



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

NÁDILE JULIANE COSTA DE CASTRO

ESTUDO DO MICROCULTIVO *IN VITRO* PARA O ISOLAMENTO DE *LEISHMANIA SP*
NO ESTADO DO PARÁ

Belém
2010

NÁDILE JULIANE COSTA DE CASTRO

ESTUDO DO MICROCULTIVO *IN VITRO* PARA O ISOLAMENTO DE *LEISHMANIA SP*
NO ESTADO DO PARÁ

Dissertação apresentada para obtenção de grau de
Mestre em Doenças Tropicais, Programa de Pós-
Graduação em Doenças Tropicais, Núcleo de
Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará.
Orientadora: Prof^a. Dr^a Edna Aoba Yassui Ishikawa

Belém

2010

NADILE JULIANE COSTA DE CASTRO

ESTUDO DO MICROCULTIVO *IN VITRO* PARA O ISOLAMENTO DE *LEISHMANIA SP*
NO ESTADO DO PARÁ

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção de grau de Mestre em Doenças Tropicais.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Arival Cardoso de Brito
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dr^a. Edilene Silva Oliveira
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dr^a Patrícia Karlla Santos Ramos
Instituto Evandro Chagas

Prof. Dr. Sebastião Aldo da Silva Valente
Instituto Evandro Chagas (suplente)

Dr^a. Edna Aoba Yassui Ishikawa
Universidade Federal do Pará
Orientadora

Julgado em: 29/09/10
Conceito: Excelente

Belém
2010

***“Problemas não são obstáculos,
mas oportunidades ímpares de evolução e superação”***

Mauricio Rodrigues de Moraes

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelas oportunidades boas e ruins que me ajudam a crescer espiritualmente.

À família, pelo apoio, incentivo e por acreditar que eu poderia sair de Oriximiná e alcançar caminhos mais distantes.

À minha mãe, pelo carinho e por sempre está incentivando minhas escolhas referentes ao conhecimento científico e profissional

À minha irmã, Juliana de Castro, que apesar dos conflitos, me apoiou em muitos momentos.

Ao meu noivo Thiago Vasconcelos dos Santos, por persistir que eu seguisse o caminho da docência e pesquisa, pelo companheirismo, amor e pela troca de conhecimento sobre leishmanioses ao longo destes 6 anos.

À minha coordenadora, Prof^a. Dr^a. Edna Aoba Yassui Ishikawa, pelo incentivo a pesquisa experimental desde a iniciação científica até a pós-graduação, pelas cobranças que visavam a minha evolução profissional, assim como a orientação realizada ao longo desse estudo, e pela amizade construída ao longo desses anos.

À direção do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, pela oportunidade de realização do curso.

À direção do Instituto Evandro Chagas pela oportunidade de realizar a pesquisa em seus laboratórios.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa de mestrado.

Ao Dr. Manoel Soares da Seção de Hepatopatias do Instituto Evandro Chagas (IEC) pela oportunidade inicial durante estágio voluntário no Instituto Evandro Chagas e pelos conselhos e incentivo para a pesquisa.

Ao Dr. Adelson Souza, pesquisador do Laboratório de Leishmanioses (IEC) (*in memoriam*) pela oportunidade inicial de usar as dependências do Laboratório de leishmanioses do Instituto Evandro Chagas ao longo deste estudo, além das poucas palavras trocadas, porém importantes sobre a pesquisa experimental.

Ao Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira (IEC), pelas valiosas sugestões quanto a pesquisa em sua fase final.

A Dr^a. Patrícia Karlla Ramos, do laboratório de Imunologia do Laboratórios de Leishmanioses do IEC, por ceder alguns insumos e pelos estudos e troca de conhecimento.

Aos técnicos do laboratórios de leishmanioses da área de infecção experimental do Instituto Evandro Chagas, Sr. Martins e Sr. Júlio, pela troca de conhecimento constante e paciente ao longo deste estudo.

À equipe do Insetário de Flebotomíneos do Laboratório de Leishmanioses do IEC pelas trocas de conhecimentos e pela amizade: Suely Pinheiro, Fábio Silva, Aprígio Lima, Iorlando Barata, Edna Leão, Luciene Aranha, Graça Silva e Roberto Brandão.

A equipe do laboratório de cultivo do Laboratório de Leishmanioses do IEC: Raimundo Nonato Pires e João Brandão.

Aos demais funcionários do Laboratório de Leishmanioses do IEC, pelo apoio e amizade.

Ao enfermeiro, estudante de mestrado e amigo Willian Dias Borges pelas colocações sobre pesquisa e pelo companherismo ao longo desses 10 anos.

Aos professores de pós-graduação em Doenças Tropicais da Universidade Federal do Pará que muito contribuíram para minha formação.

As secretárias de da Pós-graduação, Martinha e Socorro, pela paciência durante a estadia neste curso.

Aos amigos da época da faculdade que ainda estão presentes em minha vida.

Aos estudantes de iniciação científica e estagiários do Núcleo de Medicina Tropical, pelas ajudas durante o processo de produção de meio de cultura.

À família Vasconcelos pelo incentivo as estudos e pelos momentos de alegria e conforto proporcionados .

A família Gomes da Costa, especialmente ao meu tio Prof. Raimundo Gomes, pela oportunidade inicial de estudo na região metropolitana de Belém.

A Thina, pelas alegrias diárias.

A todos cujos nomes não foram citados, mas que direta e indiretamente contribuíram para este estudo.

LISTA DE SIGLAS

UFPA – Universidade Federal do Pará
IEC – Instituto Evandro Chagas
LVA – Leishmaniose Visceral Americana
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
LCM – Forma cutâneo mucosa hiperérgica
LCAD – Forma cutânea anérgica difusa
LCL – Forma cutâneo localizada normoreativa
LCDB – Forma cutâneo disseminada borderline
V. – viannia
L. – Leishmania
AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
DAT – Aglutinação direta
RIFI – Imunofluorescência Indireta
ELISA – Ensaio Imunoenzimático
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
RPMI – Rosewel Park Memorial Institute
NNN – Novy, Mcneal e Nicolle
LIT – Liver Infusion triptose
SVS – Secretária de Vigilância e Saúde
NMT – Núcleo de Medicina Tropical
USA – United States of American
OMS – Organização Mundial de Saúde
CEPAN – Comitê de Ética e Pesquisa com animais
CEP – Comitê de Ética e Pesquisa envolvendo seres humanos
SBF – Soro Bovino Fetal

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies de <i>Leishmania</i> causadoras da Leishmaniose no Brasil -----	26
Tabela 2 – Taxa de isolamento de cepas de <i>L. (L.) amazonensis</i> de hamsters por vácuo- aspiração -----	43
Tabela 3 – Taxa de isolamento de cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> de hamsters por vácuo-aspiração -----	44
Tabela 4 – Taxa de sensibilidade da técnica de vácuo-aspiração no isolamento de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> . -----	44
Tabela 5 – Taxa de isolamento de cepas de <i>L. (L.) amazonensis</i> de hamsters por microtubos.---	44
Tabela 6 – Taxa de isolamento de cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> de hamsters por microtubos. --- -----	45
Tabela 7 – Taxa de sensibilidade de isolamento em microtubos para as espécies de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> .-----	45
Tabela 8 – Taxa de isolamento de cepas de <i>L. (L.) amazonensis</i> de hamstes por microcapilares. -----	46
Tabela 9 – Taxa de isolamento de cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> de hamsters por microcapilares. -----	46
Tabela 10 – Taxa de sensibilidade de isolamento em tubos microcapilares para as espécies de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> . -----	46
Tabela 11 – Taxa de isolamento de amostras de <i>Leishmania sp</i> coletadas de pacientes por meio da técnica de vácuo-aspiração. -----	47
Tabela 12 – Taxa de sensibilidade das amostras de pacientes em tubos microcapilares.-----	48
Tabela 13 – Comparação entre as técnicas de vácuo-aspiração e microcapilar.-----	49
Tabela 14 – Correlação entre as técnicas de vácuo aspiração e microtubos. -----	49
Tabela 15 – Comparação entre as técnicas de microcapilar e microtubos -----	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Promastigota em cultura -----	22
Figura 2 Forma amastigota -----	22
Figura 3 – Estrutura das leishmânias -----	23
Figura 4 – Ciclo biológico do parasita do gênero <i>Leishmania</i> -----	24
Figura 5 – Distribuição da leishmaniose cutânea no Velho e Novo Mundo -----	27
Figura 6 - Distribuição da leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo -----	27
Figura 7 – <i>Mesocricetus auratus</i> -----	36
Figura 8 – Pata traseira com lesão -----	36
Figura 9 – Agulha e dispositivo para vácuo-aspiração montados -----	40
Figura 10 - Técnica de vácuo-aspiração por lesão nodular de hamsters -----	40
Figura 11 - Técnica de vácuo-aspiração por Marzochi -----	40
Figura 12 – Técnica de vácuo-aspiração adaptada -----	40
Figura 13 – Tubos microcapilares com meio RPMI -----	41
Figura 14 – Microtubos de centrífuga com meio RPMI -----	41

RESUMO

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam uma variabilidade de espécies na região Amazônica e para sua correta identificação é necessário o isolamento dos mesmos. Atualmente para o isolamento do parasita e posterior diagnóstico da doença têm se utilizado a técnica de microcultivo *in vitro*. O objetivo de nosso trabalho foi otimizar a técnica de microcultivo *in vitro* para o isolamento de *Leishmania sp.* Para o isolamento, além do microcultivo, foi analisado a técnica de vácuo-aspiração adaptada e a viabilidade do parasita a temperaturas abaixo de 25°C. No total foram utilizados 18 hamsters, infectados com amostras de casos clínicos de Leishmaniose tegumentar americana, sendo 3 de *Leishmania. (Leishmania) amazonensis* e 2 de *Leishmania. (Viannia) braziliensis* o qual foram realizados 56 cultivos por vácuo-aspiração em meio NNN, 12 em microtubos e 23 por microcapilares com RPMI suplementado, mantidos entre 25° e 31°C. Para a segunda etapa, participaram 7 pacientes, totalizando 6 culturas por vácuo-aspiração e 42 por microcapilares. Conservou-se a baixa temperatura 7 tubos com NNN que foram mantidas a 5°C. Foi observado que os isolamentos por vácuo-aspiração de amostras de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* em hamsters foram sensíveis a adaptação da técnica, diferente das amostras de pacientes. A positividade variou entre 2 a 8 dias e 4 e 5 dias respectivamente. Os microtubos apresentaram positividade para as mesmas amostras de hamsters no período de 5 a 8 dias. Para as amostras dos pacientes, 2/12 tubos por vácuo-aspiração foram positivos e para isolamento em microcapilares 6/42, valores inferiores aos encontrados na literatura. A amostras conservadas a 5°C apresentaram viabilidade até o 30° dia. Com estes resultados foi observado que o microcultivo é viável para uso dentro de nossa região, entretanto se mostrou limitado para o isolamento de amostras provenientes de pacientes. Devem-se utilizar outros meios de cultivo, de modo a observar o comportamento do parasito e também aperfeiçoar a coleta do material da lesão a fim de melhorar os resultados de isolamento.

Palavras-chave: *Leishmania*. Microcultivo. Vácuo-aspiração.

ABSTRACT

Leishmania parasites have variability of species in the Amazon region and its correct identification is necessary to isolate them. Currently for the isolation of the parasite and subsequent diagnosis of the disease have used the technique of *in vitro* microculture. Hence, the aim of our study was to optimize the *in vitro* microculture technique for isolation of *Leishmania sp.* to contribute to the identification of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* circulating in the state of Pará For isolation beyond the microculture was analysed the technique of vacuum aspiration adapted, and parasite viability at temperatures under 25°C. Was used 18 hamsters infected with samples from clinical cases of CL, 3 *L. (L.) amazonensis* 2 and *L. (V.) braziliensis* which held 56 culture by vacuum-aspiration in NNN media, 12 in microtubes and 23 in microcapillaries with RPMI media supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% Penicillin-Gentamicin maintained between 25°C and 31°C. For the second stage, participated in seven patients, a total of 6 cultures by vacuum aspiration and 42 by microcapillary. It was remained at low temperature 7 tubes with NNN which were kept at 5°C. It was observed that the isolates by vacuum-aspiration samples of *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* in hamsters were susceptible to adaptation of the technique, differently of samples of patients. The positivity ranged between 2-8 days and 4 and 5 days respectively. The microtubes were positive for the same samples of hamsters in the period 5-8 days. For samples of patients, 2/12 tubes by vacuum-aspiration were positive for isolation and in microcapillaries 6/42 less than the values found in literature. The samples stored at 5°C showed viability until 30° day. Thus, we find that the microculture is viable for use within our region.

Keywords: *Leishmania*. Microculture. Vacuum aspiration

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	15
2 – JUSTIFICATIVA	16
3 – OBJETIVOS	17
3.1 – GERAL	17
3.2 – ESPECÍFICOS	17
4 - REFERENCIAL TEÓRICO	18
4.1 – ASPECTOS GERAIS	18
4.2 – SISTEMÁTICA	20
4.3 – BIOLOGIA	21
4.4 – CLASSIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES	25
4.5. – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E INCIDÊNCIA	26
4.6 – CO-INFECÇÃO HIV/LEISHMANIOSE	29
4.7 – TRATAMENTO	29
4.8 – ISOLAMENTO E CULTIVO DE <i>LEISHMANIA</i>	31
4.9.1 – Cultivo <i>in vivo</i>	31
4.9.1 – Cultivo <i>in vitro</i>	31
5 – MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1. DESENHO EXPERIMENTAL	35
5.2 – CEPAS DE <i>LEISHMANIA</i>	36
5.3 – HAMSTERS	36
5.4 – CULTIVO <i>IN VITRO E IN VIVO</i>	37
5.5 – PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA	37
5.6 – MANUTENÇÃO DO MEIO DE CULTIVO	38

5.7 – PROCEDIMENTOS DIAGNÓSTICOS E ISOLAMENTO DAS LEISHMANIAS A PARTIR DE ANIMAIS INFECTADOS -----	38
5.8 – ISOLAMENTO DE <i>LEISHMANIA</i> A PARTIR DE PACIENTES -----	39
5.9 – COLETA DE MATERIAL POR MEIO DA VÁCUO-ASPIRAÇÃO -----	39
5.10 – MICROCULTIVO <i>IN VITRO</i> -----	41
5.11 – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE <i>LEISHMANIA</i> -----	42
5.12 – ANÁLISE DE DADOS -----	42
5.13 – ASPECTOS ÉTICOS -----	42
6 – RESULTADOS -----	43
6.1 – ISOLAMENTO DE <i>LEISHMANIA</i> DE HAMSTERS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE-----	43
6.1.1 – Por meio da técnica de vácuo-aspiração -----	43
6.1.2 – Em microtubos de centrifuga -----	44
6.1.3 – Em tubos microcapilares -----	45
6.2 – ISOLAMENTO DE AMOSTRAS DE <i>LEISHMANIA</i> DE PACIENTES COM LTA -----	47
6.2.1 – Por meio da técnica de vácuo-aspiração -----	47
6.2.2 – Em tubos microcapilares -----	47
6.3 – ISOLAMENTO DE AMOSTRAS DE LVA -----	48
6.4 – COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DE <i>LEISHMANIA</i> -----	49
7 – DISCUSSÃO -----	50
8 – CONCLUSÕES -----	58
REFERÊNCIAS -----	59
APÊNDICES -----	71

1 - INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses que representam um complexo espectro clínico e diversidade epidemiológica, por isso considerada um grande problema de saúde pública atingindo mais de 14 milhões de pessoas, onde vivem em áreas de risco, cerca de 350 milhões de pessoas (BRASIL, 2007; WHO, 2008a)

O diagnóstico das leishmanioses pode ser realizado através de provas imunológicas, moleculares e parasitológicas (HERWALDT, 1999).

A correta identificação do parasita por critérios biológicos e bioquímicos reconhecidos é superior em estudos de ecoepidemiologia especialmente onde leishmânias diferentes estão circulando na natureza (LAINSON e SHAW, 1978).

O isolamento do parasita em meios de cultura é muito utilizado nos centros de pesquisa, e em laboratórios que dispõe de recursos materiais para a implementação da mesma, sendo importante por servir de base para determinadas técnicas de diagnóstico molecular, identificação do parasita por eletroforese de isoenzimas, imunofluorescência indireta por anticorpos monoclonais e criopreservação de cepas para pesquisas parasitológicas em geral. O cultivo *in vitro* do parasita do gênero *Leishmania* é realizado em tubos de ensaio considerado por muitos pesquisadores como macrocultivo, em um ambiente com características laboratoriais, apresentando boas condições de higiene e biossegurança para o sucesso do isolamento.

Atualmente para o isolamento do parasita e posterior diagnóstico da doença têm se utilizado a técnica de microcultivo *in vitro*, que utiliza placas, microtubos e microcapilares, que permitem o uso de um volume menor de meio de cultura e conseqüentemente um inferior tempo de crescimento do parasita quando comparado ao método tradicional de cultura.

Neste âmbito é importante que novas alternativas sejam encontradas para que ocorra com sucesso o isolamento do parasita, visto que muitos estudos e avanços na pesquisa deste gênero dependem disso.

2 - JUSTIFICATIVA

O isolamento do parasita em meio de cultivo *in vitro* tem sido difícil pela alta contaminação do material. Como alternativa para diminuir o número de contaminações é utilizado o cultivo *in vivo*, onde um animal suscetível, como por exemplo o hamster é usado durante o processo de isolamento do parasita, entretanto devido a dificuldade ao acesso e principalmente manutenção desses animais em laboratórios, ocorre em alguns casos a restrição do diagnóstico apenas a dados provenientes de observações clínicas e parasitoscopia direta.

Assim, devido inúmeras necessidades do reconhecimento do parasita para estudos epidemiológicos da leishmaniose, que é endêmica na região amazônica, e para auxiliar nas terapias de pacientes, é importante que haja sucesso no isolamento do parasita, que hoje é restrito a técnica de cultivo *in vitro* e *in vivo*, e este sucesso atualmente depende da espécie a ser isolada e da técnica e/ou manipulação do material coletado. Diante disto, decidimos buscar novas alternativas, pois, torna-se cada vez mais necessário o investimento na aplicação de novas técnicas de isolamento do parasito e que possa ser de fácil uso não somente nas rotinas dos laboratórios de referência.

3 - OBJETIVOS:

3.1 -GERAL

Otimizar a técnica de microcultivo *in vitro* para o isolamento de *Leishmania sp* visando contribuir para a identificação das espécies circulantes na região.

3.2 - ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de microcultivo no laboratório de Biologia Molecular e Celular do Núcleo de Medicina tropical da UFPA;
- Avaliar o método da microcultura comparado ao método utilizado no laboratório de referência de Leishmaniose do IEC.
- Isolar *Leishmania* do sangue periférico de pacientes com LVA;
- Avaliar o grau de sucesso no isolamento de *Leishmania* do subgênero *Viannia* pelo método de microcultura
- Avaliar o tempo de preservação de cultura em temperatura abaixo de 25°C.

4 - REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 - ASPECTOS GERAIS

As leishmanioses são zoonoses consideradas inicialmente, de transmissão essencialmente silvestre em ambientes rurais, apresentando hoje mudanças no padrão de transmissão em decorrência das modificações sócioambientais, como o desmatamento e o processo migratório caracterizado pelo êxodo rural, levando o homem para as periferias das grandes cidades (BRASIL, 2004).

A doença é causada por protozoários que são parasitos intracelulares obrigatórios da células do sistema fagocítico-mononuclear apresentando duas formas durante seu ciclo biológico, promastigota (com flagelo livre) e amastigota (sem flagelo livre) (SHAW e LAINSON, 1981; ARRUDA NETO e FARHAT, 1994).

No continente americano, as formas clínicas da doença são conhecidas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral Americana (LVA). A LTA é uma doença de evolução crônica, que acomete isoladamente ou em associação, pele e mucosas (FALQUETO e SESSA, 2004). A severidade da doença varia de forma cutânea benigna e de cura espontânea até formas severas, muitas vezes multilantes (DORVAL et al, 2006).

Na LTA, as manifestações clínicas se apresentam com lesões por úlceras simples e úlceras múltiplas deformantes, como também forma anérgica difusa de difícil tratamento (LLANOS-CONTAS et al., 1984; FRANKE et al., 1990). Suas manifestações variam por meio de formas polares e intermediárias que vão desde a forma cutâneo mucosa hiperérgica (LCM) até a forma cutânea anérgica difusa (LCAD), passando pelas formas intermediárias que são a forma cutâneo localizada normoreativa (LCL) e a forma cutânea disseminada borderline (LCDB) hiporeativa reversível (SILVEIRA et al., 2002). A doença pode acarretar um grande número de lesões, chegando até 200, causando séria incapacidade e preconceito social (WHO, 2008c).

No Brasil a LVA é causada essencialmente por uma única espécie, a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (BRASIL, 2004). Na LVA há um aumento do baço e fígado, pancitopenia, edema facial, diarreia e dificuldade respiratória (CUNNINGHAM, 2002), além de febre irregular de longa duração e acentuado emagrecimento e palidez cutâneo-mucosa (BADARÓ e DUARTE, 2004), levando o indivíduo a morte quando não tratado (BADARÓ et al., 1986., DE BEER et al., 1990).

As leishmanioses são um risco ocupacional para os trabalhadores da área rural (LAINSON e SHAW, 1974) e de outras atividades como por exemplos pesquisadores, turistas e caçadores (LAINSON, 1981). Como boa parte das zoonoses a intensidade com que a doença atinge o homem depende, principalmente das alterações do ambiente natural, comportando-se de forma epidêmica em áreas recém desmatadas (PIGNATTI, 1995; GOMES, 1992 apud PIGNATTI, 2004).

Com relação à origem e expansão das leishmanioses na região amazônica existem dois tipos de hipóteses propostas a respeito da LTA, a tradicional, por meio da imigração e geossistema amazônico e as mais modernas sobre as migrações na região amazônica, sendo a última melhor aceita. (ALTAMIRO-INCISO, 2003). Outro estudo refere que a origem a difusão da leishmaniose humana, baseado em estudos epidemiológicos e da distribuição geográfica do parasita, tenha se iniciado na região amazônica a partir de sua região ocidental (MARZOCHI et al 1994).

Em relação à LVA existe uma grande polêmica em torno de sua origem no novo Mundo, se ela foi introduzida recentemente na época da colonização européia por meio de cães e causada pela espécie de *Leishmania (Leishmania) infantum*, ou há vários milhões de anos, devendo a espécie ser classificada como *Leishmania (L.) chagasi* considerando a mesma um caso autóctone (ADLER, 1940; LAINSON et al, 1987).

A LVA é uma doença emergente em várias áreas urbanas brasileiras o que é explicado pelas transformações ambientais associadas a movimentos migratórios e a o processo de urbanização (COSTA et al., 1990). Assim como pelo contato de cães abandonados que vagam em áreas periféricas e retornam ao centro da cidade proliferando a infecção entre cães e humanos (COSTA et al., 2007).

Já a descoberta dos agentes etiológicos da leishmaniose, ocorreu no início do século XIX, quando na Índia Cunningham (1885) observou a forma amastigota em um caso de “calazar”, e na Rússia, Borovsky (1898) demonstrou que o agente etiológico “Botão do Oriente” era um protozoário. Em 1901, Willian Leishman identificou determinados organismos por meio da escarificação de lesão proveniente de um paciente que morreu por “febre dum-dum”. Naquele tempo “Dum-dum”, uma cidade não longe de Calcutá, foi considerada particularmente insalubre, devido gravidade da doença. Inicialmente estes organismos foram identificados como novas formas de Trypanossomas, entretanto, em 1903, W. Leishman descreveu os corpúsculos que hoje reconhecemos como *Leishmania* e Ronald Ross relacionou estes organismos com o Kala-azar, que o nomeou de *Leishmania Donovanii*, classificando-os no gênero *Leishmania*. (SILVA, 1957 apud PIMENTA LEANDRO & SHALL, 2007; WHO, 2008b).

4.2 - SISTEMÁTICA

A Classificação Taxonômica do parasita apresenta-se da seguinte forma (LAINSON, 1997b):

Reino: PROTISTA Haeckel 1866

Sub-Reino: PROTOZOA Goldfuss 1817

Filum: SARCOMASTIGOPHORA Honigberg e Balamuth 1963

Sub-Filum: MASTIGOPHORA Deising 1866

Classe: ZOOMASTIGOPHOREA Calkins 1909

Ordem: KINETOPLASTIDA Honigberg 1963, emend. Vickermam 1976

Sub-ordem TRYPANOSOMATINA Kent 1880

Família TRIPANOSSOMATIDAE Doflein 1901, emed. Grobben 1905

Gênero *Leishmania* Ross 1903

4.3 - BIOLOGIA

Os parasitos do gênero *Leishmania* são digenéticos apresentando alternância de evolução entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. Nesse ciclo de desenvolvimento, a *Leishmania* apresenta-se em dois aspectos, na forma flagelada denominada promastigota (Figura 1) que sobrevive extracelularmente e é encontrada no trato digestivo do vetor flebotomíneo (hospedeiro invertebrado) e na forma amastigota (Figura 2) sem flagelo livre, podendo ser encontrada nos macrófagos, na medula óssea e nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado mamífero (SHAW, 1982; PUENTES et al 2000).

Nos macrófagos, multiplica-se exclusivamente dentro de vacúolos por divisão binária (LAINSON e SHAW, 1992; GENARO, 2003; BADARÓ e DUARTE, 2004).

Os amastigotas do gênero *Leishmania* são células pequenas, ovóides e arredondadas, de núcleos relativamente grandes e cinetoplastos em forma de bastões, e são vistos no interior de histiócitos (LOUREIRO, 1998). Esta forma caracteriza-se por apresentar poucas estruturas internas, entre elas um cinetoplasto levemente achatado e de contorno ovóide, por vezes elíptico ou fusiforme (REY, 2008). É um parasito pequeno, sem flagelo livre, vivendo e multiplicando-se dentro de macrófagos localizados na pele, vísceras ou no sangue de hospedeiros mamíferos (LAINSON, 1997b).

A forma amastigota possui dimensões de aproximadamente 2 a 6 μm de comprimento por 1,5 a 3 μm de largura e a promastigota e 14 a 20 μm de comprimento por 1,5 a 4 μm largura (Figura 3) (REY, 2008).

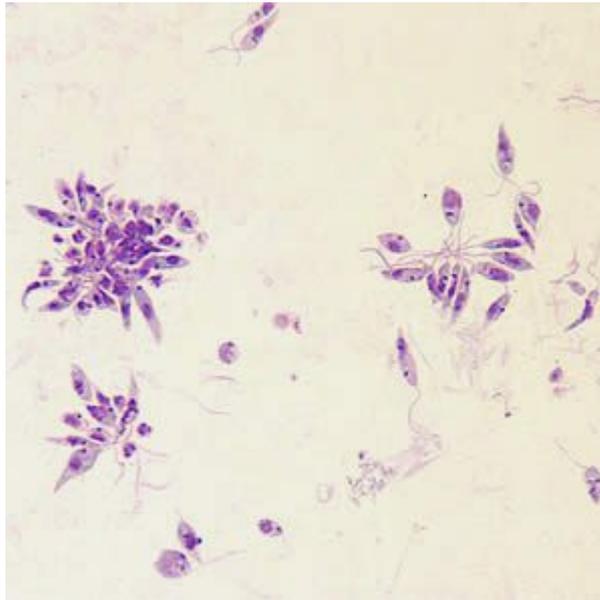


Figura 1 – Promastigota em cultura

Fonte: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.htm

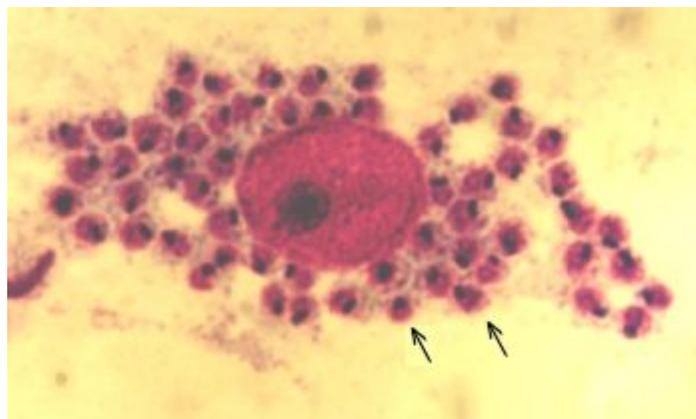


Figura 2 – Forma amastigota

Fonte: <http://www.ufrgs.br/para-site/Imagensatlas/Protozoa/Leishmania.htm>

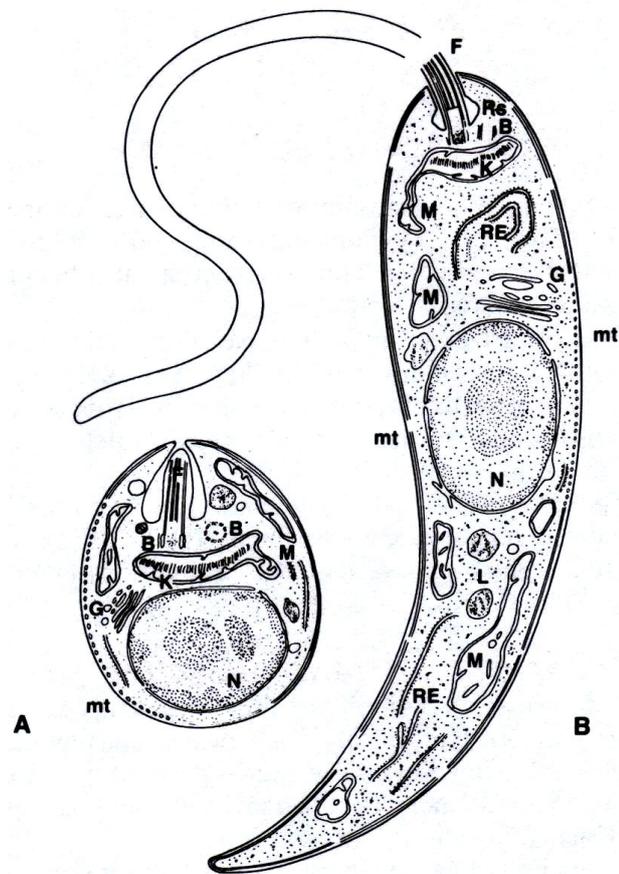


Figura 3- Ultraestrutura das leishmânias: A, forma amastigota; B, forma promastigota

Fonte: REY (2008).

Durante o ciclo biológico (Figura 4), a fêmea do flebotomíneo, inseto da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e do gênero *Lutzomya* (LEWIS et al 1977), após exercer repasto sanguíneo, ocorre no intestino do mesmo a transformação da forma amastigota para a promastigota, multiplicando-se em grande número por divisão simples e assexuada, migrando posteriormente para a probóscida do inseto (LAINSON, 1997b). Ainda que as divisões sejam sempre binárias e completas, estes parasitos permanecem agrupados, formando aglomerados com aspecto de rosáceas, ocorre então uma intensa multiplicação do parasito, que invadem as porções anteriores do estômago e o proventrículo do flebotomíneo, dificultando a ingestão de sangue pelo parasito, e devido

multiplicação parasitária causar uma obstrução mecânica, o inseto torna-se faminto e procura sugar e picar pessoas e animais (REY, 2008). No hospedeiro mamífero a infecção se inicia quando a forma promastigota é inoculada pela fêmea do inseto vetor após repasto sanguíneo. Os parasitos penetram então nos macrófagos da pele passando a assumir a forma amastigota, que se multiplica também por divisão assexuada

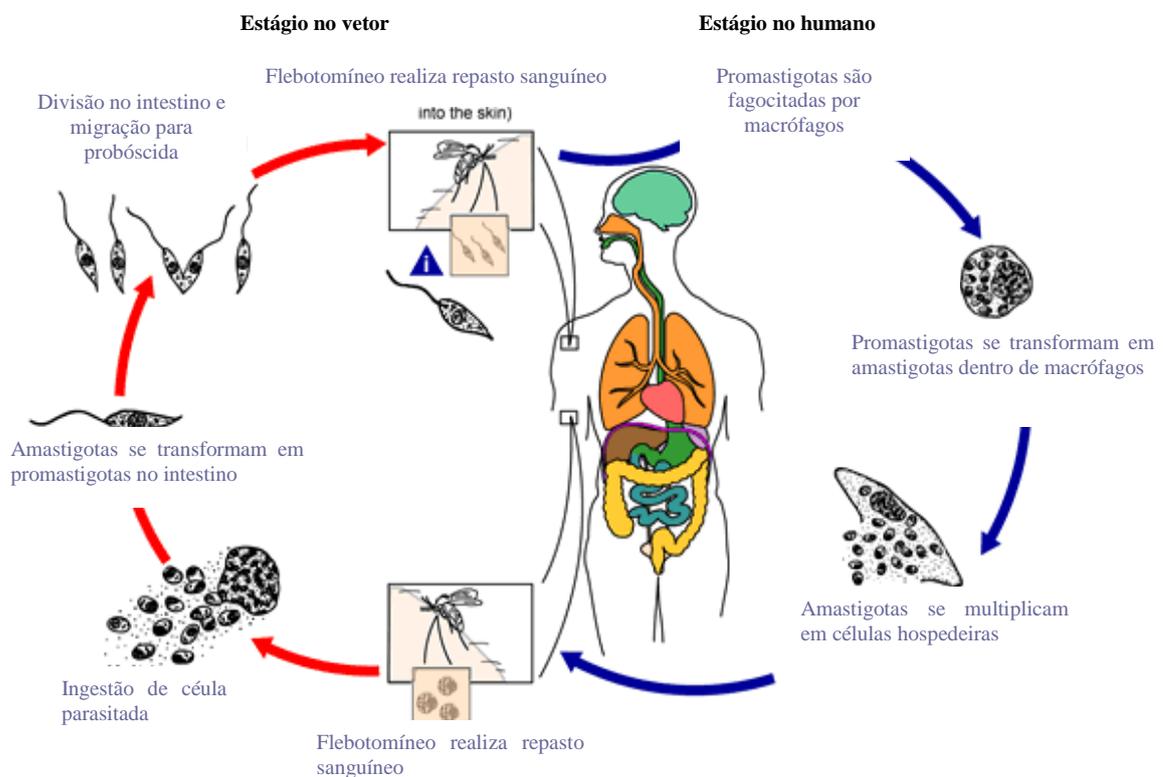


Figura 4 – Ciclo Biológico do parasito do gênero *Leishmania*

Fonte: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.htm

4.4 - CLASSIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES DE LEISHMANIAS.

O melhoramento de métodos para a detecção, isolamento e a identificação de *Leishmania*, tem claramente indicado uma multiplicidade de espécie deste parasito (LAINSON, 1997a). No Brasil a técnica mais empregada na caracterização e identificação das amostras de *Leishmania* em nível de espécies é a eletroforese de isoenzimas que é considerada padrão ouro para a identificação (GARDNER et al, 1974; SHAW, 1985). No entanto, para a realização dessa caracterização é necessário o isolamento do parasito em meio de cultivo *in vivo* e/ou *in vitro*.

Foi proposto por Lainson e Shaw (1979), que o gênero *Leishmania* fosse classificado em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, de acordo com o desenvolvimento do parasito no tubo digestivo do inseto vetor. Deste modo pertencem ao subgênero *Leishmania* as espécies que desenvolvem o ciclo no vetor na porção anterior e média do tubo digestivo, e pertencem ao subgênero *Viannia* espécies que apresentam fase profícua e prolongada de desenvolvimento de promastigosta aderidos por hemisdemossomas flagelares a parede do piloro e íleo, com migração para a região do intestino médio e anterior do inseto vetor.

Atualmente na região amazônica brasileira são conhecidas seis espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi* e duas pertencentes ao subgênero *Leishmania*: *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* (Tabela 1). Devido a existência de multiplicidade de espécies de *Leishmania*, torna-se importante que seja realizada a identificação e caracterização das espécies desse parasita. A identificação correta é importante, não apenas para um melhor entendimento da epidemiologia desses agentes, mas também para que seja feito o tratamento adequado aos pacientes, já que certos parasitas podem causar manifestações graves, como a Leishmaniose monocutânea ou leishmaniose cutâneo difusa anérgica (LAINSON e SHAW, 1987, SILVEIRA et al, 2002).

Tabela 1- Espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose no Brasil.

Subgênero <i>Leishmania</i> Ross, 1903	Subgênero <i>Viannia</i> Lainson & Shaw, 1987
<i>L. (L.) amazonensis</i> Laison & Shaw, 1972 *	<i>L. (V.) braziliensis</i> Vianna, 1911 *
<i>L. (L.) infantum chagasi</i> Cunha e Chagas, 1937 emend Shaw 2008●	<i>L. (V.) guyanensis</i> Floch, 1954 *
	<i>L. (V.) lainsoni</i> Silveira et al, 1987 *
	<i>L. (V.) naiffi</i> Lainson & Shaw, 1989*
	<i>L. (V.) shawi</i> Lainson et al, 1989 *
	<i>L. (V.) lindenbergi</i> Silveira et al, 2002 *

● Espécie causadora de leishmaniose visceral no Brasil

* Espécie causadora de leishmaniose tegumentar no Brasil

4.5 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E INCIDÊNCIA

A leishmaniose tem ampla distribuição na América, África, Ásia, Índia, e Mediterrâneo, ocorre em 88 países, tropicais e subtropicais, sendo difundida em 22 países do Novo Mundo e 66 nações do Velho Mundo (Fig. 5 e 6), sendo encontradas infecções em humanos em 16 países na Europa, incluindo: França, Itália, Grécia, Malta, Espanha e Portugal.

A LTA ocorre nas américas desde o sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina (MONTENEGRO, 1926 apud GOTIJO & CARVALHO, 2003). Conforme Dejeux (2001), há um alto número de casos de Leishmaniose Cutânea no Brasil e no Peru. Já a leishmaniose visceral está distribuída em 19 estados da Federação, atingindo quatro das cinco regiões brasileiras (BRASIL, 2005).

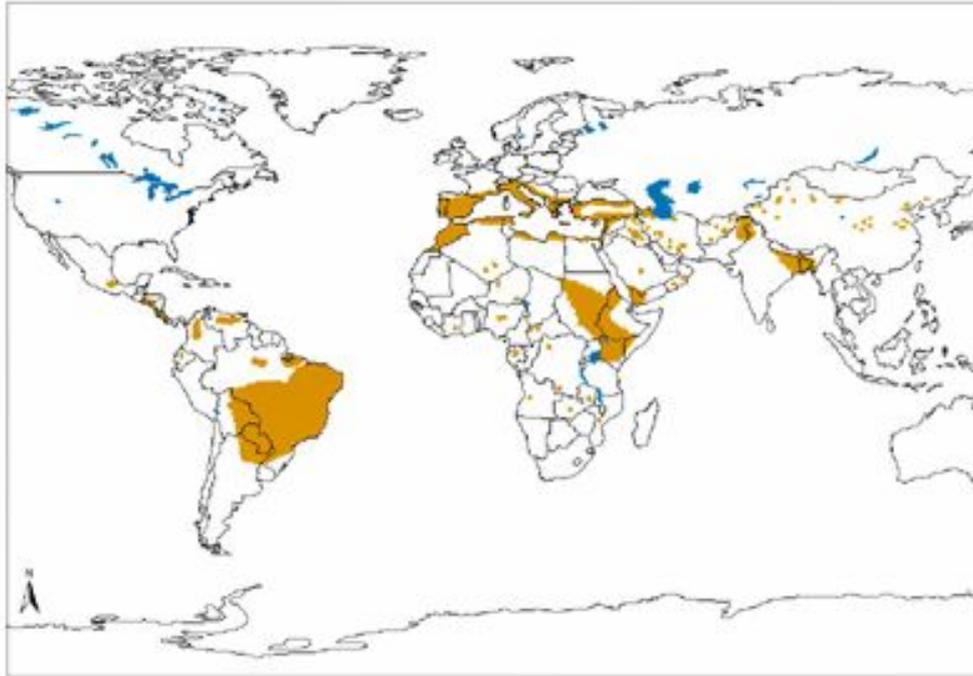


Figura 5 – Distribuição geográfica de LV no Velho e Novo Mundo.

Fonte: WHO, 2010



Figura 6 – Distribuição da Leishmaniose cutânea e mucocutânea no Novo mundo.

Fonte: WHO, 2010.

Segundo Shaw (2007), o número de casos de Leishmanioses tem crescido globalmente, e é a razão de alarmar as regiões onde a Leishmaniose mostra-se como uma doença emergente contrariando as medidas de controle. Isso seria em função dos elevados níveis exposição ao vetor.

Na LTA a coexistência de um duplo perfil epidemiológico é observado, expresso pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos ou de áreas próximas a eles, e pelo aparecimento de surtos epidêmicos associados a fatores decorrentes do surgimento de atividades econômicas como garimpos, expansão de fronteiras agrícolas e extrativismo, em condições ambientais altamente favoráveis à transmissão da doença (BRASIL, 2005). Predomina na Amazônia, em zonas florestais dos países vizinhos, na América Central e no México (REY, 2008).

No Brasil, em função de sua ampla distribuição geográfica, a leishmaniose visceral apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (BRASIL, 2005). No novo mundo, apesar da deficiência no sistema de notificação das doenças transmissíveis, o Brasil é o país que apresenta maior incidência (DEJEUX, 1992), com registro na maioria dos estados brasileiros. As estatísticas oficiais tem apresentado um aumento no numero de casos a cada ano e confirmam entre 1998 e 2000, 99,5mil casos de leishmaniose registrados (BRASIL, 2002b)

A LTA no Brasil é considerada uma doença em expansão por representar importante causa de morbidade para a população residente em área endêmica (ANDRADE et al, 2005). Nos países do Novo Mundo e no Brasil a LTA constitui um sério problema de Saúde Pública, sendo diagnosticada em praticamente todos os estados brasileiros. Sua importância não reside somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes (LACERDA, 1994; GOTIJO e CARVALHO, 2003).

Nos últimos dez anos, a média anual de casos de leishmaniose visceral foi de 3.383 casos; e a incidência, de 2,00 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2005).

4.6 - CO-INFECÇÃO HIV/LEISHMANIOSE

Conforme Dejeux (2003), a co-infecção HIV/leishmanioses atinge 35 países. Essa co-infecção é considerada emergente, apresentando aspectos peculiares na apresentação clínica, no perfil de diagnóstico laboratorial e na resposta ao tratamento específico (BRASIL, 2004).

Na co-infecção da LTA e AIDS se observa diversidades quanto ao comportamento clínico e imunológico, ilustrando diferentes apresentações clínicas, evoluções e respostas terapêuticas (SAMPAIO et al, 2002). A LVA em co-infecção com HIV é subestimado causando uma subnotificação (MARQUES et al., 2007). Para Borges et al., (1999) é importante chamar a atenção dos profissionais de saúde, que trabalham em áreas endêmicas de leishmaniose para a ocorrência de casos de infecção HIV-*Leishmania*.

4.7 - TRATAMENTO

O medicamento de escolha atualmente é a administração de antimônio pentavalente ou antimoniato de n-metilglucamina, que são moderadamente tóxicos aos pacientes e foi introduzido no século passado por Gaspar Viana (LAINSON e SHAW, 1978; FARAUT-GAMBARELLI et al 1997, LIMA et al 2007). Estas injeções podem ser feitas por via parenteral, intramuscular ou endovenosa (BRASIL, 2007).

Quando não há resposta satisfatória com o tratamento do antimonial, nos casos de resistência a droga de primeira escolha, utiliza-se como segunda escolha a anfotericina B e as pentamidinas (BRASIL, 2002; LIMA, 2007; BRASIL, 2007).

4.8 - DIAGNÓSTICO

Para o diagnóstico da LTA, o teste intradérmico de Montenegro pode ser específico e sensível (LOUREIRO et al., 1998). O teste de Montenegro na LVA aguda é sempre negativo, porém em áreas endêmicas há positividade em casos de teste cutâneo, que implica em infecção prévia (AKUFFO et al., 1995), é normalmente negativo no período de estado da doença, não sendo assim utilizado no diagnóstico da LVA (BRASIL, 2005). O teste intradérmico fundamenta-se na visualização da resposta de hipersensibilidade celular retardada, este teste geralmente persiste positivo após tratamento, ou cicatrização da lesão cutânea tratada ou curada espontaneamente, podendo negativar nos indivíduos fracos-reatores e nos precocemente tratados (BRASIL, 2007).

Os testes mais utilizados nos dias atuais, para diagnóstico da LVA são os de aglutinação direta (DAT), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA), que utilizam antígenos brutos e limitam-se em termos de produtividade e especificidade (SUDAR & RAI, 2002). O teste de ELISA é o mais utilizado para o imunodiagnóstico da LVA, e é um teste rápido, de execução e leitura fácil, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que o RIFI (EL-AMIN et al 1986, SILVEIRA et al 1997).

Os diagnósticos moleculares possuem efeitos significantes onde se constituem uma ferramenta diagnóstica oportuna e exata, sendo críticas para o resultado e tratamento dos pacientes (YANG e ROTHMAN, 2004). O método utilizado tanto para LTA como para LVA é o método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). O PCR é a técnica molecular mais aperfeiçoada até agora, e tem uma larga escala potencial e aplicações clínicas, incluindo a detecção de patógenos específicos, a avaliação de novas infecções emergentes etc. (YANG e ROTHMAN, 2004). Tem sido bem usado para detectar o DNA de Leishmânia em uma variedade de amostras clínicas (OSMAN et al, 1997). Este apresenta 95% de sensibilidade mas sua utilidade prática no ajuste clínico e do campo é limitada pois precisa de condições e aparelhos apropriados (MURRAY, 2005). Seus resultados dependem também de algumas variáveis envolvidas como: área endêmica, tipo de amostra, o alvo do DNA utilizado para amplificação e o método de extração de DNA (BRASIL, 2003). Esta técnica necessita de equipe especializada e infra-estrutura adequada, estando distante de entrar na prática da rotina diária (SAMPAIO et al 2002).

Nos exames parasitológicos busca-se evidenciar o parasito por meio de exame direto e indireto com a finalidade de confirmar a causa da doença (SAMPAIO, et al 2002)

Dois métodos parasitológicos importantes são o esfregaço em lâmina (URJEL et al., 1983) e o crescimento da *Leishmania* em cultura obtida pela inoculação do material retirado da punção aspirativa da lesão ou da biopsia triturada (CUBA et al, 1986). O método simples e seguro de diagnosticar a doença ainda é a demonstração do parasito em esfregaço corado. No entanto, esta prática não permite a identificação das espécies de *Leishmania*, isoladas tanto do homem quanto de animais silvestres, o que é absolutamente necessário para os estudos epidemiológicos (LAINSON et al, 1986). O parasito da leishmaniose pode ser visualizado por meio de exame direto por diversos métodos de coloração a base de Romanosvsky. Giemsa, Leishman e Wrigth são os corantes mais utilizados (BRASIL, 2002).

4.9 - ISOLAMENTO E CULTIVO DE *LEISHMANIA*

O isolamento inicial é o processo onde os microorganismos do gênero *Leishmania* são removidos do seu hospedeiro e transferidos para um animal experimental (isolamento *in vivo*) ou para cultura (isolamento *in vitro*) ocorrendo assim a multiplicação do parasito (EVANS, 1989).

4.9.1 - Cultivo *in vivo*

A inoculação em hamster (*Mesocricetus auratus*), que é o animal de escolha por desenvolver lesões ricas em parasitos, é inoculado na pata e focinho (SILVEIRA, 1997).

O inóculo deve ser obtido a partir de uma suspensão homogeneizada do material de biopsia em solução salina. As lesões do hamster desenvolvem-se tardiamente (a partir de um mês), sendo este método reservado para pesquisas (BRASIL, 2002a).

4.9.2 - Cultivo *in vitro*

O isolamento do parasita *in vitro* é um método de confirmação do agente etiológico permitindo posterior identificação da espécie de leishmânia envolvida a partir de provas

específicas (SILVEIRA et al, 1997; BRASIL, 2007). Este método contribui consideravelmente para o conhecimento da biologia do parasito (PUENTES et al 2000). Para Sampaio et al (2002), há mais possibilidade de sucesso no achado do parasito em cultura do que no esfregaço pois os parasitos podem ser escassos principalmente em lesões antigas, podendo ocorrer diagnósticos falso-negativos. No entanto, o crescimento de diferentes espécies da *Leishmania* pode variar extremamente em diferentes tipos meios de cultura, e os pesquisadores devem verificar aqueles que são os mais apropriados para os parasitos encontrados em suas áreas de estudo (LAINSON et al, 1994).

Os meios de cultura usados para as leishmânias estão divididos em três grandes categorias principais: semi-sólido, bifásico, e líquido. Quanto ao meio de cultura bifásico e semi-sólido ambos precisam de sangue, um fator importante para a reprodução do parasito, sendo que a maioria dos meios exige soro bovino fetal ou eritrócitos lisados (SADIGURKY & BRODSKYN, 1986), podendo também ser enriquecido com água de coco (*Cocos nucífera*) e urina humana (SCHUSTER e SULLIVAN, 2002; GARCIA, 2007)

Para o crescimento inicial de uma cepa de leishmânia em condições artificiais é indicada a adoção de meio bifásico com sangue. O meio de cultura bifásico NNN (Nicolle, Novy e Mac Neal) que é bifásico, contendo uma fase sólida a base de Agar e sangue de coelho desfibrinado e uma fase líquida, conhecido como líquido de condensação tem sido amplamente utilizado em diferentes regiões endêmicas (RAMIREZ et al 2000; SCHUSTER e SULLIVAN, 2002).

Estão disponíveis comercialmente os meios de cultura RPMI 1640, meio 199, e meio da drosófila de Schneider (BERENS, BIRUN e KRASSNER 1976). Assim como o meio de cultura bifásico NNN, especialmente utilizado na produção de parasitos obtidos através de aspirados de medula óssea, punção esplênica e biopsia de pele (LIMONCU et al 1997; BRASIL, 2006). Embora sendo este último bastante utilizado e completamente apropriado para o isolamento dos parasitos, não produz uma grande quantidade de promastigotas em um curto período de tempo, mesmo em pacientes com amostras ricas de parasitas, tornando-se para muitos estudos necessário isolamento de parasita em meio de cultivo líquido, pois produzem grandes quantidades de promastigotas em um curto espaço de tempo (LIMONCU et al 1997). O meio RPMI 1640, meio de cultura em fase líquida, tem sido empregado com

adição de soro bovino fetal (SBF) inativado, para alguns organismos mais exigentes quanto aos requisitos nutricionais como a *L. (V.) braziliensis* (SCHUSTER e SULLIVAN, 2002).

Para a LVA usa-se a técnica de punção aspirativa de medula óssea, que pode ser através de punção esternal, punção de crista ilíaca e punção tibial, ocorre através da anestesia no local punção com 0,5 a 1 ml de anestésico. Uma gota do material aspirado deve ser diluído em 0,5ml de solução salina (PBS ou NaCl a 0,9%) na própria seringa, em seguida 0,1ml desta solução deve ser inoculada em condições estéreis, em dois tubos de cultivo com NNN e mantidas entre 24-26°C (BRASIL, 2003).

Os fragmentos cutâneos obtidos por biópsia da borda úlcera são inoculados em meio de cultivo NNN e LIT (Liver infusion Triptose) entre 24°C e 26°C, nos quais os parasitas crescem relativamente bem. Conforme Cuba (1986), realizar três aspirados em diferentes locais da lesão aumenta a sensibilidade do isolamento das promastigostas em culturas de lesões cutâneas. Após o 5º dia, dependendo da espécie, podem ser encontradas formas promastigotas do parasito (BRASIL, 2007). Brustoloni (2007) cita que após suplementado com 20% de soro bovino fetal e incubado a 20°C, em meio NNN, a cultura deve ser semanalmente examinada por microscópio para detectar a presença de parasita em até 8 semanas.

O material obtido através de punção aspirativa pode ser inoculado diretamente no meio de cultivo, enquanto que o material obtido por biópsia deve ser colocado sem solução salina com antibióticos durante 24 h, a temperatura de 4°C. Após esse procedimento coloca-se o material no meio de cultivo (BRASIL, 2006).

A taxa de replicação do parasita no meio de cultura varia conforme a espécie. De acordo com Niño e Camacho (2005), a taxa de replicação da *Leishmania (L.) amazonensis* foi similar em dois meios de cultura, ocorrendo em 48h e a *Leishmania (V.) braziliensis* ocorre em 72 a 96h.

Diferentes experimentos com meios de cultura *in vitro* foram realizados nos últimos tempos, como o meio de cultura P-Y, a base de peptona, extrato de levedura e sais, demonstrando preparação imediata e viabilidade de aproximadamente um mês (LIMONCU et al 1997) e a introdução de novas soluções como infusão de cérebro, coração e solução de

urina humana (GARCIA, 2007), que permitiram crescimento primário de *Leishmania sp* em quase todas as soluções.

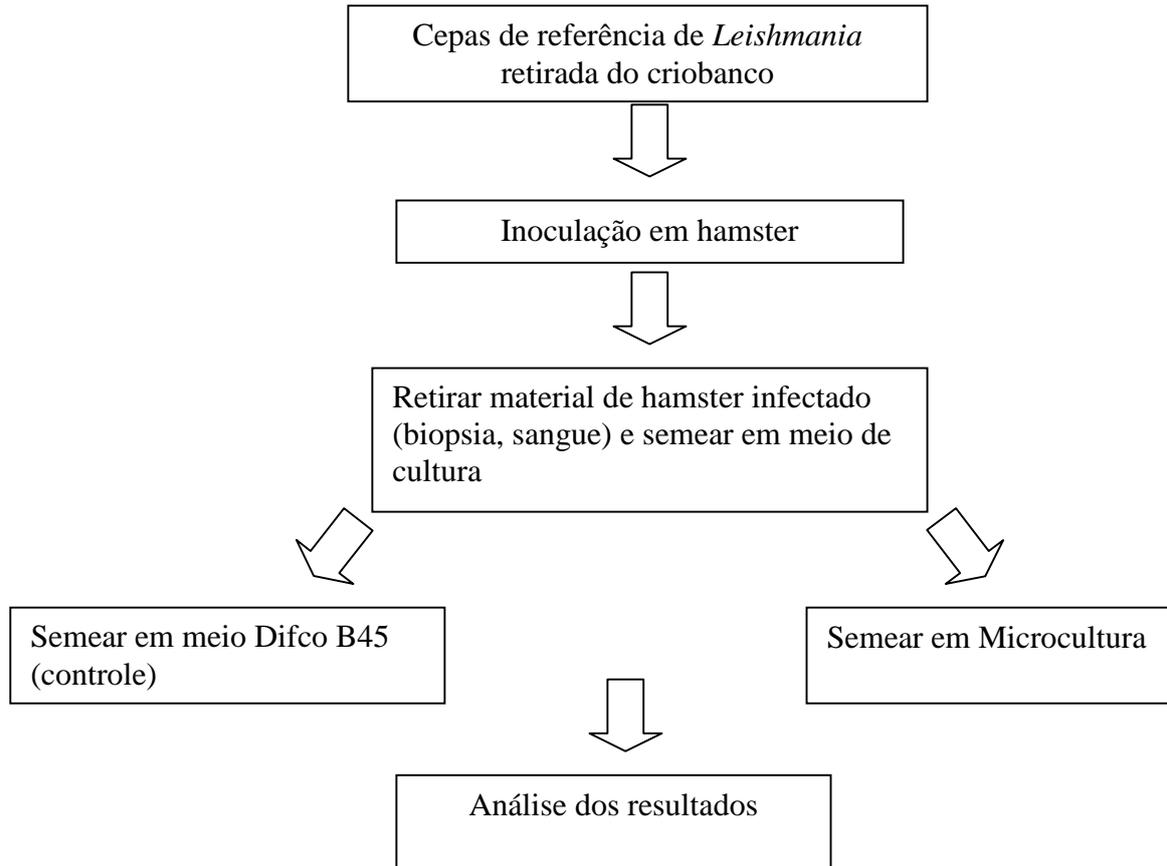
Recentemente, um novo método de cultura *in vitro* tem sido estudado e comparado com o método tradicional de cultura. Boggild et al (2008) demonstraram que a técnica aperfeiçoada de microcultura e um método novo de minicultura oferecem alternativas sensíveis aos sistemas bifásicos tradicionais da cultura. Estes estudos demonstram que o método de microcultura *in vitro* é superior ao método tradicional de cultivo para detecção de promastigota de LVA que foram obtidas por meio de amostras de medula óssea e sangue periférico (ALLAHVERDIYEV et al., 2005; GUTIERRES, 2008), e amostras de lesão cutânea para os casos de LTA (ALLAHVERDIYEV et al., 2004; BOGGILD et al., 2007; IHALAMULLA et al., 2008), e também com amostras de aspirados esplênicos de cachorros através de um Centro de Zoonoses (GUTIERRES, 2008), pois apresentou sensibilidade mais elevada e crescimento de promastigotas em um intervalo de tempo mais rápido.

Este novo método de microcultivo *in vitro* tem sido usado como base para isolamento do parasito de lesões cutâneas e de casos de leishmaniose visceral para que posteriormente este seja utilizado para outros fins, como caracterização de espécie pelo método do Estudo do Polimorfismo do fragmento de restrição (RFLP), criopreservação etc., que servirão para estudos epidemiológicos das leishmanioses (SERIN et al., 2005).

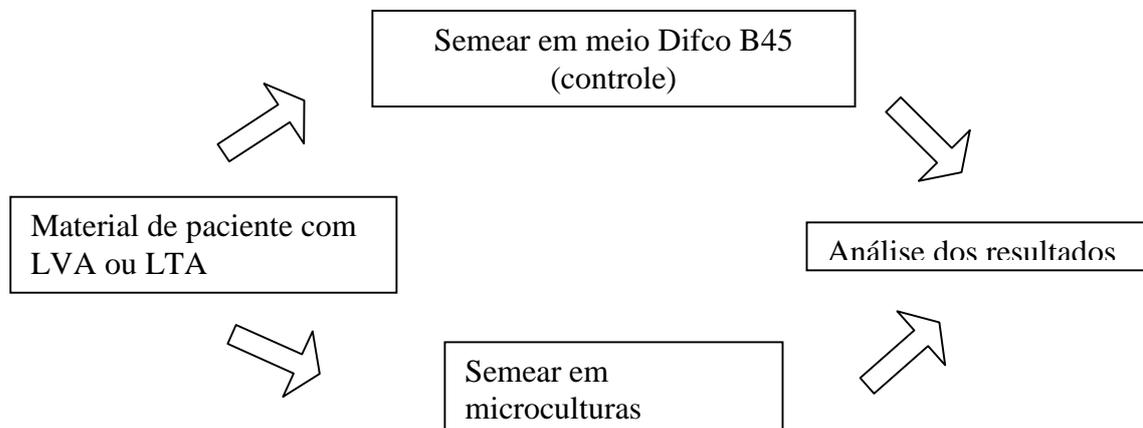
5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 - DESENHO EXPERIMENTAL

1º parte: Padronização da técnica



2ª parte: Amostra de pacientes



5.2 - CEPAS DE *LEISHMANIA*

Foram isoladas do criobanco do Laboratório de Leishmanioses da Seção de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas (IEC) – SVS, duas cepas referência de *Leishmania* causadora da LTA compreendendo as espécies *L. (V.) brazilienses* (M17323; M17593) e *L. (L.) amazonensis* (PH8, H21, M26361) e uma de LVA referente a espécie *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

5.3 - HAMSTERS

Foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*) (Figura 7) de três a cinco semanas de idade do biotério Central do Instituto Evandro Chagas (IEC) -SVS no total de 20 animais.

Estes animais foram mantidos em gaiolas em condição apropriadas de saúde e conforto no biotério experimental do laboratório de Leishmanioses-IEC sob condições adequadas de ração e água, conforme orientação do responsável pelo Biotério do IEC.

Cada animal foi inoculado, intradermicamente, 0,1 mL de cada inóculo preparado, em cada pata, recebendo uma carga total de 4×10^6 promastigotas. Os animais foram observados semanalmente para a avaliação do surgimento e desenvolvimento de lesão (Figura 8) ou algum sinal de infecção no local da inoculação.



Figura 7: *Mesocricetus auratus*
Fonte: Arquivo pessoal



Figura 8: Pata traseira com lesão.
Fonte: Arquivo pessoal

5.4 - CULTIVO *IN VITRO* E *IN VIVO*

As cepas de *Leishmania* foram retiradas do nitrogênio e transferidas para o meio de cultura bifásico de agar-sangue Difco B45, preparado conforme descrito por Walton et al., (1997). Para recuperar a virulência das cepas, formas promastigostas de *Leishmania* na fase estacionária foram retiradas diretamente da cultura e inoculadas por injeção intradérmica na face dorsal da pata traseira, esquerda e direita, de hamsters jovens. Após 1 semana de inoculação, de cada dois hamsters, foram retirados fragmentos da pele do local inoculado e passados novamente para o meio de cultura tradicional Difco B45 e microcultura.

O crescimento e a morfologia do parasito (forma promastigota) foram observados em intervalos regulares de dois dias. Após atingirem a fase estacionária de crescimento, foi realizada a caracterização do parasito por teste de imunofluorescência indireta (IFI).

5.5 - PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

5.5.1 - Meio bifásico Difco B45

O meio foi dissolvido por aquecimento 40g de Difco 0044-17-9 (Heart Infusion Agar Deydrated) em 1000 mL de água bidestilada. Após isso autoclavado por 5 minutos a uma temperatura de 121°C. Em uma câmara de fluxo laminar, foi adicionado 12% de sangue de coelho desfibrinado. Foi distribuído 3 mL do meio em cada tubo estéril de 10 mL e mantido ligeiramente inclinados até a solidificação. Os tubos foram mantidos por 24 horas na posição vertical para a formação de liquido de condensação e depois mantidos a 5°C até o momento do uso.

5.5.2 - Meio Líquido RPMI:

O meio RPMI foi diluído em 1000 mL de água destilada autoclavada, 8,4 g de RPMI e 2 g de bicarbonato de sódio. Ajustado pH e suplementado com 1% do volume de RPMI d L-Glutamina: 1% de Penicilina-Gentamicina e 10% de Soro Bovino Fetal.

5.6 - MANUTENÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO

Foram mantidos os tubos (2 ou 4) em meio NNN, após repique em temperatura de 24° a 27°C conforme o sistema tradicional observando o crescimento em intervalos de 2 a 3 dias.

Também foram mantidos 1 ou 2 tubos com meio NNN em dois tempos, após aparecimento de promastigota (dia zero) e após fase estacionária (dia três) em refrigerador em temperatura de 5°C e observados previamente 2 vezes por mês conforme Muniaraj et al (2005) para examinar a viabilidade do parasita.

5.7 - PROCEDIMENTOS DIAGNÓSTICOS E ISOLAMENTO DAS LEISHMANIAS A PARTIR DE ANIMAIS INFECTADOS.

Esfregaços foram obtidos a partir de material de vísceras, para os que estavam inoculados com cepas de LVA e material de pele para os que estavam inoculados com cepas causadoras de LTA. Os esfregaços foram corados com solução de Giemsa e analisados com microscopia óptica para observar presença de forma amastigota.

Foram colhidas amostras de sangue e lesão de hamsters infectados para o isolamento e *Leishmania* em microcultivo e por meio de dispositivo de vácuo-aspiração (Figura 9 e 10).

5.8 - ISOLAMENTO DE *LEISHMANIA* A PARTIR DE PACIENTES

Foram coletados material de pacientes positivos para LTA, conforme parasitoscopia direta, atendidos no ambulatório do Laboratório de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas (IEC), o qual poderiam ou não ter iniciado o tratamento. Dos pacientes com LTA foram colhidos material de lesão de pele.

O número de amostra de pacientes foram 7, obtidos através da demanda passiva do laboratório de leishmanioses.

5.9 - COLETA DE MATERIAL POR MEIO DA VÁCUO-ASPIRAÇÃO

Foi realizada coleta de material da lesão dos pacientes por meio da técnica de vácuo aspiração com tubos contendo 2 mL de meio NNN conforme técnica de Marzochi et al (1993) (Figura 11) alterando apenas angulação do bisel de 45° para aproximadamente 20° em relação a lesão (Figura 12). Para realização da mesma foi aplicado tratamento com antibiótico tópico Neomicina e realizado assepsia local com povidine. Posteriormente os tubos foram mantidos a 27°C e sua leitura realizada de 2 a 3 dias através de alíquota retirada com auxílio de pipeta Pasteur e inserida entre lâmina e lamínula para posterior leitura em microscópio óptico.



Figura 9 : agulha e dispositivo para vácuo-aspiração montados.
Fonte: Arquivo pessoal



Figura 10: Técnica de vácuo-aspiração em lesão nodular de hamsters
Fonte: Arquivo pessoal

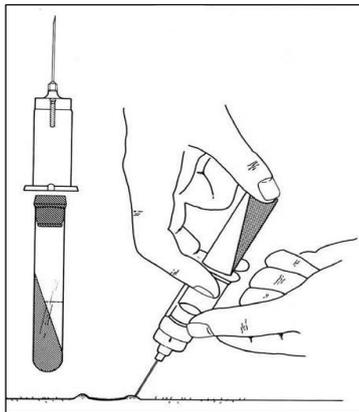


Figura 11 : Técnica de vácuo-aspiração por Marzochi et al (1993).
Fonte: Marzochi et al (1993)

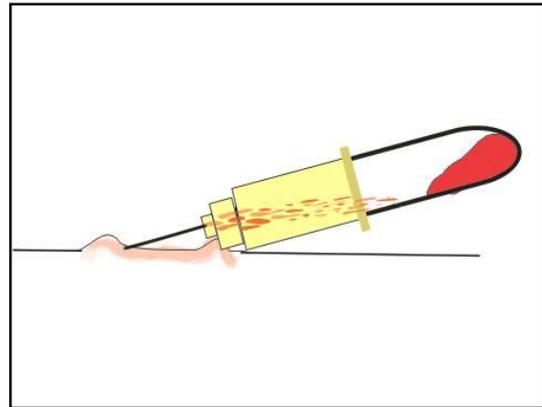


Figura 12 : Técnica de vácuo-aspiração adaptada de Marzochi et al (1993) com angulação de 20°.
Fonte: Ilustração de Nádile de Castro

5.10 - MICROCULTIVO *IN VITRO*

Para coleta de material da lesão de humanos a mesma foi previamente tratada com antibiótico Neomicina tópico 3 dias antes, e limpa com polvidine no dia da coleta. O material da lesão foi colhido com auxílio de uma seringa de 1 mL contendo 0,1 mL de RPMI suplementado, por meio de aspiração de material a baixo da borda da lesão que foi posteriormente inoculado em tubos microcapilares. Foram inoculados entre 25 a 50 μ L do material (RPMI + amostra) (Figura 13) na parte média do tubo microcapilar, selando suas bordas com chama. Os mesmos foram mantidos em posição horizontal em temperatura de 27°C realizando-se sua leitura entre 1 e 3 dias através de microscópio invertido Motic com auxílio de uma lâmina para fixação do tubo, com ocular de 10x e objetiva de 20x, de acordo com Allahverdiyev et al (2005). Estas culturas foram examinadas até o período de 35 dias, sendo consideradas negativas após este período. Para coleta de material de hamsters o protocolo foi o mesmo, apenas não havendo uso prévio de antibiótico tópico na lesão.

Para a realização do cultivo em microtubos (Figura 14), foi coletado por meio da aspiração de material da lesão da pata traseira de hamsters, com auxílio de uma seringa de insulina contendo 0,2 mL de RPMI o material da lesão nodular e transferido para microtubos de centrifuga de 500 μ L. Para a visualização do material foi retirado uma alíquota do material entre 3 a 5 dias. As culturas que permaneceram por até 35 dias negativas foram desprezadas.

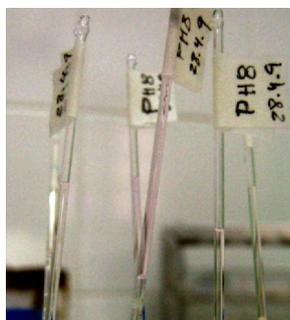


Figura 13: Tubos microcapilares com meio RPMI
Fonte: Arquivo pessoal



Figura 14: Microtubos de centrifuga com meio RPMI
Fonte: Arquivo pessoal

5.11 - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *LEISHMANIA*

Foram organizado um painel de 23 anticorpos monoclonais contra *Leishmania* que foram preparados e gentilmente cedidos pela Dr^a Diane McMahon da Yale University, USA e OMS.

Inicialmente, os parasitos, ao atingirem a fase de crescimento estacionária, foram lavados por três vezes com PBS, até obterem uma suspensão de 10^5 parasitas/mL.

O procedimento para o teste de imunofluorescência indireta (IFI), utilizando os anticorpos monoclonais foi realizado conforme descrito por Shaw et al., (1998).

5.12 - ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados obtidos foram analisados pela observação do crescimento das amostras em cada meio de cultivo e aplicação de teste estatístico, teste G e Qui-quadrado.

5.13 - ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi inserido no projeto intitulado: “Leishmaniose Tegumentar Americana: Isolamento e caracterização das espécies de *Leishmania* da Região Sudoeste do Estado do Pará.”, aprovado no Comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos do Núcleo de Medicina Tropical (NMT), com protocolo n. 55/2007 e submetido e aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa com Animais – CEPAN do Instituto Evandro Chagas, parecer n° 006/2009, registro 0048/2009, e Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos de NMT, protocolo n° 032/2008 (Apêndice A e B).

6 - RESULTADOS

6.1-ISOLAMENTO DE *LEISHMANIA* DE HAMSTERS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

6.1.1 - Por meio da técnica de vácuo-aspiração.

Foram utilizados 18 hamsters, sendo 12 hamsters infectados com cepas de *L.(L.) amazonensis* (6 com PH8, 4 com H21 e 2 com M26361) e 6 hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (4 hamsters com M17323 e 2 com M17593). De cada hamsters foram colhidos materiais de lesão por vácuo-aspiração, perfazendo um total de 33 culturas de *L. (L.) amazonensis* e 23 de *L. (V.) braziliensis*. Das culturas com *L. (L.) amazonensis*, 32 (96.9%) foram positivas e com *L. (V.) braziliensis* 9 (39.1%) foram positivas, conforme apresentado na tabela 2 e 3.

A positividade, presença de promastigotas, das culturas foi verificada entre 2 a 8 dias, com aproximadamente 30 parasitos por campo.

Foi verificado que dos 56 cultivos, 1 apresentou contaminação e 2 não obtiveram crescimento (Tabela 4)

Tabela 02. Taxa de isolamento de cepas de *L. (L.) amazonensis* de hamsters por vácuo-aspiração.

AMOSTRA	NUMERO DE HAMSTERS	NUMERO DE TUBOS DE CULTIVO	AMOSTRAS POSITIVAS (%)
PH8	6	21	21/21 (100%)
H21	4	6	5/6 (83.3%)
M26361	2	6	6/6 (100%)
TOTAL	12	33	32/33 (96.9%)

Tabela 03. Taxa de isolamento de cepas de *L. (V.) braziliensis* de hamsters por vácuo-aspiração.

AMOSTRA	NUMERO DE HAMSTERS	NUMERO DE TUBOS DE CULTIVO	AMOSTRAS POSITIVAS (%)
M17323	4	12	0/12 (0.0%)
M17593	2	11	9 /11 (81.8%)
TOTAL	6	23	9 /23 (39.1%)

Tabela 04. Taxa de sensibilidade da técnica de vácuo-aspiração no isolamento de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

RESULTADO DO CULTIVO	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	TOTAL (%)
POSITIVA	32/33 (96,9%)	9/23 (39.1 %)	41/56 (73.2%)
CONTAMINADA	-	01/23 (4.3%)	01/56 (1.7%)
SEM CRESCIMENTO	01 /33 (3,03%)	01/23 (4,3%)	02/56 (3.5%)

6.1.2. Em microtubos de centrífuga

Foram utilizados 5 hamsters, sendo 3 infectados com *L.(L.) amazonensis* (1 com PH8, 1 com H21 e 1 com M26361) e 2 com *L. (V.) braziliensis* (1 com M17323 e 1 com M17593). De cada hamsters foi colhido material da lesão perfazendo um total de 6 culturas de *L.(L.) amazonensis* e 6 de *L. (V.) braziliensis*. Das culturas com *L. (L.) amazonensis*, 5 (55.5%) foram positivas e com *L. (V.) braziliensis* 1 (16.6%) foi positiva conforme tabela 5 e 6.

A positividade, presença de promastigotas, das culturas foi verificada entre 5 a 8 dias com aproximadamente 20 parasitos por campo.

Observou-se crescimento de promastigotas em 50% dos cultivo, conforme tabela 7.

Tabela 05. Taxa de isolamento de cepas de *L. (L.) amazonensis* de hamsters por microtubos.

AMOSTRA	NUMERO DE HAMSTERS	NUMERO DE TUBOS DE CULTIVO	AMOSTRAS POSITIVAS (%)
PH8	1	2	2 / 2 (100%)
H21	1	3	3 / 3 (100%)
M26361	1	1	0 / 1 (0%)
TOTAL	3	6	5 / 6 (83,3%)

Tabela 06. Taxa de isolamento de cepas de *L. (V.) braziliensis* de hamsters por microtubos.

AMOSTRA	NUMERO DE HAMSTERS	NUMERO DE TUBOS DE CULTIVO	AMOSTRAS POSITIVAS (%)
M17323	1	3	1 / 3 (33.3%)
M17593	1	3	0 / 3 (0.0%)
TOTAL	2	6	1 / 6 (16.6%)

Tabela 7 Taxa de sensibilidade de isolamento em microtubos para as espécies de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

RESULTADO DO CULTIVO	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	TOTAL (%)
POSITIVA	5/6 (83,3%)	1/6 (16,6%)	6/12 (50%)
CONTAMINADA	-	-	-
SEM CRESCIMENTO	1/6 (16,6%)	5/6(83,3%)	6/12 (50%)

6.1.3. Em tubos microcapilares

Foram utilizados 8 hamsters, sendo 6 hamsters infectados com cepas de *L.(L.) amazonensis* (2 com PH8, 2 com H21 e 2 com M26361) e 2 hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (2 hamsters com M17593). De cada hamster foi colhido material de lesão por aspiração com seringa de 1 ml, perfazendo um total de 17 culturas de *L. (L.) amazonensis* e 6

de *L. (V.) braziliensis*. Das culturas com *L. (L.) amazonensis* 17 (100%) foram positivas e com *L. (V.) braziliensis* 6 (100%) foram positivas, conforme apresentado nas tabelas 8, 9 e 10.

A positividade, presença de promastigotas, das culturas foi verificada entre 2 a 7 dias.

Tabela 08. Taxa de isolamento de cepas de *L. (L.) amazonensis* de hamstes por microcapilares.

AMOSTRA	NUMERO DE HAMSTERS	NUMERO DE TUBOS DE CULTIVO	AMOSTRAS POSITIVAS(%)
PH8	2	6	6/6 (100%)
H21	2	7	7 /7 (100%)
M26361	2	4	4 /4 (100%)
TOTAL	6	17	17 /17 (100%)

Tabela 09. Taxa de isolamento de cepas de *L. (V.) braziliensis* de hamsters por microcapilares.

AMOSTRA	NUMERO DE HAMSTERS	NUMERO DE TUBOS DE CULTIVO	AMOSTRAS POSITIVAS(%)
M17593	2	6	6/6 (100%)
TOTAL	2	6	6/6 (100%)

Tabela 10. Taxa de sensibilidade de isolamento em tubos microcapilares para as espécies de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

RESULTADO DO CULTIVO	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	TOTAL(%)
POSITIVA	17 (100%)	06 (100%)	23/23 (100%)
CONTAMINADA	-	-	-
SEM CRESCIMENTO	-	-	-

6.2. ISOLAMENTO DE AMOSTRAS DE *LEISHMANIA* DE PACIENTES COM LTA.

6.2.1. Por meio da técnica de vácuo-aspiração

Num total de seis pacientes apresentando lesão cutânea localizada, após confirmação do diagnóstico de LTA pela parasitoscopia direta foi realizada a coleta de material por meio da técnica de vácuo-aspiração. Todas as amostras foram coletadas em duplicata, obtendo um total de 12 coletas, 10 apresentaram-se negativas e 2 positivas. A positividade das amostras foi observada entre 4 a 5 dias (Tabela 11). Não houve casos de contaminação de material.

Tabela 11: Taxa de isolamento de amostras de *Leishmania sp* coletadas de pacientes por meio da técnica de vácuo-aspiração.

AMOSTRA DE PACIENTES	NÚMERO DE TUBOS	AMOSTRAS POSITIVAS
MHOM/BR/ 2010/M27004	2	½ (50%)
MHOM/BR/2010/M27017	2	1/2(50%)
MHOM/BR/2010/M26969	2	0
MHOM/BR/2010/M27041	2	0
MHOM/BR/2010/M27031	2	0
MHOM/BR/2010/M27074	2	0
TOTAL	12	2/12 (16.6%)

6.2.2. Em tubos microcapilares.

Amostras de sete pacientes positivos para LTA foram coletadas por meio de uma seringa de 1 mL contendo 0,1 mL de RPMI e transferidas para tubos microcapilares, totalizando 42 microcapilares, sendo que destes apenas 6 foram positivos, 4 da amostra MHOM/BR/2010/M27004 e 2 da amostra MHOM/BR/2010/M27017 (Tabela 12).

O tempo de positividade observadas em cada cultura variou entre 5 e 10 dias.

Tabela 12. Taxa de sensibilidade das amostras de pacientes em tubos microcapilares.

AMOSTRA DE PACIENTES	NÚMERO DE TUBOS	POSITIVO (%)
MHOM/BR/2010/M26981	06	-
MHOM/BR/2010/M27004	06	4/6 (66,6%)
MHOM/BR/2010/M27017	06	2/6 (33,3%)
MHOM/BR/2010/M26969	06	-
MHOM/BR/2010/M27031	06	-
MHOM/BR/2010/M27041	06	-
MHOM/BR/2010/M27074	06	-
TOTAL	42	6/42 (14,2%)

6.2.3. Conservação de cepas isoladas submetidas a baixa temperatura.

Um total de 7 tubos de meio NNN com material colhido de lesões de hamster infectados com cepas de *L. (L.) amazonensis* (5 de PH8) e *L. (V.) braziliensis* (2 de M17323), foram mantidos em refrigerador a 5 °C sendo observados no 15°, 30°, 35° e 40° dias. Foram encontradas promastigotas viáveis no período máximo de 30 dias. Não Foi observada diferenças ao comparar o dia o qual foram submetidas a baixa temperatura, pós dia de positividade (entre os dias zero a três).

6.3. ISOLAMENTO DE AMOSTRAS DE LVA.

Foram utilizados 12 hamsters, infectados com cepas de *Leishmania (Leishmania) infatum chagasi* (M2269). De cada hamsters foram colhidos materiais por punção cardíaca, perfazendo um total de 24 culturas.

Não foi observado crescimento de promastigotas em 16 culturas e 8 contaminaram.

6.4 - COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DE *LEISHMANIA*

Foram realizadas comparações entre as técnicas de isolamento com vácuo-aspiração e microcapilares; vácuo-aspiração e microtubos e microtubos e microcapilares. Na tabela 13, 14 e 15 observamos que conforme o teste G e Qui-quadrado as diferenças não são significantes quando comparadas entre espécies isoladas.

Tabela 13. Comparação entre as técnicas de vácuo-aspiração e microcapilar

AMOSTRA/ TÉCNICA	Vácuo-aspiração	Microcapilar	X ²	P
<i>L.(L.) amazonensis</i>	32/33	17/17	0.005	0.8895
<i>L. (V.) braziliensis</i>	9/23	6/6	1.859	0.3143

Teste G (p) =0.3203

Tabela 14. Correlação entre as técnicas de vácuo aspiração e microtubos

AMOSTRA/ TÉCNICA	Vácuo-aspiração	Microtubos	X ²	P
<i>L.(L.) amazonensis</i>	32/33	5/9	0.845	0.5326
<i>L. (V.) braziliensis</i>	9/23	1/6	0.577	0.7781

Teste G (p) =0.7748

Tabela 15. Comparação entre as técnicas de microcapilar e microtubos

AMOSTRA/ TÉCNICA	Microtubos	Microcapilar	X ²	P
<i>L.(L.) amazonensis</i>	5/9	17/17	0.815	0.5591
<i>L. (V.) braziliensis</i>	1/6	6/6	2.423	0.2874

Teste G (p) =0.2770.

7. DISCUSSÃO

Buscar otimizar a técnica de microcultivo, *in vitro*, e também a técnica de vácuo-aspiração, além de outros meios de conservação do parasito, como por exemplo a conservação do parasito a temperaturas inferiores a 25°C, através de análises observacionais em cultivo *in vitro* de amostras positivas oriundas de hamster e posteriormente de pacientes em início de tratamento para as leishmanioses, foram os objetivos elucidados na pesquisa, com o intuito de direcionar os resultados para os centros de pesquisas de modo a expandir as formas de isolamento do subgênero *Leishmania* e *Viannia*, tornando estas com um instrumento mais sensível para o diagnóstico e tratamento.

Dentre estas apresentações, a punção aspiratória para o isolamento de *Leishmania* tem sido bem referida como o método eficaz para os casos com lesões cutâneas (HENDRICKS e WRIGHT, 1979; CUBA-CUBA et al., 1986; BARRAL et al., 1987). A proposta utilizada por Marzochi et al., (1993) para a técnica de vácuo-aspiração em lesões cutâneas apresenta angulação do bisel de 45°, modificada em nosso trabalho de acordo com considerações de Romero et al., (1999), para angulação de aproximadamente 20° associada a movimentos de homogeneização, permitindo que a fase líquida do meio alcançasse o exsudado. As mudanças tiveram o objetivo de contribuir para a sensibilidade da técnica, juntamente com a redução do volume de meio por tubo e dos custos.

Nesta pesquisa, foram utilizadas cinco amostras concernentes as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* provenientes de lesão de hamsters experimentalmente infectados, a qual apresentaram respectivamente 96,9% e 39,1% de cepas isoladas através da técnica de vácuo aspiração em meio NNN, expressando assim o grau de isolamento da espécie *L. (L.) amazonensis* superior a do subgênero *Viannia*. O resultado relativo à diversidade das amostras demonstrou que para a espécie *L. (L.) amazonensis* independentemente da amostra, a mesma alcançou resultados semelhantes de isolamento, diferente das amostras da espécie *L. (V.) braziliensis*. O estudo ainda apontou a taxa de contaminação durante a etapa de padronização de 1,7%, valor este expresso exclusivamente por amostras pertencentes a *L. (V.) braziliensis*, e média de surgimento e observação de promastigotas nas amostras coletadas da lesão de hamster entre 2 a 8 dias, onde não se registrou variação de intervalo diferenciado entre as espécies.

Observamos que a sensibilidade da técnica em lesões de hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis* possuíam condições o qual favoreciam o isolamento, como lesões nodulares e alta parasitemia, esta última observada durante análise da amostra por esfregaço em lâmina, condições por vez não encontrada em lesões de pacientes, mostrando claramente a vantagem da técnica em condições favoráveis.

Para as mesmas amostras de hamsters isoladas em microtubos, observou-se uma dificuldade na leitura dos mesmos no microscópio, em virtude da curvatura e opacidade do tubo, otimizado pela retirada de uma alíquota para leitura entre lamínula e lamina. Esses cultivos para a espécie do subgênero *Leishmania* foram mais sensíveis quando comparados ao subgênero *Viannia* semelhante ao resultado de outras técnicas, o quanto a dificuldade de isolamento e espécies deste subgênero.

Assim como Boggild et al., (2008), percebemos que o cultivo de leishmânias em microtubos mostram-se menos sensíveis que o isolamento em tubos microcapilares, embora promovam fácil acesso a amostra, além do baixo custo.

Da coleta para cultivo em microcapilares, obtivemos um resultado satisfatório para as espécies estudadas, tanto em termos de amostras positivas (100 %) quanto de amostras sem contaminação (0%), estes resultados foram confirmados para amostras em sua totalidade por espécie, quanto para amostragem isolada. Isto pode ser justificado pela coleta de material em lesões nodulares, que são lesões fechadas, onde não há contaminação bacteriana. O uso da técnica asséptica, como limpeza do local com álcool a 70% e troca de agulha da seringa, também contribuíram para a ausência de contaminação.

Quanto a variação no crescimento interespecífico das amostras coletadas de hamsters e introduzidas em tubos microcapilares não foram encontradas diferenças entre as espécies *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis*. No geral os tubos microcapilares apresentaram em média 10 parasitos por campo. O tempo de positividade para microcapilares encontrado nas amostras de hamsters infectados variou entre 2 a 7 dias, valores bem mais inferiores aos encontrados no meio de cultura tradicional usado no IEC para biopsia de hamsters, detectando um intervalo de tempo inferior a outros métodos, contudo com parasitemia claramente baixa.

É relevante ressaltar que foi evidenciado em outros estudos que para o subgênero *Viannia* o desenvolvimento do parasita é pobre em cultivo no meio NNN e em amostras de hamsters experimentalmente infectados (MARZOCHI et al., 1993), entretanto em nossos resultados esse episódio foi observado nas duas outras técnicas, todavia por meio de tubos microcapilares não houve essa confirmação, sugerindo que a técnica é sensível ao subgênero *Viannia*.

É relevante dizer que em nosso estudo, utilizamos amostras isoladas da Amazônia brasileira caracterizadas como *L. (L.) amazonensis* e *L.(V). braziliensis*. Embora outros autores tenham observado o comportamento de outras espécies, o uso de parasitos autóctones é mais adequado para otimização, visto que seu crescimento varia de acordo com a espécie (WATON, 1977, SERIN et al., 2005; HIDE et al., 2007; IHALAMULLA et al., 2008).

Além destes fatos para o isolamento das amostras em microcapilares, o meio utilizado foi o RPMI 1640, já referenciado com resultados satisfatórios de isolamentos em tubos microcapilares e em microplacas de exames sorológicos, mostrando a eficácia deste meio junto a estas novas propostas (ALLAHVERDIYEV et al., 2004, 2005; SERIN et al., 2005; HIDE et al., (2007), BOGGILD et al., 2007, 2008; IHALAMULLA et al., 2008). Este meio tem sido comparado a outros meios como NNN e Schneider, apresentado resultados positivos, com alta parasitemia e com curto intervalo entre a semeadura do meio e o aparecimento de promastigota (BRENS et al., 1976; MARKEL et al., 1992; LIMONCU et al., 1997). Para o enriquecimento do meio de cultivo foi suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF). Esta adição na concentração de 10% torna o método de microcultivo com meio RPMI mais eficaz (BOGGILD et al., 2007, 2008). Os resultados confirmaram a sensibilidade do meio RPMI, apontando intervalos de positividade mais curtos quando comparado a técnicas tradicionais.

O meio RPMI possui um preparo menos exigente que o método tradicional, em virtude de não requerer sangue de coelho desfibrinado. Esta análise nos leva a afirmar que a técnica de microcultivo possui etapas que facilitam a sua execução, o que a torna viável para isolamento do parasita em tempo reduzido, tornando a técnica não só apropriada a laboratórios de referência, mas útil no diagnóstico e tratamento. Merece ainda especial atenção a não necessidade de animais de laboratório nas etapas do microcultivo *in vitro*, em virtude do mesmo utilizar apenas meio RPMI para o isolamento, e em pouca quantidade (aproximadamente 75µl) o que proporciona a diminuição dos custos para isolamento de

Leishmania. Boggild et al (2007), afirmaram que a técnica de microcultivo mostrava-se mais sensível e econômica quando comparado a métodos tradicionais usados para diagnóstico do gênero *Leishmania*. É interessante ressaltar que, novos meios líquidos ou mistos, de baixo custo e de fácil preparo devam ser testados em tubos microcapilares para comparação de sua eficácia juntamente com meio RPMI 1640 nas espécies circulantes na nossa região.

Foi observada também a disposição dos tubos microcapilares durante a fase de crescimento, referente distribuição da massa de parasitos no tubo. Procuramos manter os mesmos em posição horizontal, visto que quando colocados verticalmente percebemos um acúmulo de massa de parasita na borda da extremidade inferior, sendo que horizontalmente há um crescimento exponencial homogêneo. Estas considerações seguiram as bases teóricas mencionadas por Ihalamulla et al (2005).

Alguns cuidados devem ser referidos, visto que apesar de vários autores realizarem a selagem dos microcapilares por meio de flambagem com sucesso (ALLAVERDIYEV et al., 2004, 2005; SERIN et al., 2005; BOGGILD et al., 2007, 2008 ; IHALAMULLA et al., 2008), vale ressaltar que durante a introdução do meio RPMI, deve-se padronizar o volume e a localização do mesmo no terço médio do tubo microcapilar de modo a evitar transferência de calor para o meio de cultura, evitando assim a morte do parasito. Além de cuidados gerais que o manipulador deve ter como aquecimento excessivo, cuidado com queimaduras, precauções universais.

Allaverdiyev et al (2004) utilizaram a técnica de inoculação de solução salina no tecido subcutâneo e imediata aspiração do homogeneizado. Desde que usando a técnica asséptica, poderíamos ter utilizado os mesmos fundamentos para o meio RPMI, inoculando-o na borda da lesão do paciente e aspirando imediatamente depois, entretanto, este meio de cultura contém substâncias cujas propriedades e/ou eventos adversos não são conhecidos quando inoculados no tecido subcutâneo humano. Além disso, o Ministério da Saúde reconhece apenas a solução salina como segura para auxílio na aspiração de lesões nodulares (BRASIL, 2007).

Dos resultados das amostras dos pacientes apenas 6 (14,2%) apresentaram-se positiva, diferente dos resultados obtidos quando trabalhados com material de hamsters. A parasitemia

em animais de laboratório é maior que a de humanos para a *Leishmania* em face a suscetibilidade deste modelo experimental à infecção do parasita. Também são fatores inerentes a estes achados; o tempo da doença, a busca dos pacientes por terapias alternativas e a resposta imunológica individual determinados geneticamente (JERÔNIMO et al., 2008). Esses valores, são diferentes dos encontrados por Allahveriyev et al., (2004, 2005), quando relacionado ao uso de microcapilar com o meio RPMI, pois seus resultados demonstraram valores entre 90,5% e 100% para amostras positivas de LTA.

Contudo, valores semelhantes foram encontrados por Allahverdiyev et al., (2004, 2005) e Boggild et al., (2007), relativo ao tempo de positividade para promastigotas, que variou entre 2 a 7 dias e 2 a 10 dias, respectivamente. Estes resultados demonstram sensibilidade do método para amostras de leishmaniose tegumentar.

Entretanto, existem outros fatores que podem influenciar no tempo de detecção das amostras. Akman et al., (2000) e Weigle et al., (2002), citam que o método tradicional de cultivo possui uma sensibilidade que depende de diferentes fatores, como o tipo de lesão e espécie do parasita. Esses fatos foram encontrados também em observados em leishmânias do Novo Mundo que possui uma variável quantidade de espécies e manifestações clínicas. O resultado da sensibilidade do microcultivo depende do processo de obtenção do parasita da lesão, pois uma coleta bem realizada apresentará resultados satisfatórios.

Devemos considerar também a temperatura a qual os tubos microcapilares com amostras com *Leishmania* provenientes de hamsters foram submetidos, pois foram mantidos à temperatura entre 27° e 31°C, diferente das temperaturas evidenciadas por outros autores, 24° a 26°C (BRASIL, 2006; 2007), o que não interferiu no isolamento das amostras. A temperatura tem um papel importante na forma extracelular das leishmânias (ECHEVERRY e HENRIQUE, 1997) assim como na multiplicação de amostras por meio do cultivo *in vitro*, quando expostas a temperaturas elevadas em torno de 35° a 37°C (BERMAN e NEVA, 1981). Cabe aqui ressaltar que este fato não foi realizado nas amostras dos pacientes, no qual permaneceram em temperatura padrão de cultivo deste protozoário (24 a 26 °C), visto que foram cultivados em laboratório cujas condições não são interferidas devido a presença de outras amostras da rotina.

A justificativa para tal temperatura a qual foram mantidos os microcapilares deve-se ao fato da pesquisa criar a estratégia de um ambiente o qual não se tenha infra-estrutura dos laboratórios-referência de cultivo *in vitro*, que podem conduzir a resultados diferentes dos do campo. Considerando os resultados das duas etapas, sendo o primeiro satisfatório, é interessante que haja um estudo mais aprofundado sobre este tema.

Das sete amostras provenientes de pacientes, 6 foram possíveis de coleta, e apenas 16,6% das amostras pode-se observar promastigotas sem contaminação. Quando comparados aos de Marzochi et al., (1993), observamos similaridade ao resultado das 14 amostras do gênero *Leishmania*, que tiveram 28,6% de positividade. Entretanto, a nossa pesquisa apresentou-se diferente dos achados encontrados por Romero et al., (1999) no qual o resultado foi de 47,1% de amostras positivas em 68 pacientes. Infelizmente com a não caracterização das espécies deste trabalho não foi possível atribuir essa diferença a nenhum fato.

A taxa de contaminação foi nula (0%) demonstrando que as condições controladas do ambiente podem influenciar em resultados satisfatórios. Romero et al., (1999) apresentaram valores semelhantes, diferente da pesquisa inicial por Marzochi et al., (1993), onde se obteve 28,6% de contaminação. Deve-se considerar que resultados com problemas de contaminação do material devem-se à manipulação e/ou manuseio do material durante a coleta, processamento do meio de cultura no laboratório, assim como a concentração de antibióticos (SHAW e LAINSON, 1981).

O intervalo de positividade das amostras foi entre 4 a 5 dias, menor do que o observado por Romero et al., (1999,) que foi de 2 a 26 dias. Este intervalo diferenciado expressa que as espécies isoladas foram mais sensíveis do que os achados dos referenciados autores.

Ainda observando a realização da técnica, realizada sem anestesia local, percebemos que os pacientes referiram incômodo e dor local durante sua realização, o que fez com que alguns pacientes não aceitassem a coleta pelo profissional, sobretudo quando a lesão era localizada na mucosa.

Da conservação do parasita em baixa temperatura pertencentes a isolados de hamsters infectados, obtivemos da análise de 7 tubos das espécies *L.(L.) amazonensis* e *L. (V.)*

braziliensis, um ensaio a 2°C, o qual não houve sucesso na conservação do parasito ao longo dos 30 dias, então foi adotada a temperatura de 5°C, a qual após 30 dias pôde-se observar a viabilidade do parasita para posterior repique, multiplicação e/ou criopreservação da amostra. A observação se estendeu até o 40° dia no qual não foi observado viabilidade. Isso confirma o que alguns estudos já destacavam, a baixa temperatura na conservação do parasita em meio NNN como mais uma alternativa eficaz (MOST et al., 1964; LAZ et al., 2009).

A conservação do parasito a temperatura de 5°C permite que amostras procedentes de regiões distantes dos laboratórios de referência sejam coletadas e armazenadas com leishmânias viáveis em até 30 dias em geladeira comum até a possibilidade de transporte do serviço de saúde local, facilitando o diagnóstico de determinados pacientes sem condições de acesso ao serviço de referência, fato comum em nossa região devido grande extensão territorial.

Das amostras de LVA, não houve crescimento de promastigota por meio de punção cardíaca dos hamsters experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, diferente de resultados encontrados por Allandiveyv et al., (2007), que conseguiu isolar o parasito de sangue periférico.

Para medir a correlação entre os resultados das amostras provenientes de hamsters infectados, foram aplicados o teste G e teste do qui-quadrado, que considerou não significativa a correlação, ou seja, os resultados das amostras não apresentaram dependência entre as relações realizadas, entre técnicas e espécies. Conforme Romero et al., (1999) outras comparações podem ser realizadas para correlacionar as amostras, como o tempo da lesão, número de lesões, diâmetro da reação do teste de Montenegro entre outras variáveis.

Pelas observações realizadas neste presente estudo, podemos dizer que a técnica de microcultivo *in vitro* apresentou-se diferente nas duas etapas a qual a pesquisa foi realizada, semelhante na etapa de padronização, aos resultados encontrados em outros eventos, visto que a pesquisa objetivou otimizar a técnica para espécies autóctones de nossa região (*L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis*), e apresentou-se diferente na segunda etapa referente as amostras dos pacientes.

Com estes resultados percebemos que o microcultivo é viável para uso dentro de nossa região, mas como o número de pacientes com leishmaniose foi baixo e também o isolamento de parasitos apresentam sensibilidade muito baixa, será importante investir em aperfeiçoar a coleta do material da lesão a fim de melhorar os resultados de isolamento, assim como em outros meios de cultura.

Pelos achados encontrados esta técnica ainda não poderá substituir a técnica de rotina, o cultivo em meio NNN, ainda não sendo possível de uso nos serviços de saúde, somente após a sua otimização.

8. CONCLUSÕES:

- É possível utilizar a técnica de microcultivo *in vitro* para as espécies de leishmânias prevalentes no estado do Pará;
- Foram encontradas diferenças significativas entre as espécies isoladas através de microcultivo em amostras provenientes de hamsters;
- O isolamento de *Leishmania* do subgênero *Viannia* provenientes de hamsters apresentou resultado satisfatório para a técnica com uso de microcapilares;
- O isolamento de *Leishmania* provenientes de hamster apresentou maior sucesso do que de humanos, para as técnicas de microcultivo e vácuo-aspiração.
- O método de microcultura para *Leishmania sp* apresentou baixa sensibilidade quando comparado ao método tradicional;
- O isolamento da *L. (L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* em microtubos mostrou-se viável, quando isolado de hamsters, porém ainda necessita de otimização para isolar de humanos;
- A técnica de vácuo-aspiração modificada apresentou resultados satisfatórios em lesões nodulares;
- A submissão de *L. (L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* em meio NNN a temperatura de 5°C é satisfatório e pode ser utilizado para conservação do parasita em até 30 dias.

REFERÊNCIAS:

ADLER, S. Observations on *Leishmania chagasi*. **Mémórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 35, p.177-179, 1940.

AKUFFO H, DARCE M, MAASHO K, BERHAN, N. T. Y. In vivo evaluation of immune responses in leishmaniasis: the use of cross-species leishmanin preparations for skin testing. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 53:16-22, 1995.

ALTAMIRO-INCISO, A. J. MARZOCHI, M. C. A. MOREIRA, J. S; SCHUBACH, A. O; MARZOCHI, K. B. F. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes pré-históricas e pós colombianas. **História, Ciência e Saúde**. Mangueiras. v. 10. n.3. p 853-882, 2003.

ALLAHVERDIYEV, A.M; UZUN, S; BAGIROVA, M; DURDU, M; MEMISOGLU, H. R. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**. v. 70 .n. 3 .p 294-297, 2004.

ALLAHVERDIYEV, A.M. BAGIROVA, M; UZUN, S; ALABAZ, D; AKSARAY, N; KOCABAS, E; KOKSAL, F. The Value a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by Using Bone Marrow and Peripheral blood.. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**. v. 73, n. 2. p. 276-280, 2005.

ANDRADE M. S; BRITO, M. E. F; SILVA, S. T; LIMA, B. S. ALMEILDA, E. L; ALBUQUERQUE, E. L. JUNIOR, J. F. M; ISHIKAWA, E; CUPOLLILLO, E; BANDÃO-FILHO, S. P. Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *Leishmania (Viannia) brasiliensis* em área de treinamento militar na zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.38, n.3 p. 229-233. mai-jun, 2005.

AMPUERO, J; MÂCEDO, V; MARSDEN, P. Características clínicas da leishmaniose Tegumentar em crianças de 0 a 5 anos em uma área endêmica de *Leishmania (Viannia)*

braziliensis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, n. 1, p. 22-26, jan-fev. 2006.

ARRUDA NETO, E. FARHAT, Calil kaialla. Leishmaniose visceral (calazar). In: FARHAT, Calil Kaialla. **Infectologia Pediátrica**. São Paulo: Atheneu. p.492-496. 1994.

BADARÓ, R. JONES, T. C., CARVALHO, E. M., SAMPAIO, D. REED, S. G., BARRAL, A., TEIXEIRA, R., JOHSON, W. D. Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **The journal of infectious Diseases**, v. 154, p. 1003-1011, 1986.

BADARÓ, R. & DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESI, R. & FOCCACIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2 ed. Vol 2. São Paulo. 2004.

BERENES, R. L.; BIRUN, R.; KRASSNER, S.M. A simple monophasic medium for axenic culture of hemoflagellates. **Journal Parasitology**. v. 62, p. 360-365, 1976.

BERMAN, J. D. & NEVA, F. A. Effect of temperature on multiplication of *Leishmania* amastigotes within human monocity-derived macrophages in vitro. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v. 30. p. 318-321, 1981.

BOGGILD, A. K; MIRANDA-VERASTEGUI, C; ESPINOSA, D; ARAVELO, J. MARTINEZ-MEDINA, D; LLANOS-CUENTAS, A; LOW, D. . Optimization of Microculture and Evaluation of Miniculture for the isolation of *Leishmania* Parasites from cutaneous lesion in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 79, n 6 .p 847-852, 2008.

BOGGILD, A. K. MIRANDA-VERASTEGUI, C, ESPINOSA, D; ARAVELO, J; ADAUI V; TULLIANO, G; LLANOS-CUENTAS, A; LOW, D, et al. Evaluation of Microculture Method and Evaluation for isolation of *Leishmania* Parasites from cutaneous lesions in Peru. **Journal of Clinical Microbiology**. v 45. n.11.p. 3680-3684, 2007

BORGES, A. S.; MACHADO, A. A.; FERREIRA, M. S.; FIGUEIREDO, J. F. C.; SILVA, G. F.; CIMERMAN, S.; BACHA, H. A.; TEXEIRA, M. C. L. Concomitância de leishmaniose e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV): estudo de quatro casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.v. 32, n.6, p.713-719, nov-dez, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde.**Guia da Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral Calazar**. v. 2. p.538- 842. 2002a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. n. 06.2002b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde **Manual de Recomendações para Diagnóstico, tratamento e Acompanhamento da Co-infecção Leishmania-HIV**. n 49. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6 ed. 816p, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2 ed, Brasília, 182p, 2007.

BRUSTOLONI, Y.M. CUNHA, R, V; DORVAL, M. E; OSHIRO, E T; PONTES, E; OLIVEIRA, A. L; HILLEBRAND, L; RIBEIRO, L. F. Comparasion of conventional Methods for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Children of the Center-West region of Brazil. **The Brazilian Journal Infection Diseases**.v. 11, n. 1, p. 106-109, 2007

COSTA, C.H.N; PEREIRA, H, F; ARAÚJO, M. V. Epidemia da Leishmaniose Visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980 – 1986. **Revista de Saúde Pública**. n.24, p. 361-372, 1990.

COSTA, C. H. N; TAPETY, C.M.M; WERNECK, G.L. Controle da Leishmaniose Visceral em meio urbano: estudo de intervenção ramdomizado fatorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. n. 40, p 415-419, 2007.

CUBA, C.C.; NETTO, E.M.; COSTA, J.L.M.; BARRETO, A.C. MARSDEN, P.D. El cultivo “in vitro” como instrumento practico para el diagnostico y aislamiento primário de *Leishmania braziliensis braziliensis*: 2 estudos en pacientes de areas endemicas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 28, p. 317-24, 1986.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and molecular Pathology** v. 72, p. 132-141, 2002.

DE BEER, P; EL JARITH, A; VAN, G. M. W. A outbreak of kala-azar in the sudan. **Lancet**. v. 335, p. 224, 1990.

DESJEUX, P. Human Leishmaniasis: Epidemiology and public health aspects. **World Health Statistics Quarterly**. v. 45, p. 257-275, 1992.

DESJEUX, P. The increase in risk factor for leishmaniasis worldwide. **Trans. Review of Society Tropical Medicine and Hygiene**. v. 95, p. 239-243, 2001.

DESJEUX, P. *Leishmania*/HIV co-infection: Epidemiology in Europe. **Annual of Tropical Medicine Parasitology**. n. 97 (suppl 1), p. 53-515, 2003.

DORVAL, M.E.M.; OSHIRO, E.T.; CUPOLILLO, E.; CASTRO, A.C.C.; ALVES, T.P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar Americana no estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39 (1), p. 43-46, jan-fev, 2006.

ECHEVERRY, M. C; WINOGRAD, ENRIQUE. Efecto de la temperatura em la transformación de promastigotas em amastigotas de *Leishmania amazonensis in vitro*. **Biomédica**. v. 17, p. 112-19. junho, 2007.

EL AMIN, E.R.; WRIGTH, E.P; ABDEL, R.A.M., KDKA, A; LAARMAN, J.J; PONDMAN, K.W. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis:

compararison of ELISA – immunofluorescence and inderect haemogglutination. Trans. **Review Tropical Medicine and Hygiene.** v. 80, p. 271-4, 1986.

EVANS, D. **Handbook on isolation characaraterization and cryopreservation of *Leishmania*.**WHO. Geneva. p. 1, 1989.

FALQUETO, A. & SESSA, P.A. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: VERONESI, R. & FOCCACIA, R. **Tratado de Infectologia.**2 ed. v. 2, São Paulo, 2004.

FARAUT-GAMBARELLI, F.R.; PIARROUX, M.; DENIAU.; B. G.; MATRY,;P.M.; FAUREGE, B; DUMON, H. In vitro and in vivo resistance of *leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 41, p. 827-830, 1997.

GARCIA, A. S. Alternativas nutricionais para o crescimento in vitro e para identificação de protozoários do gênero *Leishmania*. Dissertação (Dissertação de Mestrado). São Paulo. 134p. 2007

GARDENER, P.J., CHANCE, M.L. PERTERS, W. Biochemical taxonomy of *Leishmania* II: Eletrophoretic variation of malate dehydrogenase. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 68, p.317-325, 1974.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana.** 10º ed. São Paulo. Ed. Atheneu, 2003.

GONTIJO, B. & CARVALHO,M.R.L. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 36, n.1, p. 71-80, jan-fev. 2003.

GUTIERRES, A.; SOUZA, K. S.; AURELIANO, D. P.; GARCIA, E. L.; BARBOSA, J. A. R.; SHAW, J. J.; HIRAMOTO, R. M.; TOLEZANO, J. E. Microculture for Primary Growth of *Leishmania spp*: A rapid sensitive and feasible Method in the diagnosis the Leishmaniasis In: **XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia**, 2008, Águas de Lindóia/SP. **XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia**, 2008.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**. v. 354, p. 1191–99. 1999.

HIDE, M. SINGH, R; KUMAR, B; BANULS, A. L; SUNDAR,S. A. A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients. **Acta Trop. Jun**; v. 102, n. 3, p. 197-200, 2007.

IHALAMULLA, R. L.; SIRIWARDANA, H. V.Y. D.; KARUNAWEEERA, N. D. Efficacy of RPMI 1640 and M 199 media in the isolation of *Leishmania* from cutaneous lesions. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. v. 102. n, 2. p.173-175. 2008.

JERONIMO, S; SOUSA, A; PERSON, R. *Leishmania* Species: Visceral (kalar-zar), Cutâneos, and mucocutaneos. Leishmaniasis. In: Mandell, Douglas, and Benetts Principles, and Pratic of infections Diseases. 6th ed. Philadelphia. **Churehill Livingstone**. n.46. p. 31-45. 2005.

LACERDA, M.M. The Brazilian leishmaniasis Control Program **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 89, p. 489-495. 1994.

LAINSON, R. EpidemiologiA e ecologia de Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. **Hiléia Médica**. Belém v.3, p. 35-40, 1981.

LAINSON, R. On *Leishmania enriettii* and Other Enigmatic *Leishmania* Species of the Neotropics. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.. 92, n.3, p. 377-387, May/Jun. 1997a.

LAINSON, R. *Leishmania* e leishmaniose, com especial referência à região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**. v.11. n.1, p.29-49, jan/jun. 1997.

LAINSON, R. & SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**. v.273, p. 595-600,1978.

LAINSON, R & SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of south American leishmaniasis In: *Biology of the Kinetoplastida* .Academic Press, v.2. p 1-116,1979.

LAINSON, R. & SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, Peters, W. J. & Killick-Kendrick (eds) London, Academic Press,. p 1-100. 1987a

LAINSON, R.; SHAW, J. J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Journal of the Brazilian Association for the advancement of Science**, v. 44, p.94-106. 1992.

LAINSON, R, SHAW, J.J; SILVEIRA F.T; BRAGA, R.R. American Visceral Leishmaniasis: on the origem of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transaction Review da Society Tropical Medicine and Hygiene**.v 81. p. 517. 1987a.

LAINSON, ; SHAW,J.; SILVEIRA, F. T; SOUZA, A; BRAGA, R. R; ISHIKAWA. E. A. Y. The dermal leishmaiasis of Brazil, with special reference to thr co-epidemiology of the disease in Amazônia. . **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 89, n. 3, p. 435-443. jul-set. 1994.

LAINSON, R & SHAW, J. J. Las Leishmanias y la leishmaniasis del nuevo mundo,con particular referencia al brasil. **Boletin de la oficina sanitária panamericana**. 1974.

LEWIS, D. J. LAINSON, R; SHAW, J.J. Determination of parous rates in phebotoiminae sand flies with reference to amazon species. *Bulletin of Entomological Research*. v. 60. p. 209-219, 1997.

LEONOR, L. L. MAURILIO, J. S; TEMPORAL, S.R. EEffects of Temperature on promastigotes of several species of *Leishmania*. **Journal of Eukyotic Microbiology**. v.42, p 219-223, may, 2007.

LIMA, E. B. de; PORTO, C; MOTTA, J. O. C; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. ., v. 82, n. 2, p. 111-124. 2007

LLANOS – CUENTAS, E. A. MARSDEN, P. D. LAGO, E. L., BARRETO, A.C., JONHSON, W.D. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três braços, Bahia-Brazil. An área of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. II. Cutaneous disease. Presentaion and evolution. **Revista da Sociedade brasileira de Medicina Tropical**, v.17, p. 169-177, 1994.

LIMONCU, E.M.; BALCIOGLU, C.; YERELI, K; OZEBEL, Y & OZBILGIN, A. A New experimental In Vitro Culture Médium for Cultivation of Leishmania Species. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 2430-2431, 1997.

LOUREIRO, C.C. P; DADUTIL, P; GUTIERREZ, M. C. G; SILVA, M. R. Leishmnaiose: Métodos diagnósticos. Folha Médica. v. 117. n. 2. p. 131-134, 1998.

MARQUES, C, N. S; SÁ, R; COELHO, F. OLIVEIRA, J; J. SARAIVA, C. G; MELIÇO, S. A. Leishmaniose Visceral e infecção por vírus da Imunodeficiência Humana: Na era da Terapêutica Anti-Retrovírica de Alta Eficácia. Serviços de Doenças Infecciosas do Hospital da Universidade de Coimbra.**Acta Médica Portugal**. n 20. p.291-298. Coimbra. 2003.

MARZOCHI, M. C. A et al. Vaccum aspiratory puncture system for Leishmania culturing, isolation and transport, preliminary report. Revista do Instituto Médico Tropical de São Paulo. v. 35. n. 03. p. 301-303. maio-junho de 1993.

MARZOCHI, M.C.A et al. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-emerging anthopozoonoses and possibilites for their control. Rio de Janeiro. **Cardernos de Saúde Pública**. v. 10, n. 2, p 359-375,1994.

MUNIARAJ, M. GUPTA, A. K; NARAYAN S; SINGH D; SINHA P K; KISHORE K; DAS P; BHATTACHARY, S. K. Preservation of Leishmania donovani promastigotes in blood agar slants. The journal of communicable diseases. v. 37. n. 3. p 191-5, 2005.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmniasis. **India Journal Medicine Res**. v.123, p. 311-330, 2005

NIÑO, A.; CAMACHO, M. *Leishmania (Viannia) braziliensis* growth in vitro culture relies more on folic acid availability than *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 100, n. 3, p 309-310. May 2005.

OSMAN, O. F.; OSKAM, L.; ZIJLSTRA, E. E.; et al. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal Clinical Microbiology**. v. 35, p. 2454-40, 1997.

PIMENTA, D.N. LEANDRO, A; SCHALL, V.T. A estética do grotesco e a produção audiovisual para a educação em saúde: segregação e empatia? O caso das leishmanioses no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro. n. 23 (5). P 1161-1171. maio. 2007.

PIGNATTI, M.G. Saúde e ambiente: As doenças emergentes no Brasil. **Ambiente e Sociedade**. V 7. n 1. jan-jun. 2004.

PUNTES. F.; DIAZ, D.; HOYA, R.D. et al. Cultivation and characterization of stable *Leishmania guyanensis* complex axenic amastigota derived from infected U937 cells. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. 63: 102-110. 2000.

RAMIREZ, J. R; AGUDELO, S. MUSKUS, C; ALZATE, J. F; BERBERICH, C; BARKER, D; VELEZ, I. D. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colômbia: the sampling site withn lesions influences the sensitivity of parasitological diagnosis. **Journal Clinical of Microbiology**. v.38. p. 3768-3773,2000.

REY, L. *Leishmania* e Leishmaníases: Os parasitos. **Parasitologia médica**. 4 ed. P 359-410. 2008.

ROMERO, G. A. S; SAMPAIO, R. N. R; MACÊDO, V. O; MARSDEN, P. D. Sensitivity of Lymph Node Aspiration in Localized Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n.4, p. 509-511, Jul./Aug, 1999.

SANDIGURSKI, M; BRODOSKYN, C. L. A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v. 35. p. 942-944, 1986.

SAMPAIO, R. N. R; ANDRADE, G. B. PREREIRA, A. C; SILVA, E. A; CUBA, C. A. C. Comparative study of parasitological techniques for demonstration of amastigotes and primary isolation of promastigotes in American cutaneous leishmaniasis. **Anais Brasileiros de dermatologia**. v. 77. n.5. p. 557-561. set-out, 2002.

SAMPAIO, N. R. N.; SALARO, C. P.; RESENDE, P.; PAULA, C. D. R. Leishmaniose Tegumentar Americana associada à AIDS: relato de quatro casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.35, n.6, p.651-654, nov-dez, 2002.

SHUSTER, F. L; SULLIVAN, J. J. Cultivation of Clinically Significant Hemoflagellates. American Society for Microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15. n. 3. p. 374-389, 2002.

SERIN, M. S.; DAGLIOGLU, K.; BAGIROVA, M.; ALLAHVERDIYEV, A.; UZUN, S.; VURAL, Z.; KAYAR, B.; TEZCAN, S.; YETKIN, M.; ASLAN, G.; EMEKDAS, G.; KOKSAL, F. Rapid diagnosis and genotyping of Leishmania isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of miniexon region.

SHAW, J.J. taxonomia das Leishmanias da Amazônia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 57. n.3, p. 129-132, 1982.

SHAW, J.J. Taxonomia do gênero *Leishmania*. Conceito tradicionalista x conceito moderno. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 60, p. 67-72, 1985.

SHAW, J. J. Taxonomy of the Genus Leishmania: Present e Future Trends and Their Implications. **Mémoires do instituto Oswaldo Cruz**. , v. 89, n. 3, p. 471-478, jul/sep, 1994.

SHAW, J. The leishmaniasis-survival e expansion in a changing world. A mini review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.** v.102, v.5. p.541-547. August. 2007.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. The in vitro cultivation of members of the *Leishmania braziliensis complex*. Trans **R. Soc. Trop. Med. Hyg** v. 76, p.127, 1981.

SHAW, J.J., ISHIKAWA, E.A.Y., LAINSON, R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 783-784,1989.

SILVEIRA, F. T; LAINSON, R; CORBETT, C. E. P. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro. v. 100, n.5;. p. 525-534, 2005.

SILVEIRA, F.T., ISHIKAWA, E.A.Y., DE SOUZA, A.A.A., LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the amazon region. **Parasite**, v. 9, p. 43-50, 2002.

SILVEIRA, F.T; LAINSON, R. BRITO, A. C; OLIVEIRA, M. R; PAES, M. G; ALMEIDA, A. A; SILVA, B. M. Leishmaniose Tegumentar Americana In: LEÃO, R.N.Q (Coord.) **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico.** 886p. CEJUP, 1997

SUNDAR, S; RAI, M. Laboratory Diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical Diagnosis Lab. Immunology.** v.9, p. 951-958, 2002.

URGEL, R; RECACOECHEA M; LA FUENTE, C; ORELLANA, A. H. Simple method for collection of material from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions. **Review Society Tropical Medicine and Hygiene.** v. 77.p. 882-3, 1983.

YANG, S. & ROTHMAN, R.E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **Lancet Infect Dis.** v. 4, n. 6, p. 337-48, 2004.

WHO, International Program on Chemical Safety. "Environmental Health Criteria 86: Mercury Environmental Aspects", **World Health Organization**, Geneva, 2002

WHO. Leishmaniasis: background information. Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/. Acessado em 18/11/2008a.

WHO. Leishmaniasis. For research on diseases of poverty. Disponível em www.who.int/tnd/svs/diseases/leishmaniasis/. Acessado em 19/11/2008b.

WHO. Leishmaniasis: A brief history of the disease. Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/history_disease/en/index.html/ . Acessado em 17/11/2008c.

APÊNDICES