

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**



VITÓRIA
2010

MARCO ANDRÉ LOUREIRO TONINI

**DESCRIÇÃO DE UM NOVO FOCO DE CALAZAR CANINO
AUTÓCTONE NO MUNICÍPIO DA SERRA, REGIÃO
METROPOLITANA DE VITÓRIA, ES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Reynaldo Dietze

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Elenice Moreira Lemos

**VITÓRIA
2010**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Tonini, Marco André Loureiro, 1984-
T665d Descrição de um novo foco de calazar canino autóctone no município da Serra, Região Metropolitana de Vitória, ES / Marco André Loureiro Tonini. – 2010.
96 f. : il.

Orientador: Reynaldo Dietze.

Co-Orientadora: Elenice Moreira Lemos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Leishmaniose visceral - Serra (ES). 2. Leishmaniose visceral - Vitória, Região Metropolitana de (ES). 3. Cão - Doenças. I. Dietze, Reynaldo. II. Lemos, Elenice Moreira. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

O mestrando MARCO ANDRÉ LOUREIRO TONINI, apresentou dissertação intitulada: “DESCRIÇÃO DE UM NOVO FOCO DE CALAZAR CANINO AUTÓCTONE NO MUNICÍPIO DA SERRA, REGIÃO METROPOLITANA DE VITÓRIA-ES” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu, **aprovar sem restrições**, a dissertação e habilitar o farmacêutico MARCO ANDRÉ LOUREIRO TONINI, a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 27 de julho de 2010

Prof. Dr. Edelberto Santos Dias
(Membro Externo)

Prof. Dr. Jeffrey Jon Shaw
(Membro Externo)

Profa. Dra. Blima Fux
(Membro Interno)

Prof. Dr. Reynaldo Dietze
(Orientador)

A minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Obrigado pelo amor, carinho e incentivo dispensados durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Reynaldo Dietze, orientador deste trabalho e diretor do Núcleo Doenças Infecciosas. Obrigado pela oportunidade, confiança e ensinamentos transmitidos durante esta caminhada.

À Prof. Dra. Elenice Moreira Lemos, co-orientadora desta dissertação e chefe do Laboratório de Leishmanioses, por me receber em seu laboratório e pelo apoio na condução deste trabalho. A sua dedicação, seriedade e disciplina são impressionantes. Estes anos de convivência contribuíram muito para a minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, professor da pós-graduação e “orientador” de todas as dissertações de mestrado do NDI, obrigado pelos sábios ensinamentos e incentivo prestado durante o mestrado. Seu vigor e alegria na transmissão do conhecimento são inspiradores.

Aos amigos do Laboratório de Leishmanioses: Aretha, Lucas, Marcela, Priscila, Renata, Laura, Mauro, Nayana, Camila, Juliana, Gilson, Mariela, Lygia e Jauber, pela agradável companhia e apoio nestes anos de convivência.

Aos amigos da turma de mestrado: Carol, Eliana, Mayra, Priscila, Thais e Thiago. Obrigado pela amizade e alegria compartilhadas durante o mestrado. Espero que nossa amizade perdure e que possamos trilhar outras experiências profissionais juntos.

À amiga Mayra, pela imprescindível ajuda na realização das necropsias e punção de medula óssea dos cães.

Às veterinárias do CCZ da Serra, Virginia e Carla, e aos funcionários deste centro. Sou imensamente grato pelo importante auxílio prestado no desenvolvimento da parte prática deste estudo.

Ao biólogo da prefeitura da Serra, Joelson Simões, e sua equipe, pela essencial ajuda prestada na seleção das residências para a instalação das armadilhas para captura de flebotomíneos.

Ao Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis e seu aluno Wendel Coura Vital, pela ajuda e disponibilidade em realizar experimentos em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Edelberto Santos Dias e aos amigos do Lalei, obrigado pela recepção e aprendizado adquirido durante a semana em que passei no laboratório de vocês. Sou grato também pela disponibilidade em identificar os exemplares de flebotomíneos.

Ao Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta e à Dra. Ana Paula Marques Duarte, pela imprescindível contribuição e participação neste trabalho.

A todos os funcionários do NDI pela atenção e disponibilidade sempre que necessário.

A minha família, pelo incentivo e amor inigualáveis. Obrigado pela dedicação ao meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a Deus pelo dom da vida. Obrigado por me fortalecer na fé e me confortar nos períodos de tribulações.

“O verdadeiro homem mede a sua força, quando se defronta com o obstáculo.”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Apesar da Região Metropolitana de Vitória (RMV) ser considerada indene para leishmaniose visceral (LV), um recente inquérito soropidemiológico com cães errantes da RMV, detectou sorologia positiva (*Kalazar Detect Canine*) em sete de 158 (4,4%) animais, sugerindo a hipótese da existência da LV nesta região. Com o intuito de ratificar estes dados, 201 cães do município da Serra foram investigados para LV, utilizando testes sorológicos, parasitológicos e moleculares. Deste total, 13% (26/201) e 5,97% (12/201) apresentaram respectivamente resultados positivos no teste ELISA “in house” e *Kalazar Detect*. Nenhum animal foi soropositivo para os testes RIFI e ELISA (Biomanguinhos). Dois cães soropositivos apresentaram cultura positiva para *Leishmania (Leishmania) chagasi* e quatro animais apresentaram PCR positivo para o gênero *Leishmania*. Além disso, um óbito humano por LV foi registrado em associação a dois casos caninos da doença (ambos com *Kalazar Detect* positivo e um com cultura positiva). A investigação epidemiológica mostrou que ambos os cães foram nascidos e criados na Serra e não possuíam história de viagem para áreas endêmicas para LV. O outro cão com cultura positiva foi capturado pelo Centro de Controle de Zoonoses da Serra a 550 metros da residência da paciente. Apesar da espécie *Lutzomyia longipalpis* não ter sido encontrada, outras espécies de flebotomíneos foram capturadas: *L. edwardsi*, *L. tupynambai*, *L. cortelezzii*, *L. sordellii* e *L. intermedia*. Nossos resultados sugerem fortemente a existência da LV canina autóctone no município da Serra e o primeiro caso autóctone humano neste município, embora não confirmado devido a paciente ser natural de uma área endêmica para a doença.

Palavras-chave: leishmaniose visceral canina autóctone - Região Metropolitana de Vitória – Estado do Espírito Santo – Município da Serra.

ABSTRACT

Although the Metropolitan Region of Vitória, Espírito Santo state, is considered a free visceral leishmaniasis (VL) area, a recent canine seroepidemiological inquiry revealed that 7 out of 158 (4,4%) stray dogs were seropositive (*Kalazar Detect*) for VL, suggesting the existence of autochthonous VL in this region. In order to clarify these findings, 201 dogs from Serra municipality were screened for VL, using serological, parasitological and molecular tests. Of this total, 13% (26/201) and 5,97% (12/201) were positive for ELISA “in house” and *Kalazar Detect* tests, respectively. None of the dogs was positive for RIFI and ELISA assays (Biomanguinhos). Two seropositive dogs presented positive culture for *Leishmania (Leishmania) chagasi*, and four were PCR positive for the *Leishmania* genus. Additionally, one human VL case was reported in association with 2 canine cases (both of them positive for *Kalazar Detect* and one had a positive culture). The epidemiological investigation showed that both dogs were born in Serra and never travelled to VL endemic areas. The other dog with a positive culture was captured by the Zoonosis Control Center 550 meters far from the patient’s dwellings. Although the *Lutzomyia longipalpis* species was not detected, others phlebotomine sand fly species were found such as *L. edwardsi*, *L. tupynambai*, *L. cortelezzii*, *L. sordellii*, and *L. intermedia*. Our results strongly suggest the existence of autochthonous canine VL and the first autochthonous human case of the disease in Serra, though this cannot be confirmed because the patient was native from an endemic area for VL.

Keywords: autochthonous canine visceral leishmaniasis - Metropolitan Region of Vitória – Espírito Santo state - Serra municipality.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ciclo evolutivo da *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Adaptado do CDC (Centers for Disease Control and Prevention) 27
- Figura 2** – Mapa do Município da Serra, segundo distritos 45
- Figura 3** – Formas promastigotas de *Leishmania* isoladas em cultura a partir de medula óssea de cão procedente do Município da Serra, ES..... 63
- Figura 4** – Gel de poliacrilamida 6% mostrando produtos de PCR da região conservada do minicírculo de kDNA de *Leishmania* gerados após digestão com a enzima de restrição *Hae* III. MM, marcador molecular de 100 pb; B, branco; Lc, *Leishmania (L.) chagasi* (PP75); Lb, *L. (V.) braziliensis* (M2903); La, *L. (L.) amazonensis* (M2269); C84 e C2304, cães procedentes do Município da Serra, ES.... 64
- Figura 5** – Gel de poliacrilamida 6% mostrando produtos de PCR obtidos após amplificação de uma sequência de nucleotídeos de 120 pb da região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania*. MM, marcador molecular de 100 pb; 1, Controle negativo; Lc, Lb e La – Cepas de referência de *Leishmania*: *L. (L.) chagasi* (PP75), *L. (V.) braziliensis* (M2903), *L.(L.) amazonensis* (M2269), respectivamente; 44, 170, 56 e 09A, fragmento de 120 pb do kDNA de *Leishmania* amplificado a partir de DNA extraído de creme leucocitário de quatro cães com resultado positivo para o teste *Kalazar Detect Canine*; 2577, 2304, 56R e 85, cães com resultado negativo para PCR 64
- Figura 6** – Cão com sorologia positiva (*Kalazar Detect Canine*) e PCR positivo para o gênero *Leishmania* apresentando sinais clínicos sugestivos de LV. Nota-se profundo emagrecimento, apatia e onicogribose..... 65
- Figura 7A** – Cão errante, capturado no bairro Carapina Grande, Município da Serra, ES. **B** – Cão domiciliado prodecente do bairro André Carlone, Município da Serra, ES. Os dois animais apresentaram sorologia (*Kalazar Detect Canine*) reagente e mielocultura positiva para *Leishmania*, identificada como *L. (L.) chagasi*. Notar o aspecto saudável dos animais. 66
- Figura 8** – Localização geográfica do caso humano de LV e armadilhas com e sem presença de flebotomíneos, bairros André Carlone e Carapina Grande, Município da Serra, Espírito Santo. A imagem foi obtida pelo software Google Earth, versão 5.0.1... 69
- Figura 9** – Localização geográfica do caso humano de LV, cães com mielograma positiva para *L. (L.) chagasi* e cães *Kalazar Detect Canine* e PCR positivo, bairros André Carlone e Carapina Grande, Município da Serra. A imagem foi obtida pelo software Google Earth, versão 5.0.1.. 70

Figura 10 – Quintal das residências localizadas nos bairros Carapina Grande (A) e André Carlone (B) em cujos peridomicílios foram encontrados exemplares de flebotomíneos.....71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - População canina incluída no estudo no período de Novembro de 2008 a Maio de 2009.....	60
Tabela 2 - Resultados da triagem sorológica (IgG) nos 201 animais do estudo, utilizando ELISA e RIFI (Biomanguinhos), ELISA “in house” e <i>Kalazar Detect Canine</i> , Serra, ES.....	61
Tabela 3 – Resultados do teste ELISA “in house” para cães procedentes do bairro André Carlone e Centro de Controle de Zoonoses da Serra.....	62
Tabela 4 – Resultados do teste <i>Kalazar Detect Canine</i> para cães procedentes do bairro André Carlone e Centro de Controle de Zoonoses da Serra.....	62
Tabela 5 – Resultados de cultura, RIFI e ELISA (Fiocruz-Biomanguinhos), ELISA “in house”, <i>Kalazar Detect Canine</i> e PCR para gênero <i>Leishmania</i> de cães do Município da Serra, ES.....	67
Tabela 6 – Espécies de flebotomíneos capturados nos bairros André Carlone e Carapina Grande, Município da Serra	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS:** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- BOD:** Demanda Bioquímica de Oxigênio
- BPC:** Boas Práticas de Fabricação
- CCZ:** Centro de Controle de Zoonoses
- CDC:** *Centers for Disease Control and Prevention*
- COBEA:** Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- CPqRR:** Centro de Pesquisas Rene Rachou
- DAT:** *Direct Agglutination Test*
- DNA:** Ácido desoxirribonucléico
- DO:** Densidade óptica
- dot ELISA:** *dot enzyme-linked immunosorbent assay*
- DP:** Desvio padrão
- EDTA:** *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- EIA:** *Enzyme Immunoassay*
- ELISA:** *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
- ES:** Estado do Espírito Santo
- FIOCRUZ:** Fundação Oswaldo Cruz
- GPS:** *Global Positioning System*
- HCl:** Ácido Clorídrico
- HIV:** *Human Immunodeficiency Virus*
- IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia
- IFI:** *Indirect Immunofluorescence*
- IgG:** Imunoglobulina G
- ITS-1:** *Internal Transcribed Spacer*
- LACEN:** Laboratório Central de Saúde Pública
- LIT:** *Liver Infusion Tryptose*
- LTA:** Leishmaniose Tegumentar Americana
- LV:** Leishmaniose visceral
- LVC:** Leishmaniose visceral canina
- MEIA:** *Microparticle Enzyme Immunoassay*
- MG:** Estado de Minas Gerais
- MgCl₂:** Cloreto de Magnésio

mkDNA: Minicírculos de DNA do cinetoplasto

MG: Estado de Minas Gerais

MM: Marcador Molecular

MS: Ministério da Saúde

M2269: Cepa de referência para *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

M2903: Cepa de referência para *Leishmania (Viannia) braziliensis*

NDI: Núcleo de Doenças Infecciosas

NNN: *Novy, MacNeal e Nicolle*

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPAS: Organização Pan Americana de Saúde

pb: Pares de bases

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PCLV: Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

pH: Potencial hidrogeniônico

PP75: Cepa de referência para *Leishmania (Leishmania) chagasi*

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta

RJ: Estado do Rio de Janeiro

RMGV: Região Metropolitana da Grande Vitória

RPM: Rotação por minuto

ROC: *Receiver Operating Characteristic Curve*

RS: Estado do Rio Grande do Sul

SESA: Secretaria Estadual de Saúde

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SP: Estado de São Paulo

SRD: Sem Raça Definida

TMB: Tetrametilbenzidina

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1 LEISHMANIOSES	19
2 LEISHMANIOSE VISCERAL	20
2.1 HISTÓRICO	20
2.2 EPIDEMIOLOGIA: EXPANSÃO GEOGRÁFICA E URBANIZAÇÃO DA LV NO BRASIL.....	23
2.3 TRANSMISSÃO	26
2.4 RESERVATÓRIOS DA <i>Leishmania (L.) chagasi</i>	28
2.5 APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA LV.....	30
2.5.1 Humanos	30
2.5.2 Cães.....	31
2.6 DIAGNÓSTICO DA LV	31
2.6.1 Parasitológico.....	31
2.6.2 Imunológico	32
2.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	35
2.7 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA LV NO BRASIL	37
OBJETIVOS	41
1 OBJETIVOS GERAIS.....	42
MATERIAL E MÉTODOS	43
1 DESENHO DO ESTUDO	44
2 JUSTIFICATIVA PARA A REALIZAÇÃO DO ESTUDO	44
3 ÁREA DO ESTUDO	44
4 POPULAÇÃO CANINA DO ESTUDO	46

5 AMOSTRAS CLÍNICAS	47
5.1 SANGUE PERIFÉRICO	47
5.2 MEDULA ÓSSEA	47
5.3 BAÇO E FÍGADO	48
6 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	48
6.1 <i>KALAZAR DETECT CANINE</i>	49
6.2 RIFI (BIOMANGUINHOS – FIOCRUZ).....	49
6.3 ELISA (BIOMANGUINHOS - FIOCRUZ)	50
6.4 ELISA “in house”	50
7 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	51
7.1 EXAME PARASITOLÓGICO DIRETO	51
7.2 CULTURA	52
8 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	52
8.1 EXTRAÇÃO DO DNA.....	52
8.1.1 Extração de DNA de <i>Leishmania</i> a partir de cultura de promastigotas	53
8.1.2 Extração de DNA a partir de medula óssea e creme leucocitário	54
8.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA O GÊNERO <i>Leishmania</i> .	55
8.3 PCR-RFLP PARA IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE DE <i>Leishmania</i>	55
9 INVESTIGAÇÃO ENTOMOLÓGICA	56
10 ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-MAXADILAN	57
11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	58
RESULTADOS	59
1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO CANINA	60
2 TRIAGEM SOROLÓGICA, EXAMES PARASITOLÓGICOS E MOLECULARES PARA LVC	61

3 INVESTIGAÇÃO ENTOMOLÓGICA.....	68
DISCUSSÃO	72
CONCLUSÕES	77
RECOMENDAÇÕES.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS	94
ANEXO A - Ficha de Investigação – Inquérito Sorológico Canino para LV	95

INTRODUÇÃO

1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses compreendem um complexo de doenças infecciosas causadas por protozoários flagelados da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). São endêmicas em diversas áreas tropicais e subtropicais do mundo, abrangendo 88 países, onde constituem um significativo problema de saúde pública, sobretudo para as populações pobres destas regiões (WHO, 2006). Até o momento, já foram descritas 20 espécies de *Leishmania* patogênicas para o homem e 30 espécies de flebotomíneos vetores. Estes protozoários são responsáveis por uma diversidade de manifestações clínicas, influenciadas principalmente, pela virulência da cepa infectante e pelo “status” imunitário e nutricional do hospedeiro (DESJEUX, 2004). Este espectro clínico varia desde infecções assintomáticas, doença cutânea e/ou mucosa e doença visceral, tendo como característica o comprometimento de órgãos do sistema fagocítico mononuclear. Desta forma, as leishmanioses são separadas do ponto de vista didático em leishmaniose tegumentar (cutânea e mucosa) e leishmaniose visceral (LV) ou calazar (GRIMALDI & TESH, 1993; PEARSON & SOUZA, 1996).

A transmissão do parasita, com poucas exceções, é feita através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos genericamente como flebotomíneos. Estes insetos estão agrupados em seis gêneros, dos quais apenas dois apresentam importância epidemiológica: *Phlebotomus* (RONDANI & BERTÉ, 1840) no Velho Mundo e *Lutzomyia* (LUTZ & NEIVA, 1912) no Novo Mundo (DESJEUX, 1996).

Dentre as leishmanioses, a visceral é a forma mais grave da doença por evoluir para o óbito na quase totalidade dos casos (>95%) se não tratada (CHAPPUIS et al. 2007). Os agentes etiológicos da LV são membros do complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* (LAINSON & SHAW, 1987), que engloba três espécies: *Leishmania (Leishmania) donovani* (LAVERAN & MESNIL, 1903), que é agente causador de uma antroponose no sul do continente asiático (Índia, Bangladesh e Nepal) e no leste africano, *Leishmania (Leishmania) infantum* (NICOLLE, 1908), encontrada na região do Mediterrâneo, Oriente Médio e parte do continente asiático, sendo uma zoonose de canídeos silvestres, tendo o cão como reservatório doméstico do protozoário, e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS,

1937), que é agente etiológico de uma zoonose nas Américas, de forma semelhante à *L.(L.) infantum* (BERN, MAGUIRE & ALVAR, 2008).

No Brasil, a leishmaniose visceral é considerada uma zoonose de notável importância médica e veterinária, tendo os canídeos como principais reservatórios. Historicamente a LV é identificada como uma endemia predominantemente de áreas rurais ou silvestres. Entretanto, a partir da década de 1980, houve uma expansão progressiva da endemia para áreas urbanas em quase todo o país, aumentando ainda mais sua importância no contexto da nossa saúde pública.

Por ser objeto do presente estudo, a leishmaniose visceral será abordada em mais detalhes a seguir.

2 LEISHMANIOSE VISCERAL

2.1 HISTÓRICO

Os primeiros relatos sobre a LV remontam à Grécia em 1835, onde a doença era conhecida como “ponos” ou “haplopinakon”. Entretanto, foi na Índia em 1869, que os termos sânscritos “kalaazar” (pele negra) ou “Kala-jwar” (febre negra) foram primeiramente utilizados (MARZOCHI et al. 1981; WHO, 2010). Dois médicos, militares britânicos, o major William Boog Leishman, e o major Charles Donovan que também era professor de fisiologia da Universidade de Madras na Índia, descreveram pela primeira vez, e de forma independente, o agente etiológico da LV. Leishman, em 1901, identificou o protozoário em material esplênico obtido de necropsia de um soldado que havia falecido na cidade de Dum Dum na Índia em decorrência de uma febre conhecida localmente como “febre Dum-Dum” ou “kalazar”. Na ocasião sugeriu que o parasita que acabara de ver era uma “forma involutiva” de um *Trypanosoma* (LEISHMAN, 1903). Três meses depois, em um Hospital em Madras, distante 1.728 km de Dum Dum, Donovan observou microorganismos similares em esfregaços de material esplênico de pacientes falecidos com hipótese diagnóstica de malária (DONOVAN, 1903). Laveran & Mesnil (1903), sugeriram que estes parasitas poderiam ser piroplasmas e os nomearam *Piroplasma donovani*. Ronald Ross, em 1903, reconhecendo o pioneirismo de Leishman e Donovan na descoberta dos parasitas reformulou a

nomenclatura do protozoário para *Leishmania donovani*, criando posteriormente o gênero *Leishmania* (ROSS, 1903).

Em 1908, Nicolle e Comte foram os primeiros a descrever a leishmaniose visceral canina (LVC), ao examinarem animais naturalmente e experimentalmente infectados na cidade de Tunis na Tunísia. Essas observações iniciais tinham como objetivo principal investigar o papel do cão como reservatório natural da doença (NICOLLE & COMTE, 1908). A partir da correlação entre o agente etiológico e as manifestações clínicas da doença uma imensa área de transmissão da doença começou a ser delimitada em todo o mundo. A LV já foi descrita em 65 países de quatro continentes: Americano, Europeu, Africano e Asiático. Ainda não existem relatos da doença na Oceania e Antártida.

Nas Américas, o provável primeiro caso autóctone humano de LV foi descrito no Paraguai por Migone em 1913, em um paciente italiano nascido em Padova, cidade localizada na bacia do mediterrâneo. Este paciente havia morado também no Brasil durante 14 anos, onde trabalhou na construção da estrada de Ferro São Paulo – Corumbá. Os primeiros sintomas do paciente (febre, calafrios e diarreia) surgiram ainda em Porto Esperança, município de Corumbá. O paciente foi atendido na ocasião em um hospital de campanha em Corumbá. Em fevereiro de 1911 os sintomas retornaram e o paciente foi tratado com quinino sem sucesso. Em maio do mesmo ano o paciente foi atendido em Assunção com piora dos sintomas da doença (emagrecimento, anemia, manchas na pele, edema, aumento do volume abdominal, dispnéia, enterorragia e epistaxes). Ao exame físico apresentava hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia generalizada. Um novo tratamento com quinino foi tentado sem sucesso. Durante a investigação clínica detectou-se formas amastigotas de *Leishmania* no sangue periférico do paciente, confirmadas posteriormente em material de punção hepática e esplênica. O paciente foi então tratado com Salvarsan (606 Ehrlich), 600mg intramuscular. Apesar da melhora clínica do paciente com regressão da hepatomegalia e retorno do apetite o parasita continuava presente no sangue periférico. O paciente faleceu subitamente 30 dias após o tratamento (MIGONE, 1913).

No Brasil, os primeiros relatos de calazar datam de 1911 quando Carlos Chagas ao percorrer o Vale do Amazonas suspeitou da ocorrência da doença naquela região (PESSOA, 1978). Entretanto, a importância da leishmaniose visceral americana como um problema de saúde pública só ficou evidente após 1932, quando o Dr. Henrique Penna do Serviço de Viscerotomia da Fundação Rockefeller ao examinar 47.000 amostras de fígado de pacientes suspeitos de terem morrido por febre amarela em diversas áreas rurais do Brasil, detectou parasitas morfológicamente idênticos à *Leishmania donovani* em 41 deles (0,08%). Penna observou ainda que a maioria das mortes ocorria em crianças e que o principal foco da doença se situava nos estados do Nordeste, particularmente o Ceará (PENNA, 1934; CHAGAS, 1936).

Em 1936, diante dos achados de Penna, Carlos Chagas, então Diretor do Instituto Oswaldo Cruz, designou seu filho Evandro Chagas, para liderar uma comissão encarregada de estudar a epidemiologia da leishmaniose visceral no Brasil. Em seu primeiro estudo, realizado no estado do Sergipe, Evandro Chagas descreveu clinicamente o primeiro caso vivo de leishmaniose visceral no Brasil: um garoto de 16 anos cuja irmã havia falecido com LV diagnosticada *post mortem* através de viscerotomia realizada por Penna. Além desta descrição, o grupo de Evandro Chagas contribuiu significativamente para o estudo da LV através de dois achados importantes: o encontro de animais domésticos (7 cães e 1 gato) infectados por *L.(L.) chagasi* e a observação de que o inseto hematófago encontrado freqüentemente dentro e nos arredores dos domicílios dos pacientes com LV era o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* (CHAGAS, 1936). Chagas e Cunha, embora não tenham notado diferenças morfológicas entre a *Leishmania* isolada de casos americanos e as espécies provenientes do Velho Mundo (*Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*), observaram à época, características biológicas distintas desta espécie como p.ex. menor susceptibilidade dos animais de laboratório e diferenças encontradas nas provas de aglutinação utilizando soros hiperimunes de coelhos, capazes de distinguir a espécie americana das do Velho Mundo. Segundo os autores, estas observações justificariam a criação de uma nova espécie – *Leishmania chagasi* – assim designada em homenagem a Carlos Chagas (DEANE, 1938).

Com a morte prematura de Evandro Chagas em 1940 o interesse no estudo da leishmaniose visceral no Brasil sofreu um impacto negativo, sendo retomado somente em 1953, quando aproximadamente 100 habitantes da pequena cidade de Sobral, no interior do estado do Ceará, morreram em um grave surto de calazar. Este fato chamou a atenção das autoridades de saúde, que organizaram um inquérito para estudar a epidemiologia da doença. Três figuras proeminentes da medicina tropical brasileira foram convocadas: Joaquim Eduardo Alencar, Tomás Aragão, e o casal Leônidas e Maria Deane. No Ceará, eles deram duas contribuições vitais para o estudo da doença: encontro de infecções maciças de flagelados, considerados por eles promastigotas de *L. (L.) chagasi*, em espécimes de *L. longipalpis* capturados em ambiente silvestre, e o encontro de raposas *Lycalopex vetulus* naturalmente infectadas por este protozoário (DEANE & DEANE, 1954 a,b; LAINSON & RANGEL, 2005).

A partir de 1955, Alencar e o casal Deane registraram no Ceará e em outros estados da região nordeste aproximadamente 1000 novos casos da doença em humanos. Eles chamaram a atenção para a ocorrência eminentemente rural ou silvestre da LV, com padrão típico de transmissão em paisagens conhecidas como pés-de-serra, boqueirões e grotões (DEANE & DEANE, 1962). Apesar da predominância deste padrão epidemiológico de transmissão, já existiam relatos ocasionais da ocorrência de transmissão urbana da doença que veio aumentando progressivamente para se disseminar a partir da década de 1980 (PESSOA, 1969; DEANE & DEANE, 1962).

2.2 EPIDEMIOLOGIA: EXPANSÃO GEOGRÁFICA E URBANIZAÇÃO DA LV NO BRASIL

A leishmaniose visceral é endêmica em 65 países, que notificam cerca de 500.000 novos casos humanos da doença anualmente. A maioria destes casos (90%) ocorre em áreas rurais pobres e periferias urbanas de 5 países em desenvolvimento: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (WHO, 2006). Nas Américas, a LV ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo que o Brasil responde por 90% dos casos neste continente e é o terceiro mais importante foco de leishmaniose visceral do globo (MS, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006).

No Brasil, a leishmaniose visceral é considerada um grave problema de saúde pública, tendo em vista sua magnitude, expansão geográfica e controle complexo, caro e laborioso (MS, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009). Entre 1980 e 2004, 57.766 casos de LV foram registrados no Brasil com 2.911 mortes. Nos últimos dez anos, a média anual de casos notificados no País foi de 3.156 e a incidência de dois casos/100.000 habitantes (MAIA-ELKYHOURY et al. 2007; MS, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006). Na década de 1990, 90% dos casos notificados de LV ocorriam na região Nordeste. Entretanto, com a progressiva expansão das áreas de transmissão e urbanização da doença outras regiões brasileiras se tornaram importantes focos da doença, tais como as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste. Estas, que em 1998 concentravam 15% do total de casos de LV, passaram a responder por 44% do total de casos em 2005. Atualmente, 21 dos 27 estados da federação registram transmissão autóctone da doença, abrangendo aproximadamente 1.904 municípios (MAIA-ELKYHOURY et al. 2008). Dentre os 21 estados com casos autóctones, o mais recente é o Rio Grande do Sul (RS). Casos humanos da doença, associados ao primeiro relato da presença de *Lutzomyia longipalpis* neste estado, foram registrados em 2009 no município de São Borja, limítrofe à província de Corrientes, Argentina, onde foram notificados casos caninos de LV (CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, RS, 2009; SOUZA, SANTOS & ANDRADE-FILHO, 2009). Tendo em vista a ineficácia das atuais medidas de controle da doença, a Organização Pan Americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde (OPAS/OMS), considera a LV como uma doença negligenciada de categoria 3. O cenário brasileiro descrito acima está provavelmente subdimensionado. Acredita-se que um número ainda não conhecido de municípios já possua casos caninos autóctones da doença, mas ainda sem transmissão humana. É praticamente consenso entre os pesquisadores que a infecção canina precede a infecção humana. Como exemplo podemos citar o recente estudo epidemiológico realizado no RS onde casos caninos seguidos de casos humanos foram registrados no município de São Borja, e o encontro de somente casos caninos nos municípios de Uruguaiana, Porto Xavier e Santa Maria (CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, RS, 2009; SOUZA, SANTOS & ANDRADE-FILHO, 2009). Portanto a expectativa é que a doença avance, aumentando ainda mais o número de municípios endêmicos. Outro aspecto

preocupante da expansão da doença, por seu potencial de produzir grandes epidemias, é o seu avanço na direção de grandes centros urbanos e cidades com população acima de 100.000 habitantes. Casos autóctones já foram registrados em 10 capitais (São Luis, Natal, Teresina, Fortaleza, Aracaju, Palmas, Campo Grande, Brasília, Belo Horizonte e Rio de Janeiro) e em diversas cidades de médio porte como Montes Claros, Sabará, Caxias, Imperatriz, Jequié, Araçatuba, Bauru, Piracicaba e Varzea Grande (COSTA, 2008; MAIA-ELKHOURY et al. 2008).

Acredita-se que esta urbanização decorra de modificações ambientais causadas por ações antrópicas, bem como pela rápida e intensa migração de populações rurais de áreas endêmicas para periferias urbanas desprovidas de moradias e infra-estrutura sanitária adequada. Estas periferias mantiveram algumas características de áreas rurais de origem dos migrantes, como a presença de mosaico de vegetação em áreas ainda não completamente ocupadas, criação de animais domésticos como cães, galinhas e porcos no peridomicílio e condições precárias de habitação. Estas características criaram condições favoráveis para a reprodução da *L. longipalpis* e conseqüente transmissão da LV nestes espaços urbanos (COSTA, 2008; MAIA-ELKHOURY et al. 2008; SABROZA, 2005). Entretanto as hipóteses e explicações baseadas no processo migratório são insuficientes para esclarecer totalmente os fatores que conduziram ao processo de urbanização da LV no Brasil. A favor deste argumento podemos citar a presença da doença em cidades como Araçatuba e Campo Grande, que não passaram por fluxo migratório intenso e não apresentaram crescimento urbano desordenado. Por outro lado, a doença não se instalou em cidades como Recife e Salvador, que no passado sofreram intenso processo migratório a partir de populações de áreas rurais endêmicas para a doença. Há que se considerar também a existência de um complexo de espécies *L. longipalpis*, também denominadas “espécies gêmeas”, distintas tanto do ponto de vista genotípico quanto fenotípico (morfologia, ferormônios e comportamento sexual). A existência deste complexo poderia explicar variações epidemiológicas da doença observadas em diferentes áreas geográficas do Brasil e a maior ou menor capacidade de adaptação e expansão das espécies em áreas com microambientes distintos (BAUZER et al. 2007; HODGKINSON et al. 2003; WARD et al. 1985).

2.3 TRANSMISSÃO

A transmissão do agente etiológico da LV para os hospedeiros vertebrados ocorre através da picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Nas Américas, aceita-se que a *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912) seja o único vetor da doença, embora a *L. evansi* e *L. cruzi* tenham sido implicadas como vetores da LV na Colômbia e Brasil respectivamente (TRAVI et al. 1996; SANTOS et al. 1998; GALATI et al. 1997). Entretanto, a *L. longipalpis* é a única a cumprir todos os critérios essenciais estabelecidos para a competência vetorial que incluem: antropofilia, distribuição espacial coincidente com casos humanos da doença e infecção natural por *L. (L.) chagasi* (KILLICK-KENDRICK, 1990; DEANE, 1956; LAINSON & SHAW, 1998; LAINSON & RANGEL, 2005). Outras características que atestam a importância vetorial da *L. longipalpis* nas Américas incluem sua ampla distribuição geográfica, hábitos alimentares ecléticos e sua fácil adaptação domiciliar e peridomiciliar (RANGEL & VILELA, 2008).

A *L. (L.) chagasi* apresenta duas formas evolutivas distintas durante seu ciclo de vida: uma forma flagelada móvel conhecida como promastigota, presente no tubo digestivo do flebotomíneo, e uma forma amastigota, imóvel, com flagelo rudimentar contido no saco flagelar, que se desenvolve em células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros mamíferos. A infecção do vetor ocorre por ingestão de macrófagos contendo formas amastigotas do parasita durante o repasto sanguíneo de fêmeas em mamíferos infectados. No trato digestivo anterior do inseto ocorre o rompimento dos macrófagos e liberação destas formas, que se diferenciam em promastigotas em aproximadamente 13 a 15 horas. As formas promastigotas multiplicam-se rapidamente por divisão binária e transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo até se diferenciarem em formas infectantes - promastigotas metacíclicas. Após este ciclo, as fêmeas infectadas, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado regurgitam as formas promastigotas metacíclicas, que penetram na derme do hospedeiro, onde são internalizadas por células dendríticas e macrófagos residentes. No vacúolo parasitóforo destas células, as formas promastigotas diferenciam-se novamente em amastigotas, que se

multiplicam intensamente até ocorrer o rompimento da célula infectada e subsequente liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos. As células fagocíticas da pele, provavelmente células de Langerhans, são responsáveis pela disseminação dos parasitas pelos vasos sanguíneos e linfáticos para os linfonodos, baço, fígado e medula óssea (Figura 1) (CHAPPUIS et al. 2007; KILLICK-KENDRICK, 2002; BESTEIRO et al. 2007).

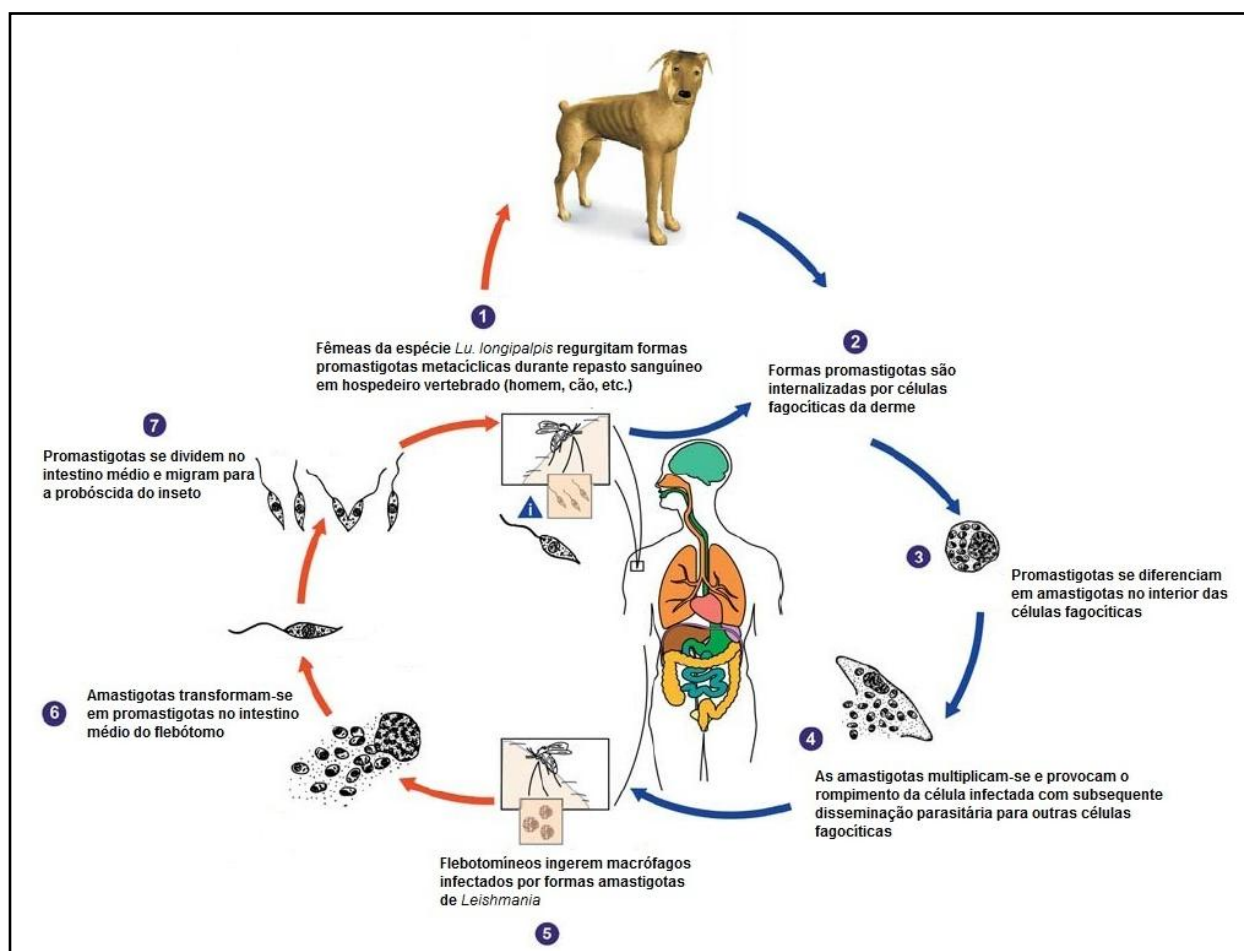


Figura 1 - Ciclo evolutivo da *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Adaptado do CDC (Centers for Disease Control and Prevention).

Insetos hematófagos, como os flebotomíneos, expressam compostos vasoativos em suas glândulas salivares, cuja ação principal é atuar contrabalanceando o processo hemostático do hospedeiro durante o repasto sanguíneo do inseto. A picada da espécie *Lutzomyia longipalpis* resulta em rápido desenvolvimento de eritema - que dura em torno de 48 horas - circunscrito em uma pequena área. O eritema está tipicamente associado a vasodilatação (LERNER, LUGA & REDDY, 2007). Nesse

sentido, Lerner et al. (1991) após estudar a glandula salivar desta espécie vetora, isolaram um peptídeo de 61 aminoácidos com grande atividade vasodilatadora, dando-lhe o nome de Maxadilan. Posteriormente, Quereshi et al. (1996) em estudos com o Maxadilan recombinante mostraram que ele apresenta propriedades imunomoduladoras, como por exemplo inibição da concanavalina A e de anticorpos - anti receptor de células T. Além disso, foi demonstrado em modelos murinos que este peptídeo pode exacerbar infecções por *L. major*, e que a vacinação com o mesmo protege camundongos contra a infecção por este parasita (MORRIS et al. 2001). Estes estudos abriram perspectivas com relação a utilização deste peptídeo no desenvolvimento de vacinas para leishmanioses. Além desta aplicação, o Maxadilan pode potencialmente ser utilizado como antígeno em testes sorológicos com a finalidade de se verificar indiretamente a exposição de humanos e animais de áreas endêmicas para LV a picadas do vetor *Lutzomyia longipalpis*. Esta aplicabilidade já foi testada em alguns estudos (GOMES et al. 2007; SOUZA et al. 2010), porém utilizando extrato bruto de glândula salivar da *L. longipalpis* e outras proteínas recombinantes deste vetor.

2.4 RESERVATÓRIOS DA *Leishmania (L.) chagasi*

Ao contrário do que ocorre na Índia, onde a LV comporta-se como uma antroponose, nas Américas a LV é primariamente uma zoonose, tendo os canídeos domésticos e silvestres (*Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus*) como principais reservatórios. Os marsupiais (*Didelphis marsuapialis* e *Didelphis albiventris*) e roedores (*Proechimys canicollis*) também já foram encontrados naturalmente infectados, mas sua importância epidemiológica ainda não é totalmente conhecida (LAINSON et al. 1990; TRAVI et al. 1998). Entretanto, com a construção de habitações humanas em áreas onde o ciclo zoonótico da LV existe, animais sinantrópicos podem ser o elo entre os ciclos silvestres e domésticos da doença (DANTAS-TORRES, 2007).

O cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório da *L. (L.) chagasi* em áreas urbanas, contribuindo para a manutenção e disseminação do ciclo de transmissão da LV no ambiente doméstico. A eficiência deste animal como reservatório da doença decorre da sua grande susceptibilidade à infecção, do

intenso parasitismo cutâneo do protozoário, e da existência de infecções oligo ou assintomáticas (DANTAS-TORRES, 2007).

Do ponto de vista epidemiológico, a doença canina é considerada mais importante que a doença humana, pois além de sua elevada prevalência – no Brasil a taxa de soroprevalência canina pode chegar a 67% em determinadas áreas endêmicas - há ainda um grande contingente de animais assintomáticos (40% a 60%) que albergam parasitas na derme (MARZOCHI et al. 1985a; SHERLOCK & ALMEIDA, 1970; MAGALHÃES et al. 1980; IVERSON et al. 1983; COUTINHO et al. 1985; FRANÇA-SILVA et al. 2003; PARANHOS-SILVA et al. 1996).

No Brasil, a infecção canina foi documentada pela primeira vez por Evandro Chagas e colaboradores em 1938, durante um inquérito canino realizado nas localidades de Moju e Abaetetuba no Estado do Pará, onde 4,1% dos animais examinados estavam infectados (CHAGAS et al. 1938). Entretanto, foram Deane & Deane que chamaram a atenção para a importância desses animais como reservatórios da LV, devido à abundância e frequência do parasitismo cutâneo e concomitância da infecção humana e canina em uma mesma área geográfica (DEANE, 1956). No Brasil, até o presente momento, todos os surtos humanos descritos estão associados ou foram precedidos pela infecção canina (CAMARGO-NEVES et al. 2001; OLIVEIRA et al. 2001). A importância do homem como reservatório da LV nas Américas, apesar de não totalmente esclarecida não deve ser desprezada. É provável que em situações específicas, os seres-humanos tenham algum papel na cadeia de transmissão, como por exemplo durante períodos epidêmicos. Na década de 1950, trabalhos clássicos realizados por Leonidas Deane levantaram a hipótese de que doentes poderiam atuar como reservatórios do parasita. Este autor conduziu um experimento em que fêmeas de *L. longipalpis*, obtidas de colônias mantidas em laboratório, foram alimentadas em 14 indivíduos com LV. Quatro dos 14 pacientes (28,5%) infectaram 12 dos 81 flebótomos (14,8%) utilizados no estudo (DEANE, 1956). Naquela ocasião desconhecia-se a existência de infecções assintomáticas, que estudos posteriores demonstraram ocorrer na grande maioria (80%) das infecções (BADARO et al. 1986; EVANS et al. 1992; DIETZE et al. 1997). Ainda é desconhecido o papel dos indivíduos assintomáticos como reservatórios da LV.

2.5 APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA LV

2.5.1 Humanos

A infecção causada por *L.(L.) chagasi* apresenta um espectro clínico amplo, que varia desde formas completamente assintomáticas, passando por formas clínicas com sintomatologia discreta ou moderada, até aquelas de apresentação mais grave. No Brasil, um em cada 18 a 20 indivíduos infectados desenvolve clinicamente a leishmaniose visceral (BADARO et al. 1986; EVANS et al. 1992; DIETZE et al. 1997). O período de incubação da LV é amplo podendo variar de dois a seis meses. No homem a doença caracteriza-se clínica e laboratorialmente por febre irregular, emagrecimento, astenia, perda do apetite, diarreia, tosse seca, hepatoesplenomegalia, micropoliadenopatias, pancitopenia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia. Com a progressão da doença ocorre agravamento do quadro clínico, com aumento das visceromegalias, emagrecimento acentuado, edemas, aparecimento de petéquias e sangramentos espontâneos. A doença é geralmente fatal quando não tratada e a morte advém de sangramentos e infecções bacterianas secundárias (MURRAY et al. 2005; CHAPPUIS et al. 2007; AMATONETO et al. 2008). A LV pode manifestar-se também como parte da co-infecção associada ao Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). No Brasil o número de casos desta associação vem aumentando nos últimos anos, principalmente devido à urbanização da LV e à ruralização do HIV. Este número deve aumentar ainda mais se levarmos em consideração a proporção de 1:18-20 de infecções assintomáticas mencionadas acima. Em analogia ao que ocorre em outras doenças bacterianas (tuberculose, sífilis, etc) e parasitárias (toxoplasmose, Doença de Chagas), acredita-se que um percentual de pacientes infectados e doentes tratados não eliminem a *Leishmania* do organismo. Isto foi demonstrado de forma indireta em pacientes infectados pelo HIV na Espanha, que moravam em áreas não endêmicas para a doença, diagnosticados com LV. Estes pacientes haviam nascido ou morado em áreas endêmicas para a doença ou haviam sido tratados no passado (DESJEUX & ALVAR, 2003).

2.5.2 Cães

Os cães infectados pela *Leishmania (L.) chagasi* apresentam um espectro clínico muito semelhante à doença humana i.e. infecções inaparentes, moderadas e graves. De forma similar ao calazar humano, a LV canina apresenta período de incubação de meses (3 a 6) ou até anos, dado este demonstrado de forma clara em infecções experimentais. As infecções por sua vez podem evoluir de forma aguda, subaguda ou crônica. A classificação clínica mais usada atualmente é a estabelecida por Mancianti et al. (1988), assim definida: a) **assintomáticos** – animais com aparência saudável sem sinais clínicos visíveis da doença; b) **oligossintomáticos** – animais com sinais clínicos discretos da doença tais como ulcerações cutâneas freqüentemente observadas na ponta das orelhas e em áreas periorbitais, perda de peso moderada e alopecia localizada; c) **sintomáticos** – animais apresentam um ou mais sinais clínicos típicos da LV, como ulcerações cutâneas disseminadas, cegueira, perda de peso excessiva, anorexia, adinamia, apatia, onicogribose, dermatite furfurácea, alopecia generalizada, ceratoconjuntivite, linfadenomegalia, diarreia, enterorragia e edema de patas (MARZOCHI et al. 1985a e b; COSENZA, 1995; NEVES, 2005; MORENO & ALVAR, 2002).

2.6 DIAGNÓSTICO DA LV

2.6.1 Parasitológico

O diagnóstico parasitológico da LV humana e canina pode ser feito por meio da visualização do parasita em cultura (formas promastigotas) ou em esfregaço de punção aspirativa de baço, fígado, medula óssea, linfonodos ou em biopsias de órgãos (formas amastigotas) (DIETZE, 2005; GOMES et al. 2008). No diagnóstico da infecção canina, pode-se ainda utilizar amostras clínicas de pele - intacta ou de regiões com lesão - para a demonstração de formas amastigotas do parasita (MADEIRA et al. 2009).

O aspirado esplênico é o método de maior sensibilidade na infecção humana, seguido do aspirado de medula óssea, biópsia hepática e aspirado de linfonodos (ZIJLSTRAE et al. 1992; HAILU et al. 2006). As colorações mais utilizadas são o

Giemsa, Wright, Leishman ou Panótico Rápido, todas elas essencialmente colorações de Romanovsky. O encontro das formas amastigotas do parasita é diretamente proporcional à qualidade do material aspirado, à experiência do microscopista e ao número de campos observados. Portanto, é necessário que a lâmina seja exaustivamente examinada, antes de ser considerada negativa. Em situações ideais, a sensibilidade do aspirado de medula óssea é de aproximadamente 95% (DA SILVA, STEWART & COSTA, 2005).

Além do exame direto, o material das punções aspirativas pode ser inoculado em meios especiais de cultura. O clássico meio de NNN (*Novy, MacNeal e Nicolle*), contendo ágar e sangue desfibrinado de coelho, é o mais comumente empregado. A utilização de uma interface líquida sobre o NNN, como o meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) ou Schneider, aumenta e acelera a positividade da cultura. As culturas devem ser mantidas entre 24-26°C e observadas em microscópio invertido semanalmente, por até quatro semanas (DIETZE, 2005).

Barrouin-Melo et al. (2004) realizaram um estudo comparativo da sensibilidade da cultura de aspirado esplênico e linfonodos poplíteos utilizando uma amostra de 64 cães com sorologia positiva para LV (ELISA ou RIFI), procedentes de uma área endêmica para a doença no Brasil. A sensibilidade obtida para a cultura de aspirado esplênico e de linfonodo poplíteo foi respectivamente 73,4% (47/64) e 18% (12/64), utilizando a sorologia como referência. Considerando somente os animais com infecção confirmada pela cultura, a cultura esplênica atingiu sensibilidade de 97,9% e a cultura de aspirado de linfonodo poplíteo 25%.

2.6.2 Imunológico

Na LV, os testes sorológicos em geral apresentam boa sensibilidade em virtude da grande quantidade de anticorpos (principalmente IgG) induzidos durante a doença, secundários à ativação policlonal de células B. Os testes sorológicos, entretanto, são métodos indiretos de detecção do parasita e, devido à sua praticidade, devem preceder sempre que possível, os métodos parasitológicos, podendo até, em

algumas situações, substituí-los. Na presença de dados clínicos e laboratoriais, a sorologia reativa praticamente confirma o diagnóstico de calazar (DIETZE, 2005).

No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico da LV humana e canina são a imunofluorescência indireta (RIFI) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA, imunocromatografia). Os resultados da imunofluorescência são expressos em diluições, sendo reagentes os títulos iguais ou superiores a 1:40. A RIFI, apesar de menos sensível que o ELISA, é o método mais utilizado no Brasil por estar disponível gratuitamente na maioria das regiões endêmicas por meio do Ministério da Saúde (MS). Os Kits da RIFI distribuídos pelo MS são produzidos pela Fiocruz – Biomanguinhos (Rio de Janeiro) e utilizam como antígeno formas promastigotas de *Leishmania major like* (OLIVEIRA, 2005). Este teste não é produzido sob Boas Práticas de Fabricação (BPC) e uma de suas principais limitações é a baixa sensibilidade e especificidade (68% e 87,5%) (LIRA et al. 2006). Em cães, reações cruzadas foram relatadas com *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis*, *Toxoplasma gondii*, *Ehrlichia canis* e *Demodex canis* (FERREIRA et al. 2007; LIRA et al. 2006; DA COSTA et al. 1991).

Os testes imunoenzimáticos (ELISA) são mais caros e usados pela rede privada de atendimento e em centros de pesquisa. O seu resultado é expresso em unidades de absorvância (espectrofotometria), em uma reação com diluições fixas ou mais comumente, apenas como reagente. Apesar de ser um método sensível ele apresenta como desvantagem o fato de não existirem Kits comerciais para venda, o que dificulta sua padronização.

Mais recentemente, antígenos recombinantes (K39, K26) tem sido empregados em testes rápidos imunocromatográficos tanto para o diagnóstico da LV humana quanto canina. Estes testes tem demonstrado alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da infecção humana (CARVALHO et al. 2003; BURNS et al. 1993; BERN et al. 2000) e bom desempenho para o diagnóstico da LV canina (LEMOS et al. 2008; REITHINGER et al. 2002; DA COSTA et al. 2003; OTRANTO et al. 2004).

Da Costa et al. (2003) realizaram um estudo com a finalidade de avaliar o desempenho dos antígenos recombinantes K39 e K26, dispostos em um teste rápido

imunocromatográfico para o diagnóstico da LVC. Foram testadas ainda duas proteínas complexadas ao ouro coloidal, proteína A de *Staphylococcus aureus* e proteína G de *Streptococcus pyogenes*. Cinquenta soros de cães com teste RIFI positivo (título da RIFI $\geq 1/160$) e sinais clínicos da doença, 14 soros de cães experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* e 50 soros de cães clinicamente saudáveis e com RIFI negativo para *Leishmania* e *Trypanosoma* foram testados. O teste imunocromatográfico baseado no antígeno recombinante K39 apresentou sensibilidade de 96% (48/50) e especificidade de 100% (0/14), utilizando proteína A de *Staphylococcus aureus* complexada ao ouro coloidal. Nenhuma diferença significativa no desempenho dos testes foi observada ao se utilizar proteína A ou proteína G. O teste imunocromatográfico fabricado com antígeno recombinante K26 foi igualmente específico (100%), porém menos sensível (94% de sensibilidade utilizando proteína A) que o teste produzido com a proteína rK39.

Em outro estudo, Lemos et al. (2008) avaliaram o desempenho do teste *Kalazar Detect Canine* utilizando soros de cães com (oligossintomáticos e sintomáticos) e sem sinais clínicos da doença (assintomáticos), comparando os resultados com um teste ELISA "in house" realizado com antígeno de *L.(L.) chagasi* em extrato bruto. Foram testados 76 soros de cães com mielograma positivo para *Leishmania*, procedentes de duas áreas endêmicas para a doença, Araçatuba (SP) e Belo Horizonte (MG). Como controle-negativo, foram avaliados 33 soros de cães saudáveis de área não endêmica para LV, com sorologia (ELISA) e exame parasitológico negativo para *Leishmania*. Para avaliar a reatividade cruzada do teste, foram testados 25 soros de cães com doenças parasitárias e bacteriana, tais como: leishmaniose cutânea (5), ehrlichiose (3), toxoplasmose (5) e Doença de Chagas (12). A sensibilidade do *Kalazar Detect Canine* e ELISA foi respectivamente 83% e 95%, independente da forma clínica da doença. A especificidade para ambos os testes foi de 100%. No grupo assintomático o *Kalazar Detect Canine* foi capaz de detectar 12/16 (75%) cães, enquanto que o ELISA detectou 15/16 (94%). Para o grupo de cães oligossintomáticos, 15 e 16 de 17 animais foram positivos para o *Kalazar Detect* (88%) e ELISA (94%), respectivamente. Para o grupo sintomático, o teste rápido detectou 36/43 cães (84%), enquanto que o ELISA detectou 41/43 animais (95%). O teste rápido apresentou reação cruzada com ehrlichiose (1/3

soros) e doença de Chagas (3/12 soros), alterando a especificidade de 100% para 93%.

2.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os métodos moleculares, principalmente os baseados na PCR, estão se tornando uma ferramenta cada vez mais importante no diagnóstico de doenças infecciosas (BASTIEN, PROCOP & REISCHL, 2008). O seqüenciamento do genoma de parasitas dentre eles a *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis* tem facilitado a descoberta de iniciadores (“primers”) usados nas reações de PCR (PEACOCK et al. 2007). Desta forma, diferentes métodos de extração de DNA, diferentes pares de iniciadores, alvos distintos do DNA e amostras clínicas diversas (sangue total, medula óssea, creme leucocitário, pele, fígado, baço e outros) tem sido avaliados no diagnóstico da LV (LACHAUD et al. 2001; MANNA et al. 2004; QUARESMA et al. 2009). No geral esta técnica tem se mostrado mais específica e sensível que os métodos tradicionais utilizados no diagnóstico da doença.

Iniciadores desenhados para amplificar seqüências alvos com cópias múltiplas, como a região conservada dos minicírculos de DNA do cinetoplasto (mkDNA), têm produzido um incremento na sensibilidade da detecção da infecção por *Leishmania* tanto em cães quanto em humanos (REALE et al. 1999; SING et al. 1999; SMYTH et al. 1992). Além disso, outras seqüências alvos tem sido utilizadas na PCR, como o DNA ribossomal e a região espaçadora entre os transcritos internos ou “internal transcribed spacer” (ITS-1), embora apresentem menor sensibilidade quando comparada a PCR dirigida à amplificação de minicírculos de DNA do cinetoplasto (NASEREDDIN et al. 2006).

O kDNA contém aproximadamente 10.000 minicírculos de DNA, que tem um tamanho entre 600 e 800 pb em todas as espécies do gênero *Leishmania*. Cada minicírculo é dividido em uma região conservada de aproximadamente 150 pb e uma região variável de 600 pb (MORALES et al. 2001). Iniciadores dirigidos para amplificar a região conservada podem ser utilizados para detectar todas as espécies de *Leishmania* (DEGRAVE et al. 1994). Recentemente, um estudo conduzido por Volpini et al. (2004) demonstrou que a PCR combinada à técnica RFLP (*Restriction*

Fragment Length Polymorphism), utilizando como alvo a região conservada do minicírculo de kDNA de *Leishmania*, é capaz de identificar e diferenciar as espécies *L.(L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* em amostras de biópsia de pele de pacientes com suspeita clínica de leishmaniose tegumentar americana (LTA).

Andrade et al. (2006) estudando uma área simpátrica para *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* utilizou a mesma técnica do estudo anterior (PCR-RFLP) para identificar e distinguir estas espécies em cães naturalmente infectados (diagnóstico com base na RIFI), comparando ainda a sensibilidade e especificidade desta técnica em relação à RIFI e ao exame direto. Neste estudo, “imprints” de baço, pele, linfonodo e medula óssea de 39 cães com RIFI positivo (título $\geq 1/40$) foram utilizados para investigar a presença de amastigotas de *Leishmania*, bem como para extração de DNA e amplificação por PCR. O grupo controle ($n=16$) foi composto por animais com exame direto e RIFI negativos e sem sinais clínicos de LV. Considerando a RIFI como padrão-ouro, a PCR apresentou 92% de sensibilidade e 40% de especificidade. O exame direto por sua vez apresentou respectivamente 85% e 100% de sensibilidade e especificidade. Dez (62,5%) de 16 cães negativos para RIFI e exame direto foram PCR positivos. Quando o desempenho da PCR foi comparado considerando o exame direto como padrão-ouro, a concordância foi boa para todos os órgãos avaliados ($0,4 \geq k \leq 0,7$). A sensibilidade da PCR variou de 75,9 a 96,4% de acordo com o órgão estudado, sendo baço e linfonodos os com maior sensibilidade (96,4%) e medula óssea a que apresentou menor sensibilidade (75,9%). A PCR detectou mais DNA de *Leishmania* do que o exame direto revelou amastigotas em todos os órgãos. A PCR foi mais eficiente que a RIFI e o exame direto para diagnosticar a LVC, independente do órgão examinado.

Quaresma et al. (2009) avaliou a eficácia da PCR (baseada na amplificação do fragmento de 120 pb do kDNA de *Leishmania*) no diagnóstico da LVC utilizando diferentes amostras clínicas (pele, sangue periférico e medula óssea) de 217 animais, sintomáticos (144) e assintomáticos (73) para LV, procedentes do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, área endêmica para a doença. Os resultados da PCR foram comparados com os obtidos para os métodos convencionais de diagnóstico (mielograma, “imprint” de pele, mielocultura, teste de aglutinação direta

(DAT) e RIFI / ELISA – Biomanguinhos). As amostras de medula óssea e pele se mostraram mais apropriadas para a detecção de *Leishmania* pela PCR, com 84,9% (163/192) e 80,2% (162/202) de positividade respectivamente, em comparação às de sangue periférico, que apresentaram 75,3% (149/198) de resultados positivos para a PCR. A comparação da eficiência da PCR em relação aos testes convencionais de diagnóstico (sorológicos e parasitológicos) da LVC revelou que a PCR foi o teste de maior acurácia para o diagnóstico da doença. Os testes parasitológicos e sorológicos foram positivos para 67,7% (147/217) e 47,0% (102/217) dos cães, respectivamente. A proporção de testes sorológicos e parasitológicos positivos foi significativamente maior ($p < 0,05$) entre o grupo de cães sintomáticos, 74,3% (107/144) e 57,6% (83/144) respectivamente, em comparação aos cães assintomáticos, 54,8% (40/73) e 26% (19/73) respectivamente.

2.7 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA LV NO BRASIL

No Brasil, as estratégias de controle da LV estão voltadas para os três elos da cadeia de transmissão: 1) controle da população de flebotomíneos por meio de aplicação residual de inseticida e manejo ambiental 2) controle do reservatório doméstico através da eliminação dos cães sororreativos e 3) diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos. Apesar destas medidas de controle serem conduzidas no Brasil de forma sistemática desde 1980, observa-se um aumento significativo da incidência de LV humana nos últimos anos, com surgimento de novas áreas de transmissão a cada ano. De acordo com Costa, Tapety & Werneck (2007), uma razão para a ineficiência destas estratégias é a necessidade de um sistema de vigilância permanente, com utilização extensiva de recursos humanos e financeiros, o que limita sua sustentabilidade e cobertura. Segundo Quinnell & Courtenay (2009), para se chegar a conclusões robustas sobre a real eficácia das medidas de controle empregadas no Brasil são necessários estudos de intervenção bem desenhados (OLIVEIRA, MORAIS & COELHO-MACHADO, 2008; PALATNIK-DE-SOUZA et al. 2001).

Dentre as medidas recomendadas para o controle da LV, a eutanásia dos cães soropositivos é a mais controversa, não somente pela falta de consenso entre os

pesquisadores com relação a sua eficácia na redução da incidência da doença humana, mas também devido à oposição a esta medida por parte dos proprietários dos animais, dos clínicos veterinários e das organizações de proteção animal (DYE, 1996; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006). Diversos estudos avaliaram o impacto da eliminação do reservatório canino na epidemiologia da LV, porém os resultados obtidos até então não são consistentes e divergem quanto à eficácia desta prática na redução da incidência da LV humana. Em um destes estudos, Dietze et al. (1997), com o objetivo de avaliar o efeito da eliminação canina na transmissão do calazar, conduziram um estudo de intervenção controlado em três vales de Pancas, Espírito Santo, área endêmica para calazar humano e canino. Em dois vales experimentais (intervenção) todos os cães infectados foram eliminados enquanto que no vale controle os cães soropositivos foram mantidos intactos até o fim do estudo. Durante o período de 12 meses do estudo, as taxas de soropositividade humana, medidas por dot-ELISA, aumentaram de 15% para 54% nos vales intervenção e de 14% para 54% no vale controle. Os autores concluíram que a eliminação dos cães soropositivos nos vales intervenção não resultou em nenhuma diferença estatisticamente significativa na incidência de soroconversão humana ou desenvolvimento de doença. Como explicação para estes resultados os autores sugeriram a participação dos humanos como reservatórios da *Leishmania (L.) chagasi*.

Utilizando o mesmo desenho do estudo anterior, Ashford et al. (1998) avaliaram o impacto da remoção de cães infectados na incidência da leishmaniose visceral humana e canina na região de Jacobina, Bahia. Os autores observaram uma redução significativa da incidência anual de soroconversão entre os cães, caindo de 36% para 6% ao fim dos primeiros dois anos do estudo. Além disso, na área de intervenção houve uma redução significativa da incidência de LV entre as crianças menores que cinco anos de idade. Ao contrário do estudo anterior, os autores sugeriram que embora não ocorra interrupção completa da transmissão, a eliminação dos cães soropositivos esteve associada à diminuição da incidência de LV canina e a um decréscimo significativo da incidência de casos pediátricos de LV na área de intervenção.

Mais recentemente um estudo de intervenção randomizado fatorial, realizado em Teresina, estado do Piauí, avaliou a efetividade de quatro tipos de intervenção na redução da infecção humana por *Leishmania (L.) chagasi*: A) borrifação intradomiciliar e de anexos residenciais; B) borrifação intradomiciliar e eliminação de cães infectados; C) combinação de borrifação intradomiciliar e de anexos residenciais e eliminação canina e D) apenas borrifação intradomiciliar (COSTA, TAPETY & WERNECK, 2007). Os resultados obtidos foram variáveis, mostrando que em comparação com as residências que receberam apenas borrifação intradomiciliar, a eliminação de cães infectados somada a borrifação intradomiciliar diminuiu em 80% a incidência da infecção humana. Em contrapartida, a borrifação de anexos residenciais adicionalmente a borrifação intradomiciliar sem ou com eliminação de cães infectados não esteve significativamente associada à redução da soroconversão.

De acordo com Quinnell & Courtenay (2009), as evidências disponíveis até o momento não permitem estimar a eficácia da eliminação canina no controle do calazar. Segundo estes autores, uma conclusão sólida que se pode tirar dos estudos é que a eliminação canina durante os ensaios de intervenção não reduzem totalmente a transmissão e que a eutanásia de cães soropositivos como medida integrante do programa de controle brasileiro de LV não tem sido suficiente para conter a expansão das áreas de transmissão da doença e o aumento do número de casos humanos e caninos nos últimos anos.

A ineficácia da eliminação canina no controle da LV pode ser explicada por alguns fatores, tais como: falta de continuidade das ações de remoção dos cães soropositivos, rápida reposição da população canina infectada por cães jovens susceptíveis, outros reservatórios da *Leishmania (L.) chagasi*, permanência de cães falso-negativos devido à baixa sensibilidade dos testes sorológicos disponíveis na rede pública, baixa cobertura dos programas de eliminação canina e a demora na eliminação dos cães soropositivos (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; QUINNELL & COURTENAY, 2009).

O novo enfoque do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) do Ministério da Saúde propõe incorporar áreas sem ocorrência de casos humanos ou

caninos da doença nas ações de vigilância e controle, visando assim evitar ou minimizar o impacto deste agravo em novas áreas (MS, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006). No estado do Espírito Santo (ES), atualmente 10 municípios - Pancas, Águia Branca, São Gabriel da Palha, Nova Venécia, Água Doce do Norte, Governador Lindenberg, Baixo Guandu, Itaguaçu, Itarana e São Roque do Canaã - são endêmicos para LV, sendo que todos estão localizados na região noroeste do estado (SESA – ES, 2004). A Região Metropolitana da Grande Vitória (RMGV), entretanto, se insere como área silenciosa, visto que não há, até o presente momento, registros na literatura científica de casos autóctones caninos ou humanos de LV nem da presença do vetor da *Leishmania (L.) chagasi (L. longipalpis)* nos municípios que compõem esta região. Embora seja uma área silenciosa, critérios estabelecidos pelo PCLV definem a RMGV como uma área vulnerável para LV, uma vez que os municípios que a compõe possuem fluxo migratório intenso e fazem parte do mesmo eixo viário de municípios com casos de LV. Vale lembrar também que a doença é endêmica nos três estados limítrofes ao ES.

Apesar da Região Metropolitana da Grande Vitória (RMV) ser considerada indene para LV, um inquérito soropidemiológico prévio realizado por nosso grupo em 2005, com cães errantes da RMGV, detectou sorologia positiva (*Kalazar Detect Canine*) em 7 de 158 (4,4%) animais, levantando a hipótese da existência da LV na região, embora não tenha sido possível realizar a confirmação parasitológica da doença nestes animais. Diante deste fato, a proposta deste estudo foi investigar a existência de infecção autóctone por *Leishmania (L.) chagasi* em cães procedentes do município da Serra, Região Metropolitana da Grande Vitória, Espírito Santo.

OBJETIVOS

1 OBJETIVOS GERAIS

- a) Investigar a existência de infecção autóctone por *Leishmania (L.) chagasi* em cães do município da Serra, Região Metropolitana de Vitória, Espírito Santo.

- b) Investigar a presença do vetor da *Leishmania (L.) chagasi*, *Lutzomyia longipalpis*, nos locais onde ocorrerem os casos caninos da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo de corte transversal.

2 JUSTIFICATIVA PARA REALIZAÇÃO DO ESTUDO

A idéia para a realização deste estudo teve duas motivações: **1)** A positividade do teste *Kalazar Detect Canine*TM em 7 de 158 (4,4%) cães triados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Vitória em 2005 durante coleta de sangue de animais procedentes de diferentes municípios da Região Metropolitana da Grande Vitória. Estas amostras seriam usadas como soros controles negativo para LV em uma tese realizada na Universidade Federal do Piauí. Na ocasião não houve possibilidade de confirmação parasitológica da doença nos animais. **2)** A ocorrência de um óbito por LV de uma paciente residente no Bairro André Carlone no Município da Serra. Esta paciente de 44 anos, com sintomas sugestivos da doença (febre, hepatoesplenomegalia, emagrecimento, anemia, leucopenia e plaquetopenia) foi atendida em vários Pronto Atendimentos dos municípios da Serra e Vitória durante 3 meses sem diagnóstico. Por fim a paciente foi internada no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória onde evoluiu para óbito devido a sangramento, três dias após o diagnóstico de LV. Apesar de residir há mais de 20 anos no município da Serra a paciente era natural do município de Barra de São Francisco, endêmico para LV, que entretanto não notifica casos da doença há 10 anos. Durante a investigação do caso descobriu-se também que a paciente era soropositiva para o HIV, o que abriu novas considerações a respeito da autoctonia do caso e que serão contempladas na discussão deste trabalho.

3 ÁREA DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Município da Serra (20°07'43" latitude sul e 40°18'28" longitude oeste), localizado na Região Metropolitana da Grande Vitória, a 27 km da capital do Estado do Espírito Santo, Vitória. O município da Serra limita-se ao norte com o município de Fundão, a oeste com o município de Santa Leopoldina e ao sul com os municípios de Cariacica e Vitória. A Serra concentra um terço da indústria

da Região Metropolitana da Grande Vitória, representando o seu maior parque industrial. Os maiores segmentos industriais do município são metalurgia, material plástico, material elétrico, comunicações e construção civil. O município da Serra possui uma extensão territorial de 554,278 km², onde vive uma população de 404.688 habitantes, representando 23,2% da população da Região Metropolitana da Grande Vitória e 10,7% da população do Estado. A quase totalidade desta população (99%) reside em área urbana (IBGE, 2009). O clima é tropical quente e úmido. A temperatura média anual é de 24°C e a média pluviométrica varia de 900 a 1.200 mm³. Por razões administrativas o Município da Serra é dividido em 5 Distritos: Calogi, Sede, Nova Almeida, Queimados e Carapina (Figura 2) (SERRA, 2009). Uma das etapas do estudo foi realizada no Distrito de Carapina, no bairro André Carlone, onde ocorreu o óbito acima mencionado. Vale mencionar que durante o estudo, o Município da Serra era o único da região metropolitana de Vitória cujo CCZ realizava captura e eutanásia de animais sem dono, capturados em vias públicas. Os demais municípios cumpriam uma liminar movida pelo Ministério Público Estadual que proibia a captura e eutanásia destes animais.



Figura 2 – Mapa do Município da Serra, segundo Distritos.

4 POPULAÇÃO CANINA DO ESTUDO

Durante o período de Novembro de 2008 a Maio de 2009, 201 cães procedentes da área urbana do Município da Serra foram arrolados no estudo. Estes animais haviam sido capturados em vias públicas (cães errantes) ou entregues por seus proprietários (cães domiciliados) ao CCZ do Município da Serra. Além dos cães mantidos no canil do CCZ da Serra, também foram incluídos no estudo cães domiciliados procedentes do bairro André Carlone, Serra, onde, durante o período do estudo, foi constatado um óbito humano por LV. Neste bairro, tomando como ponto de partida a residência onde ocorreu o óbito humano, delimitou-se uma área de investigação com um perímetro arbitrário de 500 metros, que abrangesse no mínimo 100 cães. Aos proprietários destes animais, foi aplicado um questionário com o intuito de se obter informações sobre a origem e histórico de viagens do cão, condições sanitárias da moradia, presença de outros animais de criação, acesso do animal às vias públicas, idade, raça e sexo (Anexo 1). Para os cães abrigados no CCZ da Serra as informações incluíam: raça, sexo, porte físico, pelagem e procedência, considerada como o local da captura. Os dados obtidos dos animais foram armazenados em um banco de dados criado no programa Windows Excel 2007 para análise posterior. Todos os animais incluídos no estudo foram submetidos à coleta de sangue periférico para realização de triagem sorológica com o teste *Kalazar Detect Canine*[™] (Inbios Inc, Seattle, EUA) que utiliza a proteína recombinante K39 como antígeno. No momento da coleta do sangue os cães eram submetidos a exame físico geral por um Médico Veterinário do CCZ para identificação de sinais clínicos de LV: ulcerações cutâneas, edema, alopecia, dermatite furfurácea, ceratoconjuntivite, pêlo opaco, onicogribose, opacidade da córnea e paresia das patas. Todos os animais com sorologia positiva (*Kalazar Detect Canine*), também foram submetidos a punção aspirativa de medula óssea para confirmação parasitológica da doença. Os cães domiciliados com confirmação parasitológica de LV (cultura ou exame direto) foram também necropsiados. Todos os cães do CCZ com sorologia positiva (*Kalazar Detect Canine*) foram necropsiados independente da confirmação parasitológica de LV.

5 AMOSTRAS CLÍNICAS

5.1 SANGUE PERIFÉRICO

As amostras de sangue periférico foram obtidas por punção endovenosa da veia radial com auxílio de agulha e seringa estéreis (BD Plastipak, Becton Dickson Ltda, Brasil). A região da coleta foi previamente submetida à anti-sepsia com álcool iodado ou etanol a 70%. De cada animal coletou-se aproximadamente 4,0 ml de sangue em tubos de vidro de tampa roxa para coleta a vácuo (Labor Import), contendo solução anticoagulante de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após centrifugação a 2200 g por 10 minutos, o plasma e a camada leucocitária foram aliquotados em microtubos *ependorf* estéreis de 1,5 ml (Axygen™) para utilização em testes sorológicos e ensaios moleculares, respectivamente. O plasma era utilizado no mesmo dia da coleta para a realização do teste *Kalazar Detect Canine*™ (Inbios Inc, Seattle, EUA), e o creme leucocitário era estocado em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA.

5.2 MEDULA ÓSSEA

Todos os cães com sorologia positiva para o teste *Kalazar Detect Canine* foram submetidos à punção aspirativa de medula óssea. Para a realização deste procedimento, os animais eram submetidos à sedação com Acepromazina (Acepran™, Univet) (1 mg/kg) por via intramuscular, e após 10 a 15 minutos era administrado anestésico geral, Hidrocloridrato de Cetamina (Ketamina™, Agener União) (25 mg/kg) por via intravenosa. O cão era então posicionado em decúbito lateral e após tricotomia e anti-sepsia local (Polivinil Pirrolidona Iodo 10% - PVPI Tópico), uma agulha estéril (calibre 40 x 12 mm) acoplada a uma seringa descartável (BD Plastipak, Becton Dickinson Ltda, Brasil) de 20 ml era posicionada na região do tubérculo maior do úmero proximal. A agulha era inserida a um ângulo aproximado de 45° tendo como referencia uma linha imaginária paralela ao eixo maior do úmero. Por meio de movimentos rotatórios, era exercida uma pressão até atingir a cavidade medular e, posteriormente, procedia-se a aspiração do material medular. Um volume máximo de 0,5 ml era aspirado por coleta. Imediatamente após a coleta, a seringa contendo o material aspirado era levada a uma bancada que

dispunha de Bico de Bunsen, para então proceder a manipulação do material em torno da chama. Assim, duas gotas do material medular eram rapidamente adicionadas a frascos de cultura contendo 2 ml meio líquido *Liver Infusion Tryptose* (LIT). Uma pequena gota do material era também colocada sobre uma lâmina de vidro previamente desengordurada com etanol à 70% para realização de esfregaço, tendo sido realizado quatro esfregaços por animal. O restante do material medular era adicionado a microtubos estéreis de 1,5 ml para posterior utilização em testes moleculares.

As lâminas contendo os esfregaços eram identificadas com o número de identificação do cão e data da coleta, e levadas ao Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (NDI/UFES) para serem coradas e analisadas quanto à presença de formas amastigotas de *Leishmania*, conforme será descrito na seção 7.1 dos Materiais e Métodos.

5.3 BAÇO E FÍGADO

Fragmentos de baço e de fígado foram obtidos de todos os cães submetidos à necropsia. Para o procedimento de eutanásia, os cães foram pré-medicados com Acepromazina (0,1 mg/kg), administrada pela via intramuscular, seguido de administração intravenosa de Hidrocloridrato de Ketamina (25 mg/kg) e sobredose de Tiopental Sódico (1 ml/kg). A eutanásia foi realizada pelos Médicos Veterinários responsáveis pelo CCZ da Serra.

6 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

A triagem sorológica para LV foi realizada utilizando os seguintes testes: teste rápido imunocromatográfico rK39 (*Kalazar Detect Canine*), ELISA e RIFI (Kit Leishmaniose Visceral Canina – Biomanguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro) e um ELISA “in house”. Cães soropositivos em pelo menos um dos testes sorológicos acima foram submetidos a exames parasitológicos e/ou ensaios moleculares para confirmação do diagnóstico de LV.

6.1 KALAZAR DETECT CANINE

Os soros ou plasmas dos cães foram submetidos ao teste rápido imunocromatográfico *Kalazar Detect Canine*TM (InBios International, Seattle, WA, USA) para a pesquisa de anticorpos IgG contra o antígeno recombinante K39 de *Leishmania* do complexo donovani. Para isso, 20 µl de soro ou plasma foram adicionados à fita reagente e esta colocada em um microtubo de 1,5 ml contendo três gotas de tampão. De acordo com as recomendações do fabricante, o teste era considerado positivo quando duas bandas, uma controle e outra teste eram reveladas dentro de 10 minutos. O teste era considerado negativo quando somente a banda controle era revelada. Bandas fracas na região teste também foram consideradas positivas. O resultado do teste era considerado inválido quando a banda controle não era revelada.

6.2 RIFI (BIOMANGUINHOS - FIOCRUZ)

A RIFI foi realizada utilizando o kit produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ/RJ, o qual utiliza formas promastigotas de *Leishmania major* "like" (MHOM/BR/76/JOF) como antígeno. O teste foi realizado pelo Laboratório Central de Saúde Pública do ES (LACEN-ES), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, amostras de soro dos cães nas diluições de 1:40 e 1:80 foram transferidas para lâminas recobertas com formas promastigotas de *Leishmania* fixadas. Anticorpos policlonais anti-IgG de cão conjugado com isotiocianato de fluoresceína foram adicionados às lâminas para revelação da reatividade dos anticorpos IgG presentes no soro dos cães. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência, empregando luz azul e ultravioleta. Amostras que apresentassem fluorescência a uma diluição $\geq 1:80$ eram consideradas positivas. Soros controles positivos e negativos foram utilizados no ensaio com o propósito de monitorar a reação.

6.3 ELISA (BIOMANGUINHOS - FIOCRUZ)

O ensaio imunoenzimático foi realizado utilizando o kit produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ/RJ, o qual utiliza formas promastigotas de *Leishmania major* “like” (MHOM/BR/76/JOF) como antígeno. O teste foi realizado pelo LACEN-ES, seguindo as normas do fabricante. Resumidamente, microplacas (MaxiSorp™ – Nalge Nunc, Rochester, NY, USA) de 96 poços de fundo chato sensibilizadas com antígenos solúveis de *Leishmania major like* foram incubadas com os soros dos cães na diluição 1:100. Em seguida, foram adicionados à placa anticorpos policlonais anti-IgG de cão conjugado com peroxidase, seguido da adição do substrato TMB (tetrametilbenzidina). A reação enzimática foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico e a absorbância das amostras e dos controles foi lida em leitor de ELISA utilizando um filtro de 450 nm. Controles positivos e negativos foram incluídos na reação para determinação do ponto de corte.

6.4 ELISA “in house”

Formas promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/1070/BH46) foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) e mantidas em estufa B.O.D à temperatura de 24 a 26°C até atingir a fase estacionária de crescimento (7 dias de cultivo). Durante este período, observou-se características como motilidade, morfologia e densidade parasitária da cultura. Certificada a homogeneidade da cultura quanto aos parâmetros acima, a suspensão de parasitas foi transferida para tubos de polipropileno de 50 mL (Falcon™ Becton Dickinson, San Diego, EUA) e submetida a três lavagens por centrifugação (1000 x g, 10 min, à 4°C) em solução salina tamponada com fosfatos (PBS), pH 7,2. Em seguida, os parasitas foram mantidos em banho de gelo e submetidos a três tratamentos de um minuto com ultra-som, utilizando o equipamento Sonifier Cell Disruptor™ (Branson Sonic Power, Danbury, CO, EUA). O material sonicado foi então centrifugado a 18500 rpm por 90 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para tubos de diálise. A diálise foi realizada contra solução de PBS por 36 horas, substituindo o PBS a cada 6 horas. Finalmente, o material restante foi filtrado em filtros estéreis (membrana de 0,22µm) e uma alíquota do filtrado foi utilizada para o cálculo da concentração de proteínas, determinada através do método descrito por Lowry et al. (1951). O restante do

filtrado estéril foi diluído em PBS a uma concentração de 1 mg/ml, e estocado em freezer (-70°C) até o momento do uso.

O ensaio imunoenzimático foi realizado conforme o protocolo estabelecido por Rosario et al. (2005), no qual é realizada a pesquisa de anticorpos IgG no soro de cães utilizando antígenos solúveis de promastigotas oriundos da cepa de referência *Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/1070/BH46). Resumidamente, microplacas de 96 poços de fundo chato (MaxiSorp™ – Nalge Nunc, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com antígenos solúveis de promastigotas na concentração de 2,0 µg/poço e mantidas em refrigeração à 4°C durante a noite. No dia seguinte, as placas foram submetidas a quatro lavagens com solução de lavagem (PBS + Tween) e incubadas a 37°C por 45 minutos com as amostras de soro na diluição de 1:80. As placas foram lavadas novamente e, aos poços, foram adicionados anticorpos de ovelha anti-IgG de cão conjugado com peroxidase (Bethy Laboratories, Montgomery, TX, USA) na diluição de 1:16000. As microplacas foram incubadas a 37°C por 45 minutos e, em seguida, submetidas a quatro lavagens. Em seguida, as placas foram incubadas com substrato (10 ml de ácido cítrico + 1 µg de ortofenildiamina + 2 µl de peróxido de hidrogênio 30 vol.) por 45 minutos a 37°C. Por fim, a reação enzimática foi interrompida através de adição de ácido sulfúrico 2,5M e a absorbância lida em leitor de ELISA (Biotek™) a 490 nm. Soros de cães nascidos e criados no canil da Universidade Federal de Ouro Preto foram utilizados como controles negativo, enquanto que soros de cães sabidamente positivos para LV, provenientes de Belo Horizonte, área endêmica para a doença, foram usados como controles positivo. Estes soros controles foram incluídos na reação para determinação do ponto de corte, que foi determinado através da curva ROC; amostras que apresentassem densidade óptica maior do que 0,223 foram consideradas positivas.

7 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

7.1 EXAME PARASITOLÓGICO DIRETO

Os esfregaços em lâminas confeccionados a partir dos aspirados de medula óssea, de baço e de fígado dos cães soropositivos (*Kalazar Detect Canine*) foram corados com corante Panótico Rápido (“Diff-Quick”) e submetidos à análise microscópica em

objetiva de imersão (100X) para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania spp.* Cada esfregaço foi cuidadosamente examinado por ao menos 2 horas, antes de ser considerado negativo.

7.2 CULTURA

Fragmentos de baço e de fígado colhidos dos cães com sorologia positiva para LV (*Kalazar Detect Canine*) foram mantidos refrigerados (4°C) durante 24 horas em solução salina com antibióticos (estreptomicina 100µg/ml e penicilina 5000U/ml). Os fragmentos eram então triturados em homogeneizador de tecidos e cultivados em tubos contendo o meio NNN (*Novy, Nicolle e McNeal*) suplementado com 1 ml de meio LIT. Conforme descrito na seção 5.2, as alíquotas de medula óssea eram inoculadas diretamente em frasco contendo 2 ml de meio líquido LIT. Após 24 horas de incubação, o conteúdo do frasco de cultura era transferido para tubos contendo NNN. Todas as culturas foram mantidas em estufa B.O.D entre 24-26°C e observadas diariamente em microscópio óptico invertido (objetiva de 20X), para visualização de formas promastigotas de *Leishmania*. Após quatro semanas as culturas negativas eram descartadas.

8 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

8.1 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA foi extraído a partir das culturas positivas para *Leishmania sp.* isoladas dos cães soropositivos. Não sendo possível o isolamento de *Leishmania sp.* em cultura ou quando esta não era realizada, foram utilizadas amostras clínicas de medula óssea e/ou creme leucocitário dos cães soropositivos para a extração do DNA. Para ambos os casos, foi utilizado o kit comercial descrito a seguir.

8.1.1 Extração de DNA de *Leishmania spp.* a partir de cultura de promastigotas

Foi utilizado o Kit *WizardTM Genomic DNA Purification* (PromegaTM) para a extração do DNA de *Leishmania spp.* a partir das culturas de promastigotas. Inicialmente, transferiu-se um volume da cultura que continha $1,0 \times 10^8$ parasitas para um tubo de polipropileno de 15 ml. Os parasitas foram lavados duas vezes por centrifugação a 2200 g por 10 minutos a 4°C, utilizando PBS (pH 7,2). A partir de então as seguintes etapas foram executadas:

1. Adição de 300 µl de solução de lise celular ao sedimento de parasitas, que era então transferido para um microtubo de 1,5 ml;
2. Homogeneização por inversão durante 10 minutos e centrifugação a 15.000g durante um minuto à temperatura ambiente, seguido de descarte do sobrenadante;
3. Adição de 100 µl de solução de lise nuclear ao sedimento e homogeneização da mistura por 20 a 30 segundos;
4. Adição de 100 µl de solução de precipitação protéica e homogeneização vigorosa em agitador do tipo “vortex” por 20-30 segundos;
5. Centrifugação da mistura a 15.000 g por três minutos à temperatura ambiente e transferência do sobrenadante para um novo microtubo contendo 300 µl de isopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$), seguido de homogeneização por 10-15 min., até o aparecimento de uma massa em suspensão, corresponde ao DNA extraído;
6. Centrifugação da mistura a 15.000 g em temperatura ambiente por 1 min., e observação, ao final deste processo, de um sedimento claro no fundo ou nas paredes do microtubo;
7. Descarte do sobrenadante e adição de 300 µl de etanol 70%, seguido de homogeneização da mistura por inversão do microtubo;
8. Aspiração cuidadosa do etanol e inversão do microtubo sobre folhas de papel de filtro por 15 a 20 minutos;
9. Finalmente, adição de 50 µl de solução de hidratação de DNA, mantendo o microtubo à temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte, o microtubo contendo o DNA extraído foi estocado sob refrigeração à temperatura de 4 a 8°C.

8.1.2 Extração de DNA a partir de medula óssea e creme leucocitário

Para a extração do DNA das amostras de medula óssea e de creme leucocitário foi utilizado o Kit *WizardTM Genomic DNA Purification* (Promega[®]). As seguintes etapas foram executadas:

1. Adição de 300 µl de medula óssea ou creme leucocitário a um microtubo estéril de 1,5 ml contendo 900 µl de solução de lise celular;
2. Homogeneização da mistura 5 a 6 vezes por inversão, seguido de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente para a lise das hemácias;
3. Centrifugação a 15.000g durante um minuto à temperatura ambiente, seguido de descarte do sobrenadante;
4. Adição de 300 µl de solução de lise nuclear ao sedimento e homogeneização da mistura por 20 a 30 segundos;
5. Adição de 100 µl de solução de precipitação protéica e homogeneização vigorosa em agitador do tipo “vortex” por 20-30 segundos;
6. Centrifugação da mistura a 15.000 g por três minutos à temperatura ambiente e transferência do sobrenadante para um novo microtubo contendo 300 µl de isopropanol (CH₃CHOHCH₃), seguido de homogeneização por 10-15 min., até o aparecimento de uma massa em suspensão, correspondente ao DNA extraído;
7. Centrifugação da mistura a 15.000 g em temperatura ambiente por 1 min., e observação, ao final deste processo, de um sedimento claro no fundo ou nas paredes do microtubo;
8. Descarte do sobrenadante e adição de 300 µl de etanol 70% para lavagem do sedimento de DNA, seguido de homogeneização da mistura por inversão do microtubo;
9. Aspiração cuidadosa do etanol e inversão do microtubo sobre folhas de papel de filtro por 15 a 20 minutos;
10. Finalmente, adição de 50 µl de solução de hidratação de DNA, mantendo o microtubo à temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte, o microtubo contendo o DNA extraído foi estocado sob refrigeração à temperatura de 4 a 8°C.

8.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O GÊNERO *Leishmania*

A técnica de PCR utilizada na identificação do gênero *Leishmania* seguiu o protocolo descrito por Andrade et al. (2006). Esta PCR amplifica uma sequência de nucleotídeos de 120 pares de base (pb) da região conservada do minicírculo do kDNA da *Leishmania*. Os iniciadores da região conservada do minicírculo do kDNA foram: 150 (5' GGG (G/T)AG GGG CGT TCT SCG AA 3') e 152 (5' (G/C)₃ (A/T)C TAT (A/T)TT ACA CCA ACC CC 3'). Para cada microtubo da reação utilizou-se 2,5 µl de DNA molde não diluído, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™, Carlsbad, California, EUA), 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega™, Madison, Wisconsin, EUA), 10 pmol dos iniciadores 150 e 152, 1,5 mM de MgCl₂, 1 µl de solução tampão 10X (20 mM Tris-HCl - pH 8,4; 50 mM KCl) para um volume final de 20 µl. As condições da reação foram desnaturação inicial a 94 °C por 5 min seguidos de 35 ciclos da seguinte seqüência: 94 °C por 1 min, 65 °C por 1 min, 72 °C por 1 min; extensão final a 72 °C por 5 min. A amplificação foi realizada em termociclador Lcx Probe System (Abbott™, Versão 2.3).

Os produtos amplificados foram separados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% no sistema mini-gel (BIORAD™, Hercules, California, EUA). O gel foi corado com brometo de etídio a uma concentração de 0,5 µg/ml por 5 minutos, e, em seguida, lavado com água corrente por mais 5 minutos. Posteriormente o gel foi visualizado e fotografado em sistema DNR MiniBis Pro (Bioamerica™, Miami, Florida, EUA). Como controles-positivo foram utilizados amostras de DNA extraídas de culturas de promastigotas de cepas de referência das espécies *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269). Um controle-negativo sem DNA foi incluído em todas as reações de PCR.

8.3 PCR-RFLP PARA IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE DE *Leishmania*

O protocolo de identificação da espécie de *Leishmania* foi realizado segundo a metodologia proposta por Volpini et al. (2004), que possibilita a distinção das

mesmas pelo tamanho dos fragmentos gerados após digestão do fragmento de 120 pb (gênero *Leishmania*) pela enzima de restrição *Hae III*. Resumidamente, 5 µl do produto de PCR obtido pelos iniciadores 150 e 152 foram digeridos através da adição de 1U da enzima de restrição *Hae III* (Invitrogen™) ao microtubo contendo 1 µl de tampão e 3 µl de água deionizada (Milli Q™, Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA), compondo um volume final de 10 µl. A mistura foi incubada por 3 horas em banho-maria a 37 °C. Após a digestão, 5 µl do produto digerido foi submetido à migração eletroforética em gel de poliacrilamida a 6% no sistema mini-gel (BIORAD™). O gel foi corado com brometo de etídio a uma concentração de 0,5 µg/ml por 5 minutos, e, em seguida, lavado com água por mais 5 minutos. O gel foi visualizado e fotografado em sistema DNR MiniBis Pro (Bioamerica™). Os fragmentos de restrição obtidos pela digestão do DNA das amostras foram comparados com o perfil gerado após a digestão de DNA das cepas padrões de *Leishmania*: *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75).

9 INVESTIGAÇÃO ENTOMOLÓGICA

No início da investigação entomológica contamos com a supervisão do pesquisador Edelberto Santos Dias, Coordenador do Centro de Referência em Capacitação de Flebotomíneos e Competência Vetorial do Centro de Pesquisas Rene Rachou (CPqRR, Fiocruz – Minas Gerais), que auxiliou na definição dos pontos de instalação das armadilhas. As capturas foram realizadas em residências localizadas nos bairros vizinhos André Carlone e Carapina Grande, onde no primeiro foram registrados casos caninos e humano de LV e no segundo somente casos caninos. A seleção das residências para a instalação das armadilhas foi realizada com base na ocorrência do caso humano e dos casos caninos de LV nestes locais, bem como pela presença de fatores ecológicos e ambientais favoráveis ao desenvolvimento e reprodução de flebotomíneos, isto é, abundância de matéria orgânica, presença de plantas (árvores, arbustos), presença de animais domésticos (cães e/ou gatos) ou de criação como porcos, galinhas, coelho, entre outros. Na ausência de condições ecológicas e ambientais para a criação de flebotomíneos nas residências com

registro de caso humano e/ou presença de cães soropositivos (*Kalazar Detect Canine*), procurou-se residências vizinhas a estas que apresentassem tais características. Duas armadilhas luminosas do tipo CDC (SUDIA & CHAMBERLAIN, 1962) foram utilizadas para cada residência, sendo que ambas foram instaladas no peridomicílio. As coletas foram realizadas entre Setembro de 2009 a Fevereiro de 2010. Durante este período, as armadilhas foram instaladas semanalmente, no mínimo uma vez por semana. Todos os pontos de coleta foram georeferenciados por GPS (*Global Positioning System*) e posteriormente plotados nos mapas dos bairros André Carlone e Carapina Grande, obtidos através do *software* Google Earth, versão 5.0.1. As armadilhas foram instaladas ao entardecer, entre 17:00 e 18:00 pm, e retiradas no dia seguinte até às 8:30 am. Os insetos coletados durante a noite eram levados ao Laboratório de Leishmanioses do NDI/UFES, onde eram mortos por congelamento em freezer a - 20°C, e então submetidos a um processo de triagem para seleção dos flebotomíneos. Os exemplares de flebotomíneos eram então preservados em tubos de hemólise contendo etanol 70% até o momento da identificação. A identificação das espécies de flebotomíneos foi realizada pelo Laboratório de Leishmanioses do CPqRR. Todos os exemplares coletados foram identificados de acordo com suas características morfológicas, seguindo a chave de identificação proposta por Young & Duncan (1994). Espécimes com caracteres ausentes ou incompletos que prejudicassem a identificação foram considerados como *Lutzomyia spp.*

10 ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-MAXADILAN

Com o intuito de verificar indiretamente a exposição dos cães aos flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* foi executado um ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos IgG contra a proteína salivar “Maxadilan”, específica dessa espécie. O experimento foi realizado no Laboratório de Entomologia Médica do CPqRR. Inicialmente, placas de 96 poços de fundo chato (MaxiSorp™ – Nalge Nunc, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com uma mistura de três variantes da proteína recombinante “Maxadilan” (variantes 1, 3 e 4) na concentração de 2,0 µg/ml e mantidas em refrigeração a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as placas

foram lavadas quatro vezes com solução de PBS-Tween 0,05% e incubadas durante a noite com solução de bloqueio (PBS-Tween 0,1% + *Bovine Serum Albumine* 5,0%). Após quatro lavagens, as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 60 minutos com as amostras de soro na diluição de 1:400. As placas foram então lavadas novamente e, aos poços, foram adicionados anticorpos de ovelha anti-IgG de cão conjugado com peroxidase (Bethy Laboratories, Montgomery, TX, USA) na diluição de 1:16000. As microplacas foram incubadas a temperatura ambiente por 60 minutos e, em seguida, submetidas a quatro lavagens. Em seguida, as placas foram incubadas com substrato (10 ml de ácido cítrico + 1 µg de ortofenildiamina + 2 µl de peróxido de hidrogênio 30 vol.) por 45 minutos a temperatura ambiente. Por fim, a reação enzimática foi interrompida com ácido sulfúrico 2,5M e a absorbância lida em leitor de ELISA (Biotek™) a 490 nm. Soros de cães nascidos e criados em canil telado da Universidade Federal de Ouro Preto foram utilizados como controles negativo, enquanto que soros de cães sabidamente positivos para LV, provenientes de Belo Horizonte, área endêmica para a doença, foram usados como controles positivo. Estes soros controles foram incluídos na reação para a determinação do ponto de corte, que foi determinado pela curva ROC; amostras que apresentassem densidade ótica maior do que 0,246 foram consideradas positivas.

11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo e todos os procedimentos realizados com os cães do estudo cumpriram com as normas adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

RESULTADOS

1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO CANINA

Dos 201 cães arrolados no estudo, 40,79% (82/201) eram animais abrigados no canil do CCZ do Município da Serra, e 59,21% (119/201) eram cães domiciliados do bairro André Carlone, Serra. A classificação dos animais segundo procedência pode ser vista na Tabela 1. Trinta e um cães do CCZ não possuíam cadastro no arquivo do Setor de Controle Animal e, portanto não puderam ser classificados.

Tabela 1 - População canina incluída no estudo no período de Novembro de 2008 a Maio de 2009.

	CÃES – n (%)			Total
	Errantes*	Domiciliados*	Sem identificação	
CCZ	20 (24,39%)	31 (37,80%)	31 (37,80%)	82
André Carlone	0 (0%)	119 (100%)	0 (0%)	119
Total	20 (9,95%)	150 (74,62%)	31 (15,42%)	201

*Classificação segundo o *Guidelines for Dog Population Management – WHO, 1990*.

Dos 201 cães incluídos no estudo, 116 (57,71%) eram fêmeas e 81 (40,29%) eram machos. Em quatro (1,99%) animais a informação quanto ao sexo não foi anotada na ficha de coleta de sangue. Dentre os 119 cães domiciliados procedentes do bairro André Carlone, somente 33/119 (27,73%) não possuíam raça definida. As raças por ordem de frequência foram: Poodle (22,68%), Pinsher (21,84%), Lhasa Apso (4,20%), Beagle e Yorkshire (3,36% cada) e Basset (2,52%). As outras raças menos frequentes encontradas foram: Chow Chow, Pequinês, Pitbull, American Sttafordshire, Rotweiller, Dash Hound, Pastor Belga, Labrador, Pastor Alemão, Beagle, Cocker Spaniel e Fila, estas representando 13,44% do total. Apenas um animal foi classificado como mestiço.

Em relação aos cães mantidos no canil do CCZ, a grande maioria (81,70%) não possuía raça definida (SRD); o restante pertencia às raças Poodle (6), Basset (1), Dash Hound (1) e Fila (1). Dois cães eram mestiços e quatro não possuíam identificação quanto à raça nos arquivos do CCZ.

2 TRIAGEM SOROLÓGICA, EXAMES PARASITOLÓGICOS E MOLECULARES PARA LVC

Dos 201 cães avaliados, 13,0% (26/201) e 5,97% (12/201) apresentaram respectivamente resultados positivos no teste ELISA “in house” e *Kalazar Detect Canine*. Apenas três cães apresentaram sorologia concordante positiva no ELISA “in house” e no *Kalazar Detect Canine*. Os ensaios RIFI e ELISA (Biomanguinhos) foram negativos em todos os 201 animais (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados da triagem sorológica (IgG) nos 201 animais do estudo, utilizando ELISA e RIFI (Biomanguinhos), ELISA “in house” e *Kalazar Detect Canine*, Serra, ES.

Teste Sorológico	Resultado - (n/total)	
	Positivo	Negativo
ELISA e RIFI (Biomanguinhos)	0% (0/201)	100% (201/201)
ELISA “in house”	13,00% (26/201)	87,00% (175/201)
<i>Kalazar Detect Canine</i>	5,97% (12/201)	94,02% (189/201)

Ao analisarmos os resultados do teste ELISA “in house” separadamente para cada grupo de cães (André Carlone e CCZ), observa-se uma maior frequência de positividade entre os cães procedentes de André Carlone, 16% (19/119), em relação aos cães mantidos no canil do CCZ da Serra, 8,53% (7/82) (tabela 3). As médias de densidade óptica obtidas no teste ELISA “in house” foram semelhantes nos dois grupos de animais testados (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados do teste ELISA “in house” para cães procedentes do bairro André Carlone e Centro de Controle de Zoonoses da Serra.

ELISA	Resultado			
	Positivo		Negativo	
	André Carlone	CCZ	André Carlone	CCZ
Porcentagem	16,00% (19/119)	8,53% (7/82)	84,03% (100/119)	91,46% (75/82)
Média D.O. ± DP	0,288 ± 0,048	0,274 ± 0,041	0,117 ± 0,052	0,144 ± 0,033
Amplitude	0,224 – 0,372	0,225 – 0,341	0,026 – 0,223	0,061 – 0,217

ELISA foi considerado positivo para valores de D.O. maiores que 0,223
DO - Densidade óptica, DP – Desvio padrão

Os resultados do teste *Kalazar Detect Canine* dos cães de André Carlone e CCZ estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados do teste *Kalazar Detect Canine* para cães procedentes do bairro André Carlone e Centro de Controle de Zoonoses da Serra.

Cães	<i>Kalazar Detect Canine</i> - % (n/total)	
	Positivo	Negativo
CCZ - Serra	7,31% (6/82)	92,68% (76/82)
André Carlone	5,04% (6/119)	94,95% (113/119)

Do total de 12 cães com sorologia positiva pelo teste *Kalazar Detect Canine*, dois (16,66%) (N° 84 e 2304) apresentaram mielocultura positiva para *Leishmania*. O cão de N° 84 também apresentou exame parasitológico direto positivo para formas amastigotas de *Leishmania* em esfregaço de baço. Estes animais não apresentavam sinais clínicos da doença (infecção assintomática – Figuras 7 A e B). Uma fotografia da cultura positiva de um destes cães é mostrada na Figura 3, onde nota-se formas promastigotas do parasita ainda em fase de crescimento. Os isolados destes cães foram identificados, pela técnica PCR-RFLP, como pertencentes à espécie *Leishmania (L.) chagasi* (Figura 4). Além disso, quatro cães, cuja cultura foi negativa, apresentaram PCR positivo para o gênero *Leishmania sp.*, (Figura 5). Nestas amostras, entretanto, o fragmento de 120 pb amplificado não foi

digerido pela enzima de restrição *Hae III*, provavelmente devido à baixa concentração do DNA amplificado. Três destes cães eram domiciliados nascidos e criados no bairro André Carlone e não possuíam histórico de deslocamento para áreas endêmicas para LV, segundo seus proprietários. O outro animal PCR positivo havia sido capturado pelo CCZ em Barcelona, bairro localizado a aproximadamente 10 km do bairro André Carlone.

Em relação à apresentação clínica dos demais cães que apresentaram pelo menos um teste positivo para LV (*Kalazar Detect Canine*, ELISA “in house” ou PCR), apenas um cão (Nº 44A), cujo PCR e *Kalazar Detect Canine* foram positivos, apresentou sinais clínicos sugestivos de LV. Estes sinais incluíam caquexia, diarreia, apatia, emagrecimento e onicogribose (Figura 6). O animal evoluiu para o óbito em um final de semana e foi mantido em freezer -20 °C. A necropsia realizada posteriormente revelou esplenomegalia. Não foi possível a realização da punção aspirativa do baço e subsequente exame parasitológico direto (esfregaço em lâmina e cultura).

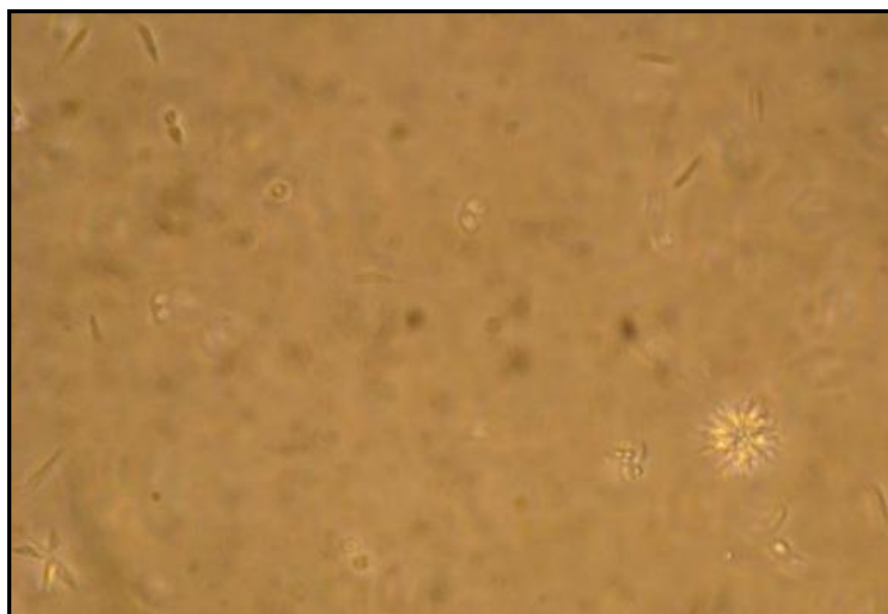


Figura 3 - Formas promastigotas de *Leishmania* isoladas em cultura a partir de medula óssea de cão procedente do Município da Serra, ES.

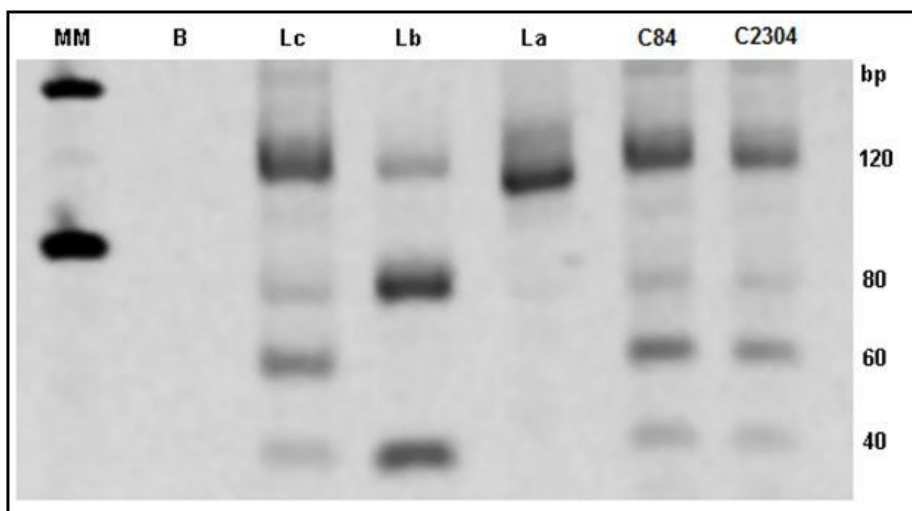


Figura 4 - Gel de poliacrilamida 6% mostrando produtos de PCR da região conservada do minicirculo de kDNA de *Leishmania* gerados após digestão com a enzima de restrição *Hae III*. MM, marcador molecular de 100bp; B, branco; Lc, *Leishmania (L.) chagasi* (PP75); Lb, *L. (V.) braziliensis* (M2903); La, *L. (L.) amazonensis* (M2269); C84 e C2304, Cães procedentes do Município da Serra, ES.

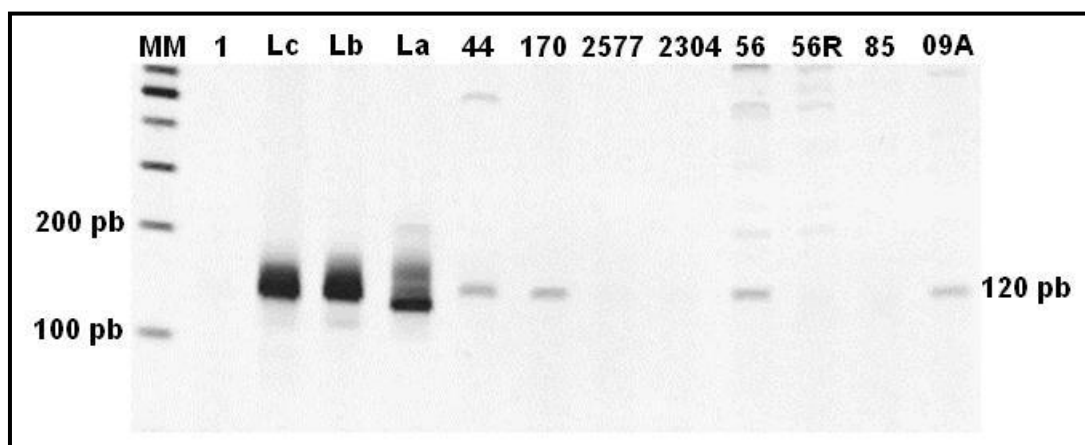


Figura 5 - Gel de poliacrilamida 6% mostrando produtos de PCR obtidos após amplificação de uma sequência de nucleotídeos de 120 pb da região conservada do minicirculo do kDNA de *Leishmania*. MM, marcador molecular de 100 pb; 1, Controle negativo; Lc, Lb e La – Cepas de referência de *Leishmania*: *L. (L.) chagasi* (PP75), *L. (V.) braziliensis* (M2903), *L.(L.) amazonensis* (M2269), respectivamente; 44, 170, 56 e 09A, fragmento de 120 pb do kDNA de *Leishmania* amplificado a partir de DNA extraído de creme leucocitário de quatro cães com resultado positivo para o teste *Kalazar Detect Canine*; 2577, 2304, 56R e 85, Cães com resultado negativo para PCR.



Figura 6 - Cão com sorologia positiva (*Kalazar Detect Canine*) e PCR positivo para o gênero *Leishmania* apresentando sinais clínicos sugestivos de LV. Nota-se profundo emagrecimento, apatia e onicogribose.

Caso de Óbito: conforme mencionado anteriormente houve um óbito humano por LV no bairro André Carlone antes do início do estudo. A paciente, de 44 anos foi atendida em vários Pronto Atendimentos dos municípios da Serra e Vitória durante três meses com sinais e sintomas sugestivos da doença (febre, emagrecimento, tosse seca, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e plaquetopenia) sem diagnóstico. Por fim a paciente foi internada na Santa Casa de Misericórdia de Vitória onde evoluiu para óbito por hematêmese, três dias após o diagnóstico de LV, realizado através da visualização de formas amastigotas de *Leishmania* em aspirado de medula óssea. Apesar de residir há mais de 20 anos no município da Serra, a paciente era natural do município de Barra de São Francisco, endêmico para LV, que entretanto não notifica casos da doença há 10 anos. Durante a investigação do caso descobriu-se também que a paciente era soropositiva para o HIV (EIA/MEIA, IFI e *Rapid Check HIV 1 & 2*). A paciente possuía dois cães (Cães de N°84 e N°85) em sua residência no bairro André Carlone, os quais apresentaram resultados positivos para o teste *Kalazar Detect Canine*, tendo sido isolado *Leishmania* da medula óssea em um deles (N°84). Segundo os familiares da paciente, ambos os cães nasceram e foram criados no município da Serra e nunca haviam viajado para áreas endêmicas para LV. Soros de cinco familiares da paciente foram submetidos à RIFI para *Leishmania*. Destes, quatro apresentaram resultados positivos, sendo duas amostras reagentes em títulos de 1/80 e duas para títulos de 1/40. Entretanto, nenhum deles apresentava sinais clínicos da doença.

Um dos dois cães com cultura positiva pertencia à paciente. Este animal também apresentou esfregaço positivo de material esplênico para formas amastigotas do

parasita. O outro animal era um cão errante que fora capturado pelo CCZ em um bairro (Carapina Grande) adjacente ao bairro onde morava a paciente, há aproximadamente 550 metros de sua residência (Figura 7A e B).

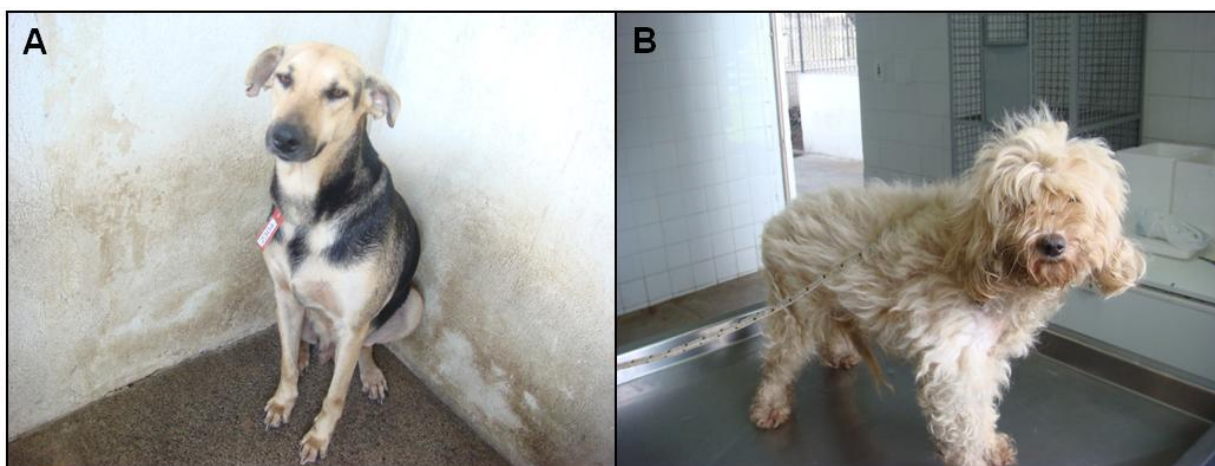


Figura 7 A - Cão errante, capturado no bairro Carapina Grande, Município da Serra, ES. **B** – Cão domiciliado procedente do bairro André Carlone, Município da Serra, ES. Os dois animais apresentaram sorologia (*Kalazar Detect Canine*) reagentes e mielocultura positiva para *Leishmania*, identificada como *L.(L.) chagasi*. Notar o aspecto saudável dos animais.

A tabela 5 mostra os resultados das reações sorológicas, ensaio molecular e parasitológico dos 35 animais com resultado positivo em alguma delas. O teste *Kalazar Detect Canine* foi o que apresentou a maior concordância com a PCR.

Tabela 5 - Resultados de cultura, RIFI e ELISA (Fiocruz-Biomanguinhos), ELISA "in house", *Kalazar Detect Canine* e PCR para gênero *Leishmania* de cães do Município da Serra, ES.

Nº Cão	Resultado				
	Cultura	RIFI e ELISA ¹	ELISA ²	<i>Kalazar Detect</i>	PCR
09A	-	-	-	+	+
44A	-	-	-	+	+
56	-	-	-	+	+
57	-	-	-	+	-
84*	+	-	-	+	+
85	-	-	-	+	-
170	-	-	-	+	+
2304*	+	-	-	+	+
2577	-	-	-	+	-
106	NR	-	+	+	NR
27	NR	-	+	+	NR
03	NR	-	+	-	-
11	NR	-	+	-	-
16	NR	-	+	-	NR
18B	NR	-	+	-	-
18D	NR	-	+	-	-
21	NR	-	+	-	-
23A	NR	-	+	-	NR
23B	NR	-	+	-	-
37	NR	-	+	-	-
58	NR	-	+	+	NR
59	NR	-	+	-	-
63	NR	-	+	-	NR
67	NR	-	+	-	-
68A	NR	-	+	-	-
81	NR	-	+	-	NR
82	NR	-	+	-	-
86	NR	-	+	-	NR
94	NR	-	+	-	-
88	NR	-	+	-	NR
98	NR	-	+	-	NR
111	NR	-	+	-	NR
116	NR	-	+	-	NR
121	NR	-	+	-	NR
152	NR	-	+	-	NR

*Cães com mielocultura positiva para *Leishmania*, identificada como *Leishmania (L.) chagasi*.

NR – Não realizado.

1– ELISA e RIFI (Fiocruz – Biomanguinhos).

2– ELISA "in house".

3 INVESTIGAÇÃO ENTOMOLÓGICA

Um total de 19 flebotomíneos foram capturados no período de Setembro de 2009 a Fevereiro de 2010. Embora a espécie *Lutzomyia longipalpis* não tenha sido encontrada, outras cinco espécies de flebotomíneos distintas foram capturadas na área do estudo: *Lutzomyia edwardsi*, *Lutzomyia tupynambai*, *Lutzomyia cortelezzii*, *Lutzomyia sordellii* e *Lutzomyia intermedia* (Tabela 6). Do total de exemplares capturados, 11 (57,89%) eram fêmeas e 8 (42,10%) eram machos. Os pontos de coleta dos flebotomíneos e o local de ocorrência do caso humano foram georeferenciados por GPS e plotados nos mapas dos bairros estudados, conforme pode-se observar na Figura 8, assim como os pontos de ocorrência dos cães positivos para o testes de PCR e *Kalazar Detect Canine* (Figura 9).

Tabela 6 – Espécies de flebotomíneos capturados nos bairros André Carlone e Carapina Grande, Município da Serra.

Espécie	Machos	Fêmeas	Total
<i>L. edwardsi</i>	1	1	2
<i>L. tupynambai</i>	1	6	7
<i>L. cortelezzii</i>	5	3	8
<i>L. sordellii</i>	1	-	1
<i>L. intermedia</i>	-	1	1
Total	8	11	19

Somente em duas das dez residências investigadas foram capturados flebotomíneos: uma no bairro André Carlone e outra no bairro Carapina Grande (Figura 8). Os flebotomíneos foram encontrados em um raio de aproximadamente 700 metros do domicílio onde residia a paciente que foi a óbito por LV. Os casos caninos e humanos de LV, por sua vez, concentraram-se em um raio aproximado de 550 metros da casa da paciente.

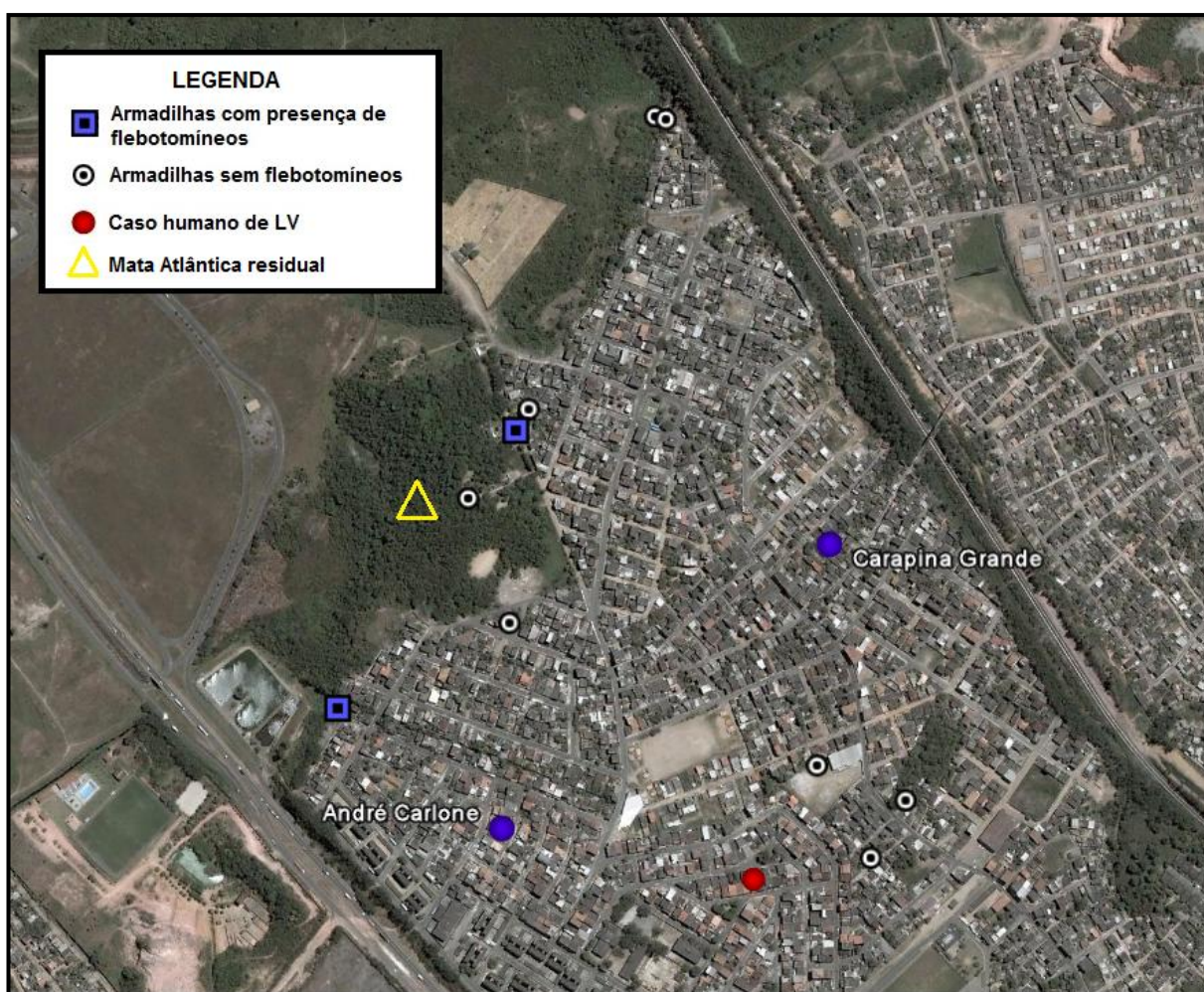


Figura 8 – Localização geográfica do caso humano de LV e armadilhas com e sem presença de flebotomíneos, bairros André Carlone e Carapina Grande, Município da Serra, Espírito Santo. A imagem foi obtida pelo software Google Earth, versão 5.0.1.

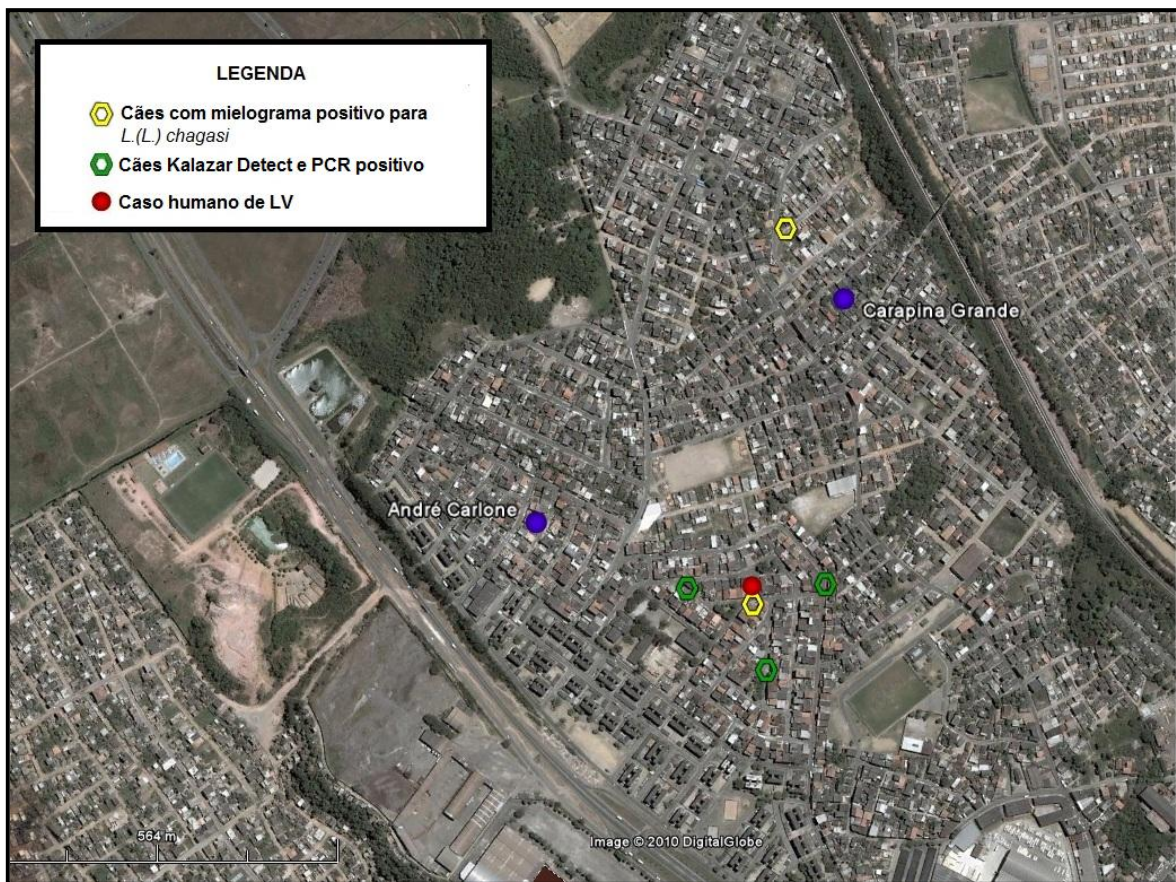


Figura 9 – Localização geográfica do caso humano de LV, cães com mielograma positivo para *L.(L.) chagasi* e cães *Kalazar Detect Canine* e PCR positivo, bairros André Carlone e Carapina Grande, Município da Serra, Espírito Santo. A imagem foi obtida pelo software Google Earth, versão 5.0.1.

As residências onde foram encontrados flebotômíneos estão localizadas no limite entre uma mata residual (Mata Atlântica remanescente) e a zona urbana do bairro, conforme indicado na Figura 8. Além disso, o peridomicílio destas residências possuía condições ecológicas e ambientais favoráveis ao desenvolvimento e reprodução de flebotômíneos, tais como presença de plantas (árvores, arbustos e/ou bananeiras), matéria orgânica e animais domésticos, como cães (Figura 10).



Figura 10 – Quintal das residências localizadas nos bairros Carapina Grande (A) e André Carlone (B) em cujos peridomicílios foram encontrados exemplares de flebotomíneos.

Soros dos 12 animais positivos para o teste *Kalazar Detect Canine* (dentre eles quatro cães com PCR positivo e dois com cultura positiva para *L. (L.) chagasi*) foram testados no ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-Maxadilan. Destes, 11 (91,66%) apresentaram sorologia positiva para este teste.

DISCUSSÃO

Três critérios devem ser obedecidos para se definir uma área como sendo endêmica para leishmaniose visceral: presença de reservatórios caninos infectados por *L. (L.) chagasi*, existência do vetor *Lutzomyia longipalpis* e ocorrência de transmissão humana da doença. Nossos resultados sugerem fortemente que o município da Serra pode ser classificado como uma nova área endêmica de LV.

A possível autoctonia do caso humano descrito neste estudo apresenta prós e contras. A paciente do nosso estudo tinha 44 anos e era natural do Município de Barra de São Francisco - área endêmica para LV – localizado no noroeste do estado, na divisa com Minas Gerais. Apesar de morar há mais de 20 anos no município da Serra, a paciente possuía histórico de viagens freqüentes à sua cidade natal, que entretanto não registra casos da doença há mais de 10 anos (MS - SINAN, 2010). Um fato complicador no raciocínio epidemiológico deste caso é o fato da paciente ser soropositiva para o HIV (diagnóstico realizado em 2000), o que nos obriga também a considerar a hipótese de reativação de uma infecção adquirida no passado em sua cidade natal. O diagnóstico de HIV foi feito em 2000 quando seu parceiro também havia sido diagnosticado. Entretanto a paciente nunca retornou para buscar o resultado da sorologia e evoluiu durante 8 anos (óbito em novembro de 2008) sem tratamento. Apesar do nível de linfócitos T CD4⁺ da paciente ser desconhecido no momento da manifestação clínica da LV, podemos assumir que, devido ao tempo de evolução da infecção pelo HIV, a paciente apresentava a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) quando a LV se manifestou. Estudos epidemiológicos realizados no início da epidemia de HIV mostraram que a sobrevivência média de um paciente HIV positivo não tratado é de 10 anos (RUTHERFORD et al. 1990). Por outro lado, a hipótese de reativação de uma infecção passada, não exclui a possibilidade de a paciente ter adquirido a infecção no bairro André Carlone, onde morava na Serra. Como apresentado na seção de resultados, os dois cães pertencentes à paciente apresentaram sorologia positiva para LV (*Kalazar Detect Canine*) e de um deles foi isolado *L. (L.) chagasi* em cultura de medula óssea. Estes animais, nascidos e criados no referido bairro, não possuíam história de viagem para áreas endêmicas da doença.

Além dos dois cães da paciente, um outro animal capturado pelo CCZ, a 550 metros da casa da paciente, também apresentou *Kalazar Detect Canine* e cultura positiva

para *L. (L.) chagasi*. Excluindo-se estes três animais, o nosso estudo detectou no inquérito soroepidemiológico realizado em cães domiciliados do bairro e em cães capturados pelo CCZ outros 32 animais positivos para pelo menos um dos testes utilizados. Destes animais, quatro apresentaram também reação de PCR positiva (três animais domiciliados e um animal errante capturado a 10 km do bairro André Carlone). A confirmação parasitológica através de cultura em dois animais, a positividade da reação de PCR em outros quatro indica a existência de casos autóctones caninos de LV no município da Serra, situado na região metropolitana de Vitória. Via de regra o aparecimento de casos humanos da doença é precedido de casos caninos. Como exemplo podemos citar a epidemia de LV humana em Araçatuba – São Paulo e São Borja no Rio Grande do Sul onde a presença de cães infectados foi detectada um ano antes do início da epidemia humana (SESA - SP, 2009; GALIMBERTTI et al. 1999; CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, RS, 2009; SOUZA, SANTOS & ANDRADE-FILHO, 2009). Em Araçatuba, com 182.000 habitantes, foram notificados nos primeiros seis anos (1999 a 2004) da epidemia 189 casos humanos com 20 óbitos (10,5%). O município da Serra com 404.688 habitantes dista somente 27 km de Vitória, capital do estado com 320.156 habitantes, que é contígua à Vila Velha com 413.600 habitantes e Cariacica com 365.859 habitantes. Juntos eles perfazem 1.504.303 habitantes o que dá uma idéia da magnitude de uma eventual epidemia (IBGE, 2009). Vale a pena mencionar que um estudo soroepidemiológico prévio realizado por nosso grupo, com cães errantes do município de Vitória – área considerada indene para LV – já havia detectado cães com sorologia positiva (*Kalazar Detect Canine*) em sete de 158 (4,4%) animais, o que reforça a possibilidade da existência da LV canina também em Vitória. Recentemente, durante a realização de inquérito sobre toxoplasmose canina, detectamos dois animais com *Kalazar Detect Canine* positivo em oito animais investigados. Estes cães errantes haviam sido capturados pelo CCZ de Vitória.

Os resultados dos testes sorológicos utilizados no nosso estudo foram desapontadores devido a baixa concordância entre eles. Somente três cães apresentaram sorologia positiva concordante no ELISA “in house” e *Kalazar Detect Canine*. Nenhum animal foi positivo para os testes (RIFI e ELISA) produzidos por Biomanguinhos – FIOCRUZ. É importante mencionar que dos quatro testes usados no inquérito sorológico somente o *Kalazar Detect Canine* é produzido sob “Boas

Práticas de Fabricação” e disponível comercialmente para compra. De qualquer forma é preocupante o fato do Programa de Controle de Leishmanioses do Ministério da Saúde utilizar a RIFI e ELISA há anos em inquéritos soroepidemiológicos caninos, visando a detecção e a eliminação de animais positivos como forma de controle da doença humana. No nosso estudo, uma possível justificativa para o baixo desempenho dos testes RIFI e ELISA fabricado por Biomanguinhos seria a baixa sensibilidade dos mesmos em animais assintomáticos, como o eram a quase totalidade dos cães do nosso estudo.

A investigação entomológica conduzida nos bairros com registros de casos caninos e humanos de LV não revelou a presença de *Lutzomyia longipalpis*, apesar de termos logrado capturar outras espécies de flebotomíneos. A ausência de *L. longipalpis* em nossas capturas não descarta a existência deste vetor na área estudada. Para tal seria necessário um estudo sistemático da fauna flebotomínica local por um período mínimo de dois anos o que não foi possível no nosso trabalho. Foram feitas somente coletas pontuais por curto período de tempo (69 capturas em 16 dias ao longo de seis meses). A ausência de *Lutzomyia longipalpis* em áreas de ocorrência de LV autóctone já foi observada em diferentes ocasiões e regiões, onde outras espécies de flebotomíneos (*L. evansi*, *L. cruzi*, *L. migonei* e *L. cortelezzii*) foram sugeridas como vetores do parasita (TRAVI et al. 1990; SANTOS et al. 1998; DE SOUZA et al. 2003; CARVALHO et al. 2008; SALOMÓN et al. 2010). Como havíamos encontrado 35 animais com sorologia positiva (ELISA “in house” e *Kalazar Detect Canine*) julgávamos que não teríamos dificuldade em encontrar o vetor da LV. Embora esteja claro que a transmissão natural da *L. (L.) chagasi* para o reservatório canino ocorre através da picada de flebotomíneos infectados, a possibilidade da existência de outros mecanismos de transmissão não pode ser descartada. Neste contexto, Coutinho et al. (2005) avaliaram a participação do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* na epidemiologia da LVC. Neste estudo, os autores relataram infecção natural por *Leishmania* - determinada através de PCR - em 15,4% (6/39) dos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* coletados de cães soropositivos para *Leishmania*. Além disso, foi possível transmitir a infecção a hamsters (*Mesocricetus auratus*), através da inoculação oral de macerados de carrapatos coletados de cães infectados por *Leishmania*. Os autores sugerem que o hábito dos cães de lambem e coçar a si mesmos e outros animais - o que pode

resultar muitas vezes em ingestão de carrapatos e outros ectoparasitas - pode representar uma via alternativa de infecção por *L. (L.) chagasi*. Além do mais, o hábito dos carrapatos machos de trocar freqüentemente de hospedeiro poderia favorecer, em cães saudáveis, a infecção por este mecanismo.

Estudos recentes têm empregado uma proteína salivar específica (Maxadilan) da espécie *L. longipalpis* como antígeno vacinal experimental contra *L. major* (MORRIS et al. 2001). Em nosso estudo utilizamos Maxadilan recombinante, em um ensaio imunoenzimático, como forma indireta de confirmar a exposição dos animais ao vetor da LV. Onze dos 12 animais soropositivos para o teste *Kalazar Detect Canine* apresentaram sorologia positiva para o ELISA anti-maxadilan, sugerindo que estes animais foram expostos a picadas de *L. longipalpis*. Curiosamente, um dos animais com mielocultura positiva apresentou ELISA negativo para Maxadilan. Neste caso caberiam 3 hipóteses: resultado falso negativo da sorologia, mecanismo alternativo de infecção por carrapatos ou a participação de outra espécie de flebotomíneo na transmissão.

Dentre as espécies de flebotomíneos capturadas somente a *Lutzomyia intermedia* apresenta importância epidemiológica, sendo considerada espécie vetora de LTA. O encontro desta espécie no peridomicílio demonstra a capacidade de domiciliação e de adaptação ao ambiente modificado pelo homem, típico desta espécie. Embora não haja registros de casos de LTA na área do estudo, o encontro desta espécie indica a possibilidade de transmissão de LTA nestes bairros.

CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem fortemente ser o Município da Serra uma nova área de transmissão de LVC, apesar de não ter sido possível encontrar todos os elos da cadeia epidemiológica;

Os testes RIFI e ELISA produzidos por Biomanguinhos/FIOCRUZ não foram capazes de detectar a infecção nos animais do nosso estudo, mesmo aqueles com confirmação parasitológica da doença, mostrando o baixo desempenho destes ensaios no diagnóstico da LVC, já observado em outros estudos;

Apesar da espécie *L. longipalpis* não ter sido capturada na área do estudo, os resultados positivos encontrados no ensaio ELISA anti-Maxadilan para os cães com teste *Kalazar Detect Canine* positivo sugerem que estes animais foram picados pelo vetor da LV.

RECOMENDAÇÕES

Os médicos dos serviços de saúde da região metropolitana de Vitória devem ser alertados sobre a possibilidade de transmissão autóctone de LV para que não ocorra diagnóstico tardio da doença como foi o caso da paciente deste estudo.

Para que se tenha uma idéia da dispersão da LV na região metropolitana de Vitória sugere-se a realização de um inquérito sorológico canino mais amplo, utilizando-se o *Kalazar Detect Canine* e a PCR nos animais soropositivos. Recomenda-se também a realização de um estudo sistemático da fauna de flebotomíneos dos locais onde forem encontrados cães infectados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMATO-NETO, V.; GRYSCHKEK, R.C.B; AMATO, V.S; TUON, F.F. Parasitologia: uma abordagem clínica. Rio de Janeiro. Editora Elsevier, 2008.

ANDRADE, H.M. ; REIS, A.B. ; SANTOS, S.L. ; VOLPINI, A.C. ; MARQUES, M.J. ; ROMANHA, A.J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.231-238, set. 2006.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis Reservoirs and Their Significance in Control. **Clinics in Dermatology**, v.14, p. 523-532. 1996.

ASHFORD, D.A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M.C.; SAMPAIO, D.P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 59. n. 1. p. 53-57. 1998.

BADARO, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON Jr, W.D. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**. v. 154, p. 1003–1011.1986.

BARROUIN-MELO, S.M.; LARANGEIRA, D.F.; TRIGO, J.; AGUIAR, P.H.P.; DOS-SANTOS, W.L.C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Comparison between Splenic and Lymph Node Aspirations as Sampling Methods for the Parasitological Detection of *Leishmania chagasi* Infection in Dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99. n. 2. p. 195-197. 2004.

BAUZER, L.G.S.R.; SOUZA, N.A.; MAINGON, R.D.C.; PEIXOTO, A.A. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 102. n. 1. p. 1-12. 2007.

BERN C.; JHA, S.N.; JOSHI, A.B.; THAKUR, G.D.; BISTA, M.B. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 63. p. 153–157, 2000.

BERN, C; MAGUIRE, J.H.; ALVAR, J. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v.2. p.01-08, out.2008.

BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R.A.M.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**. v. 37. p. 1063-1075. 2007.

BASTIEN, P.; PROCOP, G.W.; REISCHL, U. Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than “Conventional” PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 6. p. 1897-1900. 2008.

BURNS Jr, J.M.; SHREFFLER, W.G.; BENSON, D.R.; GHALIB, H.W.; BADARO, R.; REED, S.G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania*

chagasi that detects antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 90. p. 775–779, 1993.

CAMARGO-NEVES, V.L.; KATZ, G.; RODAS, L.A.; POLETTO, D.W.; LAGE, L.C.; SPINOLA, R.M.; CRUZ, O.G. Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Aracatuba, Sao Paulo, Brazil, 1998-1999. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, p.1263-1267. 2001.

CARVALHO, S.F.G.; LEMOS, E.M.; COREY, R.; DIETZE, R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of brazilian visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.68, n.3, p.321-324. 2003.

CARVALHO, G.M.L.; ANDRADE-FILHO, J.D.; FALCÃO, A.L.; LIMA, A.C.V.M.R.; GONTIJO, C.M.F. Naturally infected *Lutzomyia* Sand Flies in a *Leishmania*-Endemic Area of Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v. 8. n. 3. p. 407-414. 2008.

Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Leishmaniose visceral americana humana – casos autóctones e óbitos de leishmaniose visceral americana, segundo município de residência, 1999-2009. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_auto9904.htm>. Acessado em 24.fev. 2010.

CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo da leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**. v.50, p.221-222. 1936.

CHAGAS, E.; CUNHA, A.M.; FERREIRA, L.C.; DEANE, L.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F.N.; PAUMGARTTEN, M.J.; SÁ, B. Leishmaniose visceral americana (Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana. v. 33. p. 89-229. 1938.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews – Microbiology**. v.5, p.873-882. 2007.

COSENZA, G.W. Leishmaniose visceral em Belo Horizonte. Boletim epidemiológico, Secretaria do Estado da Saúde, SUS, Minas Gerais. v.4, n.2, p.4-6, 1995.

COSTA, C.H.N.; TAPETY, C.M.M.; WERNECK, G.L. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40. n. 4. p. 415-419, jul-ago, 2007.

COSTA, C.H.N. Characterization and speculation on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 24. n. 12. p. 2959-2963. dez 2008.

COUTINHO, S.G., NUNES, M.P., MARZOCHI, M.C.A., TRAMONTANO, N.C., 1985. A surgery for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 80, p. 17–22. 1985.

COUTINHO, M.T.Z.; BUENOA, L.L.; STERZIKA, A.; FUJIWARAA, R.T.; BOTELHOA, J.R.; DE MARIAB, M.; GENARO, O.; LINARDIA, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 128. p. 149-155. 2005.

CUNHA, A.M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem, *Leishmania chagasi*. **O Hospital**. v.11. p. 3-9. 1937.

DA COSTA, C.A.; GENARO, O.; DE LANA, M.; MAGALHÃES, P.A.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; DA COSTA, R.T.; MAGALHÃES-ROCHA, N.M.; MAYRINK, W. Leishmaniose visceral canina: Avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 24, n. 1. p. 21-25. 1991.

DA COSTA, R.T.; FRANC, J.C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; GENARO, O.; CAMPOS-NETO, A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 97. p. 678–682. 2003.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigm of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 48. p. 151–156. 2006.

DANTAS-TORRES, F. T. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**. v. 10. n. 149. p. 139-146. 2007.

DA SILVA, M.R.B.; STEWART, J.M.; COSTA, C.H. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 76. n. 6. p. 811-814. 2005.

DEANE, L. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v.13, n. 2, p. 315-321, fev. 1938.

DEANE, M.P, DEANE, L.M. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente parasitada pela *Leishmania donovani*. **O Hospital**, v.46, p.171-173. 1954.

DEANE, M.P.; DEANE, L.M. a. Infecção natural do *Phlebotomus longipalpis* por leptomonas, provavelmente de *Leishmania donovani*, em foco de calazar, no Ceará. **Hospital (Rio de Janeiro)**, v.45, p.697-702, 1954.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. b. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **Hospital (Rio de Janeiro)**, v.45, p.419-421, 1954.

DEANE, L.M. Leishmaniose visceral no Brasil: Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. **Serviço Nacional de Educação Sanitária**, Rio de Janeiro, Brasil. 1956.

- DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. V.4, p.198-212. 1962.
- DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPPE, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 89. p. 463- 469. 1994.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v.27. p. 305-318. 2004.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in dermatology**, v.14, p.417-423. 1996.
- DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 97. suppl. 1. p. 3-15. 2003.
- DE SOUZA, M.B.; MARZOCHI, M.C.A.; CARVALHO, R.W.; RIBEIRO, P.C.; PONTES, C.S.; CAETANO, J.M.; MEIRA, A.M. Ausência da *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no Município do Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 19. p. 1881–1885. 2003.
- DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of Eliminating Seropositive Canines on the Transmission of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**. v. 25. p. 1240-1242. 1997.
- DIETZE, R. Diagnóstico Sorológico e Parasitológico da Leishmaniose Visceral. **Consulta de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas**. p.63-65, nov.2005.
- DONOVAN, C. The etiology of one of the heterogeneous fevers of India. **The British Medical Journal**. v.2. n.1401. 1903.
- DO ROSÁRIO, E.Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. vol. 100. n. 2. p. 197-203. 2005.
- DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 55. p. 125–130. 1996.
- EVANS, T.G.; TEIXEIRA, M.J.; MACAULIFFE, I.T.; VASCONCELOS, I.; VASCONCELOS, A.W.; SOUZA ADE, A.; LIMA, J.W.; PEARSON, R.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Journal of Infectious Diseases**. v. 166, p. 1124–1132. 1992.

FERREIRA, E.C.; CARNEIRO, M.; REIS, A.B.; PAES, D.V.; DA SILVA, E.S. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**. v. 146. p. 235–241. 2007.

FRANÇA-SILVA, J.C., DA COSTA, R.T., SIQUEIRA, A.M., MACHADO-COELHO, G.L., DA COSTA, C.A., MAYRINK, W., VIEIRA, E.P., COSTA, J.S., GENARO, O., NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 111, p. 161–173. 2003.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; REGO JR, F.A.; OSHIRO, E.T.; CHANG, M.R. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 31. p. 378-390. 1997.

GALIMBERTI, M.Z.; KATZ, G.; CAMARGO-NEVES, V.L.F.; RODAS, L.A.C.; CASANOVA, C.; COSTA, I.P.; Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 32. suppl.1. p. 217-218. 1999.

GOMES, R.B.; MENDONÇA, I.L.; SILVA, V.C.; RUAS, J.; CRUZ, M.S.P.; BARRAL, A.; COSTA, C.H.N. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.101, p. 127-133, 2007.

GOMES, Y.M.; CAVALCANTI, M.P.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**. v. 175. n. 1. p. 45-52. 2008.

GRIMALDI J.R, G; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**. n.3. v.6. 1993.

HAILU, A.; SCHOONE, G.J.; DIRO, E.; TESFAYE, A.; TECHANE, Y.; TEFERA, T.; ASSEFA, Y.; GENETU, A.; KEBEDE, Y.; KEBEDE, T.; SCHALLIG, H.D. Field evaluation of a fast anti-*Leishmania* antibody detection assay in Ethiopia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.100. n.1. p.48-52, 2006.

HODGKINSON, V.H.; BIRUNGI, J.; QUINTANA, M.; DIETZE, R.; MUNSTERMANN, L.E. Mitochondrial cytochrome B variation in populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* across eastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 64. n. 4. p. 386-392. 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA – IBGE. IBGE – cidades, Serra – ES. Disponível em: < <http://www.ibge.com.br/cidadesat/topwindow.htm?1> > Acesso em 21 mar. 2010.

IVERSON, L.B., CAMARGO, M.E., VILLANOVA, A., REICHMANN, M.I.A.B., ANARADE, E.A., TOLENZANO, J.E. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana no Município de São Paulo, Brasil (1979–1982). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.25, p. 310–317. 1983

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical Veterinary Entomology**. vol. 4, p.1-24. 1990.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycles of leishmania in the sand-fly and transmission of leishmaniasis by bite. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. **Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum**. Spain. 2002.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; REYNES, J.; LAMOTHE, J.; BASTIEN, P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, p. 613-617. 2001.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol 1 Academic Press Inc. (London) 1-120. 1987.

LAINSON, R; DYE, C; SHAW, JJ; MACDONALD, DW; COURTENAY, O; SOUZA, AAA; SILVEIRA, FT. Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol.85, p.435-443, 1990.

LAINSON, R, SHAW, J.J. New World leishmaniasis – the neotropical *Leishmania* species. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. **Topley & Wilson's Microbiology Infections**. 9 Ed. London: Topley & Wilson's; p. 241-66. 1998

LAINSON, R; RANGEL E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol.100. p. 811-827. 2005

LAVERAN, A.; MESNIL, F. Sur un protozaire nouveau (*Piroplasma donovani*). Parasite d'une fièvre de l'Inde. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences**. vol.137. p. 957-961. 1903.

LEISHMAN, W.B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **The British Medical Journal**. v.30. p. 1252-1254. mai. 1903.

LEMONS, E.M.; LAURENTIB, M.D.L.; MOREIRA, M.A.B.; REIS, A.B.; GUINCHETTI, R.C.; RAYCHAUDHURID, S.; DIETZE, R. Canine visceral leishmaniasis: Performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect™) in dogs with and without signs of the disease. **Acta Tropica**. v. 107. n. 2. p. 205-207. 2008.

LERNER, E.A.; RIBEIRO, J.M.C.; NELSON, R.J.; LERNER, M.R. Isolation of Maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 266. n.17. p. 11234-11236.1991.

LERNER, E.A.; LUGA, A.O.; REDDY, V.B. Maxadilan, a PAC1 receptor agonist from sand flies. **Peptides**. v. 28. n. 9. p. 1651-1654. 2007.

LIRA, R.A.; CAVALCANTI, M.P.; NAKAZAWA, M.; FERREIRA, A.G.P.; SILVA, E.D.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C.; SOUZA, W.V.; GOMES, Y.M. Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**. v.137. p. 11-16. 2006.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 193. p. 265–275.1951.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.4. p. 84-85. 1912.

MADEIRA, M.F.; FIGUEIREDO, F.B.; PINTO, A.G.S.; NASCIMENTO, L.D.; FURTADO, M.; MOUTA-CONFORT, E.; DE PAULA, C.C.; BOGIO, A.; GOMES, M.C.A.; BESSA, A.M.S.; PASSOS, S.R.L. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target? **Research in Veterinary Sciences**. v. 87, n.02, p.260-262. 2009.

MAGALHÃES, P.A.; MAYRINK, W.; COSTA, C.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; BATISTA, S.M. ; MICHALICK, M.S.M. ; WILLIAMS, P. Calazar na zona do Rio Doce–Minas Gerais. Resultado das medidas profiláticas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 22, p. 197–202. 1980

MAIA-ELKYHOURY, A.N.S.; CARMO, E.H.; SOUZA-GOMES, M.L.; MOTA, E. Análise dos registros de leishmaniose visceral pelo método de captura-recaptura. **Revista de Saúde Pública**, v.41, n.6, p. 931-937, 2007.

MAIA-ELKYHOURY, A.N.S; ALVES, W.A. ; de SOUSA-GOMES, M.L.; de SENA, J.M.; LUNA, E.A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**. v.24. n.12. p. 2941-2948, dez. 2008.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L.M.; DELLA MORTE, R.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A.E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**. v. 125. p. 251-262. 2004.

MANCIANTI, F., GRAMICCIA, M., GRADONI, L., PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.82, p.566-567. 1988.

MANUAL de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília – DF: Ministério da Saúde / Secretária de Vigilância em Saúde, 2006.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.; AMENDOEIRA, M.R. Leishmaniose visceral (calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**. vol.41, n.5. p.61-84. 1981.

MARZOCHI, M.C.A., COUTINHO, S.G., de SOUZA, W.J.S., de TOLEDO, L.M., GRIMALDI JÚNIOR, G., MOMEN, H.,PACHECO, R .da S., de SABROZA, P.C., SOUZA, M.A., RANGEL JÚNIOR, F.B., TRAMONTANO, N.C. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, p.349-357, 1985a.

MARZOCHI, M.C.A., SABROZA, P.C., TOLEDO, L.M., MARZOCHI, K.B., TRAMONTANO, N.C., RANGEL FILHO, F.B. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro - Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.1, p.5-17, 1985b.

MIGONE, L.E. Um caso de kala-azar à Asunción (Paraguay). **Bulletin de La Société de Pathologie Exotique**. v.6. p. 118-120. 1913.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. II Fórum de discussão sobre o tratamento da leishmaniose visceral canina. **Secretária de Vigilância em Saúde**. out. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: < <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>> Acesso em 25 fev. 2010.

MORALES, M.A.; ARES, C.; CANAVATE, C.; BARKER, D.C.; ALVAR, J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 95. p. 104-107. 2001.

MORRIS, R.V.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R.; LANZARO, G.C.; TITUS, R.G. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L.major* infection. **Journal of Immunology**. v.167. n.9. p. 5226-5230. 2001.

MORENO, J. & ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v.18, n. 9, 2002.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**. v.366. p. 1561-1577.2005.

NASEREDDIN, A.; EREGAT, S.; AZMI, K.; BANETH, G.; JAFFE, C.L.; ABDEEN, Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. **Journal of Parasitology**. v. 92. p. 178-183. 2006.

NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu. 2005.

NICOLLE, C.J. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de Leishman observés en Tunisie. **Arch Inst Pasteur Tunis**. v. 3. p. 1-26. 1908.

NICOLLE, C ; COMTE, C. Origine Canine du Kala-azar. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**. p. 299–301. 1908

OLIVEIRA, C.D.; ASSUNÇÃO, R.M.; REIS, I.A.; PROIETTI, F.A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, p.1231-1239. 2001.

OLIVEIRA, G.M. Técnicas Diagnósticas Utilizadas na Rotina dos Serviços de Saúde do Brasil. **Consulta de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas**. p.66-67, nov.2005.

OLIVEIRA, C.D.L. ; MORAIS, M.H.F ; COELHO-MACHADO, G.L.L. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities : challenges for control. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 24, n. 12, p. 2953-2958. dez. 2008.

OTRANTO, D. ; PARADIES, P. ; SASANELLI, M. ; SPINELLI, R. ; BRANDONISIO, O. Rapid Immunochromatographic Test for Serodiagnosis of Canine Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42. n. 6. p. 2769-2770. 2004.

PALATNIK DE SOUZA, C.B. ; DOS SANTOS, W.R. ; FRANÇA-SILVA, J.C. ; DA COSTA, R.T. ; REIS, A.B. ; PALATNIK, M. ; MAYRINK, W. ; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.65. n.5. p. 510-517. 2001.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L.A.; SANTOS, W.C.; GRIMALDI JR.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 55, p. 39–44. 1996.

PEACOCK, C.S.; SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, J.C.; QUAIL, M.A.; PETERS, N.; ADLEM, E.; TIVEY, A.; ASLETT, M.; KERHORNOU, A.; IVENS, A.; FRASER, A.; RAJANDREAM, M.A.; CARVERL, M.; NORBERTCZAK, H.; CHILLINGWORTH, T.; HANCEL, Z.; JAGELS, K.; MOULEL, S.; ORMOND, D.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; RABBINOWITSCH, E.; ARROWSMITH, C.; WHITEL, B.; THURSTON, S.; BRINGAUD, F.; BALDAUF, S.L.; FAULCONBRIDGE, A.; JEFFARES, D.; DEPLEDGE, D.P.; OYOLA, S.O.; HILLEY, J.D.; BRITO, L.O.; TOSI, L.R.O.; BARRELL, B.; CRUZ, A.K.; MOTTRAM, J.C.; SMITH, D.F.; BERRIMAN, M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**. v. 39. n. 7. p. 839-847. 2007.

PEARSON, R.D.; SOUZA, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**. v.22. n.1. p. 1-13. 1996.

PENA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**. v.48. p.1949-1950. 1934.

PESSOA, S.B. **Parasitologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1969.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.

QUARESMA, P.F.; MURTA, S.M.F.; FERREIRA, E.C.; DA ROCHA-LIMA, A.C.V.M.; XAVIER, A.A.P.; GONTIJO, C.M.F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**. v. 111. p. 289-294. 2009.

QUERESHI, A.A.; ASAHINA, A.; OHNUMA, M.; TAJIMA, M.; GRANSTEIN, R.D.; LERNER, E.A. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.54. n. 6. p. 665-671. 1996.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**. v. 136. n. 14. p. 1915-1934. 2009.

RANGEL, E.F.; VILELA, M.L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 24. n. 12. p. 2948-2952. dez. 2008.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N.S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37. p. 2931-2935. 1999.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C.R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40. p. 2352–2356. 2002.

ROSS, R. Further notes on Leishman's bodies. **The British Medical Journal**. v.28. p.5. nov.1903.

RUTHERFORD, G.W.; LIFSON, A.R.; HESSOL, N.A.; DARROW, W.W.; O'MALLEY, P.M.; BUCHBINDER, S.P.; BARNHART, J.L.; BODECKER, T.W.; CANNON, L.; DOLL, L.S.; HOLMBERG, S.D.; HARRISON, J.S.; ROGERS, M.F.; WERDEGAR, D.; JAFFE, H. Course of HIV-I infection in a cohort of homosexual and bisexual men: an 11 year follow up study. **British Medical Journal**. v. 301. p. 1183-1188. 1990.

SABROZA, P. Vigilância da leishmaniose visceral nas Américas a partir da caracterização de unidades territoriais de relevância epidemiológica. **Consulta de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas**. p.129-136, nov.2005.

SALOMÓN, O.D.; QUINTANAB, M.G.; BEZZIC, G.; MORÁNC, M.L.; BETBERDERC, E.; VALDÉZC, D.V. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. **Acta Tropica**. v. 113. p. 84-87. 2010.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMANN, M.P.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical Veterinary Entomology**. v.12. p. 315-317. 1998.

Secretaria de Saúde do Estado do Espírito Santo 2004. Série histórica dos casos notificados do período 1986-2004. Vitória. **Programa de Controle das Leishmanioses**. Secretaria do Estado do Espírito Santo.

SERRA EM NÚMEROS: Indicadores sociais e econômicos do município. Serra. 2 ed. 2009.

SHERLOCK, L.A.; ALMEIDA, S.P. Notas sobre calazar canino no Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**. v. 22, p. 231–242.1970.

SING, N.; CURRAN, M.D.; RASTOGIL, A.K.; MIDDLETON, D.; SUNDAR, S. Diagnostic PCR with *Leishmania donovani* specificity using sequences from the variable region of kinetoplast minicircle DNA. **Tropical Medicine and International Health**. v. 4. p. 448-453. 1999.

Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Situação de Leishmaniose visceral no RS. Rio Grande do Sul. 2009.

SMYTH, A.J.; GHOSH, A.; HASSAN, M.D.Q.; BASU, D.; BRUIJN, M.H.L.; ADHYA, S.; MALLIK, K.K.; BARKER, D.C. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**. v. 105. p. 183-192. 1992.

SOUZA, G.D.; DOS SANTOS, E.; ANDRADE-FILHO, J.D. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104. n.8. p. 1181-1182. 2009.

SOUZA, A.P.; ANDRADE, B.B.; AQUINO, D.; ENTRINGER, P.; MIRANDA, J.C.; ALCANTARA, R.; RUIZ, D.; SOTO, M.; TEIXEIRA, C.R.; VALENZUELA, J.G.; OLIVEIRA, C.I.; BRODSKYN, C.I.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Using Recombinant Proteins from *Lutzomyia longipalpis* Saliva to Estimate Human Vector Exposure in Visceral Leishmaniasis Endemic Areas. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v. 4. n. 3. 2010.

SUDIA, W.A.; CHAMBERLAIN, R.W. Battery-operated light trap: an improved model. **Mosquito News**. v. 22. p. 126-129. 1962.

TRAVI, B.L.; VÉLEZ, I.D.; BRUTUS, L.; SEGURA, I.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J. *Lutzomyia evansi* an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 84. p. 676–677. 1990.

TRAVI, B.L.; MONTOYA, J.; GALLEGO, J.; JARAMILLO, C.; LLLANO, R.; VELEZ, I.D.. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), vector of visceral leishmaniasis in Northern Colombia. **Journal of Medical Entomology**. v. 33. p. 278-285. 1996.

TRAVI, B.L.; OSORIO, Y.; GUARIN, N.; CADENA, H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**. v. 88. p.73-75. 1998.

VOLPINI, A.C.; PASSOS, V.M.; OLIVEIRA, G.C.; ROMANHA, A.J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.90, p. 31-37. 2004.

WARD, R.D.; RIBEIRO, A.L.; RYAN, L.; FALCÃO, A.L.; RANGEL E.F. The distribution of two morphological forms of *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ & NEIVA) (DIPTERA: PSYCHODIDAE). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 80. n. 2. p. 145-148. 1985.

WERNECK, G.L. Geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cadernos de Saúde Pública**. v.24. n.12. p. 2937-2940. dez. 2008.

World Health Organization. A brief history of the disease. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/history_disease/en/index.html.> Acesso em 20 fev. 2010.

World Health Organization. Control of leishmaniasis. **Technical Report Series**, v.793, p.50-52. 2006.

World Health Organization. Guidelines for dog population management. 1990.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera, Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, v. 54. p. 1-881. 1994.

ZIJLSTRA, E.E.; ALI, M.S.; el-HASSAN, A.M.; el-TOUM, I.A.; SATTI, M.; GHALIB, H.W.; KAGER, P.A. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. vol. 86. n.5. p.505-507, 1992.

ANEXOS

ANEXO A: Ficha de Investigação – Inquérito Sorológico Canino para LV.



Prefeitura Municipal da Serra
Vigilância Ambiental em Saúde
CCZ/ Controle Animal



FICHA DE INVESTIGAÇÃO

Inquérito Sorológico Canino

Nº: _____

Data: ____/____/____

Nome do Proprietário: _____

Endereço : _____ **nº.:** _____ **Bairro:** _____

Telefone: _____ **Idade :** _____

Naturalidade: _____ **Mora no município há quanto tempo?** _____

Outros Locais onde residiu:

Local: _____ Tempo: _____

Local: _____ Tempo: _____

Possui cães : () sim Quantos ? _____

() não

Já desfez de algum cão ? () sim Porquê? _____

() não

Seu cão tem acesso à rua? () sim () não

Origem do cão : _____

Histórico de viagens do cão (citar o ano e tempo de permanência) :

Raça : () SRD
() outros Qual ? _____

Sexo : () macho **Idade :** () até 6 meses

() fêmea () 6m a 1 ano

Porte : () pequeno () 1 – 5 anos

() médio () > 5 anos

() grande () > 10 anos

Características da pelagem:

Possui gatos? () sim Quantos? _____

() não

Criação de animais:

() Galinhas

() Porcos

() Outros Qual (is) ? _____

Possui no imóvel :

- jardim
- horta
- canteiros
- acúmulo de material orgânico
- quintal com terra