

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**GABRIELA PORFIRIO-PASSOS**

**AVALIAÇÃO SORO-EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE  
CÃES ASSINTOMÁTICOS PARA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA EM ÁREA ENDÊMICA**

**ALEGRE – ES**

**2013**

**GABRIELA PORFIRIO-PASSOS**

**AVALIAÇÃO SORO-EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE  
CÃES ASSINTOMÁTICOS PARA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA EM ÁREA ENDÊMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de **Mestre em Ciências Veterinárias**, linha de pesquisa em Diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.  
Orientador: Prof. Dr. Marcos Santos Zanini

**ALEGRE – ES**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

P289a      Passos, Gabriela Porfirio, 1978-  
Avaliação soro-epidemiológica e molecular de cães assintomáticos para leishmaniose tegumentar americana em área endêmica/ Gabriela Porfirio Passos. – 2013.  
91f. : il.

Orientador: Marcos Santos Zanini.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Cão. 2. Leishmaniose3. Diagnóstico. 4. Teste imunoenzimático –  
lúna, ES. I. Zanini, Marcos Santos. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 619

---

**GABRIELA PORFIRIO PASSOS**

**“AVALIAÇÃO SORO-EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE CÃES  
ASSINTOMÁTICA PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM ÁREA  
ENDÊMICA”.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2013.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**



---

Prof Dr Marcos Santos Zanini  
Universidade Federal Do Espírito Santo – UFES  
Orientador



---

Profª Drª Maria De Fátima Madeira  
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ



---

Profª Drª Isabella Vilhena Freire Martins  
Universidade Federal Do Espírito Santo – UFES

Dedico aos meus animais que me ensinam todos os dias sobre o amor, companheirismo e doação.

Aos animais que participaram do projeto, meu muito obrigada, de todo meu coração.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a este trabalho a Deus, meu guia e minha luz, pois sem Ele, nada até agora seria possível.

À minha mãe, professora Dr<sup>a</sup>. Lenir C. Porfirio, por ser minha maior incentivadora, mentora, “*Ad-hoc*”, exemplo de vida, amiga e que nos momentos mais difíceis nunca me deixou desistir e principalmente nunca desistiu de mim, sempre me apoiando. É o maior amor da minha vida.

Ao meu pai, Luciano Passos que mesmo ausente, nunca deixou de me apoiar e sempre se esforçou para manter contato.

A minha irmã, Giuliana P. Passos e sobrinha, Melissa P.P. dos Santos, pelo incentivo e grande força, valeu Mel por todas as vezes que a Tinda tinha que estudar mas os desenhos eram mais legais, né!

A grande amiga, Janaína Alves que compartilha comigo os momentos de tristezas e também de alegrias nesta etapa, com a graça de Deus.

Em especial, a minha “equipe de dois”, meu novo irmão e super amigo, Paulo Marcos Amaral Silva, que dividiu comigo todas as agonias com erros e acertos de protocolos e muitas foram às madrugadas em claro e que nesta dissertação, revelam no papel, seu verdadeiro significado.

A Sayanne Luns Hatum de Almeida que nos acompanhou por muitas vezes nos exames e coletas e se tornou a queridinha do “chefe” e é responsável pela base do nosso laboratório, sem ela não existiriam os testes sorológicos.

Ficam as lembranças aos que por curtos momentos passaram pra dar um “oi” e apoio, Kelvinson Fernandes Viana; Barbara Rauta de Avelar, Hegiany Libarde Bridi, Marcio Paiva Barcellos, Layara Pestana Sarmiento, Juliana Guadalupe Souza Belmondes, Luanna Castro Oliveira, Diefrey Ribeiro Campos, Stela Rechinelli Passos, agradeço por sua confiança e credibilidade em minha pessoa, pelo mútuo aprendizado de vida, durante nossa convivência, no campo profissional e particular.

Aos amigos Danilo Lima, Luciano Garcia por todos os nossos ótimos momentos “a campo” e Maria Helena Oggioni, por nos acariciar com seus lanchinhos matinais e todo carinho e disponibilidade da equipe de apoio da Vigilância Sanitária do Município de Iúna, ES.

A grande amiga Luceli Souza, que por muitos momentos foi capaz de guardar uns minutinhos do seu tempo para ouvir minhas lamentações e dar bons conselhos.

A grande amiga Zélia Teresinha Gai, que muito me auxiliou com um cantinho especial emprestado nos momentos necessários de silêncio e estudo.

Ao amigo Gustavo Wolter por seu grande auxílio nas traduções emergenciais.

A todos os amigos(as) que entenderam a ausência para desenvolvimento, realização e fechamento deste trabalho.

Os resultados deste trabalho não teriam significado estatístico se não fosse o trabalho da professora e amiga Dra. Ana Paula Madureira, obrigada pela paciência. Além dos agradecimentos a FAPES, pelo financiamento a pesquisa e a CAPES pela bolsa de mestrado.

E, por fim, ao meu orientador professor Dr. Marcos Santos Zanini que me aceitou e mostrou o duro “caminho das pedras” de um laboratório de imunodiagnóstico. Muitas vezes foi meu “pai branco”, mas não deixou de me mostrar seu lado acadêmico. Foram ótimas todas nossas viagens com longas horas de papo.

Muito obrigado a todos.

*“Quando você quer alguma coisa, todo o universo conspira para que você realize o seu desejo”.*

*Paulo Coelho.*



## RESUMO

Com o objetivo de realizar o diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana (LTA) em cães, foram utilizados métodos de cultura e isolamento, testes sorológicos de ELISA e *Western Blot* (WB) e pesquisa de DNA do parasito para dois grupos de animais, um grupo composto de animais sem lesões clínicas sugestivas de LTA, mas residentes em torno de casos clínicos humanos confirmados para LTA, e outro grupo de animais com lesões sugestivas de LTA que serviram como controle dos protocolos realizados. O estudo foi realizado no município de Lúna, ES, Brasil, região endêmica para enfermidade. No primeiro grupo, foram analisadas amostras de soro de 109 animais sem histórico ou lesões indicativas de LTA, estas foram submetidas às técnicas de ELISA e WB que resultaram em 20 animais sorologicamente positivos para as duas técnicas. O teste ELISA apresentou sensibilidade de 100,00% (IC<sub>95%</sub> - 0,83 a 1,00) e especificidade de 77,53% (IC<sub>95%</sub> - 0,67 a 0,86), em relação à técnica de WB. O teste WB apresentou maior acurácia e mostrou-se mais adequado para diagnóstico dos animais assintomáticos, enquanto a técnica de ELISA para a triagem. Para a pesquisa do DNA do parasito nos 20 animais assintomáticos e positivos pela técnica de WB utilizou-se sangue total e biópsia de tecido íntegro do pavilhão auricular pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados para PCR da biópsia de tecido íntegro e PCR de tecido sanguíneo mostraram sensibilidade de 30,0% (IC<sub>95%</sub> - 0,12 a 0,54) e 20,0% (IC<sub>95%</sub> - 0,06 a 0,44), respectivamente. A especificidade, 99,0% (IC<sub>95%</sub> - 0,93 a 0,99) e 100% (IC<sub>95%</sub> - 0,96 a 1,00), para a PCR da biópsia de tecido íntegro e PCR de tecido sanguíneo quando comparadas ao WB. Os resultados mostram que tecido íntegro do pavilhão auricular e sangue de animais assintomáticos submetidos à técnica de PCR, apresentaram baixa sensibilidade e alta especificidade, assim, a PCR da biópsia de tecido íntegro é melhor indicador para animais assintomáticos que a PCR de tecido sanguíneo. Para o segundo grupo, foram identificados três animais com lesões sugestivas para LTA e sorologicamente positivo. A partir de uma amostra de biópsia de lesão sugestiva de LTA presente no pavilhão auricular, parte desta foi destinada a cultura e isolamento e outra parte para comparação de três protocolos de extração do DNA de tecido animal para diagnóstico da LTA canina. Os protocolos utilizados tiveram como base o Fenol-Clorofórmio, Acetato de Potássio e associação entre as duas metodologias. Em comparação com os padrões moleculares de concentração de DNA concluiu-se que o protocolo com Acetato de Potássio foi o mais indicado para o tipo de tecido empregado. Por fim, de posse dos dados apresentados para os animais sorologicamente positivos e assintomáticos estudados, foi possível concluir que estes não representaram potenciais reservatórios do parasito, o que evidencia ainda que para avaliação deste perfil da enfermidade seja indicada a associação de métodos de diagnóstico.

**Palavras-chave:** Extração de DNA. ELISA. *Western Blot*. PCR. *Leishmania braziliensis*. Cães.

## ABSTRACT

The aim to make the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis (ATL) in dogs, it was used isolation and culture methods, ELISA and *Western Blot* (WB) serological tests and parasite DNA research for two animals groups, one group composed of animals without clinical suggestive lesions of ATL, but residents around confirmed human clinical cases of ATL, and another group of animals with suggestive lesions of ATL which served as control of the performed protocols. The study was conducted in the municipality of Iúna, ES, Brazil, an endemic disease region. In the first group, were analyzed serum samples from 109 animals with no history or indicative of ATL injuries, they were subjected to ELISA and WB techniques, which resulted in 20 animals serologically positive for both techniques. The ELISA test presented sensitivity of 100.00% (CI<sub>95%</sub> - 0.83 to 1.00) and specificity of 77.53% (CI<sub>95%</sub>- 0.67 to 0.86), compared to the WB technique. The WB test was more accurate, and proved to be more suitable for diagnosis of asymptomatic animals, while the ELISA technique for screening. For parasite DNA research in the 20 asymptomatic animals and positive by WB technique it was used whole blood and intact tissue biopsy of pinna by the technique of polymerase chain reaction (PCR). The results of intact tissue biopsy PCR and tissue blood PCR showed a sensitivity of 30.0% (CI<sub>95%</sub>- 0.12 to 0.54) and 20.0% (CI<sub>95%</sub>- 0.06 to 0.44), respectively. The specificity, 99.0% (CI<sub>95%</sub>- 0.93 to 0.99) and 100% (CI<sub>95%</sub>- 0.96 to 1.00), for intact tissue biopsy PCR and tissue blood PCR when compared the WB test. The results show that the pinna intact tissue and blood of asymptomatic animals subjected to PCR, showed a low sensitivity and high specificity, thereby intact tissue biopsy PCR is a better indicator for asymptomatic animals compared to the blood tissue PCR. For the second group, three animals were identified with ATL suggestive lesions and serologically positive. From a sample of an ATL suggestive lesion biopsy present in pinna, part of this was destined to culture and isolation and another portion was destined for comparison of three protocols for DNA extraction from animal tissue for canine ATL diagnosis. The used protocols were based on Phenol-Chloroform, Potassium Acetate and an association of the two methodologies. Compared to molecular standards of DNA concentration, it was concluded that the protocol with potassium acetate was the most suitable for the used tissue. Finally, in possession of data presented for the studied asymptomatic and seropositive animals, it was concluded that these did not represent potential parasite reservoirs, which also shows that for evaluation of this disease profile must be given the combination of diagnosis methods.

**Keywords:** DNA extraction, ELISA, Western Blot, PCR, *Leishmania braziliensis*, dogs

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Anestesia local na borda da lesão cutânea, com lidocaína a 2% para realização de biópsia e posterior cultivo para identificação do protozoário.....	26
Figura 2 –	Sequência das etapas do ELISA Indireto.....	30
Capítulo 2		
Figura 1 –	(A) Cão com lesão característica de LTA no pavilhão auricular. (B) Cão com lesão característica de LTA no focinho.....	49
Figura 2 –	Análise da extração de DNA em gel de agarose 0,7%. M1, M2 e M3: marcador de peso molecular derivado do fago Lambda (Fermentas®) de concentração conhecida (25ng/μL), em três volumes diferentes, 1, 2 e 3μL respectivamente. A1 e A2 = repetições do Protocolo Fenol – Clorofórmio; B1 e B2 = repetições do Protocolo de associação de metodologias; C1 e C2 = repetições do Protocolo Acetato de Potássio.....	52

## LISTA DE TABELAS

Capítulo 1		
Tabela 1 –	Comparação dos testes sorológicos (WB e ELISA) de acordo com as localidades.....	45
Capítulo 3		
Tabela 1 –	Resultados do teste de Western Blot, PCR da biópsia de tecido íntegro do pavilhão auricular, PCR de tecido sanguíneo, cultivo e isolamento de Leishmania em cães assintomáticos de localidades rurais do município de Lúna no Estado do Espírito Santo, Brasil, março de 2011 a março de 2012, onde ocorreram casos humanos da doença, no período de julho de 2008 a junho de 2012.....	65

## LISTA DE SIGLAS e/ou ABREVIATURAS

ACL	American Cutaneous Leishmaniasis
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
CEUA-UFES	Comitê de Ética em Experimentação Anima - Universidade Federal do Espírito Santo
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
CONCEA	Comitê de Experimentação Nacional de Controle Animal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Deoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido diaminotetracético - sal dissódico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ES	Espírito Santo
FAPES	Fundo de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo
IC <sub>95%</sub>	Intervalo de confiança em 95%
IDR	Intradermorreação
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2	Imunoglobulina G2
Kappa	Índice estatístico
kDa	KiloDaltons
kDNA	Ácido desoxirribonucleico - kinetoplastida
<i>L.(V).braziliensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>
<i>L.braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
<i>L.major-like</i>	<i>Leishmania major-like</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LIT	Liver Infusion Triptose
LM	Leishmaniose mucosa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
M	Molar
M1, M2 e M3	Marcadores de pesos moleculares derivado de fago Lambda
mg/kg/IM	Milligrama por kilo e via Intra Muscular
mg/mL	Miligrama por mililitro
mM	MiliMolar
NaCl	Cloreto de Sódio
ng/mL	Nanograma por mililitro
NNN	Novy, MacNeal, e Nicolle
OMS	Organização Mundial de Saúde

OPD	Ortofenileno diamina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase-Restriction Fragment Length Polymorfism
<i>primers</i> B1 e B2	Iniciadores que amplificam sequência de 750 pares de bases
qPCR	Real time PCR quantitativo
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro fetal bovino
SRD	Sem raça definida
Tampão TBE	Tampão Tris Ácido Bórico EDTA
Tampão TE	Tampão Tris-EDTA
Tampão Tris-HCl	Trisaminometano-Hidrocloro
TMB	Tetrametil benzidina
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
WB	<i>Western Blot</i>
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µL/mL	Microlitro por mililitro

## LISTA DE SÍMBOLOS

- ® - Marca registrada
- ( $\pm$ ) - Variação para maior ou menor entre dois valores
- 2x2 - Tabela de contingência
- $\chi^2$ : - Qui quadrado
- (<) – Menor que
- (>) – Maior que
- =- Igual
- p- Probabilidade
- (+)- Positivo
- (-)- Negativo
- 1:10 Diluição

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	Descrição da técnica para obtenção de antígeno solúvel.....	82
ANEXO 2	Descrição da técnica de ELISA “ <i>in house</i> ” .....	83
ANEXO 3	Descrição da técnica do kit para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7® (Biogene®, Brasil), para uso veterinário.....	84
ANEXO 4	Descrição da técnica de <i>Western Blot</i> .....	86
ANEXO 5	Descrição das técnicas de extração de DNA e da PCR de biópsia de pele íntegra e tecido sanguíneo.....	88
ANEXO 6	Descrição da técnica de cultivo e isolamento de formas de <i>Leishmania</i> .....	91



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA .....	20
2.2	OCORRÊNCIA DOS VETORES DA LTA NO ESPÍRITO SANTO.....	20
2.3	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM HUMANOS.....	21
<b>2.3.1</b>	<b>Fatores ambientais e socioeconômicos</b> .....	21
<b>2.3.2</b>	<b>Doença clínica</b> .....	22
<b>2.3.3</b>	<b>Diagnóstico diferencial de outras patologias</b> .....	22
2.4	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO CÃO.....	23
<b>2.4.1</b>	<b>Papel do cão na transmissão e imunologia</b> .....	23
<b>2.4.2</b>	<b>Doença clínica canina</b> .....	24
<b>2.4.3</b>	<b>Animais assintomáticos</b> .....	24
<b>2.4.4</b>	<b>Diagnóstico diferencial de outras patologias</b> .....	25
2.5	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DA LTA.....	25
<b>2.5.1</b>	<b>Pesquisa direta</b> .....	25
<b>2.5.2</b>	<b>Cultura da <i>Leishmania</i></b> .....	26
<b>2.5.3</b>	<b>Método de reação de hipersensibilidade – Intradermorreação</b> .....	28
<b>2.5.4</b>	<b>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</b> .....	29
<b>2.5.5</b>	<b><i>Immunoblotting</i> ou <i>Western Blot (WB)</i></b> .....	31
<b>2.5.6</b>	<b>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</b> .....	32
	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	34
<b>3</b>	<b>Cap. 1 – Título Técnica ELISA comparada ao <i>Western Blot</i> para detecção de cães assintomáticos para LTA</b> .....	35
<b>3.1</b>	<b>RESUMO</b> .....	36
<b>3.2</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	36
<b>3.3</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>3.4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
3.4.1	População e amostras sorológicas.....	38
3.4.2	Preparação do parasito para WB e ELISA.....	38
3.4.3	Análise Estatística.....	39
<b>3.5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	39
<b>3.6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	40
<b>3.7</b>	<b>Agradecimentos</b> .....	42

3.8	REFERÊNCIAS.....	42
	<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>46</b>
	<b>Cap. 2 – Título Comparação de protocolos de extração do</b>	
<b>4</b>	<b>DNA de tecido animal para diagnóstico de leishmaniose</b>	
	<b>tegumentar americana canina.....</b>	<b>47</b>
4.1	RESUMO.....	47
4.2	ABSTRACT.....	47
4.3	INTRODUÇÃO.....	48
4.4	METODOLOGIA.....	50
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.6	CONCLUSÃO.....	53
4.7	AGRADECIMENTOS.....	53
4.8	REFERÊNCIAS.....	53
	<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>56</b>
	<b>Cap. 3 –Título Avaliação da técnica de Reação em Cadeia</b>	
<b>5</b>	<b>da Polimerase na identificação de cães assintomáticos</b>	
	<b>para Leishmaniose Tegumentar Americana a partir de</b>	
	<b>biopsia de pele e tecido sanguíneo.....</b>	<b>57</b>
5.1	RESUMO.....	58
5.2	ABSTRACT.....	59
5.3	INTRODUÇÃO.....	59
5.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
5.4.1	Área de estudo.....	60
5.4.2	Seleção de animais.....	61
5.4.3	Técnica de triagem: ELISA.....	61
5.4.4	<i>Western Blot</i> .....	62
5.4.5	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	62
5.4.6	Cultivo e Isolamento.....	63
5.4.7.	Análise estatística.....	64
5.5	RESULTADOS.....	64
5.6	DISCUSSÃO.....	66
5.7	CONCLUSÕES.....	68
5.8	AGRADECIMENTOS.....	69
5.9	REFERÊNCIAS.....	69
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é considerada uma antroponose de destaque para saúde pública. É causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete a pele e mucosa, e necessita de um vetor flebotômico fêmea infectada para transmissão ao homem e aos animais. Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses ocorrem em mais de 88 países, e no Brasil, em decorrência das diferentes situações epidemiológicas encontradas em regiões com tendência a urbanização, existe necessidade de adoção de estratégias distintas para o controle dessas endemias.

São inúmeras espécies de *Leishmania* que provocam a doença clínica nas Américas, dentre as principais pode-se citar: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

Estas espécies de *Leishmania* spp. podem afetar tanto humanos como animais. Em humanos a enfermidade mostra-se desde formas inaparentes à lesões na pele que podem evoluir para cura ou para ulcerações múltiplas e de tratamento complexo. Para os cães as lesões provocadas por *L. braziliensis* ocorrem nas orelhas, focinho, bolsa escrotal que podem evoluir para cura espontânea ou para ulcerações características com as bordas elevadas. De acordo como o Ministério da Saúde, os cães são hospedeiros acidentais da infecção pelo protozoário, sem apresentar papel definido no ciclo de transmissão.

Existem diferentes métodos utilizados para o diagnóstico de LTA que vão desde a pesquisa direta, cultura e isolamento, testes sorológicos e pesquisa de DNA do parasito. Mas há evidências das dificuldades em fornecer um diagnóstico preciso com uma única técnica, e algumas vezes o diagnóstico é presuntivo, com base em sinais ou sintomas da enfermidade juntamente com a epidemiologia, pois não pôde ser confirmado pela identificação do parasito. Estes fatos evidenciam a necessidade de associar mais de um teste sorológico em conjunto com a pesquisa parasitológica.

Este trabalho teve como objetivo a avaliação soro-epidemiológica e molecular de cães assintomáticos para LTA, no entorno de casos humanos confirmados e residentes em área rural no município de Iúna, Estado do Espírito Santo, Brasil.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Apresenta-se como zoonose amplamente distribuída em todas as regiões do território brasileiro (MADEIRA et al., 2003), e representa problema em saúde pública no Brasil (UCHOA et al., 2004).

Estima-se que ocorra nas áreas endêmicas do planeta a cada ano aproximadamente 2 milhões de novos casos das diferentes formas clínicas da enfermidade, dentre os 350 milhões de pessoas que são expostas anualmente ao risco de infecção (BRASIL, 2010).

A LTA permanece endêmica em áreas da América Latina, e apresenta como agentes causadores, a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Viannia) panamensis* dentre outras espécies (GONTIJO e CARVALHO, 2003),

A LTA, no Brasil é causada por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Sua transmissão envolve espécies de flebotomíneos fêmeas infectadas (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) do gênero *Lutzomyia* (REY, 2001; FALQUETO et al., 2003; RANGEL e LAINSON, 2009).

### 2.2 OCORRÊNCIA DOS VETORES DA LTA NO ESPÍRITO SANTO

Um dos principais vetores da LTA é *Lutzomyia intermedia* que tem sido encontrada no Estado do Espírito Santo em áreas endêmicas dos municípios de Afonso Cláudio, na microrregião Sudoeste Serrana (FERREIRA et al., 2001; SESSA et al., 1994); Itarana, na microrregião Central Serrana (FALQUETO et al., 1991); Santa Leopoldina na microrregião Central Serrana (SESSA et al., 1994); Viana, na microrregião Metropolitana (FALQUETO et al., 1986); Vila Valério, na microrregião Centro – Oeste e Sooretama, na microrregião Rio Doce (VIRGENS et al., 2008).

Alguns fatores ambientais são elencados na pré-disposição ao desenvolvimento dos vetores das leishmanioses. Com avanço do homem para áreas de mata selvagem e desmatamentos, há maior ocorrência da leishmaniose, pois o

local é microhabitat do vetor, desta maneira propicia o contato do vetor com oshospedeiros que desenvolvem a doença (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; BARATA et al., 2004). Estes vetores necessitam além do ambiente de floresta, condições propícias de altitude, temperatura, volume de chuvas e umidade relativa do ar. Uma pequena variação destes fatores nos microhabitats é suficiente para alterar a dinâmica das populações de flebotomíneos (DIAS et al., 2007).

A necessidade da existência de área verde densa ao redor dos fragmentos de mata facilita a dispersão dos flebótomos (APARICIO, 2001). Além da alteração da cobertura vegetal que também pode fornecer condições satisfatórias para o aumento de insetos vetores da enfermidade, também existe relação entre o uso e ocupação da terra e da proximidade das moradias com a mata, associados à localização da doença (SILVA e GURGEL, 2009).

## 2.3 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM HUMANOS

### 2.3.1 Fatores ambientais e socioeconômicos

Os principais fatores de risco relacionados à LTA são: urbanização, desmatamento e novos assentamentos, domesticação do ciclo de transmissão e desenvolvimento agrícola com a construção de represas e sistemas de irrigação que leva a novas culturas propícias para desenvolvimento do vetor. O desenvolvimento econômico leva a mudança nas interações entre seres humanos e seu ambiente físico e biológico. Padrões mundiais de assentamentos humanos em áreas urbanas em países em desenvolvimento levaram a um rápido crescimento de megacidades onde as instalações de habitação, água potável e saneamento são insuficientes, assim cria oportunidades para a transmissão de doenças transmissíveis, como a leishmaniose (DESJEAUX, 2001).

MEMBRIEVE et al. (2012) constataram que em 10 locais onde ocorreram os casos de LTA humana, também ocorreram 40 casos caninos onde, as residências estavam distantes 100 metros das áreas florestais. Até 25 metros de distância entre a residência e a floresta, apresenta fator de risco para a infecção do ser humano, enquanto a distância de 25 a 100 metros é fator de risco para os casos caninos. A proximidade entre a residência e floresta dentro da faixa de voo de flebotomíneos

torna os seres humanos e cães fontes disponíveis de alimento para as fêmeas durante os vôos de longa distância, a noite.

#### **2.4.2 Doença clínica**

Classicamente a doença se manifesta sob duas formas: leishmaniose cutânea leishmaniose mucosa, esta última também conhecida como mucocutânea, que podem apresentar diferentes manifestações clínicas. A forma cutânea localizada representa o acometimento primário da pele. A lesão é geralmente do tipo úlcera, com tendência a cura espontânea e apresentando boa resposta ao tratamento, podendo ser única ou múltipla com até 20 lesões. A forma cutânea disseminada da LTA é uma expressão relativamente rara que pode ser observada em até 2% dos casos. Estima-se que 3 a 5% dos casos de LC desenvolvam lesão mucosa. Clinicamente, a LM se expressa por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores (BRASIL, 2010).

Em humanos a enfermidade apresenta formas inaparentes, lesões discretas de pele que podem evoluir espontaneamente para cura, ulcerações múltiplas, lesões de mucosas de curso lento e tratamento complexo (COUTINHO et al., 1981).

As lesões da leishmaniose mucosa costumam aparecer principalmente na mucosa nasal, mas também são registradas em outros locais como nos lábios, boca, faringe e laringe e o principal agente causador desta enfermidade é *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A resposta imune do hospedeiro e fatores de infectividade do protozoário pode estar relacionada ao grau de lesão desenvolvido nos tecidos (LESSA et al., 2007).

#### **2.3.3 Diagnóstico diferencial de outras patologias**

Independente da forma clínica, as lesões cutâneas da LTA são caracterizadas por úlceras com bordas elevadas, “úlcera com bordas em moldura”, infiltradas e de coloração eritematoviolácea (BRASIL, 2006). É classificada como doença infecciosa e não contagiosa que acomete a pele e mucosa (CARDOSO et al., 2009).

As lesões verrucosas se caracterizam por placas, parcial ou totalmente hiperkeratóticas, que podem simular tuberculose cutânea ou cancro tuberculoso,

além de paracoccidiodomicose, psoríase, sífilis terciária, esporotricose, *Histoplasma capsulatum* e outras doenças menos frequentes. As lesões vegetantes são papilomatosas, úmidas e de consistência mole (simulam boubas) ou papilomatosas atípicas, ceratóticas ou verrucosas, lembrando a cromomicose. Para as lesões atípicas presentes em pacientes de áreas endêmicas, deve-se sempre pensar em LTA, particularmente em quadros dermatológicos de difícil diagnóstico como dermatite artefacta ou pantomima (lesão provocada pelo próprio paciente), ectima, carcinoma basocelular, impetigo e anemia falciforme em paciente com úlceras recidivantes em ambos os membros (BRASIL, 2006),

## 2.4 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO CÃO

### 2.4.1 Papel do cão no ciclo da transmissão e imunologia

Para se evitar conclusões precipitadas a respeito do papel dos cães na epidemiologia da LTA, é necessário compreender que o cão pode ou não ser componente essencial na transmissão peridoméstica e doméstica da *Leishmania (Viannia) braziliensis*, pois para a maioria das espécies de *Leishmania*, tanto os seres humanos quanto os cães são hospedeiros acidentais que foram expostos ao repasto sanguíneo da fêmea de flebotomíneo infectada (DANTAS-TORRES, 2007).

Os anticorpos na LTA se apresentam em baixos níveis e não se conhece muito bem o papel da imunidade humoral nesta enfermidade, porém sabe-se que a resposta imunológica celular é mais eficaz, pois sua manifestação ocorre mais tardiamente e acaba por coincidir com os primeiros sinais de regressão das lesões, logo após a queda da parasitemia (PEREIRA et al., 2008).

Para Ribeiro et al. (2007), a LTA mostra redução da resposta humoral em cães e os níveis de anticorpos específicos podem não ser detectados por imunofluorescência indireta (IFI). Entretanto a sensibilidade do ELISA é maior que da IFI, e o melhor antígeno para o diagnóstico da LTA em cães ainda não está definido.

É necessário melhor conhecimento dos aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos da LTA em cães, visto que, somente com informações acerca do curso da infecção por *L. braziliensis* será possível esclarecer os aspectos que irão contribuir tanto para o diagnóstico precoce dos casos caninos quanto para a

elucidação do papel destes na epidemiologia da enfermidade (MADEIRA et al., 2003).

Para Brasil (2010) há vários registros de infecção em animais domésticos, mas não há evidências que comprovem o papel destes animais como reservatórios das espécies de *Leishmania* em questão, e desta forma, são considerados hospedeiros acidentais da doença.

#### **2.4.2 Doença clínica canina**

Os cães apresentam lesões ulceradas principalmente nas orelhas, focinho, bolsa escrotal que também podem cicatrizar espontaneamente (VELASQUEZ, MEMBRIVE e MEMBRIVE, 2006). A LTA nesses animais pode apresentar-se como uma doença crônica com manifestações semelhante as da doença humana, ou seja, o parasitismo ocorre comumente na região com mucosas das vias aerodigestivas superiores. Nos cães, a úlcera cutânea sugestiva costuma ser única, eventualmente múltipla, localizada nas orelhas, focinho ou bolsa escrotal (BRASIL, 2010).

#### **2.4.3 Animais assintomáticos**

Em sete localidades rurais, nos municípios de Lobato, Colorado, Santa Fé, Maringá e Mandaguari, no Paraná, em trabalho com 53 cães que não apresentavam lesão, 25 (47,2%) tiveram a Imunofluorescência Indireta (IFI) positiva para LTA, isto é, animais soropositivos e sem sintomatologia clínica (ZANZARINI et al., 2005).

Em trabalhos realizados com cães assintomáticos, os resultados obtidos comprovam a validade da técnica de ELISA indireto para o diagnóstico de LTA nestes cães, pois dentre 96 animais que não apresentavam lesão clínica, oito cães foram soropositivos para LTA pela técnica de ELISA, sendo estes resultados confirmados por *Western Blot* (CAMPOS et al., 2011).

Com intenção de selecionar possíveis candidatos para imunização com vacinas comerciais contra leishmaniose visceral, Porfirio-Passos et al., (2012) avaliaram uma parcela de cães da área rural do município de Lúna, ES, pelos testes



imunológicos de ELISA e *Western Blot* e observaram 55% de animais sem sintomatologia, mas sorologicamente positivos.

O diagnóstico diferencial de outras doenças que ocorrem nos cães residentes em áreas endêmicas deve ser considerado.

Em estudo com 74 animais com lesões ulceradas, 41 foram positivos para esporotricose e 33 apresentaram culturas positivas para leishmaniose. Três dos 41 cães com esporotricose foram soropositivos pelo teste de Imunofluorescência indireta (IFI) para leishmaniose e dois de 20 animais testados, dentro deste grupo, tiveram teste positivo de Montenegro (SANTOS et al., 2007).

Nos cães, deve-se estar atento a outras doenças que causem úlceras, como neoplasias, piodermites e micoses, que devem ser incluídas no diagnóstico diferencial. Entre as micoses, a esporotricose deve ser considerada, por se tratar de uma zoonose e apresentarem-se com lesões muito semelhantes às lesões da LTA (BRASIL, 2010).

## 2.5 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DA LTA

Brasil (2010) recomenda exames clínico, parasitológico, imunológico e molecular. Sampaio et al. (2009) indica a pesquisa de anticorpos monoclonais para a identificação. Tannús et al. (2007) descrevem que os métodos para detecção de anticorpos circulantes mais utilizados no diagnóstico da LTA são: imunofluorescência indireta (IFI), imunoenzimáticos como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e *immunoblotting*, além de testes de aglutinação direta e citometria de fluxo.

### 2.5.1 Pesquisa direta

Para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. pode ser utilizado a pesquisa direta do parasito, por meio de visualização em lâmina, de material obtido por *imprint* ou biópsias (SAMPAIO et al., 2009).

Brasil (2010) indica que na ocorrência de lesões típicas de leishmaniose, pode ser realizado o diagnóstico clínico e epidemiológico, especialmente se o paciente originar de áreas endêmicas ou mesmo que tenha permanecido em lugares

onde há casos de leishmaniose. Entretanto, a confirmação do diagnóstico por métodos parasitológicos é fundamental, visto que há inúmeras doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LTA. A sensibilidade da técnica poderá ser aumentada pela repetição do exame, cujos procedimentos podem ser por escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa.



Figura 1. Anestesia local na borda da lesão cutânea, com lidocaína a 2% para realização de biópsia e posterior cultivo para identificação do protozoário. Fonte: Adaptado de BRASIL, (2010).

Figueiredo et al. (2009) avaliaram dermatologicamente 220 animais, entre cães e gatos. Apenas um cão apresentou uma lesão ulcerada na região da bolsa escrotal cujo exame parasitológico evidenciou formas amastigotas de *Leishmania* spp. A detecção de caso autóctone proporcionou alerta para a instalação de um possível foco de leishmaniose tegumentar americana na localidade de Santa Rita de Cássia, município de Barra Mansa, Rio de Janeiro.

### **2.5.2 Cultura da *Leishmania***

Para detectar o parasito também se realiza cultura de amostras clínicas em meio de cultivo para verificar o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* sp. (SAMPAIO et al., 2009). Brasil (2010) preconiza o isolamento do parasito por

meio de cultura como método de confirmação do agente etiológico e permite a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida no processo infeccioso. Os fragmentos obtidos da lesão cutânea por procedimento de biópsia da borda da úlcera devem ser inoculados em meios de cultivo NNN – Novy, MacNeal, e Nicolle (Ágar sangue modificado) e LIT (Liver Infusion Triptose) ou Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), e com cultivo entre 26°C e 28°C, com bom crescimento.

Após cinco dias de cultivo já podem ser encontradas formas promastigotas do parasito, caso não haja ainda crescimento, a cultura deve ser mantida até um mês, com observação, antes da liberação do resultado negativo. Outro teste alternativo é a utilização de material obtido por punção das úlceras com o uso de tubo a vácuo já com meio de cultura (BRASIL, 2010).

Sampaio et al.(2009) selecionaram pacientes atendidos no Hospital Universitário de Brasília de agosto de 2006 a junho de 2007, quando foram registrados 10 casos autóctones de LTA. Todos os pacientes com leishmaniose cutânea apresentaram lesão ulcerada, única, localizada preferencialmente nos membros superiores (seis), seguidos dos membros inferiores (dois), cabeça (um) e abdome (um). Dos 10 pacientes em estudo, seis deles chegaram ao hospital com até três meses de duração da lesão. De todos os pacientes, 50% tiveram culturas identificadas como *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Figueiredo et al. (2009) encontraram um cão com lesão sugestiva de *Leishmania* da qual foi realizada biópsia visando o isolamento parasitário. Para este procedimento, o animal foi sedado por via intramuscular com acepromazina (0,1-0,2 mg/kg) e cetamina (10 mg/kg). Procederam a anestesia no local da biópsia com lidocaína 2%. Fragmentos foram obtidos do bordo da lesão e conservados em solução fisiológica contendo 1.200 UI de penicilina; 1.000 ug de estreptomicina e 100ug de 5-fluorocitosina por mililitro. Após 24 horas foram semeados em meio de cultura bifásico NNN (Novy, MacNeal, Nicolle)/Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os tubos foram incubados a temperatura de 26°C-28°C e examinados semanalmente. Este exame possibilitou o isolamento de formas promastigotas, identificadas posteriormente, por isoenzimas como *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

### **2.5.3 Método de reação de hipersensibilidade - Intradermorreação**

Brasil (2010) conceitua que a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) é um teste fundamentado na reação de hipersensibilidade tardia (ou tipo IV) e sua interpretação deve ser cuidadosa, uma vez que seu resultado pode ser negativo nas primeiras semanas após surgimento da lesão cutânea em humanos, em contrapartida pode-se obter resultados falsos positivos quando esse teste é repetido com intervalo de poucas semanas ou ainda em moradores de área endêmica.

Toledo et al. (2001) utilizaram uma preparação do antígeno padronizado pelo Ministério da Saúde, que foi injetado por via intradérmica no antebraço humano. Foram realizadas leituras com 48h após injeção e consideraram as reações positivas na presença de endurecimento maior que 5mm no local da aplicação, identificando positividade em 88% dos casos, confirmando a validade deste teste como uma ferramenta útil de diagnóstico na leishmaniose cutânea em humanos.

Pedras et al. (2003) realizaram metodologia similar a Toledo et al. (2001), mas verificaram as leituras no local da inoculação após 72h, e foram consideradas positivas as reações cutâneas com tamanho igual ou maior que 5mm. Os autores obtiveram 100% de positividade em pacientes com leishmaniose mucosa (LM), 94,1% na leishmaniose mucocutânea (LMC) e em pacientes que apresentaram associação de LM e LMC, a positividade chegou a 97,2%.

Em estudos com cães, Santos et al. (2005) obtiveram resultados inconsistentes, onde a positividade da intradermorreação (IDR) foi de 10,1%. Neste estudo foi utilizada a mesma concentração do antígeno padronizado utilizado no teste realizado em humanos quando foi aplicado 0,1mL por via intradérmica com 0,25µg de concentração de proteínas. (PEDRAS et al.,2003; TOLEDO et al., 2001).

Entretanto, quando Genaro et al. (1992) utilizaram maior concentração de proteínas (200µg em 0,1mL) na técnica descrita por Marzochi e Barbosa-Santos (1988) os resultados obtidos experimentalmente, em animais com infecções recentes (3 meses de infecção) apresentaram positividade de 100%, com leitura após 72h de inoculação. Apesar de descreverem diferentes diâmetros de área de endurecimento são necessários mais estudos críticos e esclarecimentos sobre os processos celulares imunológicos dos cães infectados com *L. (V.) braziliensis*, com antígeno padronizado para humanos.

Em cães naturalmente infectados pelo parasita, residentes em áreas endêmicas de LTA, foi utilizada a técnica de IDR com antígeno padronizado para

humanos e houve resultados positivos de 36,5% (Marzochi e Barbosa-Santos,1988) e 30,7% (Hermeto et al., 1994).

#### **2.5.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Esta técnica é utilizada com auxílio de enzimas para detectar e mensurar anticorpos específicos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Na metodologia, são empregadas placas de poliestireno com micropoços. A interação antígeno-anticorpo é evidenciada pela ação de uma enzima (peroxidase ou fostase alcalina), conjugada com anti-anticorpo. A reação é revelada na presença de substrato para a enzima e um cromógeno, onde os mais usados são, a ortofenileno diamina (OPD) que produz cor amarelo ou a tetrametil benzidina (TMB) de cor azul. A reação final da ação da enzima deve ser lida no espectrofotômetro em comprimento de onda com variação de 405 a 492nm (Figura 2) (BEZERRA et al., 1998; MADEIRA et al., 2003; TIZARD, 2009).

Em pesquisa por perfil de subclasses de anticorpos contra *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no diagnóstico e acompanhamento da leishmaniose mucosa, Pedras et al. (2003) encontraram por meio da técnica ELISA, sensibilidade com IgG total para leishmaniose mucosa (LM) (94,7% com ambos os antígenos) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (100% com ambos os antígenos), o que mostra que a detecção de subclasses de anticorpos IgG constituem alternativa valiosa para aumentar a eficiência do diagnóstico sorológico dessas doenças, visto que o tratamento da LM requer maior tempo de duração e concentração de drogas anti-*Leishmania*.

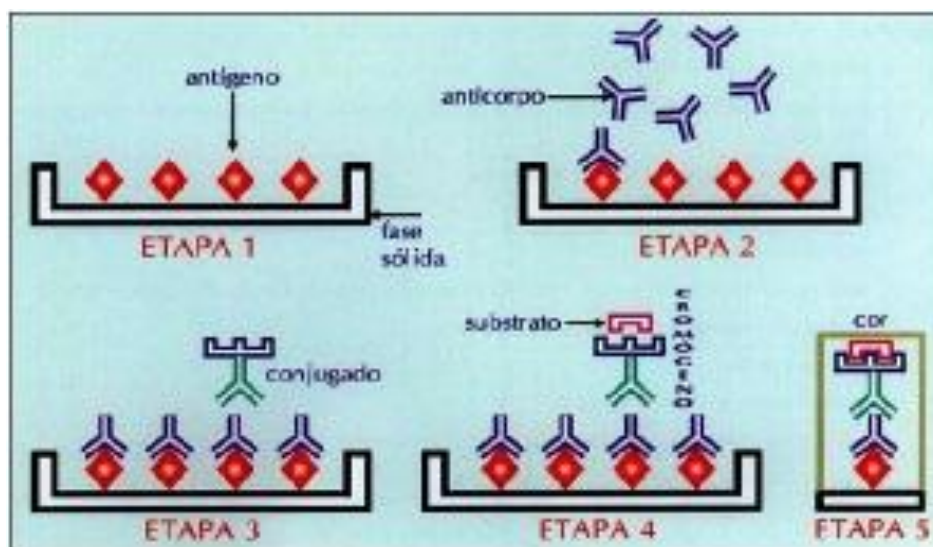


FIGURA 2. Sequência das etapas do ELISA Indireto.

Fonte: Adaptado de BEZERRA et al. (1998).

O teste com antígeno *L. (Viannia) braziliensis* no ELISA indireto para LTA, apresentou sensibilidade de 75,6% e especificidade de 100,0% em pacientes humanos com as formas cutâneas e mucosa da enfermidade. Quando comparadas com antígeno *Leishmania major*-like, mostrou a necessidade de antígenos específicos para diagnóstico da enfermidade em diferentes regiões do país (BARROSO-FREITAS et al., 2009).

Ribeiro et al. (2007) realizaram ELISA para comparar os antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* para detecção da imunoglobulina IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2 para diagnóstico de LTA e sua diferenciação de esporotricose em cães. Foi observado que a detecção de IgG por meio do ELISA que utiliza antígeno de *L. (V.) braziliensis* apresenta um melhor desempenho para o diagnóstico, com sensibilidade e especificidade de 97,1%, e permitiu a discriminação entre casos de LTA e esporotricose em cães.

Em levantamento epidemiológico, Campos et al. (2011) comprovaram que em 100% dos animais com suspeita clínica que apresentavam lesões características de LTA em alguma região do corpo, o ELISA indireto foi válido como ferramenta de diagnóstico para animais sintomáticos e também evidenciou que 8,3% dos animais apresentaram sorologia positiva sem apresentarem sinais clínicos da doença, caracterizando-os como animais assintomáticos para LTA.

Sabe-se que tanto nos testes sorológicos de Imunofluorescência Indireta (IFI) quanto no ELISA, existe a possibilidade de reações cruzadas, pois além das enfermidades que promovem tais reações, os anticorpos maternos podem ser transferidos aos filhotes, sem que ocorra a infecção nos mesmos, portanto não se pode afirmar que animais soropositivos estejam infectados e irão manifestar a doença. O desenvolvimento de sinais clínicos pode ou não ocorrer, vai depender da resposta imunológica do hospedeiro (DANTAS-TORRES, 2005).

### **2.5.5 Immunoblotting ou Western Blot (WB)**

O *immunoblotting* ou *Western Blot* é um ensaio imunoenzimático como ELISA, mas difere na fase sólida, pois é realizada sobre a superfície da membrana e não em placa de poliestireno. O teste é um valioso recurso na caracterização de frações antigênicas imunodominantes e identificação da reatividade específica dos anticorpos detectados por algum teste de triagem anterior que utiliza as múltiplas frações antigênicas como os testes confirmatórios ou suplementares. Para a detecção da interação antígeno-anticorpo é necessário inicialmente à obtenção da membrana com as frações da mistura antigênica, onde as proteínas são separadas conforme o seu tamanho, por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Depois de separadas, as frações são transferidas para a membrana de nitrocelulose onde permanecem inertes e depois utilizadas como suporte para a detecção da interação antígeno-anticorpo (BEZERRA et al.,1998).

Pela análise de *Western Blot* é possível identificar antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* que apresentaram sensibilidade e especificidade superiores ao ELISA e ao IFI com sensibilidade de 90,9% e especificidade de 100% (BRITO et al.,2000).

Segundo Szargiki et al. (2009), em trabalho que comparou técnicas de IFI, ELISA e *Western Blot* no diagnóstico de LTA, foi possível concluir que *Western Blot* foi 100% sensível e provou ser útil na identificação de portadores assintomáticos, bem como para estabelecer diagnóstico diferencial entre leishmaniose cutânea (LC) e outras enfermidades como “Doença de Chagas”, paracocidioidomicose e toxoplasmose citadas como responsáveis por reações cruzadas. Neste estudo dois ou mais métodos foram aplicados em todos os casos dos grupos para confirmação

da LTA e com estes resultados, puderam distinguir as doenças que cursam com os mesmos sinais clínicos da LTA, permitindo assim o tratamento precoce.

Além da detecção de baixos níveis de anticorpos, o *Western Blot* identifica animais que são portadores assintomáticos para LTA (ZANINI et al., 2010), e servem também como exame de controle na confirmação da LTA por meio da técnica de ELISA indireto (CAMPOS et al., 2011; ZANINI et al., 2010).

Para diagnóstico definitivo da leishmaniose é necessária associação de dois ou mais métodos de diagnóstico, preferencialmente o parasitológico, com identificação de formas amastigotas no esfregaço ou biópsias, também por formas promastigotas no cultivo "*in vitro*" das espécies (BRITO et al., 2000). E deve estar associado a um teste sorológico e ainda assim ser complementado com diagnóstico molecular (BRASIL, 2010; PITTNER et al., 2009).

### **2.5.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Para Sampaio et al., (2009), o diagnóstico de *Leishmania* pode ser realizado pela reação em cadeia de polimerase (PCR). É um procedimento rápido, com elevadas taxas de sensibilidade e especificidade e pode ser realizado a partir de quantidades reduzidas de DNA ou RNA. Os protocolos de PCR envolvem o uso de enzimas como DNA polimerase, responsável pela adição de desoxirribonucleotídeos durante a replicação, regiões específicas do ácido nucléico pesquisado (*primers*), desoxirribonucleotídeos (dNTPs), além de outros reagentes. A reação é realizada em termociclador que tem por função realizar ciclos, em diferentes temperaturas, que atuarão no processo de replicação "*in vitro*" (STEPHENS et al., 2009).

A partir destas características, o uso de técnicas baseadas em PCR tem se tornado uma nova opção de diagnóstico. Um dos alvos para o diagnóstico é a amplificação de sequência da kDNA de *Leishmania* spp., que amplifica fragmentos de 100 a 150 pares de bases de regiões ditas conservadas, comum a todas as espécies de *Leishmania*, e regiões variáveis, que amplificam fragmentos variam de 700 a 1000 pares de bases de acordo com a espécie (SILVA et al., 2012).

Vale ressaltar que além da PCR, técnicas como eletroforese de enzimas, anticorpos monoclonais, ou outros métodos moleculares como o PCR multiplex, PCR-RFLP e RAPD podem ser utilizados para o diagnóstico. No entanto, a eletroforese de enzimas exige procedimentos como cultivo e isolamento do parasita,



pois o uso de anticorpos monoclonais é limitado pelos índices de reação cruzada. Enquanto as variações da PCR requerem uma estrutura laboratorial sofisticada, reagentes de alto custo e técnicas como PCR-RFLP apresentam pouca reprodutibilidade. Por outro lado, a PCR padrão apresenta elevada sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (LIMA JÚNIOR et al., 2009)

A técnica de PCR é indicada especialmente em pacientes suspeitos para LTA, mas que apresentam resultados negativos em testes considerados convencionais para o diagnóstico etiológico. Todavia, esta metodologia não deve substituir outras formas de diagnóstico de leishmaniose, pois, mais parâmetros devem ser utilizados, como aspecto clínico e histórico epidemiológico dos pacientes (FAGUNDES et al., 2010).

Brasil (2010) recomenda para o diagnóstico laboratorial da doença canina técnicas semelhantes as realizadas na doença humana que se baseiam no diagnóstico parasitológico (exames de observação de lâmina, histopatológico ou cultura) ou sorológico (reação de imunofluorescência indireta – RIFI e ensaio imunoenzimático– ELISA).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como até o presente momento não foi encontrado nenhum estudo na literatura que comparasse ELISA e WB para identificar antígeno *L. (V.) braziliensis* para cães sem sintomatologia clínica, sugere-se a continuação deste trabalho.

Na comparação do uso de diferentes protocolos para extração de DNA em amostras de pele, concluiu-se que o protocolo que utiliza Acetato de Potássio (BARRERO et al., 2008 – modificado), foi o mais indicado.

No raio de 1.000m do entorno de casos humanos clinica e laboratorialmente positivos para LTA foram identificados cães assintomáticos para leishmaniose tegumentar americana, por meio das técnicas de *Western Blot* (WB) com resultados positivos, mas com cultura do protozoário, negativos. Este fato indica que os animais, nesta situação, não atuaram como potenciais reservatórios do parasito.

## 7. REFERÊNCIAS

APARICIO C. Utilização de geoprocessamento e sensoriamento remoto orbital para análise espacial de paisagem com incidência de leishmaniose tegumentar americana **Dissertação** (Mestrado). São Paulo: Instituto de Biociências da USP; 2001. Disponível em URL:<http://www.teses.usp.br>

BARATA, R.A.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T.; et al. Phlebotomine Sand Flies in Porteirinha, an Area of American Visceral Leishmaniasis Transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n.5, v.99, p.481-487, August 2004.

BARRERO, N.M.L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; LOPES T.S. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**, v. 35, n. 1, p. 65-74, 2008.

BARROSO-FREITAS, A.P.T.; PASSOS, S.R.L.; MOUTA-CONFORT, E.; MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A.O.; SANTOS, G.P.L.; NASCIMENTO, L.D.; MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v.103, n.4, p.383-389, 2009.

BEZERRA, A.C.S.; PROIETTI, A.B.F.C.; LOUREIRO, P.; RIBINIK, M.L.R. **Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública**. Brasília: Ministério da Saúde, 1998. 54 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância-Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde,

Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRITO, M.E.F.; MENDONCA, M.G.; GOMES, Y.M.; JARDIM, M.L.; ABATH, F.G.C. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.7, n.2, p.318-321, 2000

CAMPOS, D.R.; PALACIO, B.B.; OLIVEIRA, L.C.; ALMEIDA, S.L.H.; BRIDI, H.C.L.; PORFIRIO-PASSOS, G.; ZANINI, M.S. Utilização da técnica de ELISA para diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana em cães assintomáticos. **Anais do 38º Conbravet, Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Florianópolis, Brasil, 01-04 Novembro, 2011.

CARDOSO, P.G. SOUZA, M.B.; SANAVRIA, A. et al.; Flebótomos de áreas com ocorrências de casos humanos de leishmaniose tegumentar americana no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42 p.146-150, 2009

COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, M.C.A.; SOUZA, W.J.S.; AMENDOEIRA, M.R.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.41, p.104-118, 1981.

DANTAS-TORRES, F. Infecção, soropositividade e doença: qual a diferença? **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, n.5, p.1609-1611, set-out, 2005.

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

DESJEAUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, p.239-243, 2001.

DIAS, E.S.; FRANÇA-SILVA, J.C.; SILVA, J.C.; et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.1, p.49-52, jan-fev, 2007.

FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A.; PAULA, C.C.; BOGIO, A.; ANTONIO, L.F.; SCHIAVONI, P.B.; MONTEIRO, V.S.; MADEIRA, M.F.; QUINTELLA, L.P.; VALETE-ROSALINO, C.M.; FERREIRA E VASCONCELLOS, E.C.; COUTINHO, R.B.G.A.; PACHECO, R.S.; MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Avaliação da reação em cadeia da polimerase no diagnóstico de rotina da leishmaniose tegumentar em um centro de referência. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105 n.1 Rio de Janeiro, fev, 2010.

FALQUETO, A.; COURA, J.R.; BARROS, G.C.; et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana 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.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A.; VAREJÃO, J.B.M et al. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil: further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v.86, n.4, p.499-500, 1991.

FALQUETO, A.; SESSA, P.A.; FERREIRA, A.L.; et al. Epidemiological and Clinical Features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.8, p.1003-1010, Dezembro, 2003.

FERREIRA, A.L.; SESSA, P.A.; VAREJÃO, J.B.M.; et al. Distribution of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) at Different Altitudes in an Endemic Region of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.8, p.1061-1067, Novembro, 2001.

FIGUEIREDO, F.B.; BONNA, I.C.F.; NASCIMENTO, L.D.; COSTA, T.; BAPTISTA, C.; PACHECO, T.M.V.; AMENDOEIRA, M.R.R.; MADEIRA, M.F. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-Leishmania em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.141-145, mar-abr, 2009.

GENARO, O.; RASO, P.; COSTA, C.A.; CARVALHO, M.G.; AMARAL, F.; BOTELHO, A.C.C.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; MAYRINK, W. Montenegro skin tests in dogs experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.87, n.1, p.163-164, 1992.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.36 n.1 p.71-80, 2003.

HERMETO, M.V.; VIEIRA-DIAS, D.; GENARO, O.; ROTONDO-SILVA, A.; COSTA, C.A.; TOLEDO, V.P.C.P.; MICHALICK, M.S.M.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; MAYRINK, W. et al. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Doce Valley, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v.89, n.4, p.519-521, 1994.

LIMA JÚNIOR, M.S.C.; ANDREOTTI, R.; DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; OLIVEIRA, A.G.; MATOS, M.F.C. Identification of *Leishmania* species isolated in human cases in Mato Grosso do Sul, by means of the polymerase chain reaction. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.3, p.303-308, mai-jun, 2009.

LESSA M.M.; LESSA, H.A.; CASTRO, T.W.N.; OLIVEIRA, A.; SCHERIFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E.M. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia** v.73, n.6, p.843-7, 2007.

PEREIRA, M.A.V.; TÁVORA, C.M.P.F.; VITA, G.F.; SILVA, V.L. Diagnóstico sorológico pelo método de Imunofluorescência Indireta (IFI) para detecção de

anticorpos anti-*Leishmania* sp., em cães errantes do município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, no período de 2000 a 2001, após surgimento de caso humano autóctone. **ARS Veterinaria Jaboticabal**, SP v.24, n.3, 177-180, 2008.

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

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, n.10, (supplement2), p.359-375, 1994.

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

MEMBRIEVE, N.A.; RODRIGUES, G.; GUALDA, K.P.; BERNAL, M.V.Z.; OLIVEIRA, D.M.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U.; TEIXEIRA, J.J.V.; SILVEIRA, T.G.V. Environmental and Animal Characteristics as Factors Associated with American Cutaneous Leishmaniasis in Rural Locations with Presence of Dogs, Brazil, **PLoS ONE**, v.7, n.11, 2012.

PEDRAS, M.J.; ORSINIA, M., CASTRO, M.; PASSOS, V.M.A.; RABELLO, A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v.47, n.3, p. 477-485, 2003.

PITTNER, E.;VOLTARELLI, E.; PERLES, T.F.; ARRAES, S.M.A.A., SILVEIRA, T.G.V.; LONARDONI, M.V.C.Ocorrência de leishmaniose tegumentar em cães de área endêmica no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.6, n.3, p.561-565, 2009

PORFIRIO-PASSOS, G.; SILVA, P.M.A.; ALMEIDA, S.L.H.; ZANINI, M.S. uso das técnicas de ELISA e *Western Blot* para seleção de candidatos caninos à imunização contra leishmaniose visceral no município de Iúna – ES. **Anais** do II International Symposium on Leishmaniasis Vaccines, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, September 1–6, 2012.

RANGEL, E.F. e LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n.7, v.104, p.937-954, Novembro, 2009.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 856 p.

RIBEIRO, F.C.; SCHUBACH, A.O.; MOUTA-CONFORT, E.; SCHUBACH, T.M.P.; MADEIRA, M.F.; MARZOCHI, M.C.A. Use of ELISA employing *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. **Veterinary Parasitology** v.148, n. 3-4, p 200-206, 2007.

SAMPAIO, R.N.R.; GONÇALVES, M.C.; LEITE, V.A.; FRANÇA, B.V.; SANTOS, G.; CARVALHO, M.S.L.; TAUIL, P.L. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.6, p.686-690, nov-dez, 2009.

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

SANTOS, I.B.; SCHUBACH, T.M.P.; LEME, L.R.P.; OKAMOTO, T.; FIGUEIREDO, F.B.; PEREIRA, S.A.; QUINTELLA, L.P.; MADEIRA, M.F.; COELHO, F.; REIS, R.S.; SCHUBACH, A.O. Sporotrichosis - The main differential diagnosis with tegumentary



leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.1-6, 2007.

SESSA, P. A.; FALQUETO, A.; VAREJÃO, J. B. M. Attempted Control of Mucocutaneous Leishmaniasis Through Treatment of Diseased Dogs. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.10, n.4, p.457-463, Oct/Dec, 1994.

SILVA, A.E.P.; GURGEL, H.C. Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana através de geotecnologias no município de Ubatuba – SP. **Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Natal, Brasil, 25-30 abr 2009, INPE, p.7595-7602.

SILVA, J.G.L.; SILVA, T.M.; PELOSO, E.F.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; MAYRINK, W.; ARIOSIA, M.C.F.; SILVA, P.M.F.; MARQUES, M.J. Comparison among three Polymerase Chain Reaction assays on detection of DNA from *Leishmania* in biological samples from patients with american cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, MAR-APR; v.45, n.2, p.257-9, 2012.

STEPHENS, P.R.S.; OLIVEIRA, M.B.S.C.; RIBEIRO, F.C.; CARNEIRO, L.A.D. Capítulo 2 Virologia. In: Molinaro, E.M.; Caputo, L.F.G.; Amendoeira, M.R.R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, volume 4, Rio de Janeiro, EPSJV; IOC, 2009.

TANNÚS, M. M.; RODRIGUES, F.H.; MASTRANTONIO, E.C.; ROCHA, F.A.; PEREIRA, C.G.; SILVA, A.L.N.; SOUZA, M.A. Reatividade sorológica de cães frente a antígenos de três espécies de *Leishmania*. **Horizonte Científico**, v. 1, n.1, p. 1-28, 2007.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**, 8ª edição, Elsevier, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009, p.587

TOLEDO, V.P.C.P.; MAYRINK, W.; GOLLOB, K.J. et al. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after

treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 1, p.89-98, 2001.

UCHOA, C.M.A.; SERRA, C.M.B.; MAGALHÃES, C.M. et al. Educação em saúde: ensinando sobre a leishmaniose tegumentar americana. **Caderno de Saúde Pública**, v.20, n.4, p. 935-941, 2004.

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

VIRGENS, T. M.; SANTOS, C. B.; PINTO, I. S. Phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in an American tegumentary leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n.12, p.2969-2978, dez, 2008.

ZANINI, M.S.; VIANNA, K.F.; REIS, A.B.; CAMPOS, D.R.; MUSSI, J.M.S.; ZANINI, S.; LEMOS, E.M. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Immunoblotting analysis for the detection of IgG subclasses in the diagnosis of symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, n.173, p.143-146, 2010.

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

## Anexo 1. Descrição da técnica obtenção de antígeno solúvel

Foi produzido antígeno solúvel de acordo com o protocolo descrito por LAEMMLI (1970). As formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) foram cultivadas em meio bifásico, composto pelo meio sólido Novy-MacNeal-Nicolle(NNN) e meio líquido Schneider, a  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  em estufa incubadora refrigerada com demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) até a fase estacionária do crescimento.

As formas promastigotas foram lavadas em solução tampão fosfato (PBS) (NaCl 0,13M, KCl 0,002M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,0017M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,010M), pH 7,2, sob centrifugação à 2000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, foram expostas a ultrassom para rompimento da membrana celular. O material sonicado passou por nova centrifugação a 18500 rpm por 90 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante obtido foi submetido à diálise em PBS (NaCl 0,13M, KCl 0,002M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,0017M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,010M), pH 7,2, durante 36 horas, com troca da solução de PBS a cada 6 horas. Após diálise, o material passou por filtração em membrana de  $0,22\mu\text{m}$ , em condições estéreis, para purificação do material.

A concentração das proteínas contidas no antígeno solúvel obtido foi avaliada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Foram diluídas em PBS (NaCl 0,13M, KCl 0,002M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,0017M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,010M) estéril para uma concentração final de 1,0 mg/ml e estocadas em ultra-freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## Anexo 2. Descrição da técnica de ELISA “*in house*”

Adaptado do protocolo de Rosário et al. 2006, inicialmente as placas são sensibilizadas com antígeno solúveis de *L. (V.) braziliensis* e deixadas à temperatura de 4°C por um período de aproximadamente 8 horas. Após esse tempo as placas passam por quatro lavagens com solução de NaCl-T (0,9% de NaCl e 0,05% Twen 20).

Em seguida ocorre realização do bloqueio das placas utilizando solução de composta por soro fetal bovino (SFB), e deixado na estufa com temperatura de 37°C durante 45 minutos. Ao final destes 45 minutos as placas passam por mais duas lavagens com solução de NaCl-T (0,9% de NaCl e 0,05% Twen 20).

O passo seguinte é a aplicação da amostra de soro diluído (soro primário), na proporção de 1:40, sobre as placas e levando-as a estufa 37°C durante 45 minutos. Ao final destes 45 minutos as placas são lavadas quatro vezes com solução de lavagem. Em seguida realiza-se a hibridação com o anti-anticorpo conjugado com peroxidase seguindo as mesmas etapas de incubação que o soro primário.

A revelação é realizada pela adição de solução reveladora composta de ácido cítrico, peróxido de hidrogênio a 30% e OPD seguida da incubação à 37°C durante 10 minutos. A reação é parada com adição de ácido sulfúrico a 2,5M e seguida de leitura em leitor de ELISA a 490nm (Figura 3).

### Anexo 3. Descrição da técnica do *kit* para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7<sup>®</sup> (Biogene<sup>®</sup>, Brasil), para uso veterinário.

#### Critérios de Validação

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

#### Cálculo do Ponto de Corte

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

#### Socorro Técnico

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

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

Produzido e Fabricador por:

**Biogene Indústria e Comércio Ltda ME**  
Rua Costa Sepúlveda, 749  
Engenho do Meio - Recife - PE  
CEP 50.730-260  
CGC.: 69.951.234/0001-10  
Insc. Est. : 18.2.001.0198256-0  
Fone/Fax: 81 - 3453.2502 ou 8888.9072  
E-mail: [servio@biogene.ind.br](mailto:servio@biogene.ind.br)  
MAPA Licença n.º. 7434/2000  
**Indústria Brasileira**



Validade e data de fabricação na embalagem



### Kit para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7<sup>®</sup>

Para uso veterinário

#### Descrição

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

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

#### Apresentação

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

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

A estabilidade de todos os reagentes é de seis meses

**Observações**

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

**Procedimentos****1. Preparo dos tampões de lavagem**

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

**2. Sensibilização e neutralização da placa**

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

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

**3. Diluição dos soros**

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

O título da reação é de 1:100.

**4. Realização dos testes**

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

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

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

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

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

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

#### Anexo 4. Descrição da técnica de *Western Blot*

Na técnica de *Western Blot*, as proteínas contidas no antígeno solúvel de *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com diferentes gradientes de concentração. As amostras de antígeno solúvel de *L. braziliensis* foram diluídas em tampão de amostra (glicerol, SDS 10 % e azul de bromofenol 0,5 %) na proporção de 1:5.

A corrida eletroforética ocorreu em duas etapas, à primeira realizada no *stacking gel*, na concentração de 3,9 %, que auxilia na organização e linearização das proteínas. A segunda no *separating gel*, com 12 % de concentração, que atua na separação das proteínas de acordo com sua massa molecular. O procedimento foi realizado no sistema MINI PROTEAN (BIO-RAD®). A eletroforese foi conduzida por 10 minutos pelo *stacking gel*, a 100 V e finalizada a 200 V por 50 minutos pelo *separating gel*, com uso do tampão de corrida 1X (0,12M Tris, 0,95M Glicina e 0,017M SDS).

Após a eletroforese, uma tira do gel de aproximadamente 2 mm foi corada com Coomassie Blue para observar o padrão de bandas referente ao antígeno solúvel utilizado e para conferir se a eletroforese ocorreu de modo adequado. As proteínas presentes no gel foram transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), sob corrente elétrica de 15 V, durante um período de oito horas, imersas em tampão de corrida 1X (0,12M Tris, 0,95M Glicina e 0,017M SDS), pelo sistema MINI PROTEAN (BIO-RAD®)

Após a transferência, uma tira de 2 mm da membrana foi cortada e corada em solução de Ponceau (Sigma®) 1 %, durante dois minutos, sob agitação constante, para visualização do padrão de bandas referentes ao antígeno solúvel e confirmar se a transferência ocorreu de modo adequado. Em seguida, novas tiras de 5 mm da membrana de PVDF foram cortadas e incubadas em 2 mL de solução PBS-leite em pó desnatado (Molico®) (NaCl 0,13M, KCl 0,002M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0017M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,010M e Molico® 5%), durante uma hora, sob agitação constante, para o bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos.

Posteriormente, as tiras foram imersas em 2mL de solução PBS-leite em pó desnatado (Molico®) contendo as amostras de soros caninos a serem testados na proporção de 1:10, por um período de 8 horas, sob agitação constante. Em seguida, as tiras foram lavadas em 2mL de solução de PBS-Tween 20% (NaCl 0,13M,

KCl 0,002M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,0017M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,010M e Tween 20%) (PBS-T), durante três ciclos de 15 minutos, sob agitação constante, para a retirada de anticorpos contidos nas amostras de soro que não se associaram as proteínas de *L. braziliensis* presentes nas tiras da membrana

Na sequência, as tiras foram incubadas em 2mL de solução PBS-leite em pó desnatado (Molico®) contendo anti-anticorpos caninos ( $\text{IgG}_2$ ) (Sigma®) contra *L. braziliensis* marcados com peroxidase, na proporção de 1:1000 por uma hora, sob agitação constante. Decorrido este período, as tiras de membrana foram lavadas em 2mL de solução PBS-T, por três ciclos de 15 minutos, em agitação constante, eliminando os anti-anticorpos que não se ligaram aos anticorpos contidos na membrana. O resultado do teste foi obtido por imersão das tiras em solução reveladora ( $\text{NaCl}$  0,13M,  $\text{KCl}$  0,002M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,0017M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,010M, Etanol 1%, 0,5% Cloronaftol e 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Foram considerados casos sorologicamente positivos para leishmaniose tegumentar americana, as tiras que apresentaram bandas bem definidas de peso molecular de 66kDa, pois indicaram a formação do complexo antígeno-anticorpo referente à *L. braziliensis*.

Como controles positivos para esta técnica utilizou-se amostras séricas de cães sintomáticos com lesões típicas de LTA e previamente confirmados por técnicas de *Western Blot* e PCR para *L.(V.) braziliensis*.



## Anexo 5. Descrição das técnicas de extração de DNA e da PCR de biópsia de pele íntegra e tecido sanguíneo

Para a realização da técnica de PCR com fins de diagnóstico de LTA, é necessária a extração do material genético proveniente do animal suspeito, neste caso, foram utilizados a biópsia de pele do pavilhão auricular e sangue total dos animais com resultados positivos na sorologia. A extração de DNA foi realizada com fragmentos de 0,9 cm<sup>2</sup>.

Para a extração do DNA em amostras de pele, empregou-se procedimento com Acetato de Sódio (BARRERO et al., 2008 – modificado). As amostras de tecido foram maceradas em nitrogênio líquido até obtenção de pó fino e depositadas em microtubos de polipropileno com capacidade de 2,0 mL, juntamente com 550µL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA, 100 mM NaCl e SDS 1 %) e 15 µL de proteinase K (20 mg/mL) (Fermentas®).

Os microtubos foram submetidos à agitação por 15 segundos e imediatamente incubados em banho-maria a 60°C por 2 horas. Em seguida, 350 µL de Acetato de Sódio 5 M foram adicionados a cada amostra, levados à agitação por 15 segundos e centrifugados por 30 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos onde o DNA foi precipitado com o mesmo volume de Etanol absoluto gelado e posteriormente refrigerado a -20°C *overnight*. Posteriormente, as amostras de DNA foram centrifugadas por 30 minutos a 13000 rpm, o sedimento formado foi lavado duas vezes com 1 mL de Etanol 70% por centrifugação durante 5 minutos a 6000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, o material foi seco em estufa a 37°C para a total evaporação do álcool e por fim, as amostras foram ressuspendidas em 100 µL de tampão TE (10 mM de Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA), tratadas com 30 µg/mL de RNase, e incubadas em banho-maria a 37°C por 60 minutos. O DNA obtido foi estocado a -20°C.

A extração de DNA de sangue foi empregada à metodologia de *salting-out* (LAITINEN et al., 1994 – modificado). O procedimento foi realizado a partir de 500 µL de sangue total coletados em tubos com EDTA. Em microtubos de polipropileno de 2mL foram adicionados 500 µL de sangue juntamente com 1,5 mL de tampão de lise de hemácias (155 mM de NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM de KHCO<sub>3</sub> e 1 mM de EDTA) e mantidos em gelo por 30 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1800 rpm a 4°C, e o sobrenadante descartado por inversão de tubos. O

precipitado formado foi lavado com 750 µL de tampão de lise de hemácias e submetido a uma nova centrifugação a 1800 rpm, durante 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 300 µL de tampão de lise nuclear (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 400 mM de NaCl e 2 mM de EDTA), as amostras foram submetidas à agitação por 30 segundos, em seguida, foram adicionados 1 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 30 µL de SDS 10 %.

O material foi incubado em banho-maria a 37 °C *overnight*. No dia seguinte, foram adicionadas as amostras 100 µL de NaCl 5M, homogeneizadas e centrifugadas por 20 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e submetido à nova centrifugação por 20 minutos a 2500 rpm. Novamente o sobrenadante foi transferido para novos microtubos, e o DNA foi precipitado com a adição de dois volumes de Etanol absoluto e centrifugado por 10 minutos a 6000 rpm. O sedimento formado foi lavado com a adição de 1 mL de Etanol 70 % e centrifugação por 10 minutos a 2500 rpm, o precipitado foi seco em temperatura ambiente e ressuspensionado em 50 µL de TE (10 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM de EDTA), incubadas a 65 °C por 30 minutos, e estocadas a -20 °C.

A integridade e a qualidade do DNA extraído das amostras de tecido e sangue foram analisadas em espectrofotômetro (Nanodrop 2000C®) e em gel de agarose 0,7%, utilizando-se como padrão de comparação, marcador molecular *Lambda* (λ) (Fermentas®, USA), nas concentrações de 25, 50 e 75 ng/mL, corados com Brometo de Etídio 1 % (Hexapur®), visualizados sob luz ultravioleta. A eletroforese do gel foi conduzida em 100 Volts por uma hora, usando tampão TBE 1X (0,89 M de Tris, 0,89 M de Ácido Bórico e 0,02 M de EDTA). As imagens foram capturadas em Sistema de Fotodocumentação L PIX HE (Loccus Biotecnologia®) e digitalizadas em arquivo eletrônico e analisadas posteriormente.

A etapa subsequente à extração de DNA foi a PCR, que seguiu a mesma metodologia tanto para as amostras oriundas de sangue quanto para as provenientes de tecido. As reações foram realizadas com volume final de 25 µL e preparadas a partir de 12,5 µL de PCR *Master Mix* 2X (Fermentas®), 9,5 µL de água *DNase Free* (Fermentas®) 1 µL de cada *primer*. Foram utilizados os *primers* B1 e B2 (DE BRUIJN e BARKER, 1992), que amplificam uma sequência de 750 pares de bases do DNA de *Leishmania (Viannia)* que são:

B1: 5' - GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG - 3'

B2: 5' - CTA ATT GTG CAC GGG GAG G - 3'

Utilizou-se termociclador (BIO-RAD®) com o seguinte programa (DE BRUIJN e BARKER, 1992):

- 1ª Etapa: 96°C por 6 minutos;
- 2ª Etapa: 93°C por 30 segundos;
- 3ª Etapa: 60,8°C por 1 minuto;
- 4ª Etapa: 72°C por 1 minuto;
- 5ª Etapa: Volta para etapa 2, 40 vezes;
- 6ª Etapa: 72°C por 10 minutos;
- 7ª Etapa: 4°C por ∞.

Os produtos da amplificação gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, juntamente com o padrão molecular de 100 pares de bases (Fermentas®), corados com Brometo de Etídio 1 % (Hexapur®), visualizados sob luz ultravioleta. As imagens foram capturadas em Sistema de Fotodocumentação L PIX HE (Loccus Biotecnologia®) e digitalizadas em arquivo eletrônico para posterior análise.

Os cães em que as amostras de DNA provenientes das biópsias de pavilhão auricular e sangue total, submetidos à técnica de PCR, e que geraram bandas de 750 pares de bases, foram considerados positivos para leishmaniose tegumentar americana pelo diagnóstico molecular da PCR.

Como controle positivo da PCR utilizou-se DNA obtido da cultura de amostras referência de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903).

## Anexo 6. Descrição da técnica de cultivo e isolamento de formas de *Leishmania*

Com o intuito de pesquisar possíveis formas amastigotas de *Leishmania* spp. em tecidos íntegros, foi realizado o cultivo de 40 amostras de fragmentos positivos no teste ELISA. Os tecidos retirados dos pavilhões auriculares dos cães foram utilizados para isolamento “*in vitro*” e cultivo de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Neste procedimento, foi utilizado o protocolo adaptado de ROCHA et al. (2002) com realização de cultura em garrafas (TPP<sup>®</sup>/90026) contendo meio ágar-sangue, Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) associado ao meio líquido *Schneider*, descrito como meio NNN/*Schneider*. As culturas foram mantidas em estufa incubadora refrigerada com demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) (modelo 347) a temperatura de  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante o período de 30 dias.

Como controles positivos, foram utilizados para cultivo e isolamento, fragmentos de tecidos de animais com lesões características da enfermidade e previamente diagnosticados com LTA.