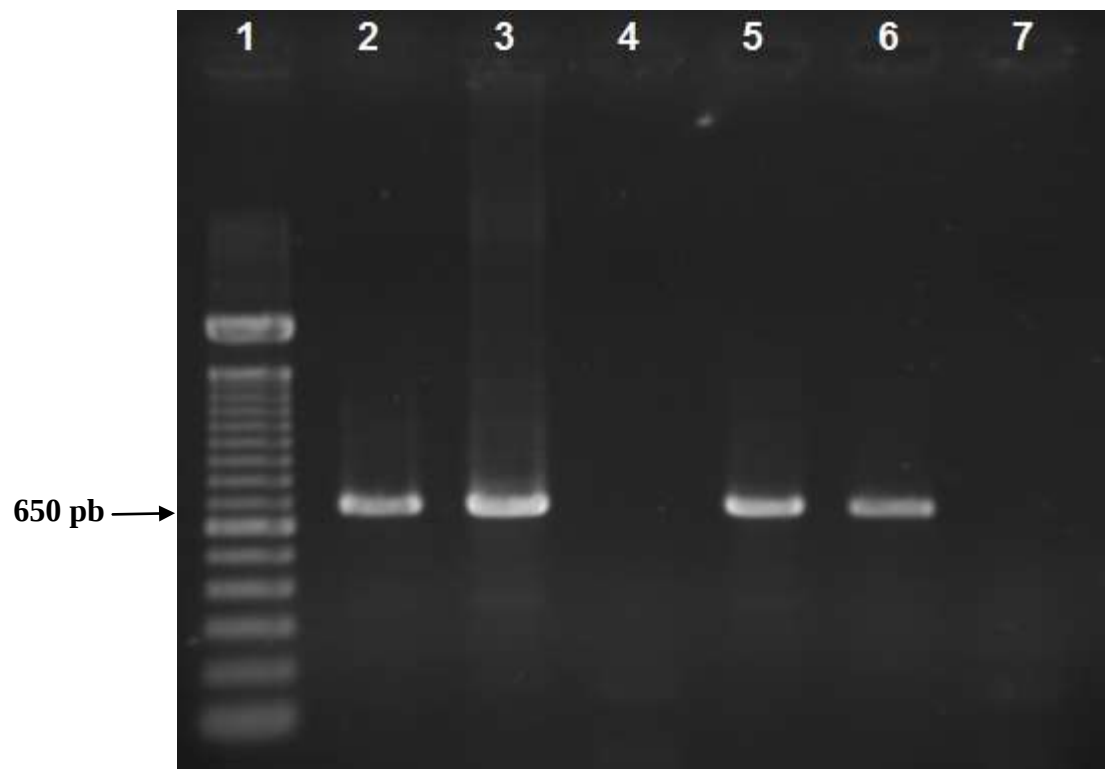


FIGURA 5 - Eletroforese de produtos de PCR de 650 pb de *Leishmania* obtidos a partir de DNA extraído de linfonodo de cães com suspeita clínica de Calazar, procedentes de Goiânia, Goiás. 1: marcador de 100pb; 2: controle positivo; 3, 5 e 6: resultados positivos referente às amostras dos cães de números 11, 39 e 141, respectivamente; 4: amostra negativa referente ao cão número 230; 7: controle negativo.

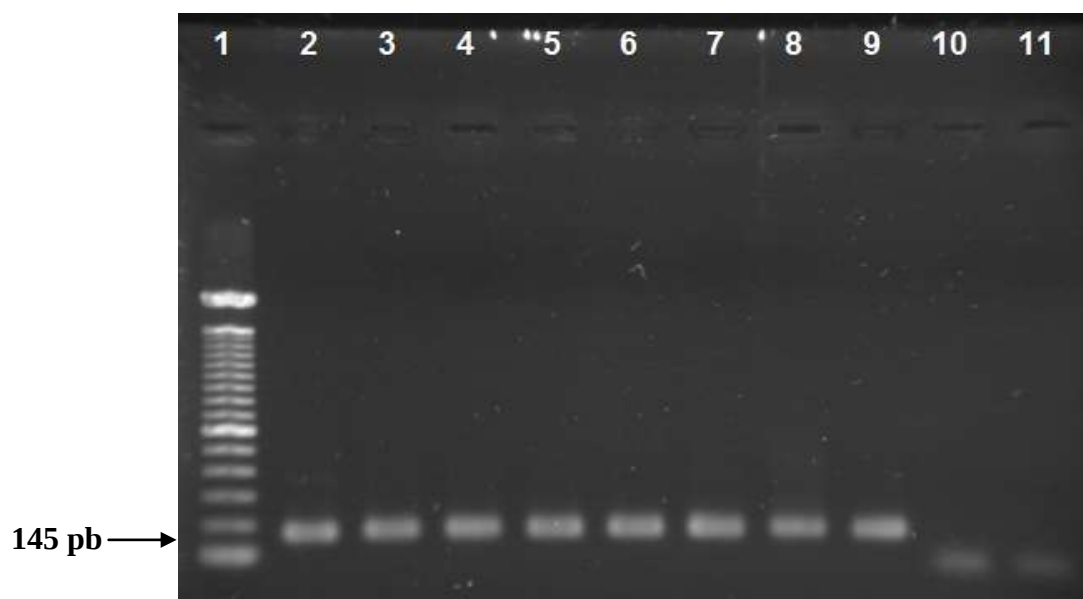


FIGURA 6- Eletroforese de produtos de amplificação por PCR com o par de oligonucleotídeos (RV1/RV2) específico para o fragmento de 145 pb dos minicírculos do kDNA de *Leishmania chagasi*: 1: marcador molecular de 100pb; 2: controle positivo para *L. chagasi*; 3 a 9: isolados dos cães de números 01, 02, 11, 39, 115, 141 e 233, respectivamente; 10: controle negativo; 11: DNA de cão livre de infecção.

Análise Estatística

Os valores de Kappa, calculados pela análise estatística, apontou variada intensidade de concordância entre os diferentes métodos de diagnóstico empregados no estudo.

A interpretação destes valores, conforme LANDIS & KOCH (1977), conduziu à seguinte classificação (Tabela 7) para a relação de concordância entre os métodos de diagnóstico empregados

TABELA 7 – Valores do Kappa entre os diferentes métodos de diagnóstico empregados no estudo

Valor do Kappa	Classificação	Associação de testes
-0,032	Não concordância	ELISA e PD Linf
0,093	Concordância fraca	ELISA e PD Pele
0,155	Concordância fraca	ELISA e PCR Pele
0,155	Concordância fraca	ELISA e PCR Linf
0,377	Concordância regular	RIFI e PD Linf
0,431	Concordância moderada	ELISA e RIFI
0,437	Concordância moderada	RIFI e PD Pele
0,453	Concordância moderada	RIFI e PCR Pele
0,453	Concordância moderada	RIFI e PCR Linf
0,907	Concordância quase perfeita	PD Pele e PD Linf
0,917	Concordância quase perfeita	PD Pele e PCR Pele
0,917	Concordância quase perfeita	PD Pele e PCR Linf
0,821	Concordância quase perfeita	PD Linf e PCR Pele
0,821	Concordância quase perfeita	PD Linf e PCR Linf
1,0	Concordância perfeita	PCR Pele e PCR Linf

6. DISCUSSÃO

O município de Goiânia caracteriza-se, conforme definição das autoridades competentes em saúde pública BRASIL (2006), por “área silenciosa”, uma vez que não há registro de casos autóctones ou transmissão de LV humana ou canina. Com base em outro critério, o município de Goiânia pode ainda ser classificado como “área vulnerável”, pois o mesmo está sujeito, permanentemente, a um fluxo migratório intenso e faz parte de eixos viários comuns a municípios ou regiões endêmicas.

O fato de as capturas dos cães pelo DCZ-GO terem sido realizadas em áreas correspondentes ao município de Goiânia, por si só, não comprova o domicílio dos animais, uma vez que estes animais poderiam ter sido trazidos de outras regiões e posteriormente evadidos ou abandonados dentro do município de Goiânia. Por este motivo não foi possível tirar conclusões sobre a autoctonia destes três casos de LVC, confirmados pelo teste de PCR. Já, com relação aos animais atendidos no HV-EV e que apresentaram teste de PCR positivo para *L. chagasi*, dois tinham domicílio no município de Caldas Novas-GO, um em Novo Brasil-GO e outro Belo Horizonte-MG, portanto nenhum domiciliado em Goiânia.

Os resultados alcançados neste estudo representam uma contribuição para sustentar e reafirmar a condição de “área vulnerável” para a situação epidemiológica atual do município de Goiânia. Da mesma forma, apesar dos casos positivos detectados, não foi possível alterar a situação de “área silenciosa”, já conhecida anteriormente ao presente trabalho.

Os sinais clínicos mais evidentes, observados em seis dos sete cães detectados como portadores de *L. chagasi* pelo teste de PCR, foram conjuntivite, linfadenopatia, alterações dermatológicas (alopecia, descamação, lesões ulcerativas, crostas, formações nodulares ou pustulares), caquexia e a onicogribose. Estas apresentações são, normalmente, apontadas por diversos autores como frequentes em cães com LVC, na sua forma sintomática (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003; COSTA VAL, 2004; FERRER, 2002; BRASIL, 2006). A ausência de sinais clínicos foi observada em um animal. Este achado pode ser

sustentado com base em informações registradas na literatura, que estimam em torno de 50% a 60% de casos assintomáticos da doença (ALVAR et al., 2004; FERRER, 1999; GRADONI, 2002).

Considerando que os métodos de diagnóstico sorológicos para leishmaniose, podem apresentar resultados falso-positivos (ALVES & BEVILACQUA, 2004; MARCONDES et al., 2003; BRASIL, 2009; LIRA, 2005; COSTA, 2007; ASSIS et al., 2008) e que os métodos de diagnóstico direto têm como uma de suas principais características a especificidade, foram considerados os resultados destes últimos (PD e PCR) para efeito de interpretações quanto à situação epidemiológica da LVC.

Alguns estudos onde os pesquisadores utilizavam um modelo matemático desenvolvido para a transmissão LV, estes sugeriram baixos ou mesmo ausência de infecciosidade para os animais assintomáticos, atribuindo nenhuma importância ao papel destes cães na transmissão desta enfermidade (LANOTTE et al., 1979; HASIBEDER et al. 1992). No entanto, estudos novos, têm mostrado que estes animais são importantes fontes de *Leishmania* para os vetores (SHERLOCK, 1996; TRAVI et al., 2001). Em outro estudo, mais recente, foi confirmado que os animais assintomáticos e oligossintomáticos são capazes de infectar os flebotomíneos e que esta capacidade pode estar sendo subestimada por alguns autores (MICHALSKY et al., 2007).

Dos 214 animais avaliados neste estudo, nove de 12 cães positivos no ELISA não foram positivos na PCR e o mesmo aconteceu com 13 de 20 animais positivos na RIFI. Estes resultados de soro positividade sem confirmação parasitológica em animais sintomáticos no presente estudo são equivalentes aos achados de outros autores para outras áreas geográficas (PINELLI, et al., 1994; INIESTA et al., 2002; REITHINGER et al., 2003 e RIERAA et al., 2004).

De fato os testes sorológicos utilizados para diagnóstico da infecção podem apresentar tanto resultados falso-positivos, em cães saudáveis que entraram em contato com o parasito, quanto falso-negativos, em cães afetados, não responsivos ou seja, não detectando-se anticorpos (BONATES, 2003). Reações cruzadas podem dever-se à existência de determinantes antigênicos e de proteínas comuns a

parasitos como *Tripanossoma cruzi*, outras *Leishmanias*, *Demodex canis* entre outros (ALVES et al., 1998; GOMES & CORDEIRO, 2004; SAVANI et al., 2003; LIRA, 2005; TRONCARELLI et al., 2008).

As reações sorológicas são bem sucedidas na detecção desta enfermidade, mas a baixa resposta humoral que pode ocorrer nos indivíduos assintomáticos, coloca seus níveis de anticorpos abaixo do ponto de corte (*cut-off*) ou no seu limite de detecção (RIERAA et al., 2004; LIRA, 2005; OMS, 2005), o que justifica três dos sete cães na faixa de indeterminação no ELISA.

Os resultados dos exames parasitológicos diretos indicam que a pele auricular íntegra foi mais adequada para o diagnóstico da LVC, uma vez que formas amastigotas intracitoplasmáticas, com morfologia típica e compatível com parasitos do gênero *Leishmania* (LEVINE, 1983) foram detectadas em seis animais, encontrando-se o parasito em cinco quando utilizado as amostras de linfonodo poplíteo. Desta forma, nossos resultados divergem dos achados de MOREIRA et al. (2007), os quais afirmam ser o linfonodo o melhor órgão para se realizar o diagnóstico etiológico.

Um assunto ainda muito polêmico é a eliminação de cães sororreagentes. Apesar de resultados sorológicos serem determinantes para eutanásia dos animais (BRASIL, 2006), em áreas onde há sobreposição de doenças que possuem reação cruzada com a LVC, esses resultados têm valor limitado, uma vez que as estratégias de controle são diferenciadas para esses cães (PALATNIK-DE-SOUSA, et al., 2001; TRONCARELLI et al., 2008). Daí a importância da realização da confirmação etiológica antes da eliminação do animal.

O ensaio da PCR utilizado foi selecionado baseado em critérios de sensibilidade, especificidade e simplicidade. Uma característica fundamental foi à possibilidade de identificar o produto de DNA pela observação visual, sem a necessidade de hibridização, que tornaria o processo mais complexo (RODGERS et al., 1990).

Entre os métodos de diagnóstico direto, a PCR mostrou-se mais sensível, uma vez que foi capaz de detectar infecção por *Leishmania*, não detectável pelo método parasitológico convencional, em um dos animais. A duração, constância, e a

intensidade da parasitemia no hospedeiro canino ainda não são totalmente conhecidas, no entanto, há estudos que indicam que a proporção de cães assintomáticos portadores de LVC possa ser mais elevada do que se admitia anteriormente (QUINNELL et al., 2001, SOLANO-GALLEG0 et al., 2001).

A PCR foi essencial para elucidar os animais realmente portadores da LVC. Entretanto, para a sua realização são necessários equipamentos sofisticados, pessoas bem treinadas, principalmente para evitar a contaminações de amostras, pois a técnica é capaz de detectar mínimas quantidades de DNA do parasito (LACHAUD et al., 2002).

Os movimentos migratórios do homem com seus animais, associados às alterações ambientais são fatores importantes na disseminação geográfica de certas doenças (BRASIL, 2006) o que talvez possa ter favorecido a introdução de cães errantes com LVC, entretanto, não foram feitos maiores estudos nesse sentido.

Os resultados apresentados demonstram pela primeira vez a presença de *Leishmania chagasi* em cães errantes capturados pelo DCZ-GO, caso autóctone canino em Caldas Novas – GO e Novo Brasil - GO sinalizam a importância de estudos relacionados à fauna flebotomínica local, assim como a avaliação de outros cães, constituindo um alerta para vigilância epidemiológica, devendo ser considerada nas estratégias de controle da LVC.

Este trabalho é pioneiro na investigação da Leishmaniose Visceral Canina no município de Goiânia, Goiás. Outros trabalhos devem ser conduzidos continuamente, visando à investigação sistemática da doença neste e em outros municípios do estado. A pesquisa científica, realizada em parceria com os órgãos atuantes em saúde pública, assim como a divulgação de seus resultados são fundamentais à compreensão das ocorrências epidemiológicas e tomadas de decisão quanto ao controle da leishmaniose visceral, doença que anualmente acomete milhares de pacientes humanos e caninos no Brasil.

Por conseguinte não foi possível confirmar nenhum caso autóctone entre os animais testados, uma vez que, entre os sete cães com PCR positivo para *L. chagasi*, nenhum teve domicílio comprovado em Goiânia, apesar de três desses terem sido capturados dentro da área do município.

7. CONCLUSÕES

Considerando os resultados alcançados e as condições em que foi realizado o presente estudo, conclui-se que:

- Há casuística de Leishmaniose Visceral Canina em cães sintomáticos ou assintomáticos, que buscam atendimento clínico-ambulatorial na cidade de Goiânia;
- Existe ocorrência de portador de infecção por *Leishmania chagasi* entre cães vadios capturados no município de Goiânia;
- Os testes de diagnóstico ELISA e RIFI apresentam resultados apenas moderadamente concordantes para o diagnóstico sorológico da LVC;
- Os exames parasitológicos e PCR conduzidos a partir de amostras de pele e linfonodo apresentam resultados equivalentes para o diagnóstico da LVC.

REFERÊNCIAS

- 1- AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, S. O.; PINHEIRO, A. A.; BITTENCOURT, D. V. V.; COSTA, R. L. G.; JULIÃO, F. S.; SANTOS, W. L. C.; BARROUIN-MELO, S. M. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.8, n.4, p. 283-294, out/dez, 2007.

- 2- ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUZA-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*. **Veterinary Parasitology**. v. 127, n.3-4, p. 227-232, 2005.

- 3- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**. v. 57, p. 1-87, 2004.

- 4- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro. v. 20, n.11, p.259-265, 2004.

- 5- AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRÍGUEZ F.; TESOURO M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal Epidemiology**. v. 18, n. 2, p. 147-156, 2003.

- 6- ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G, P.; BUZETTI, W. A. S.; NEVES, M. F.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S. Diagnóstico por RIFI e PCR de Leishmaniose Visceral em cães sintomáticos e oligossintomáticos. **Veterinária e Zootecnia**. v.15, n.2, supl.1, p.61, 2008.

- 7- BARBOSA DE DEUS, R.; MARES GUIA, M. L.; NUNES, A. Z.; COSTA, K. M.; JUNQUEIRA, R. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; TAVARES, C. A. P. Leishmania major-like antigen for specific and sensitive soro diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.9, n.6, p.1361-1366, 2002.
- 8- BIOGENE. Kit para o diagnóstico do Calazar canino. [on line]: Recife, 2007. Disponível em: <http://www.biogene.ind.br/index.php?pag=produtos>. Acesso em: 05 de set.2007.
- 9- BIO-MANGUINHOS. **Imunofluorescência Indireta (IFI) – Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**. [online]: Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: www.bio.fiocruz.br. Acesso em: 01 jun.2007.
- 10- BONATES, A. Leishmaniose visceral (Calazar). **Vet News**, Rio de Janeiro, v.61, p.4-5, 2003.
- 11- BRAGA, M. D. M.; COELHO, I. C. B.; POMPEU, M. M. L.; EVANS, T.G.; MACAULLIFE, I. T.; TEIXEIRA, M. J.; LIMA, J. W. O. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com o outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.31, n.5, p.419-424, 1998.
- 12- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA EM SAÚDE, **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Ed. MS, Brasília – DF, 2006, 122p.
- 13- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Guia de Vigilância Epidemiológica**, Ed. MS, Brasília – DF, 2005, 806p.

14- BRASIL, AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. Testes para leishmaniose canina têm melhor eficácia se usados em conjunto. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=131&sid=9&tpl=printerview> Acesso em: 12 de jun 2009.

15- BRASIL, [on line] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/CASOS_CONF_2008LV.pdf Acesso em: 12 de abr.2009.

16- BRASIL, [on line] Disponível em: <http://www.saude.gov.br/index.php?idMateria=4754>, Acesso em: 10 de mai.2009.

17- BULLE, B.; MILLON, L.; BART, J. M.; GÁLLEGO, M.; GAMBARELLI, F.; PORTÚS, M.; SCHNUR, L.; JAFFE, C. L.; FERNANDEZ-BARREDO, S.; ALUNDA, J. M.; PIARROUX, R.; Practical approach for typing of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p.3391-3397, 2002.

18- CABRAL, A. W. D. Estudo comparativo entre o diagnóstico por técnicas sorológicas e da PCR para a detecção de *Leishmania spp.*. Dissertação de Mestrado. **Universidade Estadual de São Paulo. UNESP**. Instituto de Biociências, Botucatu, 2007, 56p.

19- COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**. v.24, n.12, p.2959-2963, 2008.

20- COSTA, M. V. S. Avaliação comparativa por ensaios imunoenzimáticos de antígenos solúvel e recombinantes para sorodiagnóstico em cães sintomáticos e assintomáticos infectados com *Leishmania infantum*. **Instituto Oswaldo Cruz**. Ciências Biomédicas, Rio de Janeiro, 2007, 68p.

- 21- COSTA VAL, A. P. Tratamento da Leishmaniose Visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas. 2004. 125p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - **Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2004.
- 22- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v.27, n.5, p. 305-318, 2004.
- 23- FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba- São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**. n.28, p.36-44, 2000.
- 24- FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: AN UPDATE, 1., 1999, Barcelona. **Proceedings of the international canine leishmaniasis forum**. Barcelona, p. 6-10, 1999.
- 25- FERRER, L. M. The pathology of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. *Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum*. Sevilha, p. 21-24, 2002.
- 26- FICHOUX, Y. L.; QUARANTA, J. F.; AUFEUVRE, J. P.; LELIEVRE, A.; MARTY, P.; SUFFIA, I.; ROUSSEAU, D.; KUBAR, J. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, n.6, p.1953-1957, 1999.
- 27- FILHO, G. M. Segredos da Estatística: *pesquisa científica*. - Filho, Gercino Monteiro . Goiânia: Vieira, 2004.

- 28- GANNAVARAM, S.; ANSARI, N. A.; KATARIA, J.; SALOTRA, P. Nested PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in slit aspirates from post-kalazar dermal leishmaniasis lesions. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, p.1777-1778, 2004.
- 29- GOMES, A. P. S.; CORDEIRO, R. L. R. Reação cruzada no diagnóstico sorológico de leishmaniose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, supl.1, p.238, 2004.
- 30- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.
- 31- GRADONI, L. Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe. In: Proceedings International Canine Leishmaniasis Forum. **CANINE LEISHMANIASIS: an update**. Barcelona, Hoechst Roussel Veterinary, Barcelona. p. 32-39, 1999.
- 32- GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. **Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum**. Sevilha, p. 7-14, 2002.
- 33- HASIBEDER, G.; DYE, C.; CARPENTER, J. Mathematical modeling and theory for estimating the basic reproduction number of canine leishmaniasis. **Parasitology**. v.105, p.43–53, 1992.
- 34- INIESTA, L.; FERNANDEZ-BARREDO, S.; BULLE, B.; GOMEZ, M. T.; PIARROUX, R.; GALLEGRO, M.; ALUNDA, J. M.; PORTUS, M. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, n.9, p.1137–1141, 2002.

- 35- LACHAUD, L.; DEREURE, J.; CHABBERT, E.; REYNES, J.; MAUBOUSSIN, J. M.; OZIOL, E.; DEDET, J.P.; BASTIEN, P. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, p. 236-240, 2000.

- 36- LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of Six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40 p. 210-215, 2002.

- 37- LANDIS, J.R., KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. v.33, p.159-174, 1977.

- 38- LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. Ecologie des leishmaniasés dans le sud de la France¹⁰ Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. **Annales de parasitologie humaine et comparée**. v.54, p.277–279, 1979.

- 39- LEVINE, N. D. ***Tratado de parasitologia veterinária***. Editorial Acribia, 1983. 271 p.

- 40- LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; DUARTE, S. C.; FERNANDES, P. R.; AMARAL, A. V. C.; SOUZA, M. A. Relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.34, cap.1, p.69-72, jan./abr. 2005.

- 41- LIRA, R. A. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-manguinhos. Dissertação de Mestrado em Saúde

Pública, **Fundação Oswaldo Cruz**, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Departamento de Saúde Coletiva, Recife, 2005, 87p.

42- MARCONDES, C. B.; PIRMEZ, C.; SILVA, E. S.; LAURENTINO-SILVA, V.; STEINDEL, M.; SANTOS, A. J.; SMANIOTTO, H.; SILVA, C. F. B.; SCHUCK NETO, V. F.; DONETTO, A. Levantamento de leishmaniose visceral em cães de Santa Maria e municípios próximos, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, n.4, p.499-501, 2003.

43- MARTIN-SANCHEZ J.; PINEDA, J. A.; MORILLAS-MARQUEZ, F.; GARCÍA-GARCÍA, J. A.; ACEDO, C.; MACÍAS, J. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.70, p. 545-548, 2004.

44- MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; LIMA, A. C. V. M. R.; A-SILVA, J. C. F.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**. v., p.67-76, 2007.

45- MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**. v.145, p.245–252, 2007.

46- OLIVEIRA, A. G.; FALCÃO, A. L.; BRAZIL, R. P. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Campo Grande, MS, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v.34, n.6, p.654-655, 2000.

47- OLIVEIRA, T. M. F. DE S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D. DE; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania sp.*, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.17, n.1, p. 7-11, 2008.

48- OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em Las Américas. Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas. **Organização Panamericana de la Salud**. Ed. Panaftosa. Rio de Janeiro, 2006, 152p.

49- OTERO, A. C.; DA SILVA, V. O.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. Occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, p.128-131, 2000.

50- PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRAÇA-SILVA, J. C.; 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. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.65, n.5, p.510-515, 2001.

51- PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. **Portal Internet - Leishmaniose Visceral**. Disponível em: <http://portal1.pbh.gov.br>. Acesso em: 19 de mar.2007.

52- PEREIRA, M. G. **Epidemiologia: teoria e prática**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, 583p.

53- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally

and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, n.62, p.229-35, 1994.

54- QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; SHAW, M. A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**. v. 122, p. 253–261, 2001.

55- REITHINGER, R.; ESPINOZA, J. C.; COURTENAY, O.; DAVIES, C. R. Evaluation of PCR as a Diagnostic Mass- Screening Tool to Detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in Domestic Dogs (*Canis Familiaris*). **Journal of Clinical Microbiology**, p.1486–1493, 2003.

56- RIERAA, C.; FISA, R.; UDINA, M.; GALLEGU, M.; PORTUS, M.. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n.98, p.102-110, 2004

57- ROCHA, F. A.; OLIVEIRA, M. F.; NOGUEIRA, N. A. P.; FREITAS, C. E. J. Estudo epidemiológico dos casos de Leishmaniose visceral (Calazar) registrados no Hospital Sao Jose, de 1980 a 1990 em Fortaleza-Ceara / Epidemiological study of *Leishmania* visceral cases occurred on Sao Jose Hospital, Fortaleza, Ceara. **Revista brasileira de análises clínicas**. v.23, n.3, p.87-92, 1991.

58- RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**. v.71, n.3, p.267-275, 1990.

60- SANTOS, S. O.; ARIAS, J. R.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A. MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *cruzi* as a vector of

American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**. v.12, p.315-317, 1998.

61- SAVANI, E. S. M. M.; SCHIMONSKY, B.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**. v.37, n.2, p.260-262, 2003.

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

63- SIEGEL S, CASTELLAN N. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1988. p 284-285.

64- 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. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, p.560–563, 2001.

65- TAVARES, C. A.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N.; Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Review Molecular Diagnosis**, v.3, n.5, p.657-667, 2003.

66- THRUSFIELD M. V. **Veterinary epidemiology**. 2nd edition. Blackwell Science, Oxford, England. 1995, 479p.

67- TRAVI, B.L.; TABARES, C.J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitological status and infectivity for sand flies. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**. v.64, p.119–124, 2001.

68- TRONCARELLI, M. Z.; MACHADO, J. G.; CAMARGO, L. B.'HOFFMANN, J. L.; CAMOSSI, L.; GRECA, H.; FACCIOLI, P. Y.; LANGONI, H. Associação entre

resultados sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e de tripanossomíase canina, pela técnica de imunofluorescência indireta. **Veterinária e Zootecnia**. v.15, n.1, p.39-46, 2008.

69- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Leishmaniasis. **Technical report series**. v.793, p.50-52, 1990.

ANEXOS

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
PROJETO DE PEQUISA

Data: ____/____/____ Cão nº: _____

ANAMNESE GERAL

Raça : _____ Cor: _____ Peso: _____ Sexo: () M () F

Idade: () Filhote () Adulto () Idoso Ectoscopia: _____

Estado de hidratação: _____ Mucosas: _____

Temperatura Corporal: _____ Freq. Cardíaca: _____

Freq. Respiratória: _____ Padrão Respiratório: _____

EXAME CLÍNICO

Linfonodos e massas subcutâneas: _____

Pele e Anexos

Presença de lesões: () Sim () Não

() Localizada (até 3 locais) () Generalizada (mais que 3 locais)

Principais locais: _____

Contaminação secundária: () Sim () Não

Alopecia: () Sim () Não / Hiperemia: () Sim () Não / Prurido: () Sim () Não

Presença de crostas: () Sim () Não / Característica: _____

Presença de tecido necrosado () Sim () Não / Local (is): _____

Onicogribose: () Sim () Não

Outros: _____

Ht. %	ELISA	RIFI	P.D. Pele	P.D. Linf.	Esfreg. Sg.

Aluna: Elisa Maria Rennó Azevedo

Orientador: Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

ANEXO II

Critérios de Validação

As Densidades Ópticas (D.O.) dos controles **não reagentes** devem ser sempre inferiores a **0,100**. E as D.Os do controles **reagentes** devem ser sempre superiores a **0,300**.

Cálculo do Ponto de Corte

Calcular a média aritmética das D.Os. do soros não reagentes e somar ao fator **R = 0,142**. Para determinação da amplitude da zona cinza (faixa de indeterminados) subtrair do ponto de corte **0,03**.

Socorro Técnico

Em caso de dúvidas entrar em contato com o suporte no telefone (81) 8888.9072 ou por e-mail servio@biogene.ind.br.

Resp. Téc. Ana Cláudia Campos
Médica Veterinária CRMV - PE - 3201

Produzido e Fabricador por:

Biogene Indústria e Comércio Ltda ME

Rua Costa Sepúlveda, 749

Engenho do Meio - Recife - PE

CEP 50.730-260

CGC.: 69.951.234/0001-10

Insc. Est. : 18.2.001.0198256-0

Fone/Fax: 81 - 3453.2502 ou 8888.9072

E-mail: servio@biogene.ind.br

MAPA Licença n°. 7434/2000

Indústria Brasileira



Validade e data de fabricação na embalagem



Kit para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7®

Para uso veterinário

Descrição

A reação de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é baseada no reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos fixados em um suporte plástico. Este reconhecimento é revelado através de uma proteína conjugada a uma enzima (Peroxidase) permitindo a visualização da reação.

O ELISA/S7® tem como base um peptídeo recombinante, produzido por engenharia genética, que permite a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção. O emprego desse antígeno no kit para o diagnóstico do calazar canino - ELISA/S7® confere alta especificidade e sensibilidade ao teste, sendo único no mercado.

Apresentação

O kit é composto de uma placa de ELISA e de todos os reagentes necessários à realização de 96 reações.

Produto	Volume	Conservação
Solução de coleta	25 ml	- 20°C
Solução S7	10 ml	- 20°C
Soro controle reagente	10 µl	- 20°C
Soro controle não reagente	10 µl	- 20°C
Solução Citrato	10 ml	4°C
Conjugado (Ptn - A PO)	3 µl	4°C
Revelador (TMB)	100 µl	4°C
Água Oxigenada (H ₂ O ₂)	50 µl	4°C
Solução de lavagem (PBS 10x)	50 ml	4°C
Tween 20	200 µl	4°C
Solução de parada (H ₂ SO ₄ - 2N)	10 ml	T.A

A estabilidade de todos os reagentes é de seis meses

Observações

- Usar sempre luvas
- As lavagens devem ser feitas utilizando-se picetas, dirigindo-se o jato de tampão diretamente no fundo do poço.
- As soluções devem ser desprezadas invertendo-se a placa de uma só vez.
- Pode haver formação de cristais na Solução de Lavagem 10x. Neste caso é só proceder uma pequena agitação.
- É necessário um segundo soro controle não reagente (não fornecido no kit), para o cálculo do ponto de corte.

Procedimentos

1. Preparo dos tampões de lavagem

- O tampão de lavagem PBS está concentrado 10X. Diluir uma parte de PBS em nove partes de água destilada.
- Para o PBST é só acrescentar em uma parte do PBS 0,05% de Tween 20 (ex: para 400ml de PBS acrescentar 200µl de Tween).

2. Sensibilização e neutralização da placa

- Distribuir 100 µl por poço da solução S7 na placa.
- Incubar *overnight* à 4°C (geladeira) ou 4 horas em T.A.
- No dia seguinte desprezar a solução S7.
- Lavar 3 vezes com tampão PBST.
- Distribuir 100 µl por poço de uma solução composta de PBST + 2% de leite em pó desnatado.
- Incubar por 30 minutos a T.A.
- Após incubação desprezar a solução e lavar a placa duas vezes com PBST.

A placa sensibilizada e neutralizada pode ser utilizada imediatamente ou ser embalada seca em papel alumínio e estocada no freezer (- 20°C) por períodos de até 2 meses sem perda de suas características. No momento do uso deixar a placa descongelar por pelo menos 15 minutos a T.A.

3. Diluição dos soros

Os soros controles e amostras em testes devem ser diluídos em solução de coleta (1:100) e incubados por pelo menos 4 horas a T.A. ou 12 horas na geladeira (4°C).

O título da reação é de 1:100.

4. Realização dos testes

- Lavar a placa uma vez com tampão PBST.
- No primeiro poço (A1) colocar 100µl de PBST. Este é o branco para o leitor de ELISA (indispensável em alguns equipamentos).
- Distribuir 100µl de cada um dos soros controles, previamente diluídos, nos poços: B1 e D1 não reagente e C1 reagente.
- Distribuir 100µl por poço dos soros em teste, previamente diluídos.
- Incubar por 30 minutos a T.A.
- Lavar a placa 3 vezes com PBST.
- Distribuir 100µl por poço da solução do conjugado (Proteína - A PO). Esta solução deve ser preparada na hora diluindo 1µl do conjugado em 10ml de PBST. Descarte a sobra desta solução.
- Incubar por 30 minutos a T.A.
- Lavar a placa 3 vezes com PBS (sem o Tween 20).
- Distribuir 100µl por poço da solução de revelação. Esta solução também deve ser preparada na hora acrescentando em 10ml de Tampão Citrato 100µl de TMB e 50µl de Água Oxigenada.
- Incubar a placa por 20 minutos no escuro (ex.: dentro de uma gaveta).
- Acréscitar duas gotas da solução de parada.
- Efetuar a leitura em leitor de ELISA a $\lambda = 450$ nm.

- O ELISA/S7[®] também pode ser executado com amostras de sangue. Neste caso 250µl da solução de coleta deve ser distribuído em um tubo *eppendorff* e apenas 2 gotas de sangue (~30 µl) acrescentadas nesta solução.

- Nesta solução o sangue pode ser conservado por até 5 dias na geladeira (NÃO CONGELAR).

- As amostras de sangue podem ser centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos para que o coágulo seja totalmente separado da solução.

- Em caso de hemólise acentuada, após a centrifugação o sobrenadante deve ser transferido para um novo tubo e incubado por 20 minutos a 56°C (neutralização).

- O sobrenadante do tubo pode ser aplicado diretamente na placa para realização do teste. Neste caso, deve-se respeitar o período de incubação de pelo menos 4 horas em contato com a solução de coleta. A diluição deve ser feita acrescentando-se 25µl deste sobrenadante em 75µl de PBST (previamente colocado no poço).

ANEXO III

QUADRO 1 - Contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico laboratoriais ELISA e parasitológico direto de linfonodo, para leishmaniose visceral canina.

		Exame parasitológico direto de linfonodo		
		Pos	Neg	Total (n)
ELISA	Pos	0	10	10
	Neg	5	199	204
	Total (n)	5	209	214

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 2 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos de diagnóstico por ELISA e parasitológico direto de linfonodo.

Kappa geral	-0,032
P-valor geral	Não é interpretável e não se aplica teste de significância
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 0,094 inf: -0,158

QUADRO 3 - Contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico laboratoriais ELISA e parasitológico direto de pele, para leishmaniose visceral canina.

		Exame parasitológico direto de pele		
		Pos	Neg	Total (n)
ELISA	Pos	1	9	10
	Neg	5	199	204
	Total (n)	6	208	214

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 4 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos de diagnóstico por ELISA e parasitológico direto de pele.

Kappa geral	0,093
P-valor geral	0,158
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 0,223 inf: -0,036

QUADRO 5 - Contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico laboratoriais ELISA e PCR de pele, para leishmaniose visceral canina.

		PCR Pele		
		Pos	Neg	Total (n)
ELISA	Pos	2	8	10
	Neg	5	72	77
	Total (n)	7	80	87

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 6 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos de diagnóstico por ELISA e PCR de pele.

Kappa geral	0,155
P-valor geral	0,14
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 0,361 inf: -0,051

QUADRO 7 - Contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico laboratoriais ELISA e PCR de linfonodo, para leishmaniose visceral canina.

		PCR Linfonodo		
		Pos	Neg	Total (n)
ELISA	Pos	2	8	10
	Neg	5	72	77
	Total (n)	7	80	87

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 8 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos de diagnóstico por ELISA e PCR de linfonodo.

Kappa geral	0,155
P-valor geral	0,14
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 0,361 inf: -0,051

QUADRO 9 - Contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico laboratoriais RIFI e parasitológico direto de pele, para leishmaniose visceral canina.

		Exame parasitológico direto de pele		
		Pos	Neg	Total (n)
RIFI	Pos	6	14	20
	Neg	0	194	194
	Total (n)	6	208	214

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 10 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos de diagnóstico por RIFI e parasitológico direto de pele.

Kappa geral	0,437
P-valor geral	<0,001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 0,548 inf: 0,327

QUADRO 11 - Contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico laboratoriais RIFI e parasitológico direto de linfonodo, para leishmaniose visceral canina.

		Exame parasitológico direto de linfonodo		
		Pos	Neg	Total (n)
RIFI	Pos	5	15	20
	Neg	0	194	194
	Total (n)	5	209	214

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 12 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos de diagnóstico por RIFI e parasitológico direto de linfonodo.

Kappa geral	0,377
P-valor geral	<0,001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 0,481 inf: 0,272

QUADRO 13 - Contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico laboratoriais ELISA e RIFI, para leishmaniose visceral canina.

		RIFI		
		Pos	Neg	Total (n)
ELISA	Pos	7	3	10
	Neg	13	191	204
	Total (n)	20	194	214

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 14 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos de diagnóstico por ELISA e RIFI.

Kappa geral	0,431
P-valor geral	<0,001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 0,556 inf: 0,306

QUADRO 15 - Contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico laboratoriais RIFI e PCR de pele, para leishmaniose visceral canina.

		PCR de pele		
		Pos	Neg	Total (n)
RIFI	Pos	7	13	20
	Neg	0	67	67
	Total (n)	7	80	87

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 16 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos de diagnóstico por RIFI e PCR de pele.

Kappa geral	0,453
P-valor geral	<0,001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 0,629 inf: 0,277

QUADRO 17- Contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico laboratoriais RIFI e PCR de linfonodo, para leishmaniose visceral canina.

		PCR de linfonodo		
		Pos	Neg	Total (n)
RIFI	Pos	7	13	20
	Neg	0	67	67
	Total (n)	7	80	87

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 18 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos de diagnóstico por RIFI e PCR de linfonodo.

Kappa geral	0,453
P-valor geral	<0,001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 0,629 inf: 0,277

QUADRO 19 - Contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico parasitológico de pele e de linfonodo, para leishmaniose visceral canina.

		Exame parasitológico direto de linfonodo		
		Pos	Neg	Total (n)
Exame parasitológi co direto de pele	Pos	5	1	6
	Neg	0	208	208
	Total (n)	5	209	214

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 20 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos de diagnóstico parasitológico de pele e de linfonodo.

Kappa geral	0,907
P-valor geral	<0,001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 1,0 inf: 0,773

QUADRO 21 - Contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico parasitológico de pele e PCR de pele, para leishmaniose visceral canina.

		PCR de pele		
		Pos	Neg	Total (n)
Exame parasitológico direto de pele	Pos	6	0	6
	Neg	1	80	81
	Total (n)	7	80	87

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 22 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos de parasitológico de pele e PCR de pele.

Kappa geral	0,917
P-valor geral	<0,001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 1,0 inf: 0,707

QUADRO 23 - Tabela de contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico parasitológico de pele e PCR de linfonodo, para leishmaniose visceral canina.

		PCR de linfonodo		
		Pos	Neg	Total (n)
Exame parasitológico direto de pele	Pos	6	0	6
	Neg	1	80	81
	Total (n)	7	80	87

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 24 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos de parasitológico de pele e PCR de linfonodo.

Kappa geral	0,917
P-valor geral	<0,001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 1,0 inf: 0,707

QUADRO 25 - Contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico parasitológico direto de linfonodo e PCR de pele, para leishmaniose visceral canina.

		PCR de pele		
		Pos	Neg	Total (n)
Exame parasitológico direto de linfonodo	Pos	5	0	5
	Neg	2	80	82
	Total (n)	7	80	87

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 26 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos parasitológico direto de linfonodo e PCR de pele.

Kappa geral	0,821
P-valor geral	<0,001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 1,0 inf: 0,615

QUADRO 27 - Contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico parasitológico direto de linfonodo e PCR de linfonodo, para leishmaniose visceral canina.

		PCR de linfonodo		
		Pos	Neg	Total (n)
Exame parasitológico direto de linfonodo	Pos	5	0	5
	Neg	2	80	82
	Total (n)	7	80	87

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 28 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos parasitológico direto de linfonodo e PCR de linfonodo.

Kappa geral	0,821
P-valor geral	<0,001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 1,0 inf: 0,615

QUADRO 29 - Contingência para determinação do valor Kappa entre os métodos de diagnóstico PCR de pele e de linfonodo, para leishmaniose visceral canina.

		PCR de linfonodo		
		Pos	Neg	Total (n)
PCR de pele	Pos	7	0	7
	Neg	0	80	80
	Total (n)	7	80	87

Pos= positivo; Neg= negativo.

QUADRO 30 - Medidas Kappa obtidas na análise de concordância entre os métodos PCR de pele e de linfonodo.

Kappa geral	1,0
P-valor geral	<0,001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa	sup: 1,0 inf: 0,79