

**TESTES DIAGNÓSTICOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL –  
ATUALIDADE E PERSPECTIVAS**

**DIAGNOSIS TESTS FOR VISCERAL LEISHMANIASIS – PRESENT AND  
PERSPECTIVES**

Yasmin Chalfoun Pomárico de SOUZA

Médica Veterinária, Mestre em Clínica, Cirurgia e Patologia pelo Departamento de  
Medicina Veterinária, Setor de Clínica de Pequenos Animais, Universidade Federal de  
Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Email para correspondência: yasminchal@gmail.com

Aline Ferreira Souza de CARVALHO

Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Fisiologia e Farmacologia  
Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Letícia Athayde Rebello CARVALHO

Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Clínica de Pequenos Animais,  
Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Victor Ferreira Ribeiro MANSUR

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA),  
Lavras, Minas Gerais, Brasil.



## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose com grandes impactos na população canina e humana no Brasil. O diagnóstico precoce é de extrema importância em todos os casos. Hoje em dia, os testes mais utilizados no país são as técnicas sorológicas de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). A técnica de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) traz uma nova perspectiva ao diagnóstico da LV, apresentando maior especificidade e sensibilidade. Cabe ao médico veterinário conhecer todos os métodos de diagnóstico, suas limitações e indicações, para poder aplicá-los corretamente na rotina clínica.

**Palavras-chave:** zoonose, *Leishmania* sp., sensibilidade, especificidade, diagnóstico.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis with a huge impact in canine and human population in Brazil. Early diagnosis is very important in all cases. Nowadays, the most used tests in the country are serological techniques of Indirect Immunofluorescence Reaction (IIR) and Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique brings a new perspective to VL diagnosis, presenting greater specificity and sensitivity. The veterinarian must know all diagnosis methods, their limitations and indications to correctly apply them in the clinical routine.

**Key-words:** zoonosis, *Leishmania* sp., sensitivity, specificity, diagnosis.



## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade que acarreta grande preocupação, por seus efeitos devastadores, tanto nos animais, quanto nos seres humanos.

Mesmo diante da grande morbidade e mortalidade, ainda não foram estabelecidas formas de controle eficientes e a doença se espalha cada vez mais por todo o país. A eutanásia de cães acometidos, principais reservatórios do protozoário, ainda é polêmica, pois mesmo diante de tal medida, o número de casos ainda é crescente e alguns pesquisadores defendem o tratamento, condenando a eutanásia como uma medida de controle efetiva.

Independente deste fato, o diagnóstico precoce é fundamental e, diante da gravidade da doença, este diagnóstico deve ser sensível e específico, apresentando grande confiabilidade.

Com os recursos disponíveis na área de biologia molecular, com o crescente avanço das técnicas, novos meios de diagnóstico vêm sendo desenvolvidos e estudados, para que, no futuro, eles possam ser utilizados não só nas pesquisas, mas também na rotina, auxiliando os seres humanos e os animais.

Nesta revisão, objetivou-se abordar os principais métodos diagnósticos que podem ser empregados nesta doença, suas aplicações, viabilidade e importância.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por um protozoário dimórfico Trypanosomatidae do complexo *Leishmania donovani* que, nas formas amastigotas, parasita o sistema fagocítico-mononuclear de mamíferos, incluindo o



homem, e células apresentadoras de antígenos potenciais, como as células de Langerhans, dendríticas e granulócitos (POCAI et al., 1998).

É uma doença importante pelo impacto que produz na saúde pública e nas implicações econômicas que gera, apresentando alta incidência, letalidade, constituindo um sério problema sanitário e econômico-social pela depleção da força de trabalho, sendo considerada uma doença negligenciada e em expansão no Brasil (ALMEIDA, 2009).

Dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade (Ministério da Saúde, 2006b).

O primeiro relato de LV no Brasil foi feito em 1934, quando foram encontradas amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela. Somente 20 anos depois, é que se registrou o primeiro surto da doença em Sobral, no Ceará (GONTIJO; MELO, 2004).

Em meados dos anos oitenta, constatou-se uma transformação nos padrões epidemiológicos da LV, cuja doença, antes restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, avançou para outras regiões indenes alcançando a periferia de grandes centros urbanos (Ministério da Saúde, 2006b).

Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios, de todas as regiões do Brasil. A doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominado pelas características de ambientes rurais e periurbanas e, mais recentemente, em centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros. A partir dos anos noventa, os Estados do Pará e Tocantins (região Norte), Mato Grosso do Sul (região Centro-Oeste), Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste) passaram a figurar de maneira significativa nas estatísticas da LV no Brasil (Ministério da Saúde, 2006b).

A região Sul, previamente considerada como a única região do país livre da doença, teve seu primeiro registro de LV canina em 2008, na cidade de São Borja, no



Rio Grande do Sul. Em 2009, ocorreram os primeiros casos em seres humanos, na mesma cidade (Ministério da Saúde, 2010). O Estado de Santa Catarina teve seu primeiro relato de caso de LV canina realizado em 2012, na cidade de Florianópolis (FIGUEIREDO et al., 2012).

No Brasil, a transmissão de *Leishmania chagasi*, principal agente etiológico da LV, se dá pela picada de fêmeas de insetos dípteros pertencentes à família Psychodidae, tendo como principal vetor *Lutzomyia longipalpis*. Mais recentemente, *Lutzomyia cruzi* foi também identificado como vetor no Estado de Mato Grosso do Sul. A espécie *Lutzomyia longipalpis* está bem adaptada ao ambiente peridomiciliar, alimentando-se em uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, entre aves, homem e outros animais silvestres ou domésticos (MONTEIRO et al., 2005).

Existe uma grande polêmica em torno da origem da LV no Novo Mundo – se ela foi introduzida recentemente, na época da colonização européia e causada pela espécie *Leishmania infantum*, ou há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser classificada como *Leishmania chagasi*. Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone. Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas (GONTIJO; MELO, 2004).

## 2. Diagnóstico

Por ser uma doença de notificação compulsória e com características clínicas de evolução grave, o diagnóstico deve ser feito de forma precisa e o mais precocemente possível (Ministério da Saúde, 2006b).

No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico de LV humana e canina são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), sendo considerados, sobretudo este último, testes de escolha para inquéritos populacionais (GONTIJO; MELO, 2004).



O Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2006a), considera um caso suspeito de LV todo indivíduo (ser humano) com febre e esplenomegalia, proveniente de área com ocorrência de transmissão de LV e todo indivíduo com febre e esplenomegalia, proveniente de área sem ocorrência de transmissão, desde que descartados os diagnósticos diferenciais mais frequentes na região.

Os casos confirmados de LV em seres humanos são: quando houve encontro do parasita nos exames parasitológicos diretos ou cultura, ou RIFI com título de 1:80 ou mais, desde que excluídos outros diagnósticos. É utilizado também o critério clínico epidemiológico: pacientes clinicamente suspeitos, sem confirmação laboratorial, provenientes de área com transmissão de LV, mas com resposta favorável ao teste terapêutico (Ministério da Saúde, 2006a).

## 2.1. Exame direto

Até a década de 30, o diagnóstico humano e os inquéritos caninos eram realizados por meio dos exames diretos, como a punção de fígado, de baço e o raspado de pele. Esses exames são seguros quanto à positividade dos casos, mas não são eficazes para realizar uma cobertura total dos animais positivos (ALVES; BEVILACQUA, 2004). O material obtido é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório. A especificidade destes métodos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no mesmo tecido. A sensibilidade mais alta (98%) é alcançada quando se utiliza aspirado do baço (GONTIJO; MELO, 2004).

Segundo o Ministério da Saúde (2006b), a punção aspirativa esplênica é o método que oferece maior sensibilidade (90-95%) para demonstração do parasita (porém, apresenta restrições quanto ao procedimento), seguida pelo o aspirado de medula óssea, biópsia hepática e a aspiração de linfonodos. Por ser um procedimento mais seguro, recomenda-se a punção aspirativa da medula óssea. No exame direto, uma gota do material aspirado é colocada em uma das extremidades da lâmina previamente



limpa, e o material firmemente dispersado na outra direção. Após secagem, o esfregão deverá ser fixado em álcool metílico e corado. Recomenda-se pelo menos quatro lâminas. Formas amastigotas do parasita podem ser visualizadas pelas colorações de Giemsa ou Wright, Leishman ou Panóptico. O encontro de parasitas no material examinado depende do número de campos observados (200 campos devem ser examinados antes de se considerar uma lâmina como negativa).

## 2.2. Isolamento em meio de Cultura (*in vitro*)

Com o material obtido pela punção aspirativa, formas amastigotas do parasita, inoculadas em meios de cultura especiais, contendo ágar e sangue de coelho, transformam-se em formas promastigotas. O clássico meio de Nicole, Novy, McNean (NNN) é o mais comumente empregado. A utilização de meio líquido sobre o NNN, como o meio LIT ou de Schneider, aumenta e acelera a positividade da cultura. Uma gota do material aspirado deve ser diluído em 0,5 mL de solução salina (PBS ou NaCl a 0,9%) na própria seringa. Em seguida, 0,1 mL desta solução deve ser inoculado em condições estéreis, em dois tubos de cultivo. As culturas devem ser mantidas entre 24-26°C e observadas em microscopia óptica comum ou invertida, semanalmente, até quatro semanas. Os tubos positivos devem ser encaminhados para laboratórios de referência para identificação da espécie (Ministério da Saúde, 2006).

## 2.3. Técnicas sorológicas

Diferentes técnicas sorológicas têm sido utilizadas no diagnóstico da LV humana e canina. Os testes diferem em sua sensibilidade e especificidade, na sua aplicação prática nas condições de campo e na disponibilidade de reagentes (GONTIJO; MELO, 2004).



### 2.3.1. Reação de fixação de complemento

A Reação de Fixação de Complemento (RFC) foi utilizada pela primeira vez para diagnosticar a LV humana, em 1938. Em 1957, pesquisadores brasileiros descreveram a RFC para inquéritos caninos, com antígeno extraído do bacilo da tuberculose, concluindo que, esta técnica possuía sensibilidade e especificidade melhores que os exames diretos. Com a demonstração da possibilidade de aplicação da RFC em eluatos de sangue colhidos em papel de filtro, essa técnica tornou-se largamente difundida, com a vantagem sobre os demais métodos sorológicos de não apresentar reações cruzadas com outras enfermidades, mesmo quando se utilizam antígenos heterólogos. Contudo, reações cruzadas em títulos baixos com a doença de Chagas e a leishmaniose tegumentar americana (LTA) podem ocorrer (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

### 2.3.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A RIFI, utilizada a partir da década de 60, demonstra sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro. A especificidade desse teste é prejudicada devido à presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos, como o da doença de Chagas e os da LTA. A utilização de formas amastigotas de *Leishmania leishmania donovani* como antígeno nas RIFI aumenta significativamente a sensibilidade, sem perder a especificidade do teste, resultando em uma maior precocidade do diagnóstico frente a animais assintomáticos ou oligossintomáticos (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

A RIFI apresenta baixa especificidade, exige na sua execução pessoal treinado, é uma reação dispendiosa e não está adaptada para estudos epidemiológicos em larga escala. Uma das principais limitações da técnica é a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (GONTIJO; MELO, 2004).



Nos casos de LV, comumente são observados títulos elevados de anticorpos no soro, geralmente superiores a 1:80, sendo que títulos inferiores necessitam de confirmação por outras metodologias (ALVES; BEVILACQUA, 2004). Em cães, o resultado considerado reagente é aquele que possua título igual ou superior ao ponto de corte que é a diluição de 1:40, mas o teste deve ser repetido em 30 dias para confirmação (Ministério da Saúde, 2006b).

### 2.3.3. Testes de Aglutinação Direta (DAT) e *Fast Agglutination Screening Test* (FAST)

Na última década, o DAT tem mostrado em vários estudos sensibilidade de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100%. A técnica combina altos níveis de validade intrínseca e facilidade de execução, embora apresente problemas na padronização e controle de qualidade do antígeno e não tenha valor no prognóstico da doença. Uma variação da DAT, o *Fast Agglutination Screening Test* (FAST), vem sendo testada para aplicabilidade em situações epidêmicas e para inquéritos populacionais (GONTIJO; MELO, 2004).

O FAST foi criado para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em amostras sanguíneas de cães com LV. O teste é baseado no DAT, porém combina uma concentração parasitária mais alta com um menor volume de teste. Em contraste com o DAT, o FAST utiliza somente uma diluição sorológica e os resultados podem ser lidos dentro de três horas, enquanto o DAT leva 18 a 20 horas. A técnica permite uma varredura rápida de um grande número de amostras, o que torna o teste muito útil em levantamentos epidemiológicos de grandes populações caninas (SCHALLING et al., 2002).

Schalling et al. (2002) verificaram que a sensibilidade do FAST foi de 93,6% e a especificidade foi de 89,0%, enquanto a sensibilidade do DAT foi de 88,6% e a especificidade de 96,7%. A taxa de concordância entre os testes foi de 95,7%.



#### 2.3.4. *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)*

O teste de ELISA é o mais utilizado para imunodiagnóstico de LV. É um teste rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI. O teste é sensível, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (GONTIJO; MELO, 2004).

A necessidade de uma técnica com alta sensibilidade e especificidade fez surgir, a partir da década de 70, muitos estudos avaliando e aprimorando o ELISA-padrão, assim como, as diversas variações de ELISA: Dot-ELISA, Fucose Manose Ligant-ELISA (FML-ELISA), Bovin e Submaxillary Mucin-ELISA (BSM-ELISA), Fast-ELISA, Micro ELISA, entre outras. A utilização de antígenos recombinantes ou purificados como as glicoproteínas de membranas gp63, gp72, gp70 e rK39 específicas do gênero *Leishmania*, melhoram a sensibilidade e a especificidade da técnica. Entretanto, reações cruzadas com enfermidades causadas por outros tripanossomatídeos ainda podem ocorrer (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

O ELISA consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Esse antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos (controle do teste e das amostras) são adicionados posteriormente. A presença de anticorpos específicos no soro vão se fixar aos antígenos. A visualização da reação ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado considerado reagente é aquele que apresente o valor da densidade ótica igual ou superior a três desvios-padrão do ponto de corte (*Cut-Off*) do resultado do controle negativo (Ministério da Saúde, 2006b).

Pappas et al. (1983) já observaram que na realização do Dot-ELISA para diagnóstico da LV humana, ocorreu reação cruzada com tripanossomíase, doença de Chagas e lúpus eritematoso. No entanto, já nesta época, comentava-se a importância deste teste econômico e rápido no diagnóstico da LV.



Cabrera et al. (1999) encontraram 100% de sensibilidade e 100% de especificidade em um estudo utilizando o FML-ELISA, detectando a soropositividade 90 a 120 dias após a infecção.

#### 2.4. Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

A partir da década de 80, várias técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para a detecção e identificação precisa dos parasitas do gênero *Leishmania*, sem necessidade de isolamento do parasita em cultura (GONTIJO; MELO, 2004).

Recentemente, desenvolveu-se a técnica de Reação em Cadeia Polimerase (PCR), que é a mais específica e sensível. Com essa técnica é possível identificar e ampliar seletivamente o DNA do cinetoplasto do parasita. No campo, seu uso ainda é limitado pelo custo (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Este método amplifica o DNA do parasita e constitui-se em uma nova perspectiva para o diagnóstico da LV, pois apresenta 94% de sensibilidade. Entretanto, os seus resultados dependem de algumas variáveis envolvidas, entre elas temos: área endêmica; o tipo de amostra; o alvo do DNA utilizado para amplificação; o método de extração do DNA (Ministério da Saúde, 2006b).

Diferentes tipos de amostras biológicas, tais como aspirados esplênicos, de medula óssea, de linfonodos, sangue total, camada leucocitária, cultura e sangue coletado em papel-filtro podem ser utilizados como fonte de material para as reações (GONTIJO; MELO, 2004). A amplificação de fragmentos de DNA de *Leishmania* pela PCR tem sido realizada a partir de diferentes tecidos bem como de aspirado de linfonodos, medula óssea e de leucócitos de sangue periférico. O uso de sangue periférico apresenta a vantagem de ser um processo de coleta fácil, menos invasivo, mas que pode resultar em menor sensibilidade do teste devido à baixa parasitemia dos animais infectados (NUNES et al., 2007).

Vários sistemas baseados em PCR têm sido desenvolvidos para *Leishmania*. O melhor alvo para PCR e para as sondas de DNA tem sido o DNA presente nos



minicírculos do cinetoplastos (kDNA) da região conservada ou a amplificação do minicírculo completo (GONTIJO; MELO, 2004). A maioria dos pesquisadores, baseia-se na amplificação de fragmento da região conservada do minicírculo de kDNA por estes estarem presentes em 10.000-20.000 cópias e por ser a amplificação da região conservada 10 vezes mais sensível que a da região variável (NUNES et al., 2007).

Nunes et al. (2007) em um estudo avaliando a eficiência desta técnica no diagnóstico da LV canina, realizaram a extração de DNA do sangue periférico após digestão com proteinase K (0,5µg), extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e precipitação com etanol. A amplificação do DNA de minicírculos de kDNA de *Leishmania* spp. foi realizada pela PCR utilizando-se os *primers* 13A (5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT -3') e 13B (5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3') previamente descritos por outros pesquisadores. As reações foram realizadas em duplicata, contendo 5µl de tampão de reação 10x (Invitrogen®, Carlsbad, California), 1,25 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2µM de cada *primer*, 2U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen®, Carlsbad, California) e 5µl de DNA em um volume final de 50µl. As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador (MJ Research Thermal Cycler) com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, sendo seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturação, 63°C por 45 segundos para associação, 72°C por 30 segundos para extensão e 72°C por 5 minutos para extensão final. A verificação da amplificação dos fragmentos de DNA de 120pb foi feita com 10µl do produto de PCR por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, corado com nitrato de prata.

Nunes et al. (2007) ressaltam que, de modo geral, há grande variação na sensibilidade do método de PCR, particularmente no que se refere ao método de extração de DNA utilizado, da escolha dos oligonucleotídeos iniciadores, das amostras clínicas utilizadas, bem como do tempo de infecção. Neste trabalho, os oligonucleotídeos escolhidos amplificaram um fragmento de minicírculos de DNA de cinetoplasto que resultou em melhor limiar de detecção, porém, a qualidade das amostras clínicas pode influenciar os resultados de sensibilidade e especificidade observados na PCR. Os pesquisadores verificaram uma baixa sensibilidade (55%) e



especificidade (66,3%) da técnica, mas existem inúmeras razões para esta ocorrência: as colheitas de sangue total realizadas por agentes de saúde, que não estão acostumados a homogeneizar as amostras, resultaram em amostras com presença de coágulos que dificultaram a extração do DNA alvo. Outro fator que pode colaborar para a baixa sensibilidade da PCR em amostras de sangue é o grau de parasitemia dos animais infectados.

Métodos de hibridização com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa (RT-PCR) para detecção de RNA e PCR para detecção de DNA, estão disponíveis para identificação do parasita (GONTIJO; MELO, 2004). A associação da hibridização com sonda de DNA radioativamente marcada pode favorecer o desempenho da PCR, no entanto, a hibridização é um procedimento mais demorado, que oferece riscos ao operador, além da necessidade de adequações físicas para o desenvolvimento desta metodologia, o que justifica a diminuição de sua aplicação mais recentemente (NUNES et al., 2007).

Nos estudos com LV, a PCR tem sido utilizada com várias finalidades além do diagnóstico, tais como o monitoramento do tratamento e estudos epidemiológicos. Esta técnica tem sido descrita como um método sensível para a detecção do parasita, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente. Muitos centros de pesquisas têm avaliado o uso da PCR para o diagnóstico de LV utilizando o sangue periférico, considerando que a biópsia esplênica e a punção de medula óssea não são técnicas adequadas para uso fora do ambiente hospitalar (GONTIJO; MELO, 2004).

Apesar de ser um método sensível para a detecção de *Leishmania* em uma variedade de materiais clínicos de humanos e cães, é um método mais utilizado em estudos epidemiológicos do que no diagnóstico de rotina. Para utilização em larga escala, ajustes são necessários para se tornar mais simples e com custo operacional mais baixo (GONTIJO; MELO, 2004).

Na era pós-genômica há um número crescente de sequências de nucleotídeos de DNA de *Leishmania*, obtidos não só no projeto genoma, mas também de trabalhos individuais. Esses dados podem ser utilizados para estudar a função de diversos genes,



podendo esclarecer aspectos da relação hospedeiro/parasita e eventualmente serem utilizados como instrumento de diagnóstico e ainda indicar possíveis alvos quimioterápicos (GONTIJO; MELO, 2004).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante de tantos recursos biomoleculares para realização do diagnóstico precoce da LV, uma doença de forte impacto, em pleno crescimento no país, é obrigação do médico veterinário ter conhecimento dos principais métodos utilizados atualmente.

Além disso, novas técnicas estão sendo estudadas, com o objetivo de obter o diagnóstico cada vez mais cedo. Ainda existem dúvidas e oportunidades para aprimoramento destes métodos, por isso, os pesquisadores devem investir no estudo quanto à eficiência desses métodos, seu aprimoramento, padronização de passos, ou o estudo de novos métodos dentro da biologia molecular, visando dar um passo à frente neste contexto.

### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. B. P. F. *Inquérito soropidemiológico e caracterização da leishmaniose canina por PCR-RFLP em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil*. 2009, 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá. 2009.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.



CABRERA, G. P. B.; SILVA, V. O.; COSTA, R. T. et al. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 61, n. 2, p. 296-301, 1999.

FIGUEIREDO, F. B.; LIMA, F. E. F.; TOMIO, J. E. et al. Leishmaniose visceral canina: dois casos autóctones no município de Florianópolis, Estado de Santa Catarina. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 40, n. 1, p. 1026-1030, 2012.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/  
DEPARTAMENTO de VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. *Leishmaniose visceral grave: normas e condutas*. Brasília, 62p., 2006a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/  
DEPARTAMENTO de VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Série A: Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 122p., 2006b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/  
DEPARTAMENTO de VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA; CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO GOVERNO DO RIO GRANDE DO SUL. *Nota técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação de Leishmaniose Visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina*. Brasília, 3p., 2010.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.



NUNES, C. M. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

PAPPAS, M. G.; HAJKOWSKI, R.; HOCKMEYER, W. T. Dot enzyme -linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *Journal of Immunological Methods*, v. 64, n. 1-2, p. 205-214, 1983.

POCAI, E. A.; FROZZA, L.; HEADLEY, S. A. et al. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 28, n. 3, p. 501-505, 1998.

SCHALLING, H. D. F. H.; SCHOONE, G. J.; BEIJER, E. G. et al. Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 109, n. 1-2, p. 1-8, 2002.

