

pneumocistose. Tomografia de crânio: achados inespecíficos. ELISA anti-HIV+. Dez dias depois, apresentou estabilidade respiratória e hemodinâmica, foi retirada do respirador. Manteve quadro febril e apresentou afasia. CD4: 6 células x mm³, carga viral: 276.915 cópias. Novamente, apresentou dispnéia grave, parada respiratória e óbito. À necropsia: observada disseminação de *Toxoplasma gondii* em cérebro, medula óssea, pulmões, pâncreas, ovários, traquéia e suprarenais, e caracterizados: encefalite, traqueíte, pneumonite intersticial, focos broncopneumônicos, adrenalite, pancreatite entre outros achados. **Conclusões.** A toxoplasmose disseminada com SARA e CIVD simulando sepse é de apresentação incomum e o relato destes dois casos que cursaram de forma semelhante sugere sua existência. Contudo, o diagnóstico deste quadro em vida foi dificultado pela inespecificidade das suas manifestações clínicas comuns às de outras patologias nestes pacientes, daí a importância da realização rotineira de necropsia nesses casos..

PR 20.

LEISHMANIOSE CUTÂNEA DISSEMINADA CAUSADA POR *LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS* COM APRESENTAÇÃO CLÍNICA ATÍPICA

Daniel Barbosa¹, Rosse Osório¹, Marcelo de Jesus Martins¹, Andréa Bomura³, Eliane G. Nascimento², Carlos César B. Nascimento², Antonio Carlos Sousa², Armando Nascimento², George S. Santana³, Aldina Barral³ e Jackson Costa³

1 - Universidade Federal da Bahia - UFBA, 2 - Centro de Referência Em Doenças Endêmicas Pirajá Da Silva - CERDEPS/PIEJ, 3 - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-CPQGM/FIOCRUZ-Bahia

Introdução/Objetivo: A Leishmaniose Tegumentar (LT) caracteriza-se por apresentar quatro formas clínicas de importância médica: cutânea localizada, difusa, disseminada e mucosa. A forma cutânea disseminada responde por 1 a 2% dos casos de LT, caracterizando-se pela presença de 20 ou mais lesões dos tipos nodulares, acneiformes e/ou ulceradas. O exame anatomo-patológico pode mostrar padrão folicular com ou sem reação granulomatosa, sendo raro o encontro de parasitas. A IDRM e a blastogênese podem ser positivas ou negativas (consideradas transitórias), e os títulos de anticorpos costumam ser elevados. Em nosso ambulatório do Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva-CERDEPS/PIEJ, acompanhamos um paciente com a forma cutânea disseminada causada por *L. braziliensis*, cujos aspectos clínico-evolutivos e laboratoriais pretendemos descrever. **Relato de caso:** E.G.S, 79 anos, masculino, negro, lavrador, procedente de Itagibá-Bahia - admitido em março/1997, com história de leishmaniose cutânea disseminada desde 1985. Fez uso de Sb⁺⁵ por cinco anos consecutivos com dose total de 303g/Sb⁺⁵. Permaneceu 4 anos com lesões ativas sem receber nenhum tipo de assistência médica. Na admissão, apresentava cerca de 100 lesões localizadas em diversos segmentos do corpo: face, membros superiores e inferiores - aspecto de polimorfismo lesional (ulcero-vegetante, tubérculos, placas infiltradas, nódulos). Iniciou-se série com Glucantime[®], dose de 15mg/Sb⁺⁵/dia/20 dias com intervalos variados. No período de 1997 a 2000, apresentou episódios de melhora clínica temporária. Em maio de 2001, utilizou-se isotionato de pentamidina 4mg/Kg/peso/dias alternados/10 doses, com melhora do quadro. Posteriormente, utilizou-se associação de Glucantime[®] 15mg/Sb⁺⁵/dia/30dias + Pentoxifilina 800mg/dia/60 dias, havendo remissão do quadro até fevereiro de 2002, quando apresentou recidiva de lesões em, dedos, cotovelos, joelhos e orelhas. Utilizou-se Glucantime[®] 15mg/Sb⁺⁵/kg/dia/60 dias + Pentoxifilina 800 mg/dia/60dias. Em janeiro de 2003, todas as lesões apresentavam remissão. Paciente retornou em junho de 2003, com lesões no 2º e 3º dedos da mão direita. Introduziu-se Pentoxifilina 800mg/dia + Azitromicina 1gr/dia/20dias. Em setembro, ainda persistia atividade no 3º dedo da mão direita, optando-se por uso de antibióticos sistêmicos. Em janeiro de 2004, encontrava-se clinicamente curado, permanecendo até dezembro de 2004 quando apresentou lesões com sinais de infiltração no lábio inferior e orelhas. Exames complementares: IDRM(+), RIFI e ELISA (reagentes), anatomopatológico (reação inflamatória crônica granulomatosa com presença de formas amastigotas de *Leishmania*), imunohistoquímica (+). **Conclusão:** Trata-se de uma forma clínica da LT transitória entre os pólos da doença, caracterizando-se por polimorfismo lesional, evolução crônica, dificuldade de resposta ao tratamento específico, simulando a forma cutânea difusa da LT, porém sem apresentar evolutivamente sinais de anergia - chama-se atenção à dificuldade de diagnóstico parasitológico e resposta terapêutica aos diversos esquemas utilizados, incluindo drogas de segunda escolha e alternativas.

PR 21

VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE NESTED-PCR PARA DETECÇÃO DAS TRÊS ESPÉCIES DE PARASITOS DE MALÁRIA HUMANA EM ÁREAS ENDÊMICAS DO ESTADO DO PARÁ - RESULTADOS PRELIMINARES.

Danielle Barbosa^{1,5}; Luciana Silva^{2,4}; Giselle Viana³; Ediclei Carmo³; José Peres⁴; José Nascimento⁴; Ivana Pimentel⁴; Marinete Póvoa⁴

1. Centro Universitário do Pará - CESUP; 2. Universidade Federal do Pará - UFPA; 3. Instituto Evandro Chagas/SVS/MS - FIDESIA; 4. Instituto Evandro Chagas/SVS/MS; 5. PIBIC/CNPQ/IEC/SVS/MS, Rodovia Br 316 - Km 07, S/ N° - Bairro: Levilândia - CEP: 67030-000 - Ananindeua - PA, E-mail: giselleviana@iec.pa.gov.br

Introdução: A microscopia convencional pela Gota Espessa (GE) é o método de escolha para o diagnóstico da malária em áreas endêmicas sobretudo devido ao baixo custo e sensibilidade e especificidade satisfatórias. Porém, a identificação correta dos agentes etiológicos da malária humana e o nível de detecção pela microscopia depende de alguns fatores, como: experiência do microscopista, coloração adequada das lâminas, manutenção dos microscópios, tempo gasto para examinar cada lâmina, etc. Para superar algumas das limitações da microscopia convencional para a malária, métodos baseados na Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (PCR) têm sido desenvolvidos para a detecção e identificação de parasitos de malária e em estudos epidemiológicos por detectar infecções mistas, baixos níveis de parasitemia, avaliar a quimioterapia utilizada e a eficácia de vacinas. **Objetivos:** Validar a técnica de Nested-PCR para detecção dos três agentes etiológicos da malária humana (*P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*) em áreas endêmicas do Estado do Pará e comparar os resultados obtidos pelo Nested-PCR com os da microscopia convencional pela GE corada pelo Giemsa realizada no IEC. **Material & Métodos:** Neste estudo preliminar foram incluídas 30 amostras de sangue total preparadas em membrana de fibra de vidro Whatman[®] de 2,5 cm de diâmetro (Titerk, ICN Biomedicals - England) oriundas das localidades de Novo Repartimento e Parauapebas (PA), além de controles positivos para as três espécies de plasmódios (*P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*) e água destilada estéril como controle negativo. Estas membranas foram preparadas, lavadas e submetidas ao Nested-PCR para amplificação da subunidade pequena do gene 18S do RNA ribossômico (ssurRNA) de *Plasmodium* por meio da utilização dos seguintes oligonucleotídeos: P1 (5' - ACG ATC AGA TAC CGT CGT AAT CTT - 3') e P2 (5' - GAA CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCA T - 3') na 1ª etapa como oligonucleotídeos universais e F2 (5' - CAA TCT AAA AGT CAC CTC GAA AGA TG - 3'), M1 (5' - GGA AGC TAT CTA AAA GAA ACA CTC ATA T - 3') e V1 (5' - CAA TCT AAG AAT AAA CTC CGA AGA GAA A - 3') específicos para *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax* respectivamente, utilizados na 2ª etapa do teste. A visualização das amostras testadas foi realizada em gel de agarose a 2% e coloração em brometo de etídio. **Resultados:** Quatro amostras foram descartadas por contaminação. Das 26 amostras testadas pelo Nested-PCR, 92,31% (24/26) apresentaram resultados semelhantes aos da GE, 3,84% (1/26) foi negativa pelo Nested-PCR e positiva para *P. falciparum* pela GE e o restante 3,84 (1/26) foi positiva para *P. vivax* pela GE e obteve o resultado de mista (*P.*

vivax + *P. falciparum*) pelo Nested-PCR. **Conclusão:** Os resultados preliminares obtidos indicam boa correlação entre o grupo de amostras positivas pela GE do IEC e testadas pelo Nested-PCR, contudo há necessidade de aumentar o número amostral, sobretudo com inclusão de grupo de amostras sabidamente negativas para determinação de parâmetros estatísticos que permitam a validação da técnica de Nested-PCR.

Fontes financiadoras: RAVREDA/SVS/OPAS, IEC/SVS/MS.

PR 22

ESTUDO BIOLÓGICO DE UM ISOLADO DE *Trypanosoma* sp OBTIDO DE CÃO DOMÉSTICO NO MUNICÍPIO DO RIO JANEIRO, RJ, BRASIL

Juliana H.S. Barros^{1,*}, Maria F. Madeira¹, Cathia M.B. Serra², Maurilio J. Soares³, Cibele Baptista¹, Cristianni A. Leal¹, Cíntia X. Melo¹ & Mauro C.A. Marzochi^{1,4}

¹Serviço de Parasitologia, Centro de Referência em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fiocruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ; ²Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Niterói, RJ; ³Lab. Biologia Celular de Microrganismos, Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz; ⁴Secretaria Municipal de Saúde (SMS/RJ), Rio de Janeiro, RJ; *Bolsista do Programa Integrado de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), CNPq / Fiocruz.

Introdução: Cães domésticos (*Canis familiaris*) estão associados à infecção natural com diferentes protozoários da família Trypanosomatidae, principalmente dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. Durante um estudo com cães soro-reatores para Leishmaniose no Município do Rio de Janeiro, RJ, foi encontrado um cão co-infestado por *Leishmania (V.) braziliensis* e por *Trypanosoma* sp, sendo este último isolado em meio axênico a partir do cultivo de fragmentos de pele íntegra da região escapular. **Objetivo:** Estudar morfológicamente o *Trypanosoma* sp isolado de cão: quais as formas evolutivas presentes em meio de cultura e qual o potencial infectivo "in vitro" em macrófagos murinos. **Materiais & Métodos:** Curva de crescimento foi realizada em meio Schneider com 10% de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram incubadas a 26-28°C e o número de parasitas avaliado por contagem em câmara de Neubauer diariamente, durante 10 dias. Foram examinadas lâminas coradas pelo Giemsa para cada ponto da curva. Adicionalmente, formas de cultura de 15 dias foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão. O potencial infectivo "in vitro" foi verificado em macrófagos obtidos de camundongos albinos "outbreak", a partir de lavado peritoneal com meio RPMI. Uma suspensão contendo 1x10⁶ macrófagos foi colocada em placas de Petri contendo lâminulas, incubadas a 37°C / 5% CO₂. Após 24 horas de cultivo, os macrófagos foram expostos às formas de cultura do parasita (12º dia de cultivo), contendo cerca de 7% de formas tripomastigotas. Lâminulas foram lavadas, coradas e examinadas em 3, 24, 48 e 72h pós-infecção. **Resultados:** A curva de crescimento, iniciada com 1x10⁶ parasitas por mL de meio, alcançou seu pico máximo entre o 4º e o 5º dia, obtendo-se 5,38x10⁶ parasitas/mL. Lâminas coradas mostraram epimastigotas típicos finos e bem longos, com membrana ondulante bem evidente. Formas tripomastigotas não foram observadas durante a curva. No entanto, quando cultivados em meio bifásico (NNN/Schneider) demonstrou cerca de 7% de formas tripomastigotas no 12º dia de cultivo. Análise ultra-estrutural demonstrou a presença de epimastigotas e de células arredondadas com grandes vacúolos que preenchiam quase todo o espaço citoplasmático. Com 3h pós-infecção em macrófagos verificou-se inúmeros parasitas aderidas à superfície das células, já com 24 e 48h se observava a interiorização e destruição dos protozoários. Após 72h foram encontrados macrófagos repletos de vacúolos. **Conclusão:** A correta identificação de novos isolados de tripanosomatídeos possui grande valor nas ações de vigilância epidemiológica. Desse modo, os dados biológicos e morfológicos encontrados neste estudo, contribuem também para o processo de identificação. Outras metodologias estão sendo aplicadas visando a caracterização definitiva da amostra.

Apoio: CNPq - IPEC / Fiocruz

PR 23

PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS DE ESTUDO EM ASPIRADO ESPLÊNICO E DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS *IN SITU* NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Stella Maria Barrouin-Melo^{a,b}, Daniela F. Larangeira^a, Silvana O. Santos^a, Paulo H. P. Aguiar^{a,b}, Mariza Paixão^c, Washington L. C. Dos-Santos^a, Lain Pontes-de-Carvalho^a

(a) Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ, R. Waldemar Falcão, 121, Salvador, BA.CEP: 40295-001; (b) Escola de Medicina Veterinária – UFBA, Av. Ademar de Barros, 500, Salvador, BA, CEP: 40170-000; (c) Laboratório Central do Estado da Bahia – R. Waldemar Falcão, 123, Salvador, BA, CEP: 40296-710.

Introdução: A biópsia esplênica por aspiração percutânea com agulha fina é útil no diagnóstico parasitológico da leishmaniose visceral e na avaliação de populações celulares para o diagnóstico de doenças linfoproliferativas, em seres humanos ou outros animais. Há, porém, necessidade de padronização do exame de amostras caninas. Neste trabalho, examinamos as populações leucocitárias em aspirados esplênicos de cães sadios ou portadores de leishmaniose visceral. **Objetivo:** Padronizar e validar métodos de estudo em aspirados esplênicos de cães, para a definição de parâmetros imunológicos *in situ*, passíveis de aplicação na rotina clínica ou no monitoramento de intervenções experimentais (terapêuticas ou vacinais). **Material & Métodos:** Previamente, as técnicas para obtenção de preparados por citocentrifugação de leucócitos totais esplênicos e de sangue periférico foram padronizadas utilizando-se seis animais saudáveis. As células foram coradas (Wright) para contagem diferencial comparativa de leucócitos esplênicos e do sangue periférico, ou utilizadas para padronização das técnicas de imunofluorescência e imunocitoquímica com anticorpos monoclonais (AcMos) específicos para leucócitos de cão, anti-CD4 (YKIX 302), anti-CD8 (YCATE 55), anti-CD45RA (YKIK 753), anti-CD45RB (YKIX 716), anti-CD45 (AB6) e anti-monócitos/macrófagos (IH1). Para validação das técnicas, foram estudados cães de uma área endêmica para leishmaniose visceral (Litoral Norte do Estado da Bahia). Dez animais apresentavam *Leishmania chagasi* em cultivo de aspirado esplênico, sorologia (ELISA) positiva e quadro clínico compatível com leishmaniose visceral. Dez outros animais eram saudáveis, com sorologia e estudo parasitológico de aspirados esplênicos negativos para leishmaniose. **Resultados:** A contagem diferencial revelou que as proporções de linfócitos foram significativamente maiores ($P = 0,0081$, teste t) e as de neutrófilos menores ($P = 0,0134$) em aspirados esplênicos em comparação com as observadas em sangue periférico, tanto de animais saudáveis, quanto de portadores de leishmaniose visceral ($P < 0,05$). Entretanto, a comparação entre amostras de aspirado esplênico de animais doentes e sadios evidenciou maior proporção de neutrófilos e menor de linfócitos ($P < 0,0001$) nos animais doentes. As diferenças na razão neutrófilos/linfócitos entre sangue periférico (3,2: 1) e aspirado esplênico (0,27: 1) foram mais evidentes em animais sadios do que em portadores de leishmaniose visceral (3,5: 1 e 1,8:1 respectivamente). Os ensaios de imunofluorescência e imunocitoquímica possibilitaram a identificação de subpopulações celulares distintas, identificadas especificamente pelos anticorpos monoclonais. **Conclusões:** O material aspirado do baço tem um perfil celular diferente do observado no sangue periférico. As técnicas de contagem diferencial, imunocito-