

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE ANTICORPOS PARA *LEISHMANIA* spp.
ATRAVÉS DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA EM
POPULAÇÃO CANINA DA REGIÃO DA LOMBA DO PINHEIRO, CIDADE
DE PORTO ALEGRE, RS, BRASIL, A PARTIR DE CASOS AUTÓCTONES
HUMANOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.**

Dissertação de Mestrado

Jairo Ramos de Jesus

Porto Alegre

2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE ANTICORPOS PARA *LEISHMANIA* spp.
ATRAVÉS DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA EM
POPULAÇÃO CANINA DA REGIÃO DA LOMBA DO PINHEIRO, CIDADE
DE PORTO ALEGRE, RS, BRASIL, A PARTIR DE CASOS AUTÓCTONES
HUMANOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.**

AUTOR: Jairo Ramos de Jesus

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, na área de Medicina Veterinária Preventiva, Especialidade de Parasitologia do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Antônio Pacheco de Araujo.

Co-orientadora: Dra. Silvia Maria Spalding.

Porto Alegre

2006

Nome do Autor: Jairo Ramos de Jesus

TITULO DO TRABALHO: AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE ANTICORPOS PARA *LEISHMANIA* spp. ATRAVÉS DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA EM POPULAÇÃO CANINA DA REGIÃO DA LOMBA DO PINHEIRO, CIDADE DE PORTO ALEGRE, RS, BRASIL, A PARTIR DE CASOS AUTÓCTONES HUMANOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.

Aprovada em: 12 JAN. 2006

APROVADO POR:

Prof. Dr. Flávio Antônio Pacheco de Araujo.

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Carlos Marcos Barcellos de Oliveira.

Membro da Comissão

Profa. Dra. Neuza Satiel Stobbe.

Membro da Comissão

Prof. Dr. César Augusto Marchionatti Avancini.

Membro da Comissão

Ao Criador de tudo e de todos, por tornar tudo
isso possível mais uma vez.

Aos meus queridos pais pela fé e amor, em
mim depositados.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Antônio Pacheco de Araujo pela confiança, dedicação, tolerância e ensinamentos a mim dedicados.

A minha co-orientadora Dra. Silvia Maria Spalding, pela oportunidade recebida.

A bióloga M.Sc. Fátima Maria Tiecher, responsável pelo Laboratório de Parasitologia do LACEN/RS, e a todos que lá trabalham pela atenção, carinho, amizade e preciosos ensinamentos a mim dedicados.

A Ana Vera Finardi Rodrigues, Bibliotecária da Faculdade de Veterinária, pelo auxílio na elaboração do trabalho.

A minha mãe e companheira amada de jornada, Vera Zilda Ramos de Jesus, pelos exemplos de resignação, fé e confiança, recebidos diariamente. A ti peço desculpas pela minha ausência, fato sempre comum em tais empreitadas.

Aos meus preciosos amigos Lucas Brunelli de Moraes, Guilherme Fonseca de Souza, Thanara Louzada Carneiro Correia e Marcos Denes Lucho, quero deixar claro que sem vocês eu não teria, se quer, começado e que suas ajudas jamais serão esquecidas. Muito obrigado pelo companheirismo e iniciativas.

A minha colega e amiga Dra. Sandra Tietz Marques, pelo incentivo e fé a mim destinados e as demais colegas de mestrado, companheiras de Laboratório de Protozoologia por alguns anos, pela paciência, tolerância, amizade e ajuda a mim prestadas, inclusive em momentos difíceis durante minha jornada, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Importância e Justificativa	15
1.2 Problema	16
1.3 Hipótese	17
1.4 Objetivo	18
1.4.1 Objetivos Gerais	18
1.4.2 Objetivo Específico	18
1.5 Equipe Técnica	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Definição e Histórico	20
2.2 Hospedeiro Vertebrado	23
2.3 Hospedeiro Invertebrado	24
2.4 Morfologia	27
2.5 Ciclo Biológico e Patogenia	28
3 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	30
3.1 Definição	30
3.2 Epidemiologia	30
3.2.1 Situação Epidemiológica no Município de Porto Alegre, RS, Brasil.	33
3.3 Fatores de Risco para Leishmaniose Tegumentar Americana	36
3.4 Sinais Clínicos	38
3.4.1 Sinais Clínicos em Humanos	39
3.4.2 Sinais Clínicos em Caninos	41
3.5 Imunologia na Leishmaniose Tegumentar Americana	43
3.6 Diagnóstico das Leishmanioses	46
3.7 Tratamento	50

3.8 Controle e Prevenção	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS	57
5 RESULTADOS	63
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO	71
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
9 ANEXOS	78

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Espécies do Gênero *Leishmania*, Parasitos de Homens e Animais, de maior interesse em Parasitologia. (Adaptação da classificação proposta por Lainson e Shaw, 1987).....21
- Tabela 2 - Casos Autóctones de Leishmaniose Tegumentar Americana no Rio Grande do Sul, 2001 a 2005. (Boletim Epidemiológico -v.7,n.2,Junho 2005. CEVS/RS).....35
- Tabela 3 - Reações de Imunofluorescência Indireta (IFI) positivas para Leishmaniose Tegumentar Canina, na região da Lomba do Pinheiro – Porto Alegre – janeiro de 2006.....63
- Tabela 4 - Demonstrativo das características (idade em anos; sexo e raça) dos caninos soropositivos para *Leishmania* spp. na Imunofluorescência Indireta, na região da Lomba do Pinheiro – Porto Alegre – janeiro de 2006.....64
- Tabela 5 -Resultado do teste de Imunofluorescência Indireta para *Leishmania* spp., segundo a faixa etária de 200 cães na região da Lomba do Pinheiro – Porto Alegre – janeiro de 2006.....64
- Tabela 6- Resultado do teste de Imunofluorescência Indireta para *Leishmania* spp., segundo a raça de 200 cães na região da Lomba do Pinheiro – Porto Alegre – janeiro de 2006.....65
- Tabela 7- Resultado do teste de Imunofluorescência Indireta para *Leishmania* spp., segundo o sexo de 200 cães na região da Lomba do Pinheiro – Porto Alegre – janeiro de 2006.....65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Casa em encosta de morro, circundada por mata nativa.....	57
Figura 2 – Pátio dos fundos de residência na Estrada do Rincão, evidenciando o ambiente rico em matéria orgânica úmida.....	58
Figura 3 - Georreferenciamento dos casos confirmados de Leishmaniose em Porto Alegre, até o ano de 2003.....	59
Figura 4 - Mapa Esquemático da Estrada do Rincão, divisão entre os bairros da Lomba do Pinheiro, Restinga e Belém Velho, evidenciando o raio de 1 km utilizado em cada foco autóctone humano e a delimitação do perímetro de trabalho.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana
IFI – Imunofluorescência Indireta
RS - Rio Grande do Sul
FAVET – Faculdade de Veterinária
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
M.V. – Médico Veterinário
IPB – Instituto de Pesquisas Biológicas
LACEN – Laboratório Central
OMS – Organização Mundial da Saúde
NCRV – Núcleo de Controle de Roedores e Vetores
CGVS – Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde
ECE – Equipe de Controle Epidemiológico
CEVS – Coordenadoria Estadual de Vigilância em Saúde
LC – Leishmaniose Cutânea
LCM – Leishmaniose Cutâneo-Mucosa
LCD – Leishmaniose Cutâneo Difusa
HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida
IFN – Interferon
IL – Interleucina
IgG – Imunoglobulina G
IgE – Imunoglobulina E
H E – Hematoxilina Eosina
SBF – Soro Bovino Fetal
NNN – Novy, McNeal, Nicolle
ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoenzimático)
PCR – Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase)
DNA – Ácido Desorribonuclêico
LV – Leishmaniose Visceral
FUNASA – Fundação Nacional de Saúde
SMS – Secretária Municipal de Saúde
POA – Porto Alegre
FEPPS – Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, considerada em expansão no Brasil. No ano de 2002 foi notificado o primeiro caso humano autóctone de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no município de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Atualmente, já foram notificados 17 casos humanos até o presente momento, e existem vários casos suspeitos, esperando por confirmação diagnóstica, o que torna o Estado uma área de risco para LTA. No meio urbano, o cão tem um papel importante, servindo de fonte de infecção e reservatório do protozoário. Sendo assim, foi realizada uma avaliação sorológica em 200 cães domiciliados no raio de 1 km a partir da localização de 3 casos autóctones humanos, ocorridos na Estrada do Rincão localizada na região do Bairro Lomba do Pinheiro, município de Porto Alegre, RS, Brasil. A reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) foi usada para o diagnóstico sorológico dos cães participantes do estudo. A soroprevalência para anticorpos de *Leishmania* spp. encontrada foi de 3,5% (7/200), sendo que do total de positivos, 6 eram de indivíduos machos e 1 de uma fêmea. Utilizando o Teste Exato de Fisher para análise estatística, observou-se uma associação significativa ($p = 0,0484$) entre a positividade na IFI e o sexo dos animais, sendo evidenciado que os machos têm 7 (odds-ratio = 7,624) vezes mais predisposição à infecção do que as fêmeas. Nos demais aspectos analisados estatisticamente (raça e idade), não foram encontradas associações significativas.

ABSTRACT

The Leishmaniasis is a parasitic disease caused by a protozoan from the genus *Leishmania*, which is considered in expansion in Brazil. In 2002 it was notified the first autochthon human case of American tegumentary leishmaniasis (ATL) in district of Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. Presently, 17 human cases were notified until now, and there are many suspect cases, waiting for the diagnostic confirmation, converting this State in a risk area for the ATL. In the urban ambience, the dog plays an important role, performing as a source of infection and this protozoa reservoir. Being thus, it was realized a serologic evaluation in 200 domiciled dogs in a 1 km radius from 3 autochthon human cases that occurred at the Rincão Road, situated at the region of Lomba do Pinheiro, in district of Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, Brazil. The Indirect immunofluorescent reaction (IFR) was used for the serologic diagnostic of the dogs that has participated in this research. The seroprevalence of *Leishmania spp.* antibodies was 3,5% (7/200), considering that from the totality of positives, 6 were male individuals and 1 was a female. Using the Fischer's Accurate Test for the statistical analysis, it was observed a significant association ($p=0,0484$) between the positively in the IFR and the gender of the animals. In the excessively aspects analyzed statistically (race and age) there wasn't found any significant associations. It was evidenced that males has 7 (odds-ratio=7,624) times more predisposition to this infection than the females.

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma das principais doenças transmitidas por vetores no mundo. No Brasil, a doença é considerada re-emergente e em franca expansão, já que; atualmente, com o crescimento dos centros urbanos e as dificuldades sócio-econômicas a doença não se encontra mais confinada às regiões florestais, ocorrendo também nas periferias e nos grandes centros urbanos. Com relação à Leishmaniose Tegumentar Americana, no Brasil, o número de novos casos anuais esperados fica em torno de 30.000 casos/ano (SANTOS *et. al.*, 2005a). É de amplo conhecimento que a região norte- nordeste do país é a que apresenta uma maior incidência de casos de Leishmaniose, tanto visceral quanto tegumentar. Porém, com os movimentos migratórios das populações dessas regiões em direção ao sul do país, a patologia; a partir da década de 80, começou a se expandir por todo o território nacional tornando-se um grande problema de saúde pública. Nas regiões de baixa incidência, devido à falta de dados epidemiológicos o diagnóstico, controle e o tratamento dos casos torna-se um desafio aos profissionais da saúde.

Até 2002, somente o Estado do Rio Grande do Sul não era considerado área de risco para a doença, porém, nesse ano ocorreu a notificação do primeiro caso autóctone de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Porto Alegre. Atualmente, já foram notificados 17 casos autóctones no Estado, além da existência de vários outros suspeitos, transformando dessa maneira o Estado em área de risco para a doença. (SANTOS *et al.*, 2005a).

Com a chegada da doença aos centros urbanos o cão, por ser o animal doméstico mais presente no meio familiar, torna-se a principal fonte de infecção e de perpetuação da enfermidade nas cidades, tornando fundamental uma ampla atuação dos pesquisadores na busca de dados referentes a esses animais na cadeia epidemiológica da doença no meio urbano, pois devido aos fatores sócio-econômicos, anteriormente citados, o número de cães abandonados cresce geometricamente e essa superpopulação acaba por desequilibrar o nicho ecológico constituído pelos centros urbanos,

ocasionando não somente um aumento no número de agressões aos animais abandonados por parte das pessoas e vice-versa, mas também aumentando os riscos de transmissão de zoonoses. Essa situação de superpopulação de cães abandonados já é comum em vários bairros de Porto Alegre, sendo que o problema se torna mais evidente nos bairros abastados e nas vilas. Estudos realizados pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul revelam que para cada bebê humano nascido, também nascem 15 cães e que uma única cadela e seus descendentes podem gerar 64.000 novos animais em 6 anos (NATALIDADE..., [2005]). Esses dados associados às tímidas atuações oficiais para o controle da superpopulação canina de rua, servem de alerta para os graves problemas de Saúde Pública que podem surgir, a partir desse desequilíbrio.

1.1 Importância e Justificativa

O presente trabalho justifica-se pela:

- a- Importância da LTA como problema de saúde pública emergente no Estado do Rio Grande do Sul.

- b- Necessidade de conhecer a condição da população canina (fonte de infecção mais comum no meio urbano) com relação a sua positividade para o agente.

- c- Necessidade de investigar a soroprevalência para *Leishmania* spp. na população canina da região de ocorrência dos primeiros casos autóctones no Estado do Rio Grande do Sul.

1.2 Problema

- A população canina da região da Lomba do Pinheiro, Estrada do Rincão, é soropositiva para *Leishmania* spp.?

- A soropositividade dos cães serve como alerta para possível aumento no número de casos humanos da doença?

- É possível que a população canina da região da Lomba do Pinheiro, Estrada do Rincão, mesmo sem sinais clínicos de LTA, seja soropositiva e, portanto, fonte de infecção e risco à saúde pública da região?

1.3 Hipótese

- Sim, a população canina da região da Lomba do Pinheiro, Estrada do Rincão, apresenta soropositividade para *Leishmania* spp.

- Sim, a soropositividade canina elevada serve de alerta para possível aumento de casos em humanos.

- Sim, é possível que a população canina da Lomba do Pinheiro, Estrada do Rincão, seja soropositiva, mesmo na ausência de sinais clínicos e se constitua em fonte de infecção e risco de saúde pública para a região.

1.4 Objetivo

1.4.1 Objetivos Gerais

- Contribuir para o estudo da Leishmaniose na população canina do município de Porto Alegre;
- Avaliar a situação da doença com relação à população canina e o risco implicado à população humana.

1.4.2 Objetivo Específico

Investigar se há cães soropositivos para *Leishmania* spp. na região da Lomba do Pinheiro, Estrada do Rincão, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

1.5 Equipe Técnica

O presente trabalho foi realizado pela equipe técnica do Laboratório de Protozoologia da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, formada por:

- M.V. Jairo Ramos de Jesus (Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias - UFRGS);
- M.V. Prof. Dr. Flávio Antônio Pacheco de Araujo (chefe do Laboratório de Protozoologia – FAVET/UFRGS; orientador do projeto).

Tendo como co-orientadora a farmacêutica/bioquímica Dra. Silvia Spalding, diretora técnica da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Instituto de pesquisas biológicas (IPB)- Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN) e a colaboração da bióloga Msc. Fátima Maria Tiecher, diretora e responsável técnica pelo Laboratório de Parasitologia do IPB-LACEN/RS.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Definição e Histórico

Leishmanioses são infecções parasitárias de animais e do homem causadas por protozoários digenéticos que têm seu ciclo biológico realizado em dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado. Pertencentes à ordem Kinetoplastida, incluídos na família Trypanosomatidae e no gênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1970). A doença é classificada como zoonose e admite 2 formas distintas: Leishmaniose Cutânea ou Tegumentar e Leishmaniose Visceral (BARBOSA; BARBOSA, 1994b).

A primeira observação dos parasitos pertencentes a esse gênero foi feita por Cunningham em 1885, em casos do que viria a ser considerada Leishmaniose Visceral na Índia. Porém, o gênero *Leishmania* só foi criado por Ross em 1903 e no mesmo ano, Wrigth descobre o agente etiológico do botão-do-orientes, incluindo-o no mesmo gênero com o nome de *Leishmania tropica*. No Brasil, a doença era conhecida por Cerqueira desde 1885, através do encontro de lesões similares ao botão-do-orientes, porém só em 1911, Gaspar Vianna nomeia estes parasitos de *Leishmania brasiliensis* (GENARO *et al.*, 2002).

Com relação à classificação taxonômica das espécies do gênero, por muito tempo esta foi baseada nos aspectos clínicos da doença. Com o crescimento do conhecimento sobre a patologia, os parâmetros fisiológicos, biológicos e a distribuição geográfica, foram introduzidos na tentativa de aprimorar a identificação do parasito. Porém, como esses parâmetros são resultantes da interação entre o parasito e o hospedeiro e das alterações de meio ambiente, ao longo do tempo surgiram dificuldades em agrupar as espécies e, conseqüentemente, foram surgindo cada vez mais espécies e subespécies. De 1961 a 1970 com Pessoa e sua classificação binominal, baseada na epidemiologia da doença, várias classificações foram propostas até que em 1972 e 1973 baseando-se no desenvolvimento em insetos vetores, animais de laboratório e meios de

cultura; Lainson e Shaw idealizaram o agrupamento das espécies em complexos, envolvendo a região do intestino do inseto em que estas se desenvolviam. Só em 1987, após extensa revisão, os mesmos propõem a organização das espécies que parasitam o homem em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, e o agrupamento das espécies conforme tabela abaixo, sendo essa a classificação usual. (MICHALICK, 2002).

Tabela 1- Espécies do Gênero *Leishmania*, Parasitos de Homens e Animais, de maior interesse em Parasitologia (Adaptação da classificação proposta por Lainson e Shaw, 1987).

Subgênero	
<i>Leishmania</i>	<i>Viannia</i>
Complexo <i>Leishmania donovani</i> <i>L. (L) donovani</i> <i>L. (L) infantum</i> <i>L. (L) chagassi</i> Provável pertencente: <i>L. (L) archibaldi</i>	Complexo <i>Leishmania brasiliensis</i> <i>L. (V) brasiliensis</i> <i>L. (V) guyanensis</i> <i>L. (V) panamensis</i> <i>L. (V) peruviana</i> <i>L. (V) lainsoni</i> <i>L. (V) naiffi</i> <i>L. (V) shawi</i> <i>L. (V) colombiensis</i>
Espécies fora do complexo <i>donovani</i> <i>L. (L) tropica</i> <i>L. (L) aethiopica</i> <i>L. (L) major</i> <i>L. (L) gerbilli</i>	
Complexo <i>Leishmania mexicana</i> <i>L. (L) mexicana</i> <i>L. (L) amazonensis</i> <i>L. (L) venezuelensis</i> <i>L. (L) enrietti</i> <i>L. (L) aristidesi</i> Provável pertencente: <i>L. (L) pifanoi</i> <i>L. (L) garnhami</i>	
Complexo <i>Leishmani hertigi</i> <i>L. (L) hertigi</i> <i>L. (L) deanei</i>	

Fonte: Michalick, 2002

Nos últimos vinte anos os métodos genéticos e moleculares para caracterização de espécies patogênicas receberam um maior espaço nas abordagens modernas a respeito da epidemiologia dos parasitos e outras doenças infecciosas. Devido à subestimação da severidade da doença, do surgimento de novas situações epidêmicas e dos impactos sócio-econômicos causados, os parasitos do gênero *Leishmania* têm sido estudados através de técnica moleculares e genéticas. Baseando-se nas hipóteses de modo de evolução clonal e na hibridização entre espécies, conclui-se que algumas das várias espécies existentes sejam na realidade variações genéticas (clones) de outras espécies, onde não são possíveis diferenciações genéticas ou moleculares consideráveis entre essas. Por outro lado, novas espécies foram consideradas, pois conclui-se que se originaram da hibridização de outras duas espécies, já que as espécies em questão apresentavam características genéticas e moleculares semelhantes com ambas a espécies que a originaram. Exemplos são: *L. (V) peruviana*, considerada um híbrido entre as espécies *L. (V) brasiliensis* e *L. (V) panamensis* e as espécies *L. (L) pifanoi* e *L. (L) garnhami*, que não podem ser diferenciadas de *L. (L) mexicana* e *L. (L) amazonensis*, respectivamente; sendo consideradas variações genéticas dessas e não mais novas espécies, do ponto de vista de evolução genética. Desse modo, com o uso cada vez maior de técnicas moleculares e genéticas, é provável que ocorra futuramente uma nova classificação ou a modificação da classificação atual baseando-se em padrões genéticos e moleculares. (BAÑULS *et al.*, 1999).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) divide e reconhece as leishmanioses em quatro grupos clínicos: cutânea, cutâneo-mucosa, cutânea difusa e visceral. A Leishmaniose cutânea é uma doença de baixa gravidade. A cutâneo-mucosa pode causar lesões extremamente mutilantes no maciço facial; enquanto a forma difusa, além de ser um grande desafio terapêutico, apresenta-se com o estigmatizante aspecto hanseniforme. A forma visceral acompanha-se de elevada mortalidade, quando não tratada (WHO, 1990). A Leishmaniose possui uma epidemiologia extremamente diversa, e já foram incriminadas como patogênicas ao homem 20 espécies do gênero *Leishmania*. (DESJEUX, 2004).

2.2 Hospedeiros Vertebrados

Os hospedeiros vertebrados incluem grande variedade de mamíferos: roedores, edentados (tatu, tamanduá, preguiça), marsupiais (gambá), canídeos e primatas, incluindo o homem. (GENARO *et al.*, 2002).

Em um estudo sobre a infecção natural de animais silvestres no Estado de Pernambuco, Andrade *et al.*, (2005), identificaram alguns roedores sinantrópicos e silvestres infectados por *L. (V) brasiliensis*, sendo essa espécie isolada em *Bolomys lasiurus* e *Rattus rattus*.

Marzochi; Schubach e Mazorchi, (1999), relatam que também são encontrados como reservatórios silvestres de *Leishmania* spp. *Choloepus didactylus* (preguiça-real), *Tamanduá tetradactyla* (tamanduá) e *Didelphis marsupialis* (gambá), exemplares das espécies *Dasyprocta azarae* (cotia), *Kannabateomys amblyonyx* (rato-da-taquara) e *Cuniculus paca* (paca), além de alguns pequenos roedores dos gêneros *Orzyzomys* (rato-de-arroz), *Proechimys* (rato-de-espinho), *Akodon* (rato-do-mato) e *Rattus* (rato doméstico).

Segundo Falqueto *et al.*, (1986) a participação de animais domésticos no ciclo epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é conhecido desde o início do século, Mazza em 1926 encontrou cães infectados em área de desmatamento recente ao norte da Argentina, onde havia alta incidência de Leishmaniose Cutâneo-Mucosa em humanos. Diversos trabalhos conduzidos em áreas endêmicas de LTA demonstraram que tanto o cão quanto o jumento (*Equus asinus*) são frequentemente encontrados infectados. No Brasil, estudos indicam ser relativamente comum à presença de cães infectados em áreas endêmicas, principalmente na região Sudeste do país.

2.3 Hospedeiros Invertebrados

Os hospedeiros invertebrados, ou vetores, são pequenos insetos da ordem Díptera, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gêneros *Phlebotomus* (velho mundo) e *Lutzomyia* (novo mundo) (GENARO *et al.*, 2002). Os flebotomíneos são dípteros corcundas e pilosos, com asas em forma de lança, mantidas eretas sobre o corpo quando em repouso. São conhecidos, popularmente, no Brasil como Birigui, Cangalhinha, mosquito Palha e etc. São mais comuns em áreas florestais ou próximas a estas, mas podem invadir domicílios e anexos peridomiciliares. Nas Américas são divididos em três gêneros, sendo o gênero *Lutzomyia* o de maior importância médica e estando dividido em vários subgêneros, estando as espécies mais importantes, envolvidas na transmissão de LTA, nos subgêneros *Lutzomyia*, *Psychodopygus* e *Pintomyia*. Os flebotomíneos apresentam o corpo medindo 2 a 3 mm, com eixos da cabeça e abdômen, formando um ângulo de 90° entre si. Os adultos apresentam vôo saltitante e em geral se deslocam somente algumas dezenas de metros, porém existem relatos de espécies que, em regiões áridas, podem se deslocar por longas distâncias (MARCONDES, 2001).

As fêmeas são hematófagas, mas também se alimentam de substâncias açucaradas de excreções de afídeos (pulgões), contendo melezitose, e de seiva de vegetais. A hematofagia é necessária para a produção dos ovos e a ingestão de carboidratos importante para o desenvolvimento de *leishmanias* no tubo digestivo do inseto. De ovo a adulto decorre um período de aproximadamente 30 dias, sendo que as fêmeas apresentam longevidade de 15 a 20 dias. Porém a duração do ciclo completo pode variar de 30 a 90 dias e a fêmea quando em ovoposição libera no solo úmido e rico em matéria orgânica entre 40 a 70 ovos. Durante o dia os flebotomíneos se escondem em lugares escuros, úmidos e abrigados (fendas de rochas, troncos de árvores, galinheiros) iniciando sua atividade com o crepúsculo, tendo sua máxima atividade variando de uma hora após o crepúsculo até aproximadamente as 23:00 horas, período onde em maior número invadem o domicílio para hematofagia (GENARO *et al.*, 2002; MARCONDES, 2001).

Segundo Chaves e Ñez, (2004) os mosquitos da Ordem Diptera: Psychodidae: Phlebotominae são os vetores dos parasitos *Leishmania* causando a Leishmaniose ao redor do mundo. Em todo o mundo existem cerca de 500 espécies de flebotomíneos conhecidas, sendo que já foram incriminadas como vetores de Leishmaniose cerca de 30 a 70 espécies. Embora os flebotomíneos, tanto do gênero *Phlebotomus* (velho mundo) quanto *Lutzomyia* (novo mundo) sejam os principais vetores de *Leishmania* spp., existem estudos que suportam a idéia de que os mosquitos do gênero *Lutzomyia* são mais susceptíveis ao desenvolvimento de infecção pelo agente do que as espécies pertencentes ao gênero *Phlebotomus*. (NIEVES; PIMENTA, 2000).

Na América do Sul os principais hospedeiros invertebrados do parasito são os mosquitos do gênero *Lutzomyia*. (GENARO *et al.*, 2002). No Brasil, além de *Lutzomyia longipalpis* principal vetor da Leishmaniose Visceral e também envolvida em alguns casos de LTA, as principais espécies envolvidas são *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia wellcomei*, *Lutzomyia pessoai*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia fischeri*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia migonei* entre outras. (GENARO *et al.*, 2002; RANGEL; BANDEIRA, 2003; CASTRO *et al.*, 1996). As espécies desse gênero invadem facilmente o peridomicílio, o interior das residências humanas e abrigos de animais domésticos, adaptando-se a variadas temperaturas, sendo que seu período de maior densidade populacional ocorre após a estação chuvosa, na maioria das espécies (CASTRO, *et al.*, 1996; MARCONDES, 2001).

No município de Porto Alegre, o Núcleo de Controle de Roedores e Vetores (NCRV) da Secretaria Municipal de Saúde tem realizado expedições noturnas para capturar insetos vetores, a partir de coletas mensais no domicílio de pacientes confirmados com LTA, peridomicílio e mata. As espécies capturadas foram *L. neivai*, *L. migonei*, *L. pessoai*, *L. lanei* e *L. fisheri*, em ordem decrescente de ocorrência. Levando em consideração os critérios de Killick-Kendrick para a incriminação da espécie vetora, ou seja, baseando-se na acentuada antropofilia, maior quantidade de exemplares coletados no intradomicílio, peridomicílio e mata e a distribuição espacial coincidente com a da doença, a espécie *Lutzomyia neivai* é considerada a principal suspeita de ser o vetor da LTA no município, faltando ainda a análise da infecção natural de *Leishmania*

spp. em exemplares desta espécie (GONÇALVES, 2003; SANTOS *et al*, 2005a). Para Marcondes, (2001) a incriminação de um flebótomo como vetor depende da antropofilia, assim como, da identificação da mesma espécie de protozoário tanto no inseto quanto no paciente. As espécies *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia nevai* podem ocorrer em matas e são muito bem adaptadas as suas bordas e a ambientes modificados, podendo invadir domicílios e se desenvolver no peridomicílio, tendo sido incriminadas como vetores de parasitos de Leishmaniose Tegumentar. Assim como, as espécies, *Lutzomyia pessoai* e *Lutzomyia fischeri*, que são muito comuns no Sudeste e Sul do Brasil sendo muito antropofílicas e agressivas para o homem.

Segundo Oliveira *et al*, (2004) a transmissão de LTA em áreas urbanas e peri-urbanas no Brasil sugere que as espécies de *Lutzomyia* responsáveis pela transmissão da doença podem ter obtido sucesso na adaptação a novo nichos. Com relação ao comportamento das espécies de mosquitos vetores, Chavez e Ñez, (2004) ressaltam que existem espécies com comportamento zoofílico e antropofílico e que ambas podem habitar a mesma região (local) e apresentarem hábitos, hospedeiros e tipo de alimentação muito semelhantes, podendo até mesmo ocorrer sinergismo entre as espécies na disseminação da LTA. Na região dos Andes no Oeste da Venezuela existem hipóteses de que as espécies zoofílicas atacando os reservatórios silvestres e domésticos podem introduzir os parasitos no habitat humano (peri e intra-domicílio), os quais podem se espalhar através da atuação das espécies antropofílicas disseminando-se na população humana.

Com relação à competência do vetor para a transmissão do agente, esta depende de diversos aspectos que interferem no parâmetro espécie-específico do parasito e vetor, estando correlacionadas diretamente com a habilidade do parasito em passar o ciclo de vida completo dentro do inseto hospedeiro, incluindo o desenvolvimento de formas metacíclicas. A detecção dessas formas, capazes de infectar vertebrados, é essencial para a incriminação dos mosquitos como um potencial vetor de *Leishmania*. (NIEVES; PIMENTA, 2000). Os mesmos autores realizaram estudos de infecção experimental em *Lutzomyia migonei* para evidenciar os diferentes padrões de desenvolvimento de duas espécies de *Leishmania* (*L. (V.) brasiliensis* e *L. (L.) amazonensis*) e sua capacidade de

tornar o inseto hospedeiro em um vetor potencial. No estudo foi possível observar o padrão diferente entre as espécies do protozoário em colonizar as diferentes porções do intestino do inseto, assim como, as diferentes formas promastigotas que surgem e colonizam as regiões intestinais, terminando as suas diferenciações em metacíclicas infectantes. Na pesquisa citada, ambas as espécies foram capazes de infectar o inseto tornando-o vetor, porém as localizações e o número de formas promastigotas foi bastante variável, demonstrando que esse comportamento parece ser intrínseco do parasito e também que, o hospedeiro invertebrado em questão é um vetor biológico capaz de transmitir duas espécies do parasito, que em determinadas áreas podem co-existir.

2.4 Morfologia

Este gênero possui apenas 2 formas durante seu ciclo evolutivo, a forma amastigota e a promastigota. A forma amastigota é tipicamente ovóide ou esférica, medindo 3 - 6,5µm por 1,5 -3 µm, com núcleo, cinetoplasto, e flagelo rudimentar, encontrada nas células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos, dos hospedeiros vertebrados. A forma promastigota é alongada, medindo entre 16 - 40 µm de comprimento por 1,5 - 3 µm de largura, possuindo citoplasma, núcleo, cinetoplasto e flagelo livre. As formas promastigotas no seu ciclo no hospedeiro intermediário (vetor) apresentam variações de formas durante seu desenvolvimento no intestino do inseto, sendo denominadas de procíclica, nectomona, paramastigota, haptonoma e metacíclica, sendo a última, considerada a forma promastigota infectante. Essas formas promastigotas têm variações em número e localização no intestino do vetor. (NIEVES; PIMENTA, 2000; GENARO *et al.*, 2002; MARZOCHI; SCHUBACH; MAZORCHI, 1999).

2.5 Ciclo Biológico e Patogenia

As espécies de *Leishmania* se multiplicam no hospedeiro vertebrado por fissão binária longitudinal, mas o ciclo biológico completo e a manutenção da virulência dependem de um hospedeiro intermediário ou vetor (MARZOCHI; SCHUBACH; MAZORCHI, 1999).

Sendo assim, as formas amastigotas de *Leishmania* são encontradas principalmente nos macrófagos, onde se multiplicam dando manutenção a seu ciclo de vida. Quando a fêmea do flebótomo vetor pica o hospedeiro vertebrado, realizando o repasto sanguíneo necessário para a sua ovopostura, ocorre a ingestão de macrófagos infectados pelas formas amastigotas. Esses macrófagos se rompem no trato intestinal do inseto liberando as formas amastigotas que por divisão binária se multiplicam e tornam-se promastigotas. As formas promastigotas vão, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, se localizar e desenvolver em regiões diferentes do intestino do vetor. Essas características são intrínsecas do parasito e servem para a classificação taxonômica das espécies de *Leishmania*, sendo considerado o desenvolvimento de espécies na região anterior do intestino médio até o piloro (*Leishmanias* suprapilarias), principalmente na região do intestino médio torácico e abdominal; na região posterior do intestino médio (*Leishmanias* peripilarias), abrangendo a região do intestino médio abdominal até a região Pilórica e, por último; o desenvolvimento restrito ao intestino posterior do inseto (*Leishmanias* hipopilarias) abrangendo a região dos Túbulos de Malpigi e do Rectum. Durante o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado (vetor) as formas promastigotas se diferenciam em várias formas (procíclicas, nectomonas, paramastigotas, haptonomas e metacíclicas) até o desenvolvimento das promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes, havendo transcorrido um período de 4 a 5 dias do repasto infectante até o surgimento destas. A partir desse momento, em um novo repasto sanguíneo, durante o processo de alimentação do flebotomíneo, ocorre à transmissão do parasito para um novo hospedeiro vertebrado. As promastigotas são inoculadas na derme do hospedeiro vertebrado pela probóscida do inseto, tendo a saliva do inseto papel potencializador na infectividade de *Leishmania*, devido à presença de neuropeptídeos vasodilatadores que atuam facilitando a alimentação do inseto, assim como,

imunossuprimindo a resposta celular local do hospedeiro, favorecendo a infectividade das formas metacíclicas. Uma vez na derme o parasito é interiorizado pelo macrófago e dentro do vacúolo fagocitário (parasitóforo) se transforma em amastigota, se adaptando ao novo meio fisiológico, resistindo à ação destruidora das lisossomas e iniciando a sua multiplicação por divisão binária. A multiplicação das amastigotas dentro dos macrófagos ocupa o citoplasma deslocando o núcleo até o rompimento da membrana celular, levando a liberação das amastigotas no tecido, sendo essas novamente fagocitadas iniciando o processo inflamatório local. Dependendo da resposta imunológica do hospedeiro, a doença, sendo espectral, pode assumir variadas formas clínicas, nas quais as lesões podem evoluir para a cura espontânea ou, até mesmo, para quadros desfigurantes, incapacitantes e refratários ao tratamento. (REY, 1991; FORTES, 1993; SCOTT, 1996; CASTRO *et al.*, 1996; AS LEISHMANIOSES, 1997; URQUHART *et al.*, 1998, MICHALICK, 2002, MARZOCHI; SCHUBACH; MAZORCHI, 1999; NIEVES; PIMENTA, 2000).

3 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

3.1 Definição

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, podendo se manifestar através de diferentes formas clínicas. É uma enfermidade polimórfica e espectral da pele e das mucosas, causada por parasitos do gênero *Leishmania* (GENARO *et al.*, 2002).

3.2 Epidemiologia

A Leishmaniose Tegumentar é encontrada em todos os países das regiões tropicais e subtropicais do mundo, exceto na Austrália, Nova Zelândia e algumas ilhas do Pacífico. O número total de novos casos anuais em todo mundo é estimado em 1,5 milhões de pessoas, mas somente 300 mil são oficialmente declarados à Organização Mundial de Saúde, devido à falta de notificação e diagnóstico da doença. Dentro dos limites geográficos da doença a extensão e severidade do problema variam, podendo ser endêmica ou ocorrer somente de forma esporádica em diferentes regiões. Essa irregularidade na distribuição mundial é enfatizada pelo fato de que mesmo sendo reportado a sua ocorrência em mais de 80 países no mundo, 90% de todos os casos ocorrem apenas em 6 países: Afeganistão, Brasil, Irã, Perú, Arábia Saudita e Síria.(KLAUS; FRANKENBURG; INGBER, 1999; DESJEUX, 2004).

A Leishmaniose Tegumentar é particularmente importante na América do Sul por apresentar aspectos de cronicidade, latência e desenvolvimento de metástases que conduzem a quadros clínicos desfigurantes (AS LEISHMANIOSES, 1997). No Brasil, estudos têm demonstrado ser comum a presença de cães infectados em áreas endêmicas

de Leishmaniose Tegumentar, especialmente na região sudeste do país (FALQUETO *et al.*, 1986).

Conforme Rey (1991), as ondas epidêmicas acompanham muitas vezes os movimentos de populações humanas em busca de novas terras para culturas, que se deslocam rumo às terras virgens das florestas tropicais, como ocorreu no oeste paulista. Assim como é comum um aumento na morbidade da doença ou até mesmo a ocorrência de surtos epidêmicos, quando um grande número de pessoas mudam de áreas livres para áreas endêmicas ou de áreas endêmicas para áreas livres, quando essas têm as condições necessárias para o desenvolvimento da doença. Dessa maneira a LTA era considerada, historicamente, uma doença de áreas rurais afetando pessoas que viviam ou trabalhavam nesses locais (militares, fazendeiros, agricultores, madeireiros...), onde o homem era mais afetado, pois se encontrava mais exposto à floresta e conseqüentemente aos fatores de risco da infecção (OLIVEIRA *et al.*, 2004). A LTA é uma doença de caráter ocupacional, levando a deformidades que podem abalar psicologicamente o doente, com reflexos no campo social e econômico (MANUAL..., 2000).

A cadeia epidemiológica da Leishmaniose Cutânea e Cutâneo-Mucosa envolve flebotomíneos, mamíferos selvagens e peridomésticos, assim como, espécies dos 2 subgêneros de *Leishmania* e o homem, determinando o ciclo silvestre da doença que se processa na concepção de um foco natural (BARBOSA; BARBOSA, 1994a).

Atualmente, a cadeia epidemiológica da doença tem se alterado, trazendo o aumento de casos urbanos e peri-urbanos, sugerindo uma adaptação do vetor a esses novos nichos, surgindo assim uma cadeia epidemiológica urbana, onde os principais fatores de risco envolvem a presença de animais, mosquitos e histórico de LTA na vizinhança. Assumindo assim um perfil epidemiológico no Brasil que envolve uma larga variedade de hospedeiros mamíferos silvestres, domésticos e diferentes flebotomíneos vetores (SOUZA *et al.*, 2005; MANUAL..., 2000).

Existem 2 situações epidemiológicas principais e distintas entre si: a primeira, que ocorre associada à derrubadas das matas para construções e instalações de povoados em regiões pioneiras e à exploração desordenada das florestas (extração de madeira, pecuária, agricultura) , onde a LTA é fundamentalmente uma zoonose silvestre e o homem se torna infectado acidentalmente quando entra em contato com o foco; a segunda, onde a doença ocorre em regiões de colonização antiga relacionada aos processos migratórios, com a ocupação de encostas de morros e os aglomerados semi-urbanizados nas periferias dos centros urbanos, não estando associada à derrubada de matas, mas a uma adaptação epidemiológica da doença, onde os cães, eqüinos e roedores desempenham importante papel como novos reservatórios do parasito (DESJEUX, 2004; MANUAL..., 2000). Nesse caso é comum o surgimento de sinais clínicos em indivíduos de todas as idades, porém; sendo ainda mais prevalentes em adultos com mais de 40 anos, apresentando lesões mais freqüentes nas pernas, braços e rosto em ordem decrescente de ocorrência. O agente etiológico mais comum, que vem sendo isolado nessas lesões é a *L. (V.) brasiliensis* (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Conforme Antonelli *et al.*, (2005) esta espécie de *Leishmania* é a mais freqüente e largamente espalhada no país, exceto ao norte do rio Amazonas.

No Brasil a LTA vem aumentando, de 1985 a 1999, foram registrados no país 388.155 casos autóctones. Comparando os dados de 1985 (13.654 casos) com os de 1999 (30.550 casos), observa-se um aumento no coeficiente de detecção de casos de 10,45/100.000 habitantes para 18,63/100.000 habitantes. A expansão demográfica da doença também é evidente, sendo que em 1994 foram registrados casos em 1861 municípios e em 1998 houve o registro em 2.055 municípios. Analisando os casos regionais até o ano de 2000, a região Norte apresentava registro de casos autóctones em 82% dos municípios, a Nordeste 88,5%. No Centro-Oeste, em 1998, a LTA atingiu 64,3% dos municípios, com destaque para o Mato Grosso com 100% dos municípios apresentando registros de casos; na região Sudeste os estados do Espírito Santo e Minas Gerais se destacaram com um percentual de LTA de 50,5% e 46,3%, respectivamente, e no Sul, o Paraná vem apresentando aumento gradativo no número de municípios com registro de casos, passando de 117 em 1994 para 146 em 1998, sendo esse Estado o responsável por 98% dos casos notificados na região Sul, apresentando um coeficiente de detecção de 4,88/100.000 habitantes em 1998. Atualmente a média de notificação de

novos casos anuais é 30.000 casos, em todo o território nacional e a região Nordeste, ainda detêm o maior número de casos notificados, 14.000 novos casos por ano (MANUAL..., 2000; SANTOS *et al.*, 2005a). Até o presente momento existem 7 espécies de *Leishmania* responsabilizadas pela doença no Brasil: *Leishmania (Viannia) brasiliensis*; *L. (V.) guyanensis*; *L. (V.) lainsoni*; *L. (V.) shawi*; *L. (V.) naiffi*; *L. (V.) lindenbergi* e *L. (Leishmania) amazonensis* (SOUZA *et al.*, 2005).

Andrade *et al.*, (2005) concordam com a afirmação de que a LTA deva ser considerada em expansão no território brasileiro e com o fato da *L. (V.) brasiliensis* ser o agente etiológico de maior prevalência, apresentando distribuição geográfica em todas as regiões do país e acrescentam que, suas características epidemiológicas e o modo de transmissão se expressam de acordo com as particularidades de cada região, sendo assim a ecoepidemiologia da LTA associada a esta espécie se torna um desafio para os programas de controle da doença.

3.2.1 Situação Epidemiológica no Município de Porto Alegre, RS, Brasil.

Em Porto Alegre no ano de 2000 foi diagnosticado o primeiro caso de LTA, no Hospital Santa Casa de Misericórdia, em um paciente de 74 anos, do sexo masculino, portador de lesão na mucosa nasal com infiltração importante no nariz e lábio superior direito, apresentando destruição da cartilagem nasal. O diagnóstico de Leishmaniose Cutâneo-Mucosa foi definido por biópsia do tecido nasal. Segundo dados de anamnese, este vivia há pelo menos 10 anos no município e não havia viajado para nenhuma área endêmica para a doença. Ainda, apresentava histórico compatível com o quadro clínico anterior, ocorrido há mais de 50 anos atrás, quando o mesmo residia em São Nicolau (RS). Nessa ocasião não ficou determinado o local de transmissão da doença e nem havia relatos de flebotomíneos em Porto Alegre, sendo este o primeiro registro de caso autóctone no Rio Grande do Sul. (ALERTA..., 2002).

Em outubro de 2002 foi diagnosticado o primeiro caso autóctone de LTA em Porto Alegre, envolvendo um paciente do sexo feminino, que morava em um sítio em borda de mata virgem na divisa entre os Bairros Lomba do Pinheiro e Restinga, há mais de 20 anos e sem histórico de viagens. A partir desta data, foi lançado o alerta de transmissão autóctone de LTA em Porto Alegre e a mesma passa a ser considerada área de risco de transmissão de Leishmaniose Cutâneo-Mucosa. A partir desse registro, o Núcleo de Controle de Roedores e Vetores (NCRV) passa a realizar expedições para captura e identificação de insetos vetores de LTA, na região do caso, colocando armadilhas no intradomicílio, peridomicílio e mata, identificando a fauna de flebotomíneos local e orientando a adoção de medidas de proteção para as famílias residentes nas imediações. A partir do alerta, os profissionais da saúde são orientados a encaminharem qualquer caso suspeito à Equipe de Controle Epidemiológico da Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre. (THIESEN; BRITO, 2003; GONÇALVES, 2003).

Atualmente, segundo Santos *et al.*, (2005a), a situação e evolução dos casos autóctones no Rio Grande do Sul é a seguinte: no ano de 2001 foram notificados, investigados e confirmados 3 casos, 2 procedentes do município de Santo Antônio das Missões e 1 do município de Viamão. Dois dos três casos haviam iniciado a sintomatologia em 2000. Em 2002, foram notificados e confirmados 2 casos, um em Porto Alegre (Lomba do Pinheiro/Restinga) e outro no município de Rolador. Em 2003 houve a confirmação de 8 casos autóctones, seis na região sul de Porto Alegre, um no município de São Miguel das Missões e um no interior do município de Capão da Canoa. O ano de 2004 terminou com o diagnóstico de dois casos de LTA em Porto Alegre e até a 19^o semana epidemiológica de 2005 foram confirmados mais 2 casos (tabela 2). De acordo com a localização dos casos, até o momento, é possível inferir sobre três áreas de transmissão de LTA: região das missões (Sto. Antônio das Missões, São Miguel das Missões, Rolador) com 4 casos, transmissão rural, onde a paisagem é formada por capões de mata rodeados de campos de pastagens; Porto Alegre/Viamão, com 12 casos, onde a transmissão ocorre em áreas periurbanas com fragmentos de matas residuais; um caso na região litorânea (Capão da Canoa), transmissão rural próxima a Mata Atlântica. Nesses 5 anos, o número de casos total foi de 17 pessoas adultas com média de idade de 47 anos, entretanto a maioria (60%) tem mais de 45

anos, com predomínio de casos no sexo masculino (11/17). Não foram registrados casos em menores de 15 anos, o que sugere até o momento ausência de transmissão intradomiciliar. Todos os pacientes confirmados, nesse período, receberam tratamento após avaliação clínica e laboratorial.

Segundo a Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde (CGVS) da Secretaria Municipal da Saúde de Porto Alegre, os casos suspeitos devem ser notificados à Equipe de Controle Epidemiológico (ECE) para encaminhamento dos exames diagnósticos, investigação epidemiológica, levantamento ambiental e liberação da medicação; uma vez que, não está concluído o mapeamento dos vetores e, conseqüentemente, o risco de transmissão da doença em Porto Alegre. (ALERTA..., 2002).

A Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde, no programa de Leishmaniose Tegumentar Americana tem suas ações voltadas, principalmente, para o fornecimento das medicações para tratamento dos casos e para a capacitação das regionais em epidemiologia, entomologistas e médicos veterinários, visando, através de levantamentos da entomofauna e da possível identificação de animais domésticos com LTA, conhecer e definir melhor a cadeia epidemiológica de transmissão da doença (SANTOS *et al.*, 2005a).

Tabela 2 - Casos Autóctones de Leishmaniose Tegumentar Americana no Rio Grande do Sul, 2001 a 2005. (Boletim Epidemiológico -v.7,n.2,Junho 2005. CEVS/RS).

N ^o do caso	Data da Notificação	Local Provável de Infecção	Sexo	Idade
1	15.06.01	Viamão	M	69
2	08.08.01	Sto. Antônio das Missões	F	51
3	09.08.01	Sto. Antônio das Missões	M	65
4	28.08.02	Rolador	M	55
5	17.10.02	Porto Alegre	F	34
6	30.05.03	São Miguel das Missões	M	45
7	12.11.03	Porto Alegre	F	51
8	11.08.03	Porto Alegre	M	15

N ^o do caso	Data da Notificação	Local Provável de Infecção	Sexo	Idade
9	10.10.03	Porto Alegre	F	59
10	10.10.03	Porto Alegre	M	57
11	13.10.03	Porto Alegre	M	53
12	10.11.03	Porto Alegre	M	54
13	29.12.03	Capão da Canoa	M	31
14	05.03.04	Porto Alegre	F	55
15	19.07.04	Porto Alegre	M	51
16	03.01.05	Porto Alegre	F	24
17	04.03.05	Porto Alegre	M	26

Fonte: DVAS/SES

3.3 Fatores de Risco para Leishmaniose Tegumentar Americana

Vários fatores são considerados como indicadores de surtos, aumentando o risco da população para a infecção de *Leishmania*, a movimentação de populações de áreas livres para áreas endêmicas e de áreas endêmicas para áreas livres, onde existam condições para o desenvolvimento da doença; as mudanças na densidade dos vetores e no número de animais reservatórios e os distúrbios nos ecossistemas que envolvem os agente e seus reservatórios e vetores são alguns desses fatores. O risco que envolve os militares em suas ações de campo em áreas endêmicas, atualmente, também se aplica à indivíduos praticantes de turismo de aventura (ecoturismo) que passam um tempo considerável ao ar livre em áreas endêmicas, muitas vezes sem proteção, como repelentes e mosquiteiros à noite (KLAUS; FRANKENBURG, 1999).

Para Reithinger *et al.*, (2003) embora algumas vezes se mostre inconstante, a abundância de cães e o fato de ser proprietário de cães, são fatores de risco para LTA, conforme foi demonstrado em 2 casos na Argentina, em estudos realizados para pesquisa de reservatórios e fatores de risco. Em Huánuco, Peru, pesquisas sugerem que

os cães têm papel importante na transmissão peridoméstica de LTA para humanos. Nesse caso, a incidência de LTA humana aumenta com o aumento no tamanho da população canina.

Segundo Machado-Coelho *et al.*, (2005) a Leishmaniose Tegumentar ocorre 1,7 vezes mais freqüentemente em homens do que em mulheres, sendo 2 vezes mais freqüente em indivíduos maiores de 22 anos e 4 vezes mais freqüente em indivíduos mal nutridos quando comparados com pessoas mais jovens e bem nutridas. Sendo assim, o risco de LTA aumenta significativamente conforme diminui o “status” nutricional e aumenta a idade dos indivíduos. O “status” nutricional também aumenta o risco de Leishmaniose Tegumentar Mucosa, quando comparada com a incidência da forma cutânea da doença, assim como, aumenta o tempo de duração das lesões. Sendo esse também influenciado pela idade dos indivíduos. Essa maior ocorrência de LTA em homens, segundo alguns estudos, pode ser atribuída aos efeitos hormonais, sendo os hormônios sexuais responsáveis pela estabilização da doença, assim como, pela cura. Porém, fatores comportamentais como a maior exposição de homens aos vetores e a ambientes de risco extra e intra-florestais, são provavelmente mais importantes na prevalência maior de risco de infecção para homens, se tratando de LTA.

Os fatores ambientais também fazem parte dos fatores de risco para infecção. Em regiões de ocorrência de 2 ou mais espécies de *Leishmania* sobrepondo-se, o risco de infecção humana e animal aumenta. Mesmo dentro de área endêmica única e bem delimitada, as variações nos micro fatores ambientais influenciam na disseminação da doença e pequenas diferenças topográficas ou climáticas podem afetar os índices de morbidade dentro dessa área endêmica restrita. As alterações sazonais e climáticas têm influências no aumento no risco de infecção, por exemplo, as estações chuvosas e o aumento na densidade populacional de mosquitos vetores, levando à aumento no risco de infecção, devido a maior possibilidade de contato com o vetor. A sazonalidade dessas chuvas por exemplo, leva a um aumento no número de casos ou no risco de infecção em certas épocas do ano (KLAUS; FRANKENBURG; INGBER, 1999).

Fatores demográficos e econômicos estão relacionados com risco de infecção. Nota-se que em áreas endêmicas, onde a população possui baixa renda e, conseqüentemente, poucos recursos médicos, homens, mulheres e crianças têm alto risco de infecção. No Oriente Médio, em certas localidades, além de considerada ocupacional, a Leishmaniose também é “parte do crescimento das crianças e jovens”, devido à alta incidência e risco de infecção nesses locais. A pobreza e a falta de recursos sócio-econômicos também levam a migrações populacionais e ao contato das pessoas com áreas intactas (foco silvestre de Leishmaniose), que após o desmatamento e/ou a urbanização possibilitam um aumento no risco de infecção humana. O descaso na notificação dos casos, assim como a subestimação da incidência da doença, provocam aumento no risco de infecção nas áreas subestimadas, onde não se conhece o comportamento real da doença. O surgimento de doenças imunossupressoras, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, trás uma nova situação epidemiológica com aumento do risco de infecção ou recidiva de Leishmaniose em indivíduos imunocomprometidos. (DESJEUX, 2004; KLAUS; FRANKENBURG; INGBER, 1999).

3.4 Sinais Clínicos

Um amplo espectro de formas pode ser observado na LTA, variando de lesões auto-resolutivas à lesões desfigurantes. O binômio, estado imunológico do paciente e as espécies de *Leishmania* envolvidas, está intimamente ligado a esta variação (GENARO *et al.*, 2002).

A LTA possui três principais manifestações clínicas em humanos: Leishmaniose Cutânea (LC), sendo esta a forma mais comum e menos severa, ocorrendo em indivíduos com resposta imune eficiente; Leishmaniose Mucosa ou Cutâneo-Mucosa (LCM), apresentando lesões de surgimento lento e progressivo, destruindo tecido mucoso e submucoso, principalmente, no nariz, boca e orofaringe e sendo causada principalmente por *L. (V.) brasiliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, e Leishmaniose Cutâneo Difusa (LCD); comum em pacientes com deficiência

imunológica para antígenos de *Leishmania*, se apresentando na forma de múltiplos nódulos e/ou placas eritematosas repletas de parasitos (MACHADO-COELHO *et al.*, 2005). Sendo a Leishmaniose Cutânea a forma mais comum de Leishmaniose Tegumentar encontrada no Brasil e tendo como marca registrada, o desenvolvimento lesões dérmicas ulcerativas únicas ou múltiplas, as quais, respondem bem ao tratamento com antimonial (ANTONELLI *et al.*, 2005)

Segundo Marzochi, Schubach e Mazorchi, (1999) os cães também apresentam a doença clínica semelhante àquela observada em humanos.

3.4.1 Sinais Clínicos em Humanos

Segundo Manual..., (2000) a Leishmaniose Cutânea (LC), pode ser localizada; nesse caso, as lesões podem variar em número podendo ser únicas ou múltiplas com característica ulcerativa de bordos elevados e fundo granulomatoso com ou sem exsudação ou disseminada; caracterizando-se por úlceras pequenas disseminadas por todo o corpo, com característica acneiforme. A Leishmaniose Cutâneo Difusa (LCD), considerada uma forma rara da doença, caracteriza-se por maciço comprometimento dérmico, iniciando na forma de mácula, evoluindo a pápula e nódulo no local da inoculação e se disseminando por todo o corpo através da via hematogena. As regiões freqüentemente envolvidas são a face e os membros superiores e inferiores e as lesões são eritematosas sob a forma de pápula, tubérculos, nódulos e infiltrações difusas. Nas lesões cutâneas as úlceras são geralmente indolores e também são aceitas lesões úlcero-crostosas, úlcero-vegetantes e impedigóides entre outras.

A apresentação mucosa da LTA geralmente é secundária às lesões cutâneas, podendo surgir meses ou anos após a resolução da lesão de pele ou podem ser primárias, surgindo espontaneamente, decorrentes de supostas infecções subclínicas. Com maciço comprometimento dérmico e natureza crônica, as lesões ocorrem na cavidade nasal, faringe, laringe e cavidade oral. Quando ocorre no nariz, corresponde a uma reação

descamativa do septo nasal, algumas vezes com perfuração do tabique (septo nasal) devido à infiltração e ulceração da mucosa que, dependendo da intensidade, pode destruir a pirâmide nasal e outras estruturas acometidas por essas lesões ulcerativas que podem, também, apresentar aspecto crostoso ou vegetante. A Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LCM), geralmente ocorre na região da face com envolvimento da mucosa nasal, oral e pele, sendo que a lesão mucosa pode ocorrer distante da lesão cutânea (secundária) ou próxima à lesão de pele, como uma extensão desta. As lesões linfáticas caracterizam-se por adenomegalia e ulcerações ao longo do trajeto dos vasos linfáticos, com caráter esporotricóide. Sendo que o comprometimento ganglionar pode preceder a lesão de pele ou ocorrer após a lesão, geralmente não ocorrendo linfadenomegalia generalizada (MANUAL..., 2000; BARBOSA; BARBOSA, 1994a; REY, 1991; PEREIRA *et al.*, 1981; LAINSON; SHAW, 1970).

A linfadenopatia acompanha a Leishmaniose Tegumentar no velho e no novo mundo. Sendo freqüentemente o único sinal clínico em casos da doença na forma visceral. Em infecções por *L. (V.) brasiliensis* a linfadenopatia freqüentemente precede a lesão cutânea e esses linfonodos podem causar dor à palpação. O tempo entre o aumento do linfonodo e o surgimento da lesão cutânea pode variar de 2 semanas a 2 meses. Os linfonodos, aumentados ou não, têm papel importante na permanência do agente no organismo, assim como na disseminação clínica. Estudos demonstram que o agente tem se mostrado persistente nos linfonodos de ratos após a cura clínica, em infecções por *L. (L.) major*, e que a internalização do parasito pelas células dos linfonodos é ferramenta que participa na ativação da resposta imune do hospedeiro levando a produção de citocinas e posterior envolvimento de linfócitos Th1 e Th2 (HARMS *et al.*, 2005).

Segundo Calza *et al.*, (2004) pesquisas revelam que em pacientes infectados pelo HIV, a apresentação tegumentar da Leishmaniose é mais rara e geralmente representa a forma primária de infecção, com um menor número de lesões, entretanto, também pode representar uma forma secundária da infecção decorrente da visceralização dos parasitos, favorecendo o surgimento de lesões cutâneas difusas. Portanto, em pacientes HIV positivos, co-infectados por *Leishmania*, a forma cutânea primária ou secundária a

manifestação visceral engloba uma gama de sinais clínicos que podem variar desde a clássica úlcera leishmaniótica até à forma disseminada, envolvendo o surgimento de eritemas e edemas generalizados.

Em estudos realizados em pacientes com LCD, Costa *et al.*, (2005) observaram sinais clínicos de encurtamento das falanges distais, especialmente das mãos, devido à destruição óssea e redução do espaço articular, levando à ocorrência de deformações nas extremidades, limitando e prejudicando as atividades diárias dos acometidos. Normalmente essas lesões são irreversíveis, progressivas e degenerativas.

3.4.2 Sinais Clínicos em Caninos

Em cães os sinais clínicos são variáveis. Muitos cães são naturalmente resistentes e clinicamente normais após serem infectados. Esses animais podem mostrar somente uma reação local na região da picada do vetor e estudos demonstraram que, em áreas endêmicas, somente 10 % dos cães infectados desenvolvem a doença clínica (LINDSAY; ZAJAC; BARR, 2002)

Sinais clínicos como linfadenomegalia, tanto pré quanto pós-lesão cutânea, esplenomegalia, alopecia, lesões oculares e lesões cutâneas, podem ser encontradas. A forma de LTA mais comum, em cães, é a cutânea, caracterizada por lesão ulcerativa característica, ocorrendo com maior frequência na região dos lábios, orelhas, saco escrotal e membros, podendo ou não estar recobertas com crostas. As lesões do tipo vegetante também podem ocorrer, únicas ou múltiplas, preferencialmente em áreas de poucos pêlos, apresentando comportamento cíclico com parasitismo mantido por toda a existência do animal.(MARZOCHI; SCHUBACH; MAZORCHI, 1999). Além disso, pode ocorrer dermatite esfoliativa e pustular na região da cabeça e dos membros. Todas as lesões cutâneas dependem e são resultantes da interação parasito-hospedeiro, bem como a capacidade de defesa primária individual do hospedeiro (BARBOSA; BARBOSA, 1994a; REY, 1991).

Conforme Ferrer *et al.*, (1988) em estudo realizado em 43 cães com Leishmaniose canina pré-diagnosticada, 60% dos animais apresentavam alopecia e descamação cutânea. Ainda conforme os mesmos, as lesões cutâneas na Leishmaniose canina têm patogenia diferente da Leishmaniose cutânea humana, sendo que nos cães, a pele é afetada durante a disseminação do agente, que acaba atingindo outros órgãos além da pele, durante a evolução da doença. O diagnóstico diferencial em cães deve incluir, devido às características clínicas que a lesão pode apresentar, Lupus Eritematoso, sarna, neoplasias, granulomas e dermatites bacterianas e micóticas.

Em estudos abordando a resposta imunológica de cães nos vários estágios da Leishmaniose canina, Inesta; Gállego e Pórtus, (2005) consideraram que animais apresentando, além da lesão cutânea, sinais como onicogribose, perda de peso, apatia, lesões oculares e epistaxe entre outros, devem ser suspeitos e na presença de 2 dos sinais acima citados, sintomáticos para Leishmaniose canina.

Ferrer; Fondevila e Marco, (1990) relatam 2 casos de lesões nodulares atípicas em 2 cães, uma na região interdigital de um Boxer e outra a região axilar de um Cocker Spaniel., ambas as lesões não eram ulcerativas nem dolorosas e apresentavam 3 e 4cm de diâmetro, respectivamente. Sendo assim, lesões nodulares, indolores e não ulceradas também devem ser consideradas sinais clínicos de Leishmaniose canina.

Em investigação sobre a ocorrência de infecção natural em animais domésticos no Espírito Santo, Falqueto *et al.*, (1986) examinaram 186 cães, dos quais 32 estavam parasitados e apresentavam sinais clínicos, principalmente no focinho e nas orelhas. A maioria (20/32) apresentava lesão única, os demais apresentavam lesões múltiplas. A forma cutânea de manifestação da LTA foi encontrada na maioria dos cães positivos (25/32), seguida da forma mucosa (4/32) e cutâneo mucosa (3/32).

3.5 Imunologia na Leishmaniose Tegumentar Americana

Embora tenham sido realizados inúmeros estudos imunológicos nos últimos anos, a maioria em modelo murino, pois este apresenta um padrão de resposta semelhante ao humano, os mecanismos envolvidos na resposta imune de portadores de LTA não estão claramente elucidados. Sabe-se que a resposta imune depende de uma complexa interação de fatores relacionados à virulência do parasito e à resposta imunológica do hospedeiro, sendo esta predominantemente mediada por células, envolvendo tanto o aspecto cura quanto proteção e até mesmo o agravamento da doença. (MARZOCHI; SCHUBACH; MAZORCHI, 1999; GENARO *et al.*, 2002). Porém, é senso comum que a resolução da Leishmaniose Tegumentar está associada com uma boa resposta imunomediada por linfócitos T. Um bom prognóstico para Leishmaniose Tegumentar, ou seja, a cura ou resistência, ocorre com a ativação de macrófagos, levando a destruição dos parasitos intracelulares. (COUTINHO *et al.*, 1998; DA-CRUZ, *et al.*, 1999).

Dentre as respostas mediadas por linfócito T, à resposta do tipo Th 1 inclui a ativação de IFN- γ , o qual é chave para a mediação de proteção, devido à ativação dos macrófagos com atividade microbicida. Sendo assim o predomínio da resposta de linfócitos T do tipo Th 1, subtipo CD4+, levando a produção e liberação de citocinas do tipo I como gamma interferon (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) tem papel central na ativação dos macrófagos e conseqüente destruição dos parasitos. Por outro lado, o mecanismo de agravamento das lesões ou a susceptibilidade ao desenvolvimento de LTA, está relacionado aos efeitos causados pela produção e liberação de citocinas do tipo II como a interleucina- 4 (IL-4), IL-5 e IL-10 que são primariamente produzidas por linfócitos T do tipo Th2, subtipo CD4+. Essas citocinas inibem a diferenciação dos linfócitos T em linfócitos T tipo Th1 CD4+, desregulando seus mecanismos efetores de proteção e, conseqüentemente, inibem a produção de IFN- γ e TNF- γ e a ativação dos macrófagos infectados pelo parasito (COUTINHO *et al.*, 1998; FARAJNIA *et al.*, 2005).

Os linfócitos T subtipo CD8⁺ também têm papel importante nos mecanismos imunológicos responsáveis pela cura, pois os mesmos quando ativados também demonstraram produção de IFN- γ , além de, um possível efeito citolítico sobre os macrófagos parasitados. Em estudos comparando as proporção de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, através da estimulação com antígenos de *Leishmania (V.) brasiliensis*, antes e depois de tratamento leishmanicida, foi observado aumento na porcentagem de CD8⁺ e declínio de CD4⁺ com conseqüente redução na relação entre CD4⁺/CD8⁺. Esse resultado sugere que os linfócitos T CD8⁺ podem estar implicados nos mecanismos de cura da LTA. Porém, não ficando claro se a cura se dá apenas pelo aumento dos níveis de CD8⁺ ou se também pode estar relacionada com o balanço na proporção da relação entre os 2 subtipos de células T envolvidos (COUTINHO *et al.*, 1998).

Segundo Farajnia *et al.*, (2005) em humanos com LTA ativa, causada por *L. (V.) brasiliensis* os linfócitos CD4⁺ são as células T predominantes, enquanto que o predomínio do subtipo CD8⁺, com diminuição dos níveis de CD4⁺, é observado depois da cura, sendo também, relacionado a níveis de proteção prolongados.

Conforme Antonelli *et al.*, (2005) existe uma correlação entre a intensidade da resposta à Intradérmoreação de Montenegro e as populações de linfócitos T, envolvidos na resposta celular imunomediada contra LTA. Quanto maior a intensidade da reação intradérmica, maior é a ativação de linfócitos T, subtipo CD4⁺, apresentando uma correlação positiva, estando os últimos envolvidos na formação de uma resposta intradérmica mais intensa no teste de Montenegro. Por outro lado, quanto menor à intensidade da reação, maiores são os níveis encontrados de linfócitos T, subtipo CD8⁺, apresentando correlação negativa, atuando, os últimos, como reguladores do processo de formação da reação ao teste de Montenegro. Em estudo realizado correlacionando a área de lesão com a área da reação de Montenegro, foi evidenciado correlação positiva entre o tamanho total da área de lesão e os níveis de IFN - γ e TNF- α , associando um maior tamanho de lesão com níveis maiores de IFN - γ e TNF- α , assim como células T CD4⁺, evidenciando a importância de ambos como indutores de dano tecidual. Analisando as correlações entre os indicadores imunológicos e os tamanhos de lesão e de reação de Montenegro, observa-se que os Linfócitos T CD4⁺ podem ser mais

importantes para a indução da resposta ao teste e encontrados em maiores níveis em lesões exacerbadas que os Linfócitos T CD8+, que podem apresentar efeito inibitório no desenvolvimento da resposta ao teste e serem encontrados em maiores níveis em pacientes com lesões cicatrizadas.

Segundo Inesta; Gállego e Pórtus, (2005) na Leishmaniose canina, altos níveis de anticorpos específicos da classe IgG tem sido associados a desordens patofisiológicas e as fases ativas da doença. Entretanto, a falta destas imunoglobulinas não regula a infecção por *Leishmania* e culturas positivas podem ser obtidas de cães com ou sem baixos níveis de IgG. Em estudos realizados sobre a expressão de imunoglobulinas em cães, tendo como foco as respostas de IgG, IgG1, IgG2 e IgE em cães naturalmente infectados, sintomáticos e assintomáticos foi possível concluir que em cães infectados sintomáticos as imunoglobulinas IgG1 e IgE apresentaram significativo aumento em seus níveis, enquanto IgG e IgG2 se mostraram elevadas tanto em cães assintomáticos quanto em sintomáticos. Isso é consequência do tipo diferente de resposta envolvendo os linfócitos T auxiliares (Linfócitos T helper), apresentada por animais assintomáticos e sintomáticos. Pois a progressão da doença está associada à resposta tipo Th2 que além de IL-4, IL-5 e IL-10 incluem IgG1, assim com, a resistência a infecção esta relacionada a resposta tipo Th1 com a consequente produção de IFN- γ e expressão de IgG2.

3.6 Diagnóstico das Leishmanioses

Diagnóstico clínico: Em se tratando de Leishmaniose Tegumentar Americana pode ser feito com base na característica da lesão que o paciente apresenta, associada à anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância, como a presença do vetor, contato prévio com animais de potencial reservatório e características fisiográficas da região. Deve-se realizar o diagnóstico diferencial de outras dermatoses granulomatosas que apresentem lesões semelhantes a LTA, tais como, dermatites bacterianas, neoplasias e infecções fúngicas, principalmente Esporotricose e Paracoccidiomicose. (GENARO *et al.*, 2002; MARZOCHI; SCHUBACH; MAZORCHI, 1999).

Diagnóstico laboratorial: Segundo Cuba, (2000) o diagnóstico parasitológico de LTA se dá, quando ocorre a visualização das formas amastigotas nos tecidos infectados ou das promastigotas, através do cultivo “in vitro” do material coletado das lesões suspeitas. A investigação direta das formas amastigotas pode ser realizada a partir de material coletado diretamente das lesões de pele ou mucosa, após assepsia, sendo os cortes histológicos, obtidos desse material, corados com Hematoxilina Eosina (H E) ou Giemsa. Genaro *et al.*, (2002) acrescenta que a visualização das formas amastigotas também pode ser feita através da realização de esfregaços em lâminas, corados com Giemsa, Leishman ou outros derivados de Romanowsky.

Para a identificação das formas promastigotas, através do seu cultivo “in vitro”, utiliza-se mais de um meio de cultura, na tentativa de satisfazer as diferentes finalidades desejadas, como por exemplo, multiplicação do parasito, manutenção das cepas parasitárias por longos períodos e morfogênese de amastigota em promastigota. Isso porque, não existe um único meio de cultura que reúna todas as qualidades necessárias. Atualmente os meios de cultivo mais tradicionalmente usados são o meio líquido monofásico de Schneider, adicionado de Soro Bovino Fetal (SBF) em concentrações de 10 a 20% e o meio bifásico de Ágar Sangue conhecido como NNN ou Meio de Novy, McNeal, Nicolle. Estando o primeiro envolvido no cultivo celular e aspectos biológicos

e moleculares da *Leishmania* e o último, no cultivo de promastigotas e na cinética de crescimento do parasito, com a vantagem de possibilitar a morfogênese celular de amastigota para promastigota em várias espécies do sub-gênero *Viannia* e *Leishmania*. (CUBA, 2000).

As técnicas convencionais para a identificação do parasito têm desapontado, devido às suas baixas sensibilidades, tornando as técnicas eficientes somente quando as amostras investigadas são ricas em parasitos ou coletadas através de técnicas invasivas, como os aspirados de medula óssea. Isso ocorre devido à biologia do parasitismo que cada espécie apresenta no hospedeiro, pois sabe-se que, as espécies do subgênero *Viannia* têm uma densidade parasitária, nas lesões, menor do que as espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* e que essa densidade também sofre a influência do número de lesões e do tempo de duração da lesão. Outros fatores que influenciam na sensibilidade das técnicas convencionais são a habilidade e experiência do pesquisador na obtenção das amostras suspeitas, o estágio da doença e a suspeita ou não de co-infecção com HIV. As técnicas de imunocitoquímica são um avanço nesse campo, a utilização de imunoperoxidase indireta com anti-soro policlonal de coelho para marcar as amastigotas dos pacientes com LTA, tem mostrado maior eficiência do que as técnicas de rotina, inclusive no diagnóstico em lesões precoces (MARTIN-SANCHEZ *et al.*, 2002; CUBA, 2000).

Ainda objetivando a identificação do parasito, pode ser realizada a inoculação em animais, sendo o Hamster Dourado (*Mesocricetus auratus*), o animal mais utilizado para isolamento de *Leishmania*, através da inoculação de um triturado de fragmentos da lesão em solução fisiológica por via intradérmica no focinho ou patas, devendo ser estes animais observados semanalmente e, no primeiro sinal clínico de infecção, deve se proceder com o isolamento e diagnóstico parasitológico, através do cultivo “in vitro” do material coletado das lesões. Alguns pesquisadores realizam, também, a inoculação intra-peritoneal, já que algumas espécies do parasito tendem a visceralização colonizando, principalmente os gânglios regionais (GENARO *et al.*, 2002; CUBA, 2000; MARZOCHI; SCHUBACH; MAZORCHI, 1999).

O diagnóstico laboratorial através de sorologia é muito empregado, com ênfase nas técnicas convencionais de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Os pacientes com LTA produzem anticorpos contra os antígenos de *Leishmania* que podem ser detectados por essas técnicas, mesmo que, com o polimorfismo de sinais clínicos causados pelas espécies do agente, ocorram significantes diferenças na produção de anticorpos, pois observa-se que em lesões mucosas a intensidade de produção de anticorpos é maior do que a induzida por pacientes com lesões cutâneas. (ROMERO *et al.*, 2005; LEONTIDES, *et al.*, 2002).

Genaro *et al.*, (2002) ressaltam que entre os métodos sorológicos mais utilizados em humanos está a Imunofluorescência Indireta, apresentando sensibilidade alta, porém variável nos estudos aplicados e, como o teste não é espécie - específico, ocorrem reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, dificultando seu uso em áreas endêmicas onde ocorrem a Doença de Chagas e a Leishmaniose Visceral. Com relação à IFI e ELISA, Manual..., (2000) resalta que ambas são úteis, principalmente nos casos com lesões extensas e múltiplas e nas lesões mucosa. A sensibilidade da IFI está em torno de 70% nas infecções por *L. (V.) brasiliensis* e é menor em infecções por *L. (V.) guyanensis*, sendo considerada positiva a reação a partir da diluição 1:40.

Estudo comparando a resposta de anticorpos em pacientes com LTA em região endêmica na Bahia demonstrou que, a sensibilidade da IFI e do ELISA foi alta em pacientes infectados por *L. (V.) brasiliensis*, mas a diferença foi estatisticamente significativa nos resultados do ELISA e, também foi observado que, os títulos da IFI estiveram sempre próximos do ponto de corte. A sensibilidade das 2 técnicas em pacientes com LTA por *L. (V.) brasiliensis* no Brasil foi de 79,6% para IFI e 98,2% para ELISA, já se tratando de infecção por *L. (V.) guyanensis*, essa cai para 71,7% e 85%, respectivamente. Sendo o ELISA considerado melhor que a IFI, especialmente, quando as espécies envolvidas estimulam baixos níveis de anticorpos. (ROMERO *et al.*, 2005).

Conforme Leontides *et al.*, (2002) a maioria dos estudos em Leishmaniose canina tem sido baseados na sorologia, incluindo principalmente a IFI e ELISA. A

sorologia detecta a maioria dos cães sintomáticos e uma proporção de cães assintomáticos, que pode ser tão alta quanto metade da população de cães soropositivos. Porém, esses métodos apresentam falhas na detecção de cães infectados no período pré-patente e antes da soroconversão, assim como, aqueles que nunca irão soroconverter e os cães soropositivos que se convertem em soronegativos, mas permanecem infectados, trazendo dados subestimados com relação à prevalência e incidência da doença nos estudos epidemiológicos. Essas falhas associadas a reações cruzadas têm contribuído para a existência de cães soropositivos não infectados, assim como, no fato da população soronegativa incluir cães infectados ou não. Segundo Genaro *et al.*, (2002) os títulos de anticorpos são normalmente baixos em casos com lesão recente, mas podem estar aumentados nas formas crônicas da doença, especialmente se houver envolvimento mucoso.

Os problemas sorológicos com pacientes humanos e caninos com Leishmaniose Tegumentar podem ser atribuídos em parte à falta de padronização adequada nos procedimentos para detecção de anticorpos específicos. Vários relatos mostram que as características intrínsecas dos testes diferem dependendo do ensaio e do antígeno usados. A dinâmica na produção de anticorpos depois do tratamento não é bem compreendida e o valor preditivo de diminuição ou aumento de anticorpos contra antígenos específicos de *Leishmania* não é bem compreendido, mesmo assim, a variação nos níveis de anticorpos parece depender mais da espécie de *Leishmania* envolvida do que de critérios como cura e sorologias pós-tratamentos (ROMERO, *et al.*, 2004).

De acordo com Feitosa *et al.*, (2000) com o desenvolvimento recente da técnica de PCR, prova altamente sensível e específica, é possível identificar e ampliar o DNA do cinetoplasto do parasito, sendo essa uma técnica mais acurada do que as sorológicas para o diagnóstico do agente. A reação de polimerase em cadeia (polimerase chain reaction / PCR) além de ser usada no diagnóstico e identificação das espécies de *Leishmania*, tem sido usada nos estudos epidemiológicos como ferramenta de pesquisa.

Em estudo realizado em cães clinicamente saudáveis na Grécia, utilizando a PCR em materiais obtidos através de biópsia de medula óssea e pele, a técnica apresentou menor sensibilidade na identificação do DNA de *Leishmania* na medula do que na pele, pois na pele, devido à atividade do mosquito, as biópsias possibilitam a identificação precoce do DNA do agente, fato que na medula depende da visceralização do agente. Ainda assim, a PCR realizada nos dois materiais foi mais sensível quando comparada aos resultados sorológicos obtidos através da IFI, confirmando assim o problema de subestimação de prevalências em estudos realizados através de sorologia, onde ocorre a presença de cães negativos porém infectados. (LEONTIDES *et al.*, 2002).

Baseado na comparação de seqüências de DNA, Mimori *et al.*, (2002), desenvolveram um painel de PCR com iniciadores (primers) que possibilitam a distinção das 5 espécies mais importantes causadoras de Leishmaniose Tegumentar no Novo Mundo. Em área endêmica de LTA no Equador, testaram a sensibilidade do PCR em material convencionalmente coletado (biópsias, aspirados e escarificações de pele e aspirados de linfonodo e medula óssea) e em coleta de material de lesão através de cotonete, método considerado mais fácil e menos doloroso e invasivo. A sensibilidade do teste foi de 93,8% nas amostras de cotonete, identificando espécies de *Leishmania* em 14 dos 16 pacientes coletados, comprovando que mesmo frente a pequenas amostras o PCR não apresenta variação significativa em sua alta sensibilidade e especificidade.

3.7 Tratamento

O tratamento, mais comumente preconizado, é a utilização de um antinomial pentavalente, Glucantime (Antimoniato de N-metil glucamina) ou Pentostan (Stiboglucanato de sódio) em leishmanioses humanas. Essas drogas foram introduzidas em 1945 e ainda apresentam efeitos no combate a alguns tipos de Leishmaniose, mas requerem tratamentos parenterais por mais de 28 dias e seus efeitos adversos associados a sua variada eficácia têm limitado seu uso. Ainda, devido ao fato deste quimioterápico estar sendo usado a mais de cinquenta anos, é comum a ocorrência de resistência em diversas partes do mundo, fato esse que sustenta a demanda por novas drogas para o

combate da doença. Contudo, a pretensão de criar uma droga ou formulação efetiva contra todas as formas do agente é muito otimismo, não somente pelas diferenças intrínsecas em suas sensibilidades a drogas, mas também pelo fato de tanto a forma visceral quanto à forma tegumentar, com seus diferentes locais de infecção, imporem diferentes farmacocinéticas às mesmas (GENARO *et al.*, 2002; CROFT; COOMBS, 2003)

O alvo da quimioterapia são as formas amastigotas intracelulares que sobrevivem e se dividem nos macrófagos teciduais. As amastigotas residem dentro da vesícula parasitófora, a qual se assemelha a um lisossoma secundário com pH 4,5-5,0; o meio ácido tem implicação na estratégia das amastigotas em conseguir nutrientes e íons para manter a homeostasia celular. Outras evidências sugerem que as diferentes espécies de *Leishmania* não só vivem em diferentes tipos de macrófagos, mas também têm diferentes adaptações para facilitar a sobrevivência intracelular, e estas devem ser levadas em conta na escolha de drogas eficientes para o tratamento dos casos. Dentre as outras drogas utilizadas estão as Pentamidinas que têm sido usadas como droga de segunda escolha, quando os antimoniais não são eficazes, apresentando como desvantagem alta toxicidade. A Anfotericina B também têm sido altamente eficiente no tratamento dos parasitos resistentes à antimoniais; porém, devido a sua alta toxicidade e complexidade de administração, não é rotineiramente utilizada. A sua formulação associada a lipídios (AmBisome®) reduz a toxicidade e aumenta a meia vida plasmática do princípio ativo quando comparada a droga isolada, porém, devido a seu alto custo, tem seu uso limitado; os análogos da Purina (Alopurinol) devido a biodisponibilidade oral e pela ampla utilização em outras doenças é bastante utilizado, porém tem desapontado como leishmanicida, já que, o Alopurinol é usado como substrato por várias enzimas dos tripanossomatídeos e é incorporado seletivamente ao ácido nucléico do parasito. A classe dos antifúngicos (Cetoconazol, Itraconazol, Fluconazol) age inibindo uma co-enzima responsável pela síntese dos esteróides do parasito, apresentando eficácia no tratamento de algumas espécies do agente. Os Imunomoduladores, como o Interferon, agem como coadjuvantes no tratamento, potencializando o efeito dos antimoniais e como mais recente avanço a droga desenvolvida para o combate ao câncer, Multifosina, apresenta como limitação o efeito teratogênico que exclui seu uso em pacientes gestantes, apresentando administração por

via oral e também, segundo os mesmos autores, devendo ser considerada no tratamento da doença em cães (CROFT; COOMBS, 2003; MANUAL..., 2000).

Segundo El-On; Jacobs e Weinrauch, (1988) já faz tempo que novas drogas para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana vem sendo pesquisadas, recentemente drogas de aplicação tópica, na forma de pomadas, tem sido testadas no tratamento de LTA apresentando resultados promissores, porém bastante variáveis. Princípios ativos como a Paramomicina, Clorpromazina, Alopuriol, Gentamicina e outros Aminoglicosídeos têm sido estudados “in vitro” e “in vivo”, demonstrando variação considerável nas suas eficácias. Ainda, segundo os mesmos autores, a forma clínica da doença influi na duração do tratamento e na formulação das drogas e dependendo da espécie do agente envolvida e das drogas utilizadas (isoladas ou associadas), as lesões podem cicatrizar completa ou parcialmente ou não responderem à terapia, podendo ocorrer até mesmo piora no quadro clínico. Portanto as terapias tópicas, assim como as orais, mesmo com seus resultados promissores, porém variáveis, dependem de mais pesquisas para padronização de doses e esquemas terapêuticos e análise de suas eficácias relativas e custos benefícios para, só assim, poderem ser usadas como ferramentas úteis e seguras no tratamento deste agravo.

Em cães o protocolo terapêutico utilizado segue os moldes do usado em humanos, embora; no que diz respeito à saúde pública, em geral é recomendável o sacrifício dos cães infectados (URQUHART *et al.*, 1998). Já que, segundo nota técnica do Ministério da Saúde, as tentativas de tratamento da Leishmaniose canina, por meio das drogas tradicionais, tem tido baixa eficácia e o uso rotineiro de drogas em cães induz à remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotomíneos e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas. Portanto, o tratamento canino não tem apresentado eficácia e nem diminuído a importância do cão como reservatório (BRASIL, 2004).

3.8 Controle e Prevenção

Com o passar dos anos, as agências internacionais de saúde têm aumentado os esforços para aperfeiçoar as metodologias de vigilância e controle da Leishmaniose. Melhores ferramentas têm sido testadas e desenvolvidas em diversos países, como o desenvolvimento de testes e "Kit's" sorológicos para aperfeiçoar o diagnóstico e detecção de casos a campo; priorização das pesquisas em busca de novas opções de tratamento, como a Multifosina, primeiro tratamento oral anti-*Leishmania* e o controle mais eficiente, e investimento em inseticidas, para o combate dos vetores. Nas áreas zoonóticas de leishmaniose, não ocorrem grandes avanços, principalmente no controle da forma cutânea da doença, devido à natureza silvestre dos mamíferos reservatórios e dos flebotômíneos, dificultando a implementação e manutenção das pesquisas. Porém, nas áreas antroponóticas, avanços como inseticidas de aplicação tópica (spot-on) e impregnados em coleiras, que têm sido registrados para o uso em cães a fim de combater e controlar a ação dos mosquitos e o surgimento de várias candidatas a vacinas, indicam inovações com relação a o controle e prevenção. (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

Segundo Reithinger *et al.*, (2004) estudos experimentais têm demonstrado que inseticidas tópicos e coleiras impregnadas com deltametrina podem proteger cães de mais de 85% das picadas de mosquitos por um período maior do que seis meses. Testes a campo em áreas endêmicas na Itália e Irã demonstraram que cães usando as coleiras tiveram risco de infecção por *L. (L.) infantum* significativamente menor, quando comparados aos grupos controles. Também surgiram evidências de que o uso das coleiras com deltametrina em cães, induziu a uma significativa redução na incidência de *L. (L.) infantum* em crianças de uma mesma região, tanto pela redução de picadas nos cães quanto pelo aumento na mortalidade dos mosquitos que realizam hematófagia nesses animais. No Brasil, estudos similares comprovaram a ação anti-repasto das coleiras contra o *Lutzomyia longipalpis*, reduzindo o índice de picadas, em cães, por 35 semanas nos estudos realizados, parecendo ser está uma alternativa interessante de controle de Leishmaniose canina e, conseqüentemente, humana.

Atualmente as vacinas contra Leishmaniose se enquadram em vacinas de primeira geração e de segunda geração. As vacinas de primeira geração utilizam como antígeno as formas promastigotas de *Leishmania* autoclavadas com ou sem a adição de adjuvante. As vacinas de segunda geração são vacinas produzidas através do uso de antígenos recombinantes, onde são encontrados vários antígenos como candidatos a vacina. O problema para a imunologia e imunoprofilaxia das infecções pelo agente, consiste inicialmente nas diferentes respostas imunes dos hospedeiros às espécies de *Leishmania* existentes e ao fato de que as diferentes espécies induzem várias diferentes respostas imunológicas, essa interação entre espécies do agente e respostas imunes dos hospedeiros é um fator que dificulta o entendimento total do que realmente constitui uma resposta protetora contra Leishmaniose em humanos (DUMONTELL; McMAHON-PRATT; PRICE, 2001).

Pesquisas realizadas na Colômbia por Vélez *et al.*, (2005) utilizando uma vacina de primeira geração, com antígenos de *L. (L.) amazonensis*, contra LTA e uma vacina placebo, demonstraram que embora a vacina seja segura, não é eficiente, pois os candidatos acompanhados por 12 meses ao final do estudo apresentavam reação de Montenegro positiva, sem diferença significativa entre os 2 grupos. Evidenciando que as vacinas de primeira geração induzem conversão vacinal (produção de anticorpos), porém essa resposta não está relacionada com proteção contra a infecção natural nos indivíduos vacinados. Dumontell; McMahon-Pratt e Price, (2001) citam que estudos vacinais realizados no Sudão, contra LV, utilizando vacina de primeira geração com antígenos de *L. (L.) major* não demonstrou diferença significativa na proteção contra LV quando comparada ao adjuvante somente, mesmo após duas aplicações vacinais.

As vacinas de segunda geração ainda em fase de teste necessitam de padronização e correção de problemas relacionados à estabilidade da formulação, potência dos antígenos e controle na qualidade de produção para somente então serem realizadas comparações mais conclusivas entre os antígenos candidatos a vacinas (DUMONTELL; McMAHON-PRATT; PRICE, 2001).

Com relação à utilização de vacinas para Leishmaniose canina, O Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA) registrou em 2003 uma vacina canina para LV, a Leishimune ® produzida pela Fort Dodge Saúde Animal Ltda. Estudos experimentais apontam para uma eficácia vacinal de 76 % contra quadros clínicos moderados e graves da doença nos cães. Entretanto, as evidências não fazem relação, até o momento, ao efeito da vacina na prevenção da infecção, nem sobre a infectividade do cão vacinado para o vetor (transmissão do parasito). Outro aspecto relevante com a introdução da vacina, diz respeito à modificação do estado imunológico dos cães vacinados, e a impossibilidade de diferenciar a infecção natural da vacinação, por meio dos testes imunológicos disponíveis no mercado, bem como nos Laboratórios de Saúde Pública (LACEN) e Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), dificultando assim as ações de vigilância e controle da LV tanto canina quanto humana. Desse modo, o Ministério não indica o uso da vacinação animal com a vacina em questão para controle da doença humana (uso em saúde pública), pois a prevenção na infecção dos cães, corresponde a uma condição imprescindível para a vacina ter potencial uso como estratégia de prevenção e controle (BRASIL, 2005).

Conforme Manual...(2000), em virtude das características peculiares da LTA as estratégias de controle devem ser flexíveis e distintas, adequadas a cada região ou foco particular, já que, as diversidades de agentes, reservatórios, vetores e situações epidemiológicas aliadas ao conhecimento ainda insuficiente sobre vários desses aspectos, torna complexo o controle da LTA. As principais medidas de controle recomendadas são o uso de inseticidas no controle do vetor, uso de proteção individual, através dos meios mecânicos como telas em janelas e portas, mosquiteiros, repelentes e roupas compridas para evitar a picada do vetor. Há necessidade da realização de inquéritos para a evidenciação dos papéis de reservatórios no ambiente peri e intradomiciliar, assim como, a realização de medidas educativas, visando capacitar os profissionais da saúde para conhecer, combater e esclarecer os indivíduos em risco sobre a dinâmica saúde/doença, relacionada à LTA. Com relação ao controle de reservatórios, não é recomendado a eliminação dos animais positivos e sim sua manutenção em lugares limpos e afastados das habitações humanas.

No RS, as ações de controle e prevenção de LTA por parte da Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde, segundo Santos *et al.*, (2005a), incluem o fornecimento de medicamento para LTA; capacitação das regionais em epidemiologia, com relação à situação do agravo no Estado; capacitação de entomologistas na captura e identificação dos vetores; levantamento da fauna de flebótomos, capacitação de médicos veterinários da região metropolitana de Porto Alegre na identificação de LTA em animais domésticos e, por fim, projeto de estudo sobre reservatórios de *Leishmania* spp. nas áreas onde houve casos de LTA, com objetivo de determinar os agentes envolvidos na transmissão desse agravo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Descrição da Área:

A área estudada localiza-se na região sudeste do município de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, local de ocorrência de 12 casos de LTA humana no período de 2000 a 2005. Na divisa entre os bairros Lomba do Pinheiro, Restinga e Belém Novo, encontra-se a Estrada do Rincão, local escolhido para o presente estudo por ser o local de ocorrência de pelo menos 5 casos de LTA humano no período referido. As habitações encontradas estão situadas nas encostas de morro, onde predominam resquícios de mata nativa e algumas lavouras ou em áreas de mata nativa desmatada (Figuras 1 e 2). Além da agricultura de pequeno porte, também é atividade comum na região a criação de suínos. Por ser uma área de periferia, afastada do centro da cidade, também é normal a presença de lixões e cães abandonados, provenientes do descaso dos antigos donos e da reprodução descontrolada dos próprios cães errantes. Os equinos também são facilmente encontrados, geralmente sendo utilizados nos trabalhos da lavoura e no transporte da população.



Figura 1 - Casa em encosta de morro, circundada por mata nativa.



Figura 2 – Pátio dos fundos de residência na Estrada do Rincão, evidenciando o ambiente rico em matéria orgânica úmida.

Para realização do estudo foram escolhidos por conveniência 3 dos 5 casos humanos da Estrada do Rincão. Conforme recomendação da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) em 1996, com relação a surtos de Leishmaniose, foi realizada a delimitação de um raio de 1 km a partir de cada um dos 3 casos. Os 3 raios de ação juntos perfaziam uma distância de 4 km ao longo da Estrada do Rincão (Figuras 3 e 4). A partir da delimitação do perímetro de trabalho, todas as residências nele localizadas foram visitadas e os moradores inqueridos sobre a presença de cães domiciliados e, havendo resposta positiva, os mesmos eram convidados a participarem no estudo.



Figura 3 - Georreferenciamento dos casos confirmados de Leishmaniose em Porto Alegre, até o ano de 2003.(Fonte:Boletim Epidemiológico, 2003-ECE-CGVS-SMS-POA).

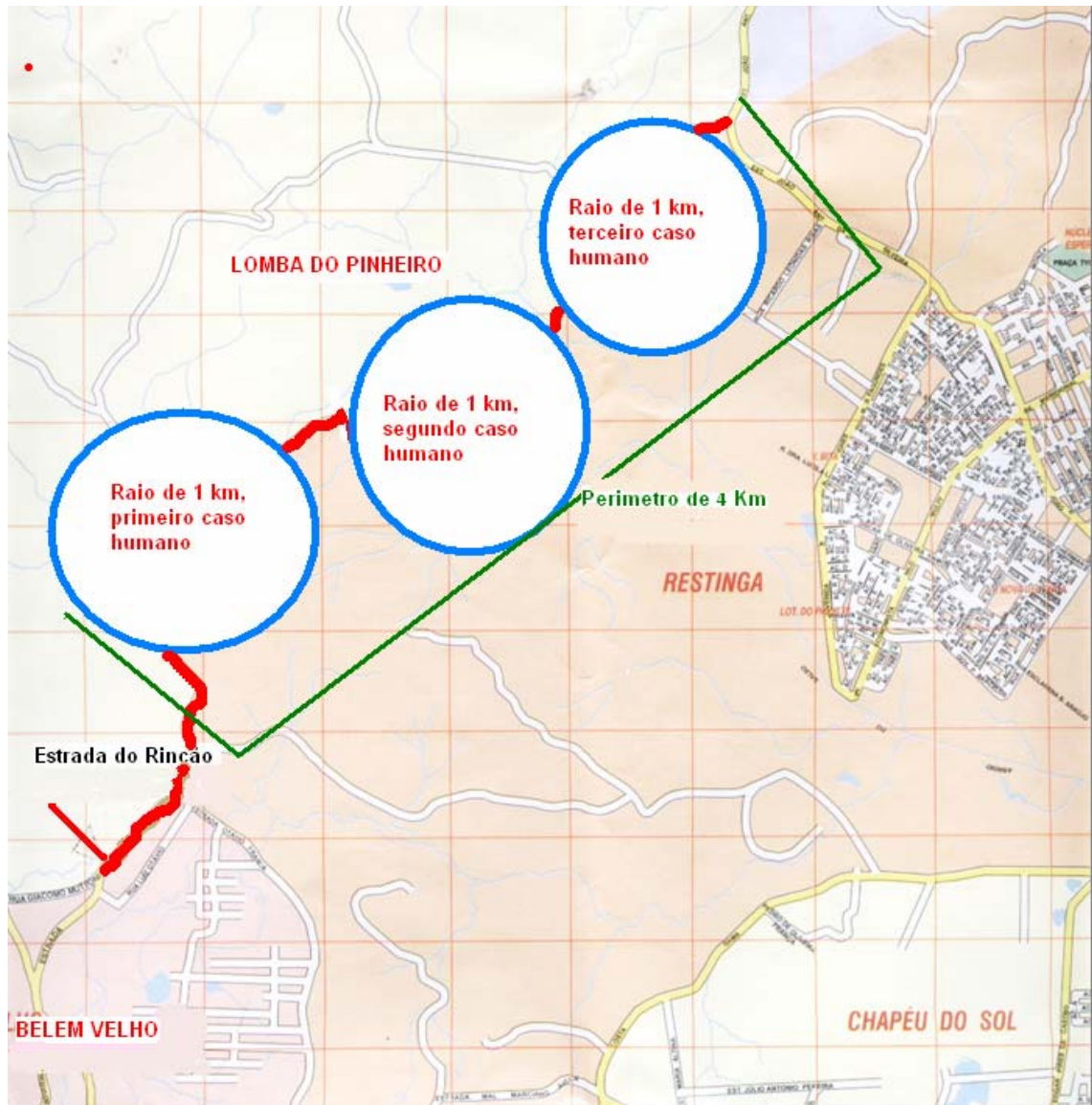


Figura 4 - Mapa Esquemático da Estrada do Rincão, divisão entre os bairros da Lomba do Pinheiro, Restinga e Belém Velho, evidenciando o raio de 1 km utilizado em cada foco autóctone humano e a delimitação do perímetro de trabalho.

Exame dos Animais:

No período de março a abril de 2005, foram visitadas todas as habitações localizadas dentro do perímetro estabelecido para coleta, com o intuito de coletar e examinar amostras de sangue do maior número possível de cães domiciliados. Visando um maior número de amostras, e sabendo que a porcentagem de cães positivos assintomáticos em área endêmicas é considerável, se optou pela coleta de sangue de cães independente da sintomatologia clínica, sendo o principal critério de seleção para a amostra o fato dos animais serem domiciliados dentro do raio de 1 km de cada um dos casos humanos pré-selecionados. No decorrer dos 4km da área de atuação foram coletadas amostras de 200 cães, todos os animais tiveram sua participação garantida no projeto, através do esclarecimento e da autorização dos proprietários mediante a assinatura de termo de consentimento informado que se encontra em anexo. O total de cães participantes foi de 109 fêmeas e 91 machos. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e pelo Comitê de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária –FAVET/UFRGS.

A coleta de material biológico (sangue) para pesquisa de anticorpos foi realizada por punção das veias Jugular ou Cefálica, utilizando seringa de 3ml com agulha hipodérmica calibre 0,7mm x 25mm após desinfecção do local com álcool 70 Gl. Os sangues coletados foram colocados em tubos de ensaio sem anti-coagulante, identificados com o nome do animal doador e armazenados em bolsa térmica com gelo em gel, para resfriamento. Todas as informações de identificação dos animais (idade, sexo, raça, pelagem, nome) assim como endereço e nome completo do proprietário foram coletados e anotados em planilhas para controle das coletas. Após o término das coletas o material era levado ao Laboratório de Protozoologia da FAVET-UFRGS, onde após centrifugação para separação dos soros, estes eram armazenados em flaconetes e congelados para posterior realização da Técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI).

O kit para diagnóstico de Leishmaniose canina usado para a reação de IFI foi cedido pelo setor de reativos do BioManguinhos, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de

Janeiro. O kit contém 4 frascos de Antígeno de *Leishmania*; 1 frasco de Glicerina Tamponada; 1 frasco de Azul de Evans; 1 frasco de conjugado Anti-cão-FITC; 4 caixas contendo 50 lâminas cada e manual de instruções. O antígeno utilizado é constituído por formas promastigotas da espécie *L.(V.) brasiliensis*. Os soros a serem testados foram diluídos em razão 2, nas diluições de 1:40 e 1:80, os controles positivo e negativo foram diluídos em 1:40, sendo que os controles positivos foram cordialmente cedidos pelo Laboratório de Protozoologia da Fundação Oswaldo Cruz, obtidos de cães positivos para LTA.

A metodologia adotada para realização da reação de Imunofluorescência Indireta, é descrita no anexo 2. A confecção das lâminas, titulação dos soros controles e leitura das amostras foi efetuada no Laboratório de Parasitologia da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN/RS).

5 RESULTADOS

Apresentaram positividade para anticorpos de *Leishmania* spp., através da reação de Imunofluorescência Indireta, 7 das 200 amostras de soros caninos analisados, evidenciando uma soroprevalência de 3,5% de anticorpos para *Leishmania* spp. no total de amostras estudadas. Nenhum dos animais positivos apresentava lesão compatível ou sugestiva de LTA.

Com relação à titulação apresentada pelas amostras positivas, 5 apresentaram reatividade na diluição de 1:40 (ponto de corte) e apenas 2 apresentaram-se reativas na diluição de 1:40 e 1:80. Conforme demonstra a tabela abaixo.

Tabela 3 –Reações de Imunofluorescência Indireta (IFI) positivas para Leishmaniose Tegumentar Canina, na região da Lomba do Pinheiro – Porto Alegre – janeiro de 2006.

Cão-número	Diluição do soro
4	1:80
28	1:40
86	1:80
88	1:40
169	1:40
173	1:40
184	1:40

Dentre as amostras positivas, 6 eram provenientes de caninos machos e 1 de uma fêmea. Com relação à idade, 3 soros pertenciam a animais com 2 anos de idade, 1 soro a um com 10 anos, 2 soros a cães com 6 anos e 1 amostra a um cão de 4 anos de idade. Desses animais, 5 eram sem raça definida (S.R.D) e 2 pertenciam à raça Pastor Alemão (P.A), conforme tabela abaixo:

Tabela 4 - Demonstrativo das características (idade em anos; sexo e raça) dos caninos soropositivos para *Leishmania* spp. na Imunofluorescência Indireta, na região da Lomba do Pinheiro – Porto Alegre – janeiro de 2006.

Amostras Positivas	Idade	Sexo	Raça
4	2	M	S.R.D
28	10	M	S.R.D
86	4	M	P.A
88	6	M	P.A
169	2	F	S.R.D
173	2	M	S.R.D
184	6	M	S.R.D

O teste do Qui-quadrado foi utilizado para verificar a existência de correlação significativa entre a idade e a positividade na IFI. Os 200 animais foram divididos em 4 grupos distintos pela idade em meses, para aplicação do teste, conforme segue abaixo:

Tabela 5- Resultado do teste de Imunofluorescência Indireta para *Leishmania* spp., segundo a faixa etária de 200 cães na região da Lomba do Pinheiro – Porto Alegre – janeiro de 2006.

	0-24	25-48	49-72	mais de 72	Total
Negativo	69	44	30	50	193
Positivo	3	1	2	1	7
Total	72	45	32	51	200

De acordo com o resultado do teste Qui-quadrado ($p = 0,7079$), não houve associação significativa entre a positividade na IFI e a idade dos cães, estratificada em meses.

De acordo com o resultado do Teste Exato de Fisher ($p = 0,7045$), não foi encontrado associação significativa entre a positividade na IFI e a presença ou ausência

de raça definida. Para essa análise a população de 200 cães foi estratificada em animais com raça definida (com Raça) e sem raça definida (SRD). Conforme tabela abaixo:

Tabela 6- Resultado do teste de Imunofluorescência Indireta para *Leishmania* spp., segundo a raça de 200 cães na região da Lomba do Pinheiro – Porto Alegre – janeiro de 2006.

	SRD	Com RAÇA	Total
IFI POS	5 (2,5%)	2 (1%)	7 (3,5%)
IFI NEG	115 (57,5%)	78 (39%)	193 (96,5%)
Total	120 (60%)	80 (40%)	200 (100%)

Para avaliar a existência de associação significativa entre a positividade na IFI e o sexo, os 200 animais foram estratificados em 2 grupos (machos e fêmeas) e o Teste Exato de Fisher foi aplicado conforme tabela abaixo:

Tabela 7- Resultado do teste de Imunofluorescência Indireta para *Leishmania* spp., segundo o sexo de 200 cães na região da Lomba do Pinheiro – Porto Alegre – janeiro de 2006.

	Machos	Fêmeas	Total
IFI POS	6 (3%)	1 (0,5%)	7 (3,5%)
IFI NEG	85 (42,5%)	108 (55%)	193 (96,5%)
Total	91 (45,5%)	109 (55,5%)	200 (100%)

De acordo com o resultado do Teste Exato de Fisher ($p = 0,0484$) houve uma associação significativa entre a positividade na IFI e o sexo dos cães. A Odds - Ratio dos machos foi de 7,624.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a soroprevalência de anticorpos para *Leishmania* spp. na população canina domiciliada em um raio de 1 km de 3 casos autóctones humanos de LTA, contribuindo, desse modo, para o estudo epidemiológico do agravo na região. Para o estudo foi utilizado o diagnóstico sorológico através da reação de IFI, com “kit’s” cedidos pelo Biomanguinhos-Fiocruz. Genaro *et al.*, (2002) ressaltam que, com relação ao diagnóstico sorológico de LTA em humanos, a IFI é o teste mais utilizado. Para Marzochi; Schubach e Mazorchi, (1999) além da IFI, o ELISA também é utilizado e indicado por vários autores para a realização de inquéritos soroepidemiológicos em humanos.

A maioria dos estudos realizados com caninos inclui as técnicas sorológicas de IFI e ELISA. Ambas apresentando sensibilidade alta, porém variável tanto em humanos como em caninos, sendo o ELISA a mais sensível entre as 2 (LEONTIDES *et al.*, 2002; ROMERO *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2005).

Devido a problemas operacionais não foi possível a obtenção do Teste Imunoenzimático (ELISA) para a utilização no estudo, sendo o mesmo realizado somente com a IFI, já que, segundo Leontides *et al.*, (2002) as sorologias detectam a maioria dos cães sintomáticos e grande parte dos assintomáticos e segundo Silveira *et al.*, (1996) a pesquisa de anticorpos em áreas endêmicas vem sendo realizada com IFI e títulos significativos têm sido encontrados em cães com ou sem sinais clínicos.

Dos 200 animais participantes no estudo 7 apresentaram positividade para anticorpos de *Leishmania* spp., evidenciando uma soroprevalência de 3,5% na população estudada. Os 7 cães positivos tiveram títulos próximos ao ponto de corte de 1:40 utilizado na IFI, e não apresentaram nenhum sinal clínico compatível com LTA.

Com relação à soroprevalência, estudos têm demonstrado variação nos resultados, Silveira *et al.*, (1996) realizando pesquisa de anticorpos na população canina em área endêmica no Paraná encontraram uma soroprevalência de 18,2% de anticorpos para *Leishmania* em uma população canina de 132 cães investigados. Em outro estudo, agora em município endêmico para LTA no Rio de Janeiro, Santos *et al.*, (2005b) encontraram soroprevalência de 8.9% em 98 cães de área endêmica suburbanizada e 39,4% em 40 animais estudados, em área endêmica rural.. Na região Sul, no estado do Paraná, em uma população de 159 cães foi observada uma prevalência de anticorpos de 4,4 % (CASTRO *et al.*, 2005). Todos os levantamentos acima citados utilizaram ponto de corte na diluição de 1:40. Leontides *et al.*, (2005) em estudo realizado na Grécia, em cães sem sinais clínicos, domiciliados em área endêmica, evidenciou 12,3% de positividade para anticorpos de *Leishmania* spp., em uma população de 73 cães, através da IFI.

Embora as soroprevalências citadas sejam maiores que a obtida na pesquisa, acreditamos ser a soroprevalência de 3,5% bastante significativa, pois é comum que os testes sorológicos apresentem algumas falhas na detecção de animais infectados no período pré-patente e antes da soroconversão, assim como dos soropositivos que negatavam, mas permanecem infectados trazendo dados subestimados para os estudos epidemiológicos de soroprevalência (LEONTIDES *et al.*, 2002). Além de ser verificado que cães com sorologia reagente muitas vezes não apresentam sinais clínicos, atuando, no entanto, como bons reservatórios, com grande poder de infectar o vetor da doença (BRASIL, 2005).

Com relação aos valores encontrados próximos ao ponto de corte, esses já foram observados por Romero *et al.*, (2005) assim como por Santos *et al.*, (2005b) e Silveira *et al.*, (1996) que constataram reatividade sorológica nas diluições de 1:40 e 1:80 na maioria das sorologias realizadas. É fato consumado que os títulos sorológicos estão intimamente relacionados com a forma de LTA envolvida, a gravidade e o número de lesões encontradas, ocorrendo títulos maiores em casos de envolvimento mucoso e de lesões múltiplas com grande comprometimento cutâneo (MANUAL..., 2000).

Quanto à associação significativa entre a positividade na IFI e o gênero (sexo) macho, esse fato pode estar relacionado com o maior deslocamento dos machos atraídos por fêmeas no cio, tornando-os mais expostos à atividade do mosquito, já que, a maioria das casas está a menos de 300 metros da mata nativa, tornando inevitável aos animais errantes um contato íntimo com a mata. Os relatos da existência de associação significativa entre sexo, raça e idade são contraditórios, variando entre os estudos, provavelmente devido a outros fatores envolvidos na cadeia epidemiológica da doença em determinado foco (LEONTIDES *et al.*, 2002).

Apenas 1 cão sorologicamente positivo era domiciliado junto a um caso humano de LTA e outro em uma distância menor do que 200 metros da residência de outro caso. Os outros 5 animais positivos são domiciliados dentro do raio de 1 km dos casos humanos, porém não em residências onde a doença ocorreu em humanos. Esses dados nos levam a pensar que no foco de LTA na região da Lomba do Pinheiro, Estrada do Rincão, o cão ainda não tenha o papel de principal fonte de infecção para humanos, não fazendo a ligação entre o foco silvestre e o urbano, não vinculando a infecção no peri e intradomicílio. Nesse caso, devido à proximidade das residências com a mata nativa, tanto os cães quanto às pessoas estariam se infectando a partir da picada do inseto vetor que tem como reservatório vertebrado, um outro animal, provavelmente silvestre, responsável pela infecção do vetor e manutenção do foco da doença. Desse modo, o cão tem participação secundária no ciclo silvestre que ocorre na região, porém fica a pergunta, de por quanto tempo o cão ainda permaneceria nesse papel, pois é sabido que o mesmo apresenta potencial para se tornar a principal fonte de infecção no meio urbano e tem sido assim responsabilizado (FALQUETO *et al.*, 1986).

Epidemiologicamente, caracterizamos a região estudada como um local de mata nativa remanescente, onde aglomerados semi-urbanizados foram surgindo nas encostas dos morros e na beira da mata. Associado a esse fato, também é facilmente observado a presença de várias espécies de animais domésticos e silvestres. Dentre os animais domésticos mais facilmente encontrados estão os cães e os suínos, sendo os últimos, criados de maneira muito rústica, sem controle sanitário, contribuindo assim, para uma grande presença de lixo que é colocado muitas vezes nas bordas da mata possibilitando

o surgimento de matéria orgânica em decomposição, propiciando as condições necessárias para a adaptação do vetor ao ambiente urbano e peri-urbano. Confirmando dessa forma, uma cadeia epidemiológica urbana, conforma a descrita por Souza *et al.*, (2005); Manual..., (2000) e Desjeux, (2004).

O presente trabalho se constitui no início de uma linha de ação na área da Medicina Veterinária que trabalha com uma patologia considerada re-emergente no Brasil e nova no Estado do Rio Grande do Sul. Sendo assim, é comum o encontro de dificuldades na obtenção de informações e recursos, sendo escassos os dados disponíveis sobre o comportamento da doença no local. Esse fato afeta tanto aos profissionais envolvidos quanto à população. Para Manual...(2000), as características epidemiológicas variáveis, peculiares às áreas endêmicas de LTA, fazem com que as estratégias de controle e prevenção sejam flexíveis e que investigações para um melhor conhecimento do problema sejam indispensáveis. Segundo Barbosa *et al.*, (1999), estudos vêm demonstrando ser comum a presença de cães infectados em áreas endêmicas, especialmente na região sudeste, em ambientes domiciliares. Esse fato alerta para a presença, embora baixa, de possíveis fontes de infecção próximas ao convívio humano. Concordamos com ambos os relatos e consideramos que os resultados obtidos no presente trabalho mostram a necessidade da continuação das pesquisas e do surgimento de novas, nas diversas áreas das ciências relacionadas com o problema.

Faz-se necessária à confirmação dos resultados aqui obtidos, empregando-se técnicas mais sensíveis que a IFI para o diagnóstico. Com por exemplo, o ELISA utilizado por Barbosa *et al.*, (1999) em estudos epidemiológicos em cães, onde a prevalência obtida foi cerca de 3 vezes maior do que a obtida na IFI, ou como o PCR, utilizado por Martin-Sanchez *et al.*, (2002) e por Leontides *et al.*, (2002), apresentando valiosa contribuição, segundo os mesmos, na confirmação do diagnóstico de Leishmaniose, devido a sua sensibilidade maior do que as dos meios convencionais de diagnóstico.

Estamos cientes do passo inicial dado com o estudo, assim como da importância do mesmo e visualizamos um futuro rico em possibilidades de pesquisa na busca de conhecer a LTA em nosso meio, não só para a Medicina Veterinária como também para as demais áreas envolvidas nesse problema de saúde pública.

7 CONCLUSÕES

- 1 3,5% dos cães estudados apresentaram positividade na IFI.
- 2 A soropositividade baixa associada ao fato de os animais positivos terem sido assintomáticos, não descartam o seu papel como fonte de infecção e potencial risco à saúde pública.
- 3 Os resultados encontrados evidenciam a possibilidade da existência do protozoário na população canina da área.
- 4 O presente estudo indica a necessidade de novas pesquisas utilizando técnicas diagnósticas mais sensíveis para comprovação dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALERTA sobre transmissão autóctone de Leishmaniose cutâneo mucosa no município de Porto Alegre. **Boletim Epidemiológico [da] Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre**, v. 5, n. 17, p. 1-5, nov. 2002.

ANDRADE, M. S. *et al.* Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (V) brasiliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 229-233, 2005.

ANTONELLI, L. R. V. *et al.* Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters** v.101, p. 226-230, 2005.

AS LEISHMANIOSES. Laboratório de imunomodulação - Depto. De Protozoologia/IOC - Fiocruz. 1997. Disponível em: <<http://websight@pobox.com>>. Acesso em: 15 maio 2004.

BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; TIBAYRENC, M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p: 1137-1147, 1999.

BARBOSA, G. M. S. *et al.* Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em cães, no Município de Parati, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, n.3, p. 641-646, jul/set. 1999.

BARBOSA, W; BARBOSA, L. G. Leishmaniose cutâneo-mucosa. IN: CASTRO, L. P.; CUNHA, A.S.; RESENDE, J.M. **Protozooses Humanas**. São Paulo: BYK, 1994a. p. 78-88.

BARBOSA, W; BARBOSA, L. G. Leishmaniose Visceral. IN: CASTRO, L. P.; CUNHA, A.S.; RESENDE, J.M. **Protozooses Humanas**. São Paulo: BYK, 1994b. p. 226.

BRASIL, Ministério da Saúde. Nota Técnica. Vacina anti-leishmaniose visceral canina Leshimune. Brasília, D.F., 29 set. 2005. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lvc-nota-tecnica.pdf>>. Acesso em: 05 out. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota técnica. Uso do antimoniato de meglumina em cães. Brasília, D.F., 30 jan. 2004. **Clínica Veterinária**, v. 9, n. 49, p. 22, mar/abr. 2004.

CALZA, L. *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis after visceral disease in a patient with AIDS. **Journal American Academy of dermatology**. v. 50, n. 3, p. 461-465, mar. 2004.

CASTRO, E. A. *et al.* Eco-epidemiological survey of leishmania (*viannia*) *brasiliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 93, n. 2, p. 141-149, 2005.

CASTRO, A.G. *et al.* **Controle diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar): Normas Técnicas**. 2 ed. Brasília: Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde, 1996. p. 85.

CHAVES, L.F.; AÑEZ, N. Species co-occurrence and feeding behavior in sand fly transmission of American cutaneous leishmaniasis in western Venezuela. **Acta Tropica**.v.92, n. 3, p. 219-224, 2004.

COSTA, A. U. M. L. *et al.* Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DLC). **Acta Tropica**, v.96, n. 1, p. 9-15, 2005.

COUTINHO, S. G. *et al.* Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 31, n.1, p. 139-142. 1998.

CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n.11, nov, 2003.

CUBA, C. A. C. Diagnostico parasitologico de la leishmaniasis tegumentaria americana. **Revista Medicina Experimental**, v. 17, p. 1-4, 2000.

DA-CRUZ, A. M. *et al.* Atypical Mucocutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania brasiliensis* in an Acquired Immunodeficiency Syndrome Patient: T-cell Responses and Remission of Lesions Associated with Antigen Immunotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 4, p. 537-542, jul/ago. 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DUMONTELL, E.; McMAHON-PRATT, D.; PRICE, Y. L. **Report of the Fourth TDR/IDRI Meeting on Second-Generation Vaccines against Leishmaniasis**. México:Universidade Autônoma de Yucatán, 2001. Disponível em: < <http://www.who.int/tdr>>. Acesso em: 17 dez 2004.

EL-ON, J.; JACOBS, G. P.; WEINRAUCH, L. Topical chemotherapy of cutaneous Leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 4, n. 3, p. 77-81, 1988.

FALQUETO, A. *et al.* Participação do cão no ciclo de transmissão da Leishmaniose tegumentar no Município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, p.155-163, abr./jun. 1986.

FARAJNIA, S. *et al.* Mononuclear cells from patients recovered from cutaneous leishmaniasis respond to *Leishmania major* amastigote class I nuclease with a predominant Th1-like response. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 139, n 3, p 498-505, 2005.

FEITOSA, M. M. *et al.* Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba- São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 5, n. 28. p. 36-44, 2000.

FERRER, L.; FONDEVILA, D.; MARCO, A. Atypical nodular leishmaniasis in two dogs. **The Veterinary Record**, v. 126, n 27, jan. 1990.

FERRER, L. *et al.* Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of small Animal. Practice**, v. 29, n. 6, p. 381-388, 1988.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. Porto Alegre. Sulina. 1993. p. 77-79.

GENARO, O. *et al.* Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10.ed. São Paulo: Atheneu. 2002. p.36-53.

GONÇALVES, B.R.D. Identificação da fauna de Flebotomíneos em função de casos autóctones de LTA. **Boletim Epidemiológico [da] Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre**. v. 5, n. 21, nov. 2003, p. 5.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology** v.35, p. 1169-1180, 2005.

HARMS, G.*et al.* Cutaneous leishmaniasis associated with extensive lymphadenopathy during an epidemic in Ceará State, northeast Brazil. **Acta Tropica**, v.93, n. 3, p. 303-310, 2005.

INESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E in various stages of canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.103. p.77-88, 2005.

KLAUS, S.; FRANKENBURG, S. Cutaneous Leishmaniasis in the Middle East. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 137-141, March 1999.

KLAUS, S.N.; FRANKENBURG, S.; INGBER, A. Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v.17, n. 3, p.57-260, May 1999.

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

LEONTIDES, S. L. *et al.* A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v.109, n. (1/2), p.19-27, 2002.

LINDSAY, D.S.; ZAJAC, A.M.; BARR, S.C. Leishmaniasis in American Foxhounds: An Emerging Zoonosis?. **Compendiumvet**, v. 24, n. 4, April 2002. Disponível em: <<http://www.compendiumvet.com>> Acesso em 20 jun. 2004.

MACHADO-COELHO, G.L.L *et al.* Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.99, p. 55-61, 2005.

MANUAL de controle da Leishmaniose tegumentar americana. Brasília: Ministério da Saúde, 2000. 62p.

MARCONDES, C. B. Flebotomíneos. In: _____. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 13-30.

MARTIN-SANCHEZ, J. *et al.* The high sensitivity of a PCR-ELISA in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 96, n. 7, p. 669-677, 2002.

MARZOCHI, M.C.A.; SCHUBACH, A.O.; MARZOCHI, K.B.F. Leishmaniose tegumentar Americana. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 39-64.

MICHALICK, M. S. M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu. 2002. p. 31-35.

MIMORI, T. *et al.* Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Acta Tropica**, v. 81, n. 3, p. 197-202, 2002.

NATALIDADE em guerra nas vilas. **Jornal Bicho de Rua**, Porto Alegre, v.1, n.4, [2005]. p. 4-5.

NIEVES, E.; PIMENTA, P.F.P. Developmente of *Leishmania (Viannia) brasiliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n 1, p. 134-140, 2000.

OLIVEIRA, C.C.G. *et al.* Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. **Acta Tropica**, v.90, n. 2, p. 155-162, 2004.

PEREIRA, L.I.A. *et al.* Leishmaniose tegumentar estudo de um surto em Crixás, Goiás (agosto de 1974), Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 10, n.3, p.181-191. 1981.

RANGEL, E. F.; BANDEIRA, V. Vetores de Doenças Urbanas. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA**, 18, 2003, Rio de Janeiro. Hotel Glória. Sociedade Brasileira de Parasitologia, Proferida em 27 ago 2003.

REITHINGER, R. *et al.* Domestic dog ownership: a risk factor for human infection with *Leishmania (Viannia)* species. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.97., p. 141-145, 2003

REITHINGER, R. *et al.* Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal for Parasitology**, v.34, p. 55-62, 2004.

REY, L. **Parasitologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 731.

ROMERO, G. A. S. *et al.* Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) brasiliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brasil. **Acta Tropica**, v. 93, n. 1, p. 49-56. 2005.

SANTOS, E. *et al.* Situação da Leishmaniose Tegumentar Americana no Rio Grande do Sul. **Boletim Epidemiológico - centro estadual de vigilância em saúde/RS**, v. 7, n. 2, jun. 2005a, p. 1-3.

SANTOS, G. *et al.* Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 161-166, mar./abr., 2005b.

SILVEIRA, T. G. *et al.* Investigação sorológica em cães de área endêmica de leishmaniose tegumentar, no estado do Paraná, Sul do Brasil. **Cadernos Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 89-93, jan./mar., 1996.

SOUZA, A. I. *et al.* Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 41-45, 2005.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, L. E. **Dermatologia de pequenos animais**. 5 ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. p. 444-445.

THIESEN, S. V.; BRITO, M. R. Leishmaniose Tegumentar Americana em Porto Alegre. **Boletim Epidemiológico [da] Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre**. v. 5, n. 21, nov. 2003, p. 4-5.

URQUHART, G. M. *et al.* **Parasitologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 273.

VÉLEZ, I. D. *et al.* Failure of a Killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in colombia. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p. 593-598, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- (WHO). Control of the Leishmaniasis. **WHO Technical Report Series**, v.793, 1990.

ANEXOS

Termo de Consentimento Informado

Este projeto tem por objetivo estudar a prevalência de soropositivos para Leishmaniose, em uma amostra representativa da população de cães de Porto Alegre. Esta doença afeta animais silvestres, domésticos e o homem. É transmitida por um mosquito conhecido como Palinha, Birigui ou Mosquito Palha. O protozoário causador deste mal pode estar “alojado” no organismo de alguns animais de estimação, sem que os mesmos apresentem qualquer sinal ou sintoma da doença, e estes animais tornam-se então um risco de transmissão para os seres humanos, embora esta seja uma doença mais freqüente em zonas rurais. Na realização deste estudo será necessária a coleta de sangue do cão selecionado, visando realização de exames laboratoriais para diagnóstico de soropositividade da doença. Estes exames não implicam em custos para o proprietário do animal, assim como, não implicam em risco de vida para os animais.

A partir destas informações, aceito o convite de participar dessa pesquisa e autorizo a coleta de sangue do cão selecionado para que se processem os exames necessários.

Isto posto, declaro que fui informado satisfatoriamente sobre os objetivos e justificativas dessa pesquisa e sobre o risco, procedimentos e benefícios envolvidos na realização da mesma. As informações que eu fornecer permanecerão, confidenciais e só serão utilizadas com objetivo científico, podendo eu me retirar do estudo a qualquer momento.

Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento.

Porto Alegre, ____ de _____ de 2004.

Assinatura do entrevistado

Jairo Ramos de Jesus
Pesquisador Responsável.

Fone: 99752929

Metodologia de Realização da Técnica de Imunofluorescência Indireta para Pesquisa de Anticorpos para *Leishmania* spp..

- 1- Ferver as lâminas e lamínulas por 30 minutos em água destilada, após a mesma entrar em ebulição;
- 2- Deixa-las estocadas em álcool comercial até o momento do uso, quando deverão ser cuidadosamente secas com auxílio de gaze ou papel absorvente;
- 3- Pingar 10 µl de antígeno em cada orifício da lâmina, tendo cuidado de mantê-lo homogêneo durante o preparo das lâminas;
- 4- Deixar fixar durante 30 min. em temperatura ambiente (evitar atritos com a parte superior da lâmina onde se encontram os parasitos fixados);*
- 5- Diluir os soros teste (1:40 e 1:80) e os controles positivo e negativo (1:40), em PBS;
- 6- Adicionar 10µl das diluições de soro por orifício, conforme o protocolo:
 - a. Os soros controles devem estar presentes em todas as lâminas para comparações no momento da leitura;
 - b. Deve-se tomar cuidado com as diluições de soro para que não se misturem durante a incubação;
- 7- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 min./37 °C;
- 8- Lavar as lâminas 3 vezes em PBS em cubas de lavagem (3), 5 minutos em cada banho;
- 9- Lavar rapidamente as lâminas (uma vez) em água destilada;
- 10- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 min./37 °C para secar;
- 11- Diluir o conjugado fluorescente, previamente titulado (vide bula do conjugado), em PBS contendo 0.004% de Azul de Evans;*
- 12- Adicionar 15µl da diluição do conjugado em cada orifício da lâmina;
- 13- Incubar as lâminas 3 vezes com PBS em cubas de lavagem (5 min. para cada banho);
- 14- Lavar rapidamente as lâminas 1 vez em água destilada;
- 15- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 min./37 °C para secar;

- 16- Montar as lâminas com glicerina tamponada e lamínulas;
- 17- Levar as lâminas ao microscópio de fluorescência e:
 - a. Focalizar o orifício do soro controle positivo e observar a fluorescência;
 - b. Focalizar o orifício do soro controle negativo e observar o background (coloração de fundo) do teste;
 - c. Focalizar os orifícios dos soros teste e considerar reativo, aqueles que apresentam fluorescência mais intensa que o background, observado no orifício do soro controle negativo (considerar não reativo os soros que apresentarem fluorescência semelhante ao do controle negativo);
 - d. Serão considerados reativos todos os soros que apresentarem positividade maior ou igual a 1/40.

*- A fixação do antígeno em lâmina, no estudo, foi realizada deixando que a secagem ocorrer-se em temperatura ambiente “over night” (de um dia para o outro), para uma melhor fixação do parasito em lâmina.

*- A diluição adotada para o conjugado foi de 1:100