



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**ALGUNS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LEISHMANIOSES CANINAS
NOS ESTADOS DE SÃO PAULO E MATO GROSSO DO SUL**

André Antonio Cutolo

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
André Antonio Cutolo
[Signature]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Parasitologia.

Orientadora: Dra. Ingrid Menz

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
SÍLVIA CELESTE SÁLVIO – CRB8/7039
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C979a Cutolo, André Antonio, 1976-
Alguns aspectos epidemiológicos de Leishmanioses
caninas nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul
/ André Antonio Cutolo. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Ingrid Menz.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Leishmaniose
tegumentar americana. 3. Psychodidae. 4.
Lutzomyia. 5. Leishmania. I. Ingrid, Menz. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Some epidemiological aspects of canine Leishmaniasis in São Paulo and Mato Grosso do Sul states

Palavras-chave em Inglês:

Canine visceral leishmaniasis
Leishmaniasis, Cutaneous
Psychodidae
Lutzomyia
Leishmania

Área de concentração: Parasitologia

Titulação: Doutor em Parasitologia

Banca examinadora:

Ingrid Menz [Orientador]
Silmara Marques Allegretti
Marlene Tiduko Ueta
Helio Langoni

Fábio dos Santos Nogueira

Data da defesa: 18-08-2011

Programa de Pós Graduação: Parasitologia

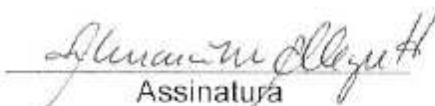
Campinas, 18 de agosto de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ingrid Menz (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti


Assinatura

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta


Assinatura

Prof. Dr. Helio Langoni


Assinatura

Prof. Dr. Fábio dos Santos Nogueira


Assinatura

Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco

Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

Assinatura

Prof. Dr. Cláudio José Von Zuben

Assinatura

Dedico este trabalho a meus pais Sergio (in memoriam) e Marlene, que são responsáveis diretos por esta e todas as conquistas de minha vida.

Agradecimentos

*Em primeiro lugar a Deus pela dádiva da vida, pela saúde do corpo e da alma,
pela alegria do dia-a-dia, pela paz compartilhada.*

*Obrigado à minha mãe Marlene, ao meu irmão Adriano e minha irmã Ana Paula
pelo apoio e estímulo constantes.*

*Obrigado ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Biologia
da UNICAMP na pessoa da Coordenadora Regina Maura Bueno Franco pela
oportunidade, por todo suporte, apoio e estímulo, tornando este sonho possível.*

*Obrigado em especial à minha orientadora Dra. Ingrid Menz, um exemplo de
dedicação profissional, competência técnica, amor e respeito aos animais...
certamente um exemplo de vida a ser seguido.*

*Ingrid, por toda sua ajuda e esforço técnico e pessoal junto à UNICAMP, não
medindo esforços para a condução deste trabalho e redação da tese, muito
obrigado!*

Agradeço à Patrícia, meu amor, por estar comigo sempre.

*Ao Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, MS, na pessoa da Dra.
Júlia Maksoud Brazuna pela parceria estabelecida e por todo suporte logístico e
técnico durante as coletas à campo e processamento das amostras laboratoriais.*

*À Fort Dodge Saúde Animal, na pessoa da Dra. Ingrid Menz, por todo apoio
concedido na fase de campo do trabalho em Campo Grande e em especial à
bióloga Neide Santos pela condução dos exames sorológicos ELISA FML.*

*Aos médicos veterinários e companheiros de batalha Fábio Nogueira, Márcio
Moreira, Audrey Rennó Braga e Francisco Carvalho, pelo conhecimento técnico,*

amizade e experiência de vida compartilhados, pelos momentos de suor e risadas nas intermináveis ruas do bairro Tarumã ! Muito obrigado. Foi uma grande honra ter trabalhado com vocês nesta empreitada gigantesca e de sucesso monitorando os cães de Campo Grande.

Obrigado à Iara, Sílvia, Cida, Bete e Juliana do CCZ de Campo Grande por todo apoio durante o acompanhamento dos cães no bairro Tarumã.

Ao Izoel, Dirce, Douglas e Gustavo por todo apoio conferido em Campo Grande e pela grande amizade estabelecida.

Obrigado Profa. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto pela confecção das análises imunoistoquímicas, pelas palavras de incentivo e por todo ensinamento.

Agradeço à toda equipe de campo do CCZ de Campo Grande. Vocês foram fundamentais no sucesso a campo deste trabalho.

Muito obrigado à Profa. Dra. Selma Giorgio por me abrir as portas da UNICAMP, por todo ensinamento e por todo apoio técnico e laboratorial fornecido.

Aos funcionários e estagiárias do Setor de Controle de Zoonoses e Vetores da Prefeitura Municipal de Monte Mor, em especial ao Paulo Milani Júnior e João Antonio Sonquine por todo apoio a campo nas coletas de flebotomíneos e no exame e coleta de amostras biológicas dos cães em Monte Mor, SP.

Muito obrigado à grande amiga Marcella Z. Troncarelli, médica veterinária, mãe, sanitarista e grande amiga. Marcellinha muito obrigado por toda ajuda sempre !!!

Obrigado à toda equipe do Laboratório de Zoonoses do Depto. de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP Botucatu, na pessoa do Prof. Dr.

Helio Langoni, por todo usual apoio e pela condução das sorologias no estudo de prevalência canina conduzido em Monte Mor, SP.

Ao Prof. Dr. Cláudio José Von Zuben pelo empréstimo das armadilhas CDC para coleta de flebotomíneos, por todo ensinamento e estímulo compartilhado.

Ao Osias Rangel, da SUCEN Regional de Campinas, pelo usual apoio e conhecimento compartilhado.

Ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, nas pessoas da Dra. Vera Lúcia Pereira-Chioccola e do Dr. Roberto M. Hiramoto por todo suporte técnico e laboratorial na condução dos exames sorológicos e provas de PCR dos cães do foco de Leishmaniose Tegumentar Americana em Monte Mor.

À amiga Fabiana F. Grecco por todo conhecimento e estímulo compartilhado sempre.

Às amigas do laboratório de Leishmanioses Adriana, Camila, Solange, Alexandra, Larissa pelos sempre agradáveis momentos vivenciados pelos corredores do Departamento de Parasitologia.

Às Profa. Dra. Silmara M. Allegretti, Ana Maria A. Guaraldo, Marlene T. Ueta pela ajuda e comentários quando do exame da pré-banca.

Ao Marco da Secretaria de Pós-graduação por toda paciência e ajuda.

A todos meus amigos aqui não nomeados, pela caminhada conjunta da vida.

Obrigado em especial aos cães... pelo aprendizado diário e por muitas vezes nos resgatar valores admiráveis, cada vez mais raros em nossa sociedade humana.

SUMÁRIO

RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	4
INTRODUÇÃO.....	6
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	16
CAPÍTULO I.....	17
CAPÍTULO II.....	29
CAPÍTULO III.....	49
ANEXO I.....	141
ANEXO II.....	143

RESUMO

A incidência das leishmanioses tegumentar (LTA) e visceral americanas (LVA) em hospedeiros caninos e humanos encontra-se em crescente expansão no Brasil. Para a vigilância epidemiológica dessas endemias, é fundamental o conhecimento da distribuição das diferentes espécies vetoras de flebotomíneos e, para a LVA, o conhecimento de parâmetros epidemiológicos como a prevalência, incidência, período de incubação e potencial de transmissibilidade de *Leishmania infantum chagasi* no cão, seu principal reservatório. Objetivou-se assim esclarecer alguns aspectos epidemiológicos das infecções caninas, incluindo-se levantamento entomológico no município de Monte Mor, situado na região centro-leste do estado de São Paulo, além da obtenção de parâmetros epidemiológicos da LVA por estudo longitudinal de 105 cães em área endêmica para a doença em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, por dois anos. Em Monte Mor, 319 amostras de soro canino foram avaliadas por ELISA e RIFI, sendo todas negativas para anticorpos anti-*Leishmania*, identificou-se sete espécies de flebotomíneos, com predomínio de *Nyssomyia neivai* (48,84%) considerada a principal transmissora do agente causador da LTA no interior paulista, além do diagnóstico de dois casos caninos de LTA, com sorologia reagente para ELISA FML e infecção por *L. (Viannia) braziliensis*. No estudo longitudinal dos 105 cães acompanhados por meio de avaliações clínicas, exames sorológicos (ELISA *L. major*-like, FML e S7) e parasitológicos diretos (esfregaços e PCR de aspirados de medula óssea e linfonodo e imunistoquímica de pele) obteve-se prevalência sorológica inicial de 30,40% (145/477) no ELISA *L. major*-like e 26,28% (97/369) no ELISA FML. A prevalência da doença clínica (sintomáticos) foi de 7,13% (62/870), sendo que 24,53% (117/477) foram soropositivos no ELISA *L. major*-like, mas sem sintomas de leishmaniose visceral canina (LVC), demonstrando quantidade elevada de cães infectados assintomáticos na área. Ao final de 24 meses não se observou associação estatística significativa nas variáveis ambientais avaliadas no início do estudo e a ocorrência de casos de LVC, como a ocorrência prévia de LVA e/ou LVC no entorno ou na casa do proprietário, a existência de outras espécies

animais na casa, o hábito intra ou peridomiciliar, o temperamento, a idade e o sexo do cão. A incidência de novas infecções variou de 11,76% (8/68), 11,76% (8/68) e 18,18% (12/66) respectivamente entre o Dia -30 e Zero, Dia Zero e Mês 12 por sorologia e Dia Zero e Mês 12 para os métodos diretos. A mortalidade natural e induzida via eutanásia de animais doentes e/ou infectados foi de 28,57% (30/105). O período de incubação médio foi de 6,46 meses. Alguns animais infectados com resultados positivos em prova diagnóstica de PCR e/ou prova de sorologia no início do estudo não apresentaram novos resultados positivos após 12 meses, indicando possível cura ou não estabelecimento da infecção. Observaram-se alguns animais com provas diretas positivas mostrando infecção assintomática por período de 24 meses. Obteve-se baixa prevalência de amastigotas em pele saudável, presente apenas em animais sintomáticos, enquanto que a ausência de amastigotas observada em cães portadores assintomáticos indica que os mesmos podem não ter papel importante na transmissão de parasitas ao flebotomíneo vetor.

PALAVRAS CHAVE: cão, epidemiologia, leishmaniose visceral canina, leishmaniose tegumentar americana, flebotomíneo, Diptera, Psychodidae, Phlebotominae, *Lutzomyia*, *Leishmania*

ABSTRACT

Cutaneous (ACL) and visceral american leishmaniasis (AVL) incidences in human and canine hosts are increasing and expanding in Brazil. In order to perform an adequate vigilance of these diseases, the knowledge regarding distribution of different sandfly vector species is mandatory, besides of precisising epidemiological parameters like prevalence, incidence, incubation period and potential of transmissibility in the dog, the main reservoir for the AVL etiologic agent. This way, the objectives of this study were to clarify some epidemiological aspects of canine leishmaniasis, including entomological surveillance in the county of Monte Mor, central east region of São Paulo state and performance of a longitudinal study in an AVL endemic area located in Campo Grande, Mato Grosso do Sul state, including 105 dogs in order to evaluate epidemiological data during two years. In Monte Mor county, 319 sera samples were analysed through in house developed ELISA and IFA methods. No seropositive result was found, seven different sandfly species were identified, prevailing *Nyssomyia neivai* (48.84%) considered the main vector for the ACL etiologic agent in São Paulo state countryside, and two dogs were diagnosed with ACL symptoms, presenting seropositivity through ELISA FML and positive identification of *L. (Viannia) braziliensis* infection using PCR. The longitudinal study was performed using clinical examination, serology (ELISA *L. major*-like, FML and S7) and direct diagnostic techniques (bone marrow and lymph node smears and PCR and immunohistochemistry in skin tissues) on dogs. A seroprevalence of 30.40% (145/477) at ELISA *L. major*-like and 26.28% (97/369) at ELISA FML was obtained at the pre-initial phase. Clinical disease prevalence was 7.13% (62/870), and 24.53% (117/477) dogs were seropositive at ELISA *L. major*-like, but asymptomatic, showing the high amount of infected healthy carriers. At the end of the 24 months period no significant association was found between visceral leishmaniasis (VL) canine cases with environmental variables evaluated at Day Zero like previous registration of human or canine VL on the study house or neighborhood, other domestic animal species at the backyard, intra or peridomiciliar, aggressive behavior, age or sex of the study dog. Incidence of

infections varied from 11.76% (8/68), 11.76% (8/68) e 18.18% (12/66) respectively between Day -30 and Zero, Day Zero and Month 12 using serology and Day Zero and Month 12 for direct diagnostic methods. Natural and induced mortality through euthanasia of sick/infected dogs was 28.57% (30/105). The mean disease incubation period was 6.46 months. Some of the infected animals with positive diagnosis at the beginning of the study had no other positive results after 12 months, indicating a possible cure or an absence of infection establishment, while others had positive diagnosis at the beginning and at month 12 with asymptomatic condition for more than 24 months. A low *Leishmania* amastigotes prevalence at healthy skin was obtained and positive results were observed only in symptomatic animals. Absence of parasites in skin of asymptomatic carriers may indicate they have no important role on the transmission of *Leishmania* to competent vectors.

KEYWORDS: dog, epidemiology, visceral canine leishmaniasis, american cutaneous leishmaniasis, sandfly, Diptera, Psychodidae, Phlebotominae, *Lutzomyia*, *Leishmania*

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas não contagiosas de quadros clínicos cutâneos e/ou viscerais, causadas por protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania sp.*, que parasitam células do sistema fagocítico mononuclear de mamíferos, onde as formas amastigotas se reproduzem. Os protozoários atingem órgãos como fígado, baço, medula óssea, entre outros, estando presentes também na pele, local em que o díptero flebotomíneo se infecta durante o repasto sangüíneo. No tubo digestivo do inseto vetor as leishmânias passam à forma promastigota e após alguns dias são transmitidas a outro hospedeiro quando do segundo repasto sangüíneo (ACHA & SZYFRES, 2003).

São doenças que afetam populações humanas em diferentes partes do mundo tropical, sub-tropical e temperado, especialmente regiões mais pobres do planeta (ALVAR et al., 2006). As formas cutâneas são endêmicas em 88 países sendo 72 destes em desenvolvimento, com cerca de 1,5 a 2 milhões novos casos anuais. As formas viscerais têm 90% de seus novos casos humanos originados no Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão, causando cerca de 500 mil novos casos e aproximadamente 60 mil mortes por ano (WHO, 2011).

Existem mais de 30 espécies distintas de *Leishmania* descritas no mundo. O sub-gênero *Leishmania* está presente no Velho e Novo Mundo, enquanto o sub-gênero *Viannia* é exclusivo das Américas (SHAW, 1994), o primeiro encontra-se na parte do intestino anterior (infecção suprapilária) e o segundo na parte posterior ao piloro (peripilária) das espécies de flebotomíneos transmissoras (LAINSON & SHAW, 1987).

Mais de 900 espécies de flebotomíneos já foram descritas no planeta, sendo aproximadamente 500 as que ocorrem no Novo Mundo (SHIMABUKURO & GALATI, 2011). Habitam diferentes ambientes indo de campos e savanas, desertos à florestas tropicais onde se encontra a maior biodiversidade deste grupo de insetos. Utilizam como abrigos locais protegidos de variações climáticas, estando associados à tocas de animais, fendas de rochas, cavernas, ocos de árvores e o peridomicílio humano, sempre com umidade elevada, pouca circulação

de ar, pouca luz e riqueza de matéria orgânica. São insetos holometábolos, com larvas terrícolas, fêmeas hematófagas e fitófagas e machos exclusivamente fitófagos, que em fase adulta vivem em média 20 a 30 dias. A preferência por hospedeiros ocorre em algumas espécies que picam exclusivamente animais como as do gênero *Brumptomyia*, que se alimentam de sangue de tatus (*Xenarthra*: Dasipodidae), outras como *Sciopemyia sordellii* preferem animais de sangue frio como anfíbios, outras têm hábito oportunista como *Lutzomyia longipalpis* e *Nyssomyia intermedia* s.l. que são zoofílicas e antropofílicas dependendo da presença do hospedeiro, sendo assim excelentes transmissores de patógenos como *Leishmania* sp., interligando o ciclo enzoótico com o homem. Têm baixa dispersão de vôo, estando as espécies do novo mundo com alcance médio menor que 100 metros e as do velho mundo ao redor de 500 metros (RANGEL & LAINSON, 2003).

Fósseis de flebotomíneos preservados em âmbar indicam que o surgimento destes insetos remonta ao período Triássico e Jurássico (248 e 213 milhões de anos atrás), quando estes dípteros primitivos provavelmente realizavam repastos sangüíneos em vertebrados ancestrais de mamíferos, aves, bem como dinossauros e pterossauros, iniciando naquela época as relações hospedeiro-parasita entre flebotomíneos e *Leishmania* (ANDRADE FILHO & BRAZIL, 2003).

Embora alguns ciclos de transmissão sejam simples, como os focos antroponóticos de calazar humano causados por *Leishmania donovani* e transmitidos por *Phlebotomus argentipes* na Índia (LEWIS, 1974), a maioria são ciclos zoonóticos que envolvem uma gama de diferentes espécies de *Leishmania*, de flebotomíneos vetores, hospedeiros mamíferos silvestres ou domésticos e o homem como hospedeiro acidental, especialmente em regiões tropicais, onde a biodiversidade de parasitas, vetores e hospedeiros é máxima (LAINSON, 1983).

As leishmanioses são no Novo Mundo originalmente zoonoses de mamíferos selvagens, sendo o homem um hospedeiro acidental quando adentra à mata se expondo à picadas de flebotomíneos infectados. As principais espécies de *Leishmania* em relação ao número de casos humanos no Brasil são a *Leishmania (Viannia) braziliensis* principal agente etiológico da Leishmaniose

Tegumentar Americana (LTA) e a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* agente causador da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) (LAINSON, 1983; BRASIL, 2006; BRASIL, 2007).

As alterações ambientais como os desmatamentos com posterior ocupação humana do entorno aproxima o ser humano de ciclos enzoóticos selvagens, facilitando a transmissão de *Leishmania* via flebotomíneos que se adaptam ao meio ambiente alterado, chegando inclusive a manter transmissões em áreas estabelecidas há décadas, como muitos dos casos de LTA causados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (LAINSON, 1983). A LVA, caracterizada por estar originalmente ligada ao meio rural do Nordeste brasileiro, vem expandindo sua distribuição e número de casos humanos em direção ao centro-sul do país com ciclos de transmissão de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* sendo registrados de forma crescente em grandes centros urbanos dos estados do Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste, (BRASIL, 2006) chegando inclusive à região sul do Brasil no município gaúcho de São Borja (SOUZA et al., 2009) e na Argentina (SALOMON et al., 2008).

Os hospedeiros animais no caso da LTA são principalmente mamíferos selvagens, sendo os registros de animais domésticos parasitados, como o cão e eqüídeos, considerados infecções acidentais e os mesmos, hospedeiros terminais, sem importância significativa na manutenção do parasita e transmissão para o humano (BRASIL, 2007), provavelmente por apresentarem baixo número de formas amastigotas na pele. No caso da LVA, doença emergente e em expansão territorial no Brasil e que era ausente no estado de São Paulo até o ano de 1998, o cão é hospedeiro altamente susceptível à doença e considerado o principal reservatório do agente etiológico para o homem, embora outras espécies de animais selvagens e domésticas já tenham sido reportadas infectadas (LAINSON et al., 1990; TRAVI et al., 1994; SHERLOCK, 1996; CABRERA et al., 2003; SAVANI et al., 2004; SANTIAGO et al., 2007; SAVANI et al., 2010; SILVA et al., 2010; SOUZA et al., 2010) .

A LTA foi diagnosticada e notificada em 550.250 pessoas no território nacional entre 1990 e 2009, com média de 27.512,5 casos por ano. No estado de

São Paulo foram 8.877 casos com média de 443 por ano e no Mato Grosso do Sul foram 4.756 casos com 237,8 por ano no mesmo período (SINAN, 2010). No Brasil em um período de 20 anos (1990 a 2009) foram registrados 61.427 casos de LVA, com uma média de 3.071,35 casos novos por ano (SINAN, 2010).

No estado de São Paulo, após o primeiro diagnóstico de caso autóctone humano no município de Araçatuba em 1999, foram 1750 casos confirmados com 138 óbitos, registrando 11,68% de letalidade no período de 2000 a 2009. No mesmo período foram avaliadas 59.483 amostras de soro canino provenientes de 48 municípios paulistas, com 6.260 amostras positivas (10,52%). São 87 os municípios com transmissão do parasita, sendo que 108 possuem o vetor *Lutzomyia longipalpis* em seus territórios (COMITÊ DE LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA DA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2010).

No Mato Grosso do Sul, a LVA esteve presente desde a década de 80 nos municípios de Ladário e Corumbá. Em 1994 uma epidemia se iniciou em Corumbá, com número elevado de casos até o ano de 1998. A partir de 1995, novos municípios foram atingidos pela epidemia, chegando a Três Lagoas no ano de 2001 e Campo Grande em 2002 (ANTONIALLI et al., 2006; FURLAN, 2010). Segundo o Ministério da Saúde (SINAN, 2010), de 1990 a 2009 foram 2.061 casos de LVA notificados no estado de Mato Grosso do Sul, sendo 1664 ocorridos a partir de 2002. Acredita-se que a rota de expansão e disseminação da LVA neste estado ocorreu do sentido leste, onde se situa Corumbá na divisa com a Bolívia, até o oeste, onde se situa Três Lagoas, na divisa com o estado de São Paulo.

Medidas preventivas contra as leishmanioses humanas incluem as de proteção individual como o uso de repelentes, telas mosquiteiras, a não exposição nos horários de maior atividade do vetor, além de manejo ambiental com limpeza de quintais e terrenos com retirada de matéria orgânica excessiva. Também inclui poda de árvores para aumentar insolação do solo, combatendo eventuais criadouros de flebotomíneos, manutenção de abrigos de animais domésticos distantes do domicílio durante a noite e inclusive a instalação de residências a mais de 400 metros de áreas de vegetação preservada e matas (BRASIL, 2007).

Com relação ao cão, as medidas profiláticas incluem o uso individual de coleiras impregnadas com deltametrina a 4%, o uso de tela em canis individuais e coletivos, além da condução das políticas municipais de controle reprodutivo e populacional de animais errantes. O uso de vacinas contra a leishmaniose visceral canina não é recomendado pelo Ministério da Saúde em programas de saúde pública (BRASIL, 2006). O uso de produtos ectoparasiticidas de uso tópico nos cães, principalmente à base de piretróides, também tem algum efeito protetor contra o flebotomíneo.

O controle das leishmanioses tem como principais estratégias o diagnóstico e tratamento precoce dos pacientes humanos, o controle dos vetores, a educação em saúde e no caso da LVA, o controle do reservatório animal canino por meio de eutanásia dos soropositivos e/ou positivos em provas laboratoriais parasitológicas diretas (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007).

Embora existente há mais de 20 anos, o programa brasileiro de controle da LVA é ineficaz já que o número de casos da doença é crescente nas várias regiões onde há a transmissão do parasita, além da expansão territorial marcante observada na última década por diferentes estados da nação (COSTA, 2001).

Falhas na eficácia dos programas de controle da LVC incluem as ações muitas vezes realizadas de forma isolada (BRASIL, 2006), o longo período entre o diagnóstico e a eliminação do cão reservatório, baixa sensibilidade dos testes sorológicos, acesso apenas parcial à população canina infectada, a oposição do proprietário na remoção do animal, a reposição dos cães eliminados pelos seus proprietários em função de laços afetivos (NUNES et al., 2008), a existência de outros reservatórios animais que não o cão (CABRERA et al., 2003; SANTIAGO et al., 2007), além do deslocamento ativo e passivo de hospedeiros caninos para áreas livres do agente etiológico.

Animais de companhia, em especial os cães, fazem parte dos lares humanos desde a época em que a humanidade se estabeleceu em vilas, cerca de 12.000 anos atrás, e atualmente estão integrados ativamente à sociedade humana (BECK & MEYERS, 1996). Os cães são os mais antigos animais domesticados e a espécie mais dispersa encontrada sob cuidados humanos no mundo. Durante a

longa história em comum entre ambas as espécies, cães têm sido usados pelo homem como ferramenta de caça, no transporte e carga, como reserva de alimento, provedor de peles, para guarda e pastoreio, como animais de laboratório, e atualmente vêm aumentando seus papéis como amigos e membros das famílias pelo mundo todo, além de atuarem cada vez mais junto às forças policiais e de resgate (JENSEN, 2007), além de trabalharem como cães guia de pessoas com necessidades especiais.

A posse de animais de companhia traz inúmeros benefícios à saúde de seus proprietários, aumentando o bem-estar psicológico e fisiológico dos mesmos em muitos lares, auxiliando no desenvolvimento e estimulando a comunicação não verbal em crianças, reduzindo a pressão sangüínea e aumentando a taxa de sobrevivência após ataques cardíacos, aumentando as oportunidades de interações entre as pessoas, enquanto para outros permite que estejam sozinhos sem se sentirem solitários (BECK & MEYERS, 1996).

Porém, a proximidade entre o homem e o cão tornou essa associação de risco para a aquisição de zoonoses, em especial as leishmanioses em que o cão, espécie comumente susceptível à infecção, é reservatório, favorecendo por exemplo o ciclo de transmissão doméstica de *Leishmania infantum chagasi* (DANTAS-TORRES & BRANDÃO FILHO, 2006). Os cães podem apresentar ainda intenso parasitismo cutâneo por amastigotas de *Leishmania* mesmo sem apresentar qualquer clínico da doença (MOLINA et al., 1994; VEXENAT et al., 1994), aumentando a possibilidade de transmissão.

A doença quando introduzida em área indene, na maioria das vezes, acometeria primeiro o cão, sendo uma etapa prévia à aquisição da enfermidade pelo ser humano (ALVES & BEVILAQUA, 2004; MICHALSKY et al., 2007;), sendo a prevalência de infecção no cão sempre maior do que no homem (BRASIL, 2006). Demonstrou-se, porém que se a LV já ocorre em uma área, a presença de cão infectado na residência pode não aumentar o risco de aquisição da doença pela família residente no domicílio, mas o risco aumentaria com a presença de cães infectados na vizinhança (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Um dos pontos cruciais no combate à LVA é a detecção dos animais infectados. O diagnóstico da infecção canina é complexo, baseado em aspectos clínicos e laboratoriais, incluindo provas parasitológicas indiretas e diretas de detecção do parasita.

No cão a leishmaniose visceral é uma doença multissistêmica com sinais clínicos variados o que dificulta seu diagnóstico, especialmente em áreas onde a doença não é endêmica (SOLANO-GALLEGO et al., 2009), incluindo emagrecimento, atrofia muscular generalizada, linfadenomegalia, crescimento excessivo das unhas e dermatite com descamações cutâneas. Esplenomegalias, artrites, lesões oculares e hemorragias também são observadas (BANETH et al., 2008).

Dentro das provas indiretas se incluem diferentes métodos sorológicos para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), a prova de ELISA, a fixação de complemento e técnicas de aglutinação direta (BRASIL, 2006). Dentro dos métodos que detectam o parasita de forma direta estão os esfregaços em lâmina, as análises de tecidos por técnicas de histopatologia e imunoistoquímica, a cultura de tecidos em meios ricos artificiais, a inoculação em animais de laboratório e o uso de ferramentas biomoleculares que detectam o DNA ou RNA do parasita. Ainda é possível a realização do Teste de Montenegro adaptado ao cão (CABRERA et al., 2002) que consiste em reações intradérmicas com extratos de parasitas mortos, também chamado de leishmanina, e de provas de xenodiagnóstico utilizando-se flebotomíneos para realizarem repasto sanguíneo no animal infectado, com posterior tentativa de detecção do parasita ou seu DNA no inseto, estas últimas mais relacionadas com atividades de pesquisa devido à dificuldade de condução nas rotinas a campo (MICHALSKY et al., 2007).

O grande desafio no diagnóstico da infecção pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* é a utilização de um método que seja 100% sensível na detecção dos cães infectados, específico o suficiente para conferir resultado positivo aos infectados pelo parasita sem reações cruzadas com outros agentes etiológicos, que tenha 100% de repetibilidade, que seja de fácil execução, que

seja conduzido com materiais biológicos de fácil coleta, que seja possível de ser conduzido em massa, que seja barato para uso em campanhas públicas e em grande escala.

Este método diagnóstico idealizado atualmente não existe.

Os métodos utilizados para o diagnóstico da infecção canina em inquéritos epidemiológicos se baseiam no uso dos *kits* oficiais ELISA Bio-Manguinhos e RIFI Bio-Manguinhos, que se encontram registrados junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O uso das técnicas diretas de visualização do parasita por meio de esfregaços de aspirados com agulha fina de linfonodos também é preconizado (BRASIL, 2006).

Uma série de pontos frágeis podem ser identificados nos elos da cadeia que culminam com o resultado final de uma prova diagnóstica: o fator humano que processa a coleta, a identificação, o armazenamento e o transporte de uma amostra biológica do campo para o laboratório; a conservação, identificação da amostra, seu processamento, leitura, registro do resultado e emissão do laudo no laboratório; o tempo transcorrido entre a coleta da amostra, a emissão do laudo final e o retorno ao local de residência do animal, com a correta identificação do mesmo no domicílio. Neste último ponto, a remoção dos animais infectados deveria ser realizada alguns dias após a coleta das amostras biológicas e não semanas ou meses como ocorre na realidade brasileira.

Equipes de campo e de laboratório motivadas, treinadas de forma adequada, com conhecimento sobre a epidemiologia da doença e humanizadas, utilizando EPI's, aparelhos e materiais descartáveis adequados são peças chave para um programa de controle adequado de qualquer zoonose. A equipe de campo deve ser capaz de realizar uma correta abordagem dos proprietários, a correta contenção dos animais, a coleta, identificação e o transporte das amostras biológicas. No laboratório a identificação das amostras e leitura correta dos resultados é fundamental, especialmente em provas de caráter subjetivo como a RIFI, onde o fator humano influencia a sensibilidade e especificidade final do método.

A qualidade do método diagnóstico é outro ponto chave no diagnóstico da doença. A quantidade de resultados falso-positivos e falso-negativos (ALVES & BEVILAQUA, 2004) influencia na eficácia do programa em reduzir as incidências da doença nos animais e no ser humano, e por conseqüência na credibilidade das ações junto à sociedade, em especial pelo fato de envolver questões de laço afetivo das pessoas com os cães que muitas vezes são considerados membros da família.

Os métodos sorológicos têm evoluído com o passar dos anos, utilizando antígenos purificados e/ou recombinantes o que certamente aumenta a qualidade dos mesmos, mas reações cruzadas com outros protozoários tripanossomatídeos como as *Leishmania* causadoras de quadros cutâneos e os *Trypanosoma* ainda ocorrem (PORROZZI et al., 2007; CÂNDIDO et al., 2008).

Os métodos parasitológicos diretos são considerados a prova ouro para diagnóstico da infecção (BRASIL, 2006), com a visualização de amastigotas em amostras de linfonodo, medula óssea, baço, fígado e pele. Algumas destas técnicas, porém são invasivas e necessitam técnicos experientes para sua realização, proporcionando máxima sensibilidade das mesmas.

As técnicas de diagnóstico molecular foram e ainda são recebidas com grande entusiasmo pela comunidade científica. Técnicas que detectam o DNA do parasita, em quantidades por vezes correspondentes a menos que uma célula amastigota na amostra, mostram alta sensibilidade e especificidade (SOLANO-GALLEGO et al., 2001), possibilitando inclusive a identificação ao nível específico da *Leishmania* infectante (GOMES et al., 2007).

Atualmente é possível quantificar o DNA existente na amostra por meio das técnicas de *Real Time*, o que tem impacto no acompanhamento da infecção no hospedeiro assintomático ou oligossintomático no decorrer do tempo, permitindo verificar se o mesmo está debelando a infecção ou se esta tende a evoluir para quadros mais sérios e polissintomáticos (NICOLAS, et al., 2002; FRANCINO et al., 2006).

Dentre as mais recentes técnicas descritas encontra-se a detecção do RNA do parasita, tal informação permite atestar se o protozoário recolhido do

hospedeiro está viável ou não, estando viáveis seus fenômenos fisiológicos normais, com a tradução de proteínas a partir do DNA, estariam ocorrendo. Tal ferramenta permite que se distinga DNA viável de DNA morto, fato que provoca ainda debates na comunidade científica com relação à utilidade da PCR quanto à detecção de animais infectados (COLOMBO et al., 2011).

Apesar da alta qualidade das técnicas de diagnóstico molecular, os custos elevados relacionados a elas ainda as tornam impraticáveis para uso no diagnóstico em massa para os inquéritos epidemiológicos preconizados pelo Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral.

Uma vez que o município tenha o vetor encontrado em seu território, se torna receptivo para instalação e permanência de ciclos de transmissão de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, como ocorrido pela primeira vez no território paulista em Araçatuba com o encontro do vetor (COSTA et al., 1997) e o estabelecimento da endemia com a ocorrência de casos caninos e humanos posteriormente nos anos de 1998 e 1999, e que se mantém até os dias atuais (COMITÊ DE LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA DA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2010). Recentemente os municípios paulistas de Espírito Santo do Pinhal, São Pedro e Campinas apresentaram início de transmissão canina, existindo ainda 25 municípios com a presença do vetor sem relatos de transmissão do agente etiológico da LVA e ainda 537 municípios silenciosos não receptivos (COMITÊ DE LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA DA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2010), destes municípios silenciosos certamente muitos possuem o vetor em seu território sem ainda detectá-lo.

É importante, assim, para a adequada vigilância das leishmanioses e tomada de ações preventivas e de bloqueios de eventuais focos de transmissão, o conhecimento da fauna e ecologia dos vetores, além da prevalência de infecções caninas ao nível municipal, especialmente com relação à presença de vetores competentes como *Lutzomyia longipalpis*, associado a campanhas educativas junto à comunidade médica, médica veterinária e da população em geral.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Tendo-se em vista o cenário epidemiológico expansivo da LVA em terras brasileiras, incluindo-se aí os dois estados vizinhos, São Paulo e Mato Grosso do Sul;

Considerando-se o papel importante que o cão desempenha no ciclo de transmissão da *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e o fato dele também se infectar com outras espécies de protozoário como a *Leishmania (Viannia) braziliensis*;

Considerando-se a necessidade da permanente vigilância epidemiológica e entomológica da doença em municípios silenciosos, especialmente tendo-se em vista a determinação de sua receptividade para o agente etiológico da LV quanto à presença do vetor *Lutzomyia longipalpis* e quanto à presença de espécies vetoras de agentes etiológicos da LTA;

Objetivou-se contribuir de forma aplicada com a vigilância das leishmanioses, buscando-se esclarecer alguns aspectos epidemiológicos das infecções caninas, incluindo-se levantamento entomológico, no município de Monte Mor, região centro leste do estado de São Paulo.

Além disso, objetivou-se obter parâmetros epidemiológicos da leishmaniose visceral canina por meio de acompanhamento longitudinal de um grupo de 105 cães em bairro endêmico para a doença no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, por um período de dois anos.

CAPÍTULO I

VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS LEISHMANIOSES NO MUNICÍPIO DE MONTE MOR, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL*

LEISHMANIASIS EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE IN MONTE MOR CITY, SAO PAULO STATE, BRAZIL

VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DE LAS LEISHMANIOSIS EN EL MUNICIPIO DE MONTE MOR, ESTADO DE SAO PAULO, BRASIL

André Antonio Cutolo^{1,2}

Marcella Zampoli Troncarelli³

Juliana Giantomassi Machado³

Claudio José Von Zuben⁴

Helio Langoni³

Selma Giorgio¹

Endereço para Correspondência:

Departamento de Vigilância à Saúde, Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal de Monte Mor. Telefone/Fax (019)-38892577.
Email: cutoloandre@yahoo.com.

¹ Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, s/nº, CEP 13083-970. Campinas, SP.

² Departamento de Vigilância à Saúde, Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal de Monte Mor. Rua Jorge Calil, 85, Jd. Nossa Senhora de Fátima, CEP 13190-000. Monte Mor, SP.

³ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP. Distrito de Rubião Júnior, s/nº, CEP 186180-000. Botucatu, SP.

⁴ Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP. Av. 24-A, 1515, Bela Vista, CEP 13506-900. Rio Claro, SP.

* Este trabalho foi publicado e uma cópia do mesmo encontra-se na íntegra no Anexo II

RESUMO

A incidência das leishmanioses tegumentar (LTA) e visceral americanas (LVA) em hospedeiros caninos e humanos encontra-se em crescente expansão no Estado de São Paulo. Para a vigilância epidemiológica dessas endemias, é fundamental o conhecimento da distribuição e ecologia das diferentes espécies vetoras de flebotomíneos e, para a LVA, o conhecimento da prevalência da enfermidade no cão, seu principal reservatório. Objetivou-se assim verificar a abundância e distribuição de flebotomíneos e pesquisar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em uma amostra da população canina do município de Monte Mor, SP, visando identificar possíveis cães infectados. Nas capturas de flebotomíneos utilizaram-se armadilhas automáticas luminosas do tipo CDC em 16 pontos diferentes do município, no período noturno (18:00 às 8:00 horas), de abril de 2006 a abril de 2008, com posterior processamento e identificação dos espécimes. Um total de 319 amostras de soro canino foi processado pelas técnicas de ELISA e RIFI com utilização de *Leishmania major* como antígeno. Em 14 dos 16 locais avaliados encontraram-se flebotomíneos, num total de 86 exemplares, com identificação de sete espécies: *Nyssomyia neivai*, *Pintomyia monticola*, *P. pessoai*, *N. whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Brumptomyia brumpti* e *Evandromyia termitophila*. *N. neivai*, considerada a principal vetora de LTA no Estado de São Paulo, mostrou-se a espécie mais abundante com 48,84% do total capturado e presente em dez dos 14 locais com flebotomíneos. Todas as 319 amostras caninas apresentaram-se negativas para anticorpos anti-*Leishmania*. A abundância de *N. neivai* aliada à presença de espécies vetoras secundárias como *N. whitmani*, *M. migonei* e *P. pessoai*, ilustra risco de transmissão da LTA no município. A ausência de *Lutzomyia longipalpis* e de cães portadores de anticorpos anti-*Leishmania*, indicam até o momento ausência da LVA canina, com baixo risco de estabelecimento desta doença no município. Ressalta-se, porém, a necessidade da manutenção das ações de vigilância epidemiológica, ampliando-se os pontos de captura de flebotomíneos, bem como se mantendo a avaliação clínica e laboratorial periódica da população canina, visando-se assim impedir a introdução e estabelecimento desta grave enfermidade no município.

ABSTRACT

Cutaneous (LTA) and Visceral (LVA) American Leishmaniasis incidences are increasing in human and canine hosts, especially LVA, which is expanding its range through São Paulo State. Distribution and ecology knowledge of different sand fly species, and in case of LVA, the prevalence of *Leishmania* infection in dogs, its main reservoir, are essential for leishmaniasis epidemiology vigilance. Considering this, it was studied sand flies abundance and distribution, and also the presence of anti-*Leishmania* IgG antibodies in dogs, from different areas of Monte Mor county, São Paulo State. Sand flies were trapped in urban and rural areas between April 2006 and April 2008. CDC automatic light traps were used from 18h to 8h, during 16 nights. 319 canine sera samples were processed by ELISA and RIFI techniques, using *Leishmania major* as antigen. 86 phlebotomines were found in 14 out of 16 evaluated places, resulting in seven different sand fly species identified: *Nyssomyia neivai*, *Pintomyia monticola*, *P. pessoai*, *N. whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Brumptomyia brumpti* and *Evandromyia termitophila*. *N. neivai*, pointed out as the main LTA vector in São Paulo State, was the most abundant species (48.84% of the total captured), being found in 10 out of 14 places where sand flies were captured. All 319 canine sera resulted negative in serological tests. The finding of *N. neivai* and also the presence of secondary vector species as *N. whitmani*, *M. migonei* and *P. pessoai*, indicates the risk of LTA transmission in different places of Monte Mor county. The absence of *Lutzomyia longipalpis* sand fly species and also the absence of dogs with anti-*Leishmania* IgG antibodies indicates, at the moment the study was done, no occurrence of canine LVA in the city, with low risk of establishment of this disease in the area. Due to the high importance of leishmaniasis in the public health context, epidemiological vigilance actions must be continuously performed.

RESUMEN

La incidencia de las leishmaniosis tegumentaria (LTA) y visceral americanas (LVA) en hospederos caninos y humanos se encuentra en creciente expansión en el

Estado de São Paulo, Brasil. Para la vigilancia epidemiológica de tales endemias, es fundamental el conocimiento de la distribución y ecología de las diferentes especies vectoras de flebotomos y, para la LVA, el conocimiento de la prevalencia de la enfermedad en el perro, su principal reservorio. Se buscó verificarse la abundancia y distribución de flebotomos y pesquisar la presencia de anticuerpos IgG anti-*Leishmania* en sueros de una muestra de la población de perros, para el eventual encuentro de perros infectados, en la ciudad de Monte Mor, Estado de São Paulo. Para las capturas de los insectos se utilizó trampas automáticas luminosas del tipo CDC, en 16 puntos diferentes de la ciudad, en el período nocturno (18h a las 8h), desde abril de 2006 hasta abril de 2008, con posterior procesamiento e identificación de los flebótomos hacia el nivel de especie. El total de 319 muestras de sueros fueron procesados por las técnicas de ELISA y RIFI con utilización de *Leishmania major* como antígeno. En 14 de 16 locales evaluados se encontró flebotomos, totalizando 86 ejemplares, con identificación de siete especies: *Nyssomyia neivai*, *Pintomyia monticola*, *P. pessoai*, *N. whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Brumptomyia brumpti* y *Evandromyia termitophila*. *N. neivai*, considerada la principal vectora de la LTA en el Estado de São Paulo, fue la especie más abundante con 48,84% del total capturado y presente en 10 de 14 locales con flebotomos. Todas las 318 muestras de sueros caninos se presentaron negativas para anticuerpos IgG anti-*Leishmania*. La abundancia de *N. neivai* junto a la presencia de especies vectoras secundarias de leishmaniosis como *N. whitmani*, *M. migonei* y *P. pessoai*, enseña el riesgo de transmisión de la LTA en el municipio. La ausencia de *Lutzomyia longipalpis* y de perros portadores de anticuerpos anti-*Leishmania*, indican hasta el presente momento la ausencia de la LVA canina, con bajo riesgo de establecimiento de esta enfermedad en el municipio. Todavía, las acciones de vigilancia epidemiológica deben de ser continuamente adoptadas, siendo de extrema importancia desde el punto de vista de la salud pública regional.

Introdução

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é causada pela *Leishmania chagasi* e é uma zoonose grave, potencialmente fatal, que atinge principalmente crianças desnutridas (LAINSON & SHAW, 1978). É uma doença transmitida por flebotomíneos do complexo *Lutzomyia longipalpis* (RANGEL & LAINSON, 2003).

A LVA encontra-se em franca expansão no Estado de São Paulo, com 1.378 casos humanos notificados e registro de 122 óbitos no período de janeiro de 1999 até dezembro de 2008, apresentando letalidade de 8,85% (CVE, 2008). Das 645 cidades do Estado de São Paulo 63 (5,8%) registraram casos de LVA humana e/ou canina até fevereiro de 2008, sendo que 361 municípios (55,9%) apresentam-se receptivos para a doença, com encontro do vetor *Lutzomyia longipalpis* (GRUPO DE ESTUDOS DE LEISHMANIOSES – CCD, 2008). A enfermidade já foi diagnosticada em 54 municípios pertencentes a cinco regionais de saúde (DRS) distintas (CVE, 2008).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é conhecida no Estado de São Paulo desde 1895. No início do século passado era conhecida pelo seu caráter ocupacional, acometendo trabalhadores associados a atividades de desmatamento, sendo uma zoonose silvestre, e o homem hospedeiro acidental do protozoário (TOLEZANO, 1994). A enfermidade é importante tanto pela extensa distribuição geográfica no Brasil como pelas graves lesões cutâneas e mucocutâneas que provoca, com efeitos psicológicos no paciente com conseqüências no campo social e econômico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994). É causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, sendo o agente principal para o Estado de São Paulo a *Leishmania braziliensis* (GOMES, 1994). Os principais transmissores são flebotomíneos do complexo *Nyssomyia intermedia* (*N. intermedia* no litoral e *N. neivai* no interior), associadas ainda à *N. whitmani* e *Migonemyia migonei* como possíveis espécies vetoras secundárias (CAMARGO-NEVES, 2002). De 1993 a 2008 foram 7.826 casos humanos notificados no Estado de São Paulo, oriundos de mais de 400 cidades distintas (CVE, 2008), incluindo um caso ocorrido em 2002 no município de Monte Mor.

Material e Métodos

Descrição do Município

Monte Mor situa-se na microrregião de Campinas estando entre 22°56'48" de latitude sul, 47°18'57" de longitude oeste e 560 metros de altitude. O clima é considerado tropical de altitude Cwa. A cidade é cortada pelo Rio Capivari, pertencente à bacia hidrográfica do Rio Tietê. A população estimada é de 43.290 habitantes. A área do município é de 241 km² (IBGE, 2008). Faz divisa com as cidades de Campinas, Hortolândia, Santa Bárbara D'Oeste, Sumaré, Indaiatuba, Elias Fausto e Capivari, situando-se a 122 quilômetros da cidade de São Paulo. Juntamente com outros 18 municípios forma a Região Metropolitana de Campinas, que possui um total aproximado de 3.200.000 habitantes, distribuídos em uma área de 3.645,6 km² (IBGE, 2008).

Captura de Flebotomíneos

Durante o período de abril de 2006 a abril de 2008, realizaram-se 16 capturas de flebotomíneos no município de Monte Mor, SP, sendo uma coleta por noite em locais diferentes, em datas aleatórias, num total aproximado de 225 horas. Foram amostradas áreas dos três setores do município conforme divisão utilizada para o Programa Nacional de Combate à Dengue (PNCD). As coletas foram realizadas com armadilhas automáticas luminosas do tipo CDC, posicionadas a uma distância de 30 a 50 cm do solo, das 18 às 8 horas do dia seguinte. Os locais de captura situavam-se em área urbana ou rural, e foram escolhidos por apresentarem uma ou mais das seguintes características: 1) proximidade a áreas de mata; 2) histórico prévio de LTA humana nas redondezas; 3) presença de abrigos de animais domésticos como aves e/ou suínos. Um inseto capturado manualmente no intra-domicílio de uma residência também foi identificado. As armadilhas foram posicionadas em área de mata, peridomicílio ou quintal de residências. Os insetos capturados foram mortos, clarificados, corados e montados em lâmina, conforme técnicas usuais para flebotomíneos e foram identificados ao nível de espécie de acordo com GALATI (2003).

Coleta de sangue e sorologia

319 cães, de 42 bairros distintos, oriundos dos três setores da divisão do PNCD municipal, foram selecionados ao acaso durante a Campanha de Vacinação anti-rábica de 2006, sendo coletado de cada um cerca de 5 ml de sangue da veia braquial, após contenção física apropriada. Um animal foi selecionado por apresentar manifestações clínicas compatíveis com Leishmaniose Visceral Canina (LVC), tais como úlceras cutâneas, caquexia e linfadenomegalia. Este animal foi eutanasiado em janeiro de 2008, com realização de necropsia e colheita de fragmentos de órgãos para diagnóstico diferencial. 116 soros foram testados apenas pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), sendo que os 203 soros restantes foram testados utilizando-se a técnica de ELISA como triagem inicial com posterior realização da prova de RIFI nas amostras positivas.

As amostras de sangue foram centrifugadas, o soro acondicionado em microtubos identificados, e posteriormente congelados a -20°C . Para a técnica de RIFI as amostras de soro foram diluídas a partir de 1:20 em Solução Salina Tamponada (SST), assim como os controles positivos e negativos. O conjugado anti-imunoglobulina de cão foi diluído segundo seu título em azul de Evans a 20 mg%. Um volume de $10\mu\text{L}$ de cada diluição do soro foi distribuído em cada célula de lâminas esmaltadas de vidro, impregnadas com promastigotas de *Leishmania major* e incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. O material foi examinado sob microscópio de fluorescência com aumento de 400x. O título de anticorpos foi determinado como a última diluição apresentando fluorescência na célula promastigota, quando comparada aos controles positivo e negativo.

O ELISA foi conduzido utilizando-se placas de poliestireno sensibilizadas com antígeno de *Leishmania major* sonicadas, o soro dos cães foi diluído a 1:80 em solução *phosphate buffer saline caseine tween* e usado conjugado antiimunoglobulina de cão, fração IgG marcada com peroxidase (Sigma-Company, USA) com a reação lida em espectrofotômetro à 492 nm. Utilizaram-se dois controles positivos e dois controles negativos por placa e o ponto de corte definido pela média dos valores negativos, multiplicado pelo fator 2,4.

Resultados e Discussão

A relação de espécies de flebotomíneos capturados no município de Monte Mor, SP, nos diferentes pontos de captura, encontra-se na Tabela 1. Nenhum flebotomíneo foi capturado na Fazenda Bordon e na mata do Bairro Estância das Águas. Os 86 insetos capturados pertencem a sete espécies distintas, sendo que 42 (48,84%) destes foram da espécie *Nyssomyia neivai*, considerada a principal vetor da LTA no Estado de São Paulo (CAMARGO-NEVES et al., 2002). Esta foi a espécie mais dispersa no município, sendo encontrada em dez dos catorze locais positivos para flebotomíneos. Ressalta-se o encontro significativo das espécies *Pintomyia pessoai*, *Nyssomyia whitmani* e *Migonemyia migonei*, respectivamente em quatro, quatro e dois locais diferentes do município. Estas espécies são também consideradas importantes na transmissão de leishmanioses (RANGEL & LAINSON, 2003).

Foram coletadas 319 amostras de sangue de cães provenientes de 42 bairros distintos do município. Inicialmente na prova de ELISA, quatro cães apresentaram título elevado próximo ao ponto de corte, sendo considerados suspeitos, outros cinco cães apresentaram-se positivos e todos os demais se mostraram negativos. Os soros reagentes foram re-examinados pela RIFI apresentando-se então negativos para a presença de anticorpos IgG anti-*Leishmania*.

Um dos cães avaliados e soropositivo ao ELISA apresentava-se com manifestações clínicas compatíveis com quadro de LVA (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2006). Este cão, da raça boxer, fêmea, de 5 anos de idade, era oriundo do município de Vinhedo, residindo no município de Monte Mor havia dois anos no momento do exame clínico. Como sinais clínicos o cão apresentava poliúria, polidipsia, emagrecimento, feridas em extremidades dos membros com descolamento de coxins plantares, unhas e perda das falanges distais dos dedos, além de dermatite necrosante de extremidade da pua. Após algumas semanas recebendo tratamento a base de antibióticos sem melhora do quadro o animal foi eutanasiado e necropsiado. Os principais achados à necropsia foram: dermatite

necrótica de extremidades, gastrite, enterite hemorrágica, pancreatite, nefrite, linfadenomegalia, cistite, neoplasia vaginal por provável TVT. Amostras dos órgãos foram fixadas em formol tamponado a 10% e analisados por técnica de imunohistoquímica, pelo Departamento de Patologia Veterinária, da FOA, UNESP - *Campus* de Araçatuba. Nenhum órgão apresentou lesões com formas amastigotas de *Leishmania*. O fato deste animal haver apresentado sorologia positiva na prova de ELISA e posteriormente negativa na prova de RIFI, aliado ao resultado negativo da imunohistoquímica nos levou ao descarte da suspeita de LVA canina.

Baseando-se na existência de casos humanos ou caninos de LVA um município pode ser classificado em silencioso (sem transmissão) ou com transmissão. Baseado na presença ou ausência do vetor *Lutzomyia longipalpis* é classificado em receptivo ou não receptivo para o estabelecimento da doença. Dependendo da proximidade e/ou fluxo de transporte e/ou migratório com outros municípios com transmissão de LVA canina ou humana é classificado em vulnerável ou não vulnerável à introdução da LVA, considerando-se o risco de expansão por contigüidade e por saltos (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2006). Segundo o GRUPO DE ESTUDOS EM LEISHMANIOSES, CCD (2008), o município de Monte Mor é classificado como silencioso, não receptivo e não vulnerável, fato que confirmamos conforme informações obtidas neste trabalho.

Conclusões

A abundância de *Nyssomyia neivai* aliada à presença de espécies vetoras secundárias como *N. whitmani*, *M. migonei* e *P. pessoai*, confirma o risco de transmissão de LTA no município. A ausência de *Lutzomyia longipalpis* e de cães portadores de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, indicam até o momento ausência da LVA canina, com baixo risco de estabelecimento desta doença no município. Assim sendo, as informações obtidas neste trabalho confirmam a classificação do município como sendo silencioso, não receptivo e não vulnerável para a LVA .

Ressalta-se, porém, a necessidade da manutenção das ações de vigilância epidemiológica, ampliando-se os pontos de captura de flebotomíneos, bem como

se mantendo a avaliação clínica e laboratorial periódica da população canina, visando-se assim impedir a introdução e estabelecimento desta grave enfermidade no município.

Agradecimentos

Aos funcionários do Setor de Controle de Zoonoses e Vetores da Prefeitura Municipal de Monte Mor pelo auxílio nas capturas de flebotomíneos e na contenção dos cães durante as coletas de sangue. À Professora Maria Cecília Rui Luvizotto do Departamento de Patologia Veterinária da FMVA, UNESP de Araçatuba pela condução das análises de imunohistoquímica das amostras biológicas do cão suspeito de LVA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; GOMES, A.C.; ANTUNES, J.L.F. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos de leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.35, p.299-306, 2002.

CVE - Centro De Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Divisão de Zoonoses, **Secretaria de Estado da Saúde**. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em 25 de dezembro de 2008.

GALATI, E. A. B. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. *In*. E. F. Rangel & R. Lainson R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 53-175.

GOMES, A.C. Sand fly vectorial ecology in the State of São Paulo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.89, p.457-460, 1994.

GRUPO DE ESTUDOS EM LEISHMANIOSES, CCD. Atualização da classificação epidemiológica dos municípios para a Leishmaniose Visceral Americana. **Bol. Epid. Paulista – BEPA**, v.5, 50, p.18-25, 2008.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em 25 de dezembro de 2008.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária. Brasília, 1994.

RANGEL, E. F. & R. LAINSON. Transmissores da leishmaniose tegumentar americana. *In*. E. F. Rangel & R. Lainson. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 291-305.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo**. Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN. Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD. São Paulo, 2006.

TOLEZANO, J.E. Ecoepidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.89, p.427-434, 1994.

Tabela 1: Flebotomíneos capturados em área urbana, peri-urbana e rural do município de Monte Mor, SP, por espécie e sexo. Abril de 2006 a Abril de 2008.

Espécie	F	M	Total (F+M)	%
<i>Nyssomyia neivai</i> ¹	35	7	42	48.84
<i>Pintomyia monticola</i> ²	13	1	14	16.28
<i>Pintomyia pessoai</i> ³	3	9	12	13.95
<i>Nyssomyia whitmani</i> ⁴	3	3	6	6.98
<i>Migonemyia migonei</i> ⁵	3	3	6	6.98
<i>Brumptomyia brumpti</i> ⁶	-	3	3	3.49
<i>Evandromyia termitophila</i> ⁷	1	-	1	1.16
<i>Nyssomyia spp.</i> ⁸⁺	1	-	1	1.16
<i>Brumptomyia spp.</i> ⁹⁺	1	-	1	1.16
Total	60	26	86	100
%	69.77	30.23	100	

Legenda: F: fêmeas; M: machos; F+M: soma de fêmeas e machos; 1: Sítio Paulo Milani, Chácara José Brisque, Sítio Guaiuvira, Chácara Ora, Intradomicílio Rua Siqueira Campos (Centro), Margem Rio Capivari (Centro), Sítio São Lázaro, Granja Barone, Sítio Quitzau; 2: Fazenda Cacinha, Granja Barone, Mata do Lobo, Área Verde, Quinhões do Boa Esperança; 3: Sítio do Morro, Sítio São Lázaro, Mata do Lobo, Sítio Quitzau; 4: Fazenda Cacinha, Sítio do Morro, Sítio São Lázaro, Granja Barone; 5: Sítio Barrocão, Fazenda Cacinha; 6: Sítio Guaiuvira, Mata do Lobo; 7: Sítio Paulo Milani; 8: Sítio do Morro; 9: Fazenda Cacinha.

+ Exemplares danificados não permitindo a identificação da espécie.

CAPÍTULO II

Título:

Leishmaniose Tegumentar Canina por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em área vulnerável para Leishmaniose Visceral na região centro-leste do estado de São Paulo, Brasil

Title:

Cutaneous Canine Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a Visceral Leishmaniasis vulnerable area in the central east region of São Paulo State, Brazil.

Autores:

André Antonio Cutolo^{1,2}

Médico Veterinário, Mestre em Zoologia, Especialização em Saúde Animal e Saúde Pública, Doutorando em Parasitologia da Unicamp. Sócio do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Responsável técnico pelo Setor de Controle de Zoonoses e Vetores da Prefeitura Municipal de Monte Mor, SP.

Vera Lúcia Pereira-Chioccola³

Pesquisadora Científica do Laboratório de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz

Osias Rangel⁴

Assistente Técnico em Pesquisa Científica e Tecnológica da Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN Campinas. Doutor em Saúde Coletiva.

Roberto Mitsuyoshi Hiramoto³

Pesquisador Científico do Instituto Adolfo Lutz

Fabiana Grecco²

Médica Veterinária, Mestre em Parasitologia

Ingrid Menz²

Médica Veterinária, Doutora em Ciências

Filiação:

1. Serviço de Controle de Zoonoses e Vetores. Departamento de Vigilância à Saúde. Prefeitura Municipal de Monte Mor. Rua Lázaro Dirceu Martimbianco, nº95. Jd. N. Sra de Fátima. CEP 13190-000. Monte Mor-SP. cutoloandre@yahoo.com
2. Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Rua Monteiro Lobato, 255. CEP 13083-862. Campinas - SP – Brasil.
3. Laboratório de Parasitologia. Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 351 8º andar, CEP:01246-000 São Paulo, SP.
4. Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN. Diretoria Regional de Serviço 05. Rua São Carlos, 546. Vila Industrial. CEP 13035-420. Campinas, SP.

Referência:

CUTOLO AA, PEREIRA-CHIOCCOLA VL, HIRAMOTO RM, RANGEL O, GRECCO FF, MENZ I. Leishmaniose Tegumentar Canina por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em área vulnerável para Leishmaniose Visceral na região centro-leste do estado de São Paulo, Brasil. 2011.

Abstract

Introduction: As part of the municipal Leishmaniasis Surveillance Program of Monte Mor county, dogs from a rural locality, where a human American cutaneous leishmaniasis (LTA) case was detected, were investigated regarding *Leishmania spp.* infection. **Methods:** All three resident dogs had symptoms compatible with cutaneous leishmaniasis, presenting skin ulcers during clinical inspection, being sampled for blood and skin lesioned tissues. IFI and ELISA serology were conducted using as antigens *Fucose Mannose Ligand (FML)*, *HSP70 Heat Shock*

Protein 70 Kd (S7), Crude and rK39 (DPP™ Leishmania Test) Bio-Manguinhos. Skin biopsies and lymphnode samples were analyzed by PCR aiming detection and identification of the *Leishmania* species. **Results:** Two out of three dogs presented positive IgG anti-*Leishmania* determined by ELISA FML. The other serological methods presented negative results. Seropositive animals had positive PCR for *Leishmania (Viannia) braziliensis* and negative for *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. These findings suggest absence of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in this area. However dogs were infected with *L. (V.) braziliensis*, showing circulation of the causative agent in the locality. **Conclusions:** The dog role as a sentinel for the risk of LTA disease occurrence in human beings is emphasized. *L. (V.) braziliensis* was obtained from popliteal lymphnode biopsy, so differentiation between *Leishmania* species infecting the dog is needed, specially in sympatric areas where *L. (L.) infantum chagasi* also occurs.

Keywords: Dog. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. American cutaneous leishmaniasis. Canine leishmaniasis.

Resumo

Introdução: Como parte do Programa de Vigilância das Leishmanioses do município de Monte Mor, região metropolitana de Campinas, estado de São Paulo, cães de uma propriedade rural com caso humano confirmado de leishmaniose tegumentar americana (LTA) foram avaliados clínica e laboratorialmente quanto à infecção por *Leishmania spp.*. **Métodos:** Os três cães residentes no local apresentavam úlceras cutâneas compatíveis com leishmaniose, sendo coletadas amostras de sangue e biópsias de pele das mesmas. Foi realizada a sorologia por meio dos métodos de IFI e ELISA utilizando-se como antígenos o *Fucose Mannose Ligand (FML)*, *HSP70 Heat Shock Protein 70 Kd (S7)*, *Crude* e *rK39 (DPP™ Leishmania Test) Bio-Manguinhos*. As biópsias de pele e de linfonodo foram analisadas por meio de PCR visando-se a detecção e identificação da espécie de *Leishmania*. **Resultados:** Dois dos três cães foram reagentes no

ELISA *FML* apresentando anticorpos IgG anti-*Leishmania*. Os outros métodos sorológicos resultaram negativos. Os animais soropositivos apresentaram PCR positivo para DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e negativo para *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Os achados sugerem a ausência de *Leishmania (L.) infantum chagasi* nesta área, porém os cães apresentaram-se infectados com *L. (V.) braziliensis*, evidenciando a circulação do agente etiológico no local. **Conclusões:** Ressalta-se o papel do cão como sentinela para o risco de ocorrência de LTA humana em áreas endêmicas. Obteve-se *L. (V.) braziliensis* de biópsia de linfonodo canino, desta maneira faz-se necessária a diferenciação entre as espécies de *Leishmania* que infectam o cão, especialmente em áreas de simpatria onde *L. (L.) infantum chagasi* também ocorre.

Palavras chave: Cão. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Leishmaniose tegumentar americana. Leishmaniose canina

Introdução

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas, sendo uma zoonose primária afetando outros animais que não o ser humano, que pode ser envolvido secundariamente (BRASIL, 2007).

É conhecida no estado de São Paulo desde 1895. No início do século passado, tinha caráter ocupacional, acometendo trabalhadores associados a atividades de desmatamento sendo, nesse caso, uma zoonose silvestre e o homem hospedeiro acidental do protozoário. O número de casos passou a decrescer no terço final de 1950, quando a área florestada do estado havia caído a níveis próximos a 18% da cobertura original. Porém, de forma surpreendente, a incidência da doença voltou a crescer por volta de 1978, na região sul do estado e, daí em diante, a incidência mantém-se crescente e ocorre de forma endêmica em áreas de colonização estabelecida, sem caráter ocupacional, com ciclos de

transmissão peri-urbano e/ou urbano zoonóticos associados a animais domésticos ou sinantrópicos (TOLEZANO, 1994).

A enfermidade é importante tanto pela extensa distribuição geográfica no Brasil como pelas graves lesões cutâneas e mucocutâneas que provoca, com envolvimento psicológico do doente e reflexos no campo social e econômico (BRASIL, 2007). É causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, sendo o agente principal para o estado de São Paulo a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (GOMES, 1994). Os principais transmissores são flebotomíneos do complexo *Nyssomyia intermedia* (*N. intermedia* no litoral e *N. neivai* no interior), associadas ainda à *N. whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Pintomyia fischeri* e *Pintomyia pessoai* como possíveis espécies vetoras secundárias (GOMES, 1994; CAMARGO-NEVES *et al.*, 2002). De 1998 a setembro de 2010 foram 7674 casos humanos notificados no Estado de São Paulo, oriundos de mais de 400 cidades distintas (CVE, 2010).

O cão (*Canis familiaris*) já foi naturalmente encontrado infectado por diferentes espécies de *Leishmania* no território paulista como *Leishmania (Viannia) braziliensis* (YOSHIDA *et al.*, 1990), *Leishmania (L.) infantum chagasi* (TOLEZANO *et al.*, 1999) e *Leishmania (L.) amazonensis* (TOLEZANO *et al.*, 2007).

Embora seja considerado o principal reservatório doméstico do ponto de vista epidemiológico para a *Leishmania (L.) infantum chagasi*, agente causador da leishmaniose visceral canina (LVC) (LAINSON, RANGEL, 2005), o papel do cão como reservatório doméstico para *Leishmania (Viannia) braziliensis* é controverso (FALQUETO *et al.*, 1986; PADILLA *et al.*, 2002; DANTAS-TORRES, 2007; PITTNER *et al.*, 2009;), sendo considerado hospedeiro acidental para a doença segundo o Ministério da Saúde, não havendo recomendações visando seu controle quando infectado (BRASIL, 2007).

Desta maneira é importante a identificação da espécie causadora da infecção no cão, visando-se o conhecimento do risco para a espécie humana referente à LVA (leishmaniose visceral americana), na confirmação do papel

sentinela do cão em relação à LTA, evitando-se a morte desnecessária destes animais no caso de confusão com a LVC.

Documenta-se neste texto o acompanhamento de dois cães naturalmente infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, com relação a aspectos clínicos das lesões, diagnóstico e identificação do parasita, tendo em vista as poucas publicações para esta espécie existentes no estado de São Paulo.

Materiais e Métodos

Em julho de 2010 o Serviço de Controle de Zoonoses do município de Monte Mor (Figura 1) foi acionado para investigar casos suspeitos de leishmaniose em cães de uma localidade rural da cidade. A moradora do local, reclamante e proprietária dos animais, notou feridas nas orelhas e face dos mesmos, sendo que a lesão da orelha de um dos cães estava presente há meses sem melhora clínica, apesar do constante tratamento com pomada antibiótica e *spray* matabicadeiras.

A proprietária dos animais teve confirmado diagnóstico de LTA e vinha recebendo acompanhamento e tratamento médico por apresentar úlcera cutânea em face posterior da coxa direita (Figura 2) além de ter resultado sorológico positivo por imunofluorescência indireta com título 1/32.

A localidade caso situa-se às margens do Rio Capivari (22°59'13,65" Sul e 47°23'04,05" Oeste, altitude de 528 metros), na divisa com os municípios de Elias Fausto e Capivari, ao lado da rodovia SP 101, que liga o município de Campinas à Capivari, passando por Monte Mor. O sítio possui uma casa simples de alvenaria, sem reboco, sem laje, possuindo espaço entre o telhado e a parede que permite a entrada de insetos no interior do domicílio. A casa se situa há cerca de 5 metros da borda da mata ciliar do Rio Capivari, vegetação de mata atlântica secundária, que na propriedade chega a ter de 5 a 30 metros de largura.

Cerca de 5 a 20 metros do entorno da casa localizavam-se três cães. Numa primeira inspeção, todos animais apresentavam-se em ótima condição corpórea, porém apresentavam úlceras cutâneas e cicatrizes suspeitas de leishmaniose tegumentar.

No dia 3 de agosto de 2010 retornou-se ao local para melhor inspeção dos cães e coleta de amostras biológicas dos animais. Os cães foram sedados com acepromazina (Acepran[®] 0,2%) na dose de 0,5 mg/Kg e butorfanol (Torbugesic[®]) na dose de 0,1 mg/Kg, administrados via subcutânea. No local da biópsia, para coleta de amostra de pele, foi aplicada via subcutânea, solução de lidocaína 1% após anti-sepsia com álcool 70^oGL.

Ao exame físico não se constatou linfadenomegalia nem qualquer outro sinal sistêmico compatível com manifestações clínicas de leishmaniose visceral. O cão A apresentou úlcera cutânea de cerca de 1,5 cm de diâmetro, de bordos elevados, em face interna da orelha direita (Figura 3), além de duas outras lesões crostosas de 0,5 e 1,0 cm de diâmetro em face interna da orelha esquerda. O cão B apresentava lesão ulcerada de 0,5 cm em face interna de orelha direita e lesão crostosa de 0,2 cm de diâmetro em face interna de orelha esquerda. O cão C apresentava úlcera cutânea circular de 0,5 cm em região nasal dorsal com rarefação pilosa em direção ao focinho que apresentava pequena lesão crostosa (Figura 4).

Realizou-se coleta de sangue da veia braquial, esfregaço por aposição de lâminas de vidro das lesões e duas biópsias de pele de borda das lesões ativas dos três animais. As biópsias foram realizadas com *punch* descartável de 0,2 cm de diâmetro. O sangue foi colocado em tubos plásticos *vacutainer* sem anticoagulante para obtenção do soro. As lâminas com esfregaço foram secas, fixadas em metanol e coradas com corante Panótico (Panótico Rápido LB, Laborclin). As amostras de pele foram aliquotadas, identificadas e congeladas em microtubos plásticos com água destilada estéril para a reação em cadeia da polimerase (PCR).

No dia 17 de agosto de 2010 realizou-se busca ativa de outros casos caninos com inspeção de 76 cães de propriedades situadas no entorno pertencente ao município, (durante campanha de vacinação anti-rábica) sem o encontro de cães com lesões suspeitas de LTA. Neste mesmo dia os três cães da propriedade caso foram inspecionados, sem observação de alteração significativa das lesões em relação à análise inicial.

Retornou-se ao local no dia 6 de outubro de 2010 para nova avaliação dos animais. O cão A continuava com a lesão ulcerada em orelha direita e com as lesões crostosas em orelha esquerda. O cão B teve total cicatrização das lesões nas orelhas. O cão C teve cicatrização da úlcera com formação de crosta no local (Figura 5).

No dia 16 de novembro de 2010 retornou-se ao sítio para nova avaliação e coleta de amostras dos cães A e C. Procedeu-se à sedação dos animais conforme descrito anteriormente. Coletou-se desta vez apenas sangue para soro e biópsias das três lesões de pele (úlcera e duas lesões crostosas) do cão A e biópsia de pele da lesão e citologia aspirativa de linfonodo poplíteo do cão C.

Realizou-se os testes sorológicos em todas as amostras coletadas pelos métodos de imunofluorescência indireta (IFI) (*Bio-Manguinhos*) e ELISA com antígeno *S7* (*HSP70 Heat Shock Protein 70 Kd*), *FML* (*Fucose Mannose Ligand*) (CABRERA et al., 1999) e de *Leishmania major* like (*Bio-Manguinhos*), além do teste imunocromatográfico com antígeno *rK39* (*DPP™ Leishmania Test Bio-Manguinhos*). As biópsias de pele dos bordos das lesões foram utilizadas para extração de DNA e PCR conforme procedimentos descritos previamente (GOMES et al., 2007; GOMES et al., 2008). Foram realizadas quatro reações para cada amostra para as seguintes identificações: i. *Leishmania spp.*; ii. *L. (L.) infantum chagasi*; iii. *L. (V.) braziliensis* e iv. proteína canina (canine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). A quarta reação foi realizada para a verificação de inibidores da PCR (COLOMBO et al., 2011).

Resultados

Os resultados das provas laboratoriais para as amostras biológicas colhidas encontram-se na tabela 1 e 2.

Tabela 1: Resultados das análises de esfregaço por aposição, PCR para determinação de *L. (V.) braziliensis* em biópsia de pele e diferentes métodos sorológicos realizados em cães suspeitos de LTA no dia 3 de agosto de 2010, Monte Mor, SP.

Cão	Esfregaço lesão	PCR pele	Métodos Sorológicos				
			Elisa FML*	Elisa S7	Elisa Bio	RIFI Bio	DPP Bio
A	-	-	+ / -	-	-	-	-
B	-	-	- / -	-	-	-	-
C	-	+	+ / +	-	-	-	-

Legenda: -: Negativo; +: Positivo; Bio: Bio-Manguinhos; RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; * Os métodos sorológicos foram realizados em duplicata;

Tabela 2: Resultados da PCR para determinação de *L. (V.) braziliensis* em biópsia de pele e linfonodo e diferentes métodos sorológicos realizados em cães suspeitos de LTA no dia 16 de novembro de 2010, Monte Mor, SP.

Cão	PCR *	Métodos Sorológicos			
		Elisa FML	RIFI Bio	Elisa Bio	DPP Bio
A	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	-

Legenda: -: Negativo; +: Positivo; Bio: Bio-Manguinhos; * Cão A positivo para as três lesões de pele amostradas e Cão 3 positivo para a cicatriz e linfonodo poplíteo.

Na coleta do dia 3 de agosto apenas o animal identificado como C apresentou resultados laboratoriais confirmatórios, com reação positiva no ELISA FML (nas duas repetições) e na PCR, com identificação específica para *L. (V.) braziliensis* e resultado negativo para *L. (L.) infantum chagasi*. O cão A apresentou sorologia positiva em apenas uma repetição, sendo negativo na PCR.

Em função do resultado duvidoso na sorologia, optou-se por retornar-se ao local de residência dos cães para nova coleta de amostras biológicas dos cães A e C, fato ocorrido no dia 16 de novembro de 2010. Os resultados obtidos novamente foram negativos na sorologia, exceto pelo ELISA FML desta vez positivo nos dois animais avaliados e com confirmação de positividade na PCR nas três amostras de pele do animal A (úlceras cutâneas e duas lesões crostosas das orelhas) e nas duas amostras do cão C (cicatriz crostosa da lesão de pele do focinho e no material aspirado de linfonodo poplíteo), que apresentava melhora clínica das lesões com cicatrização parcial das mesmas, conforme observado na Figura 5, sendo identificada *L. (V.) braziliensis*, com confirmação da negatividade para *L. (L.) infantum chagasi* em todas as amostras.

Discussão

O cão é considerado o principal reservatório da *L. (L.) infantum chagasi* (LAINSON, RANGEL, 2005), sendo extremamente susceptível à doença, apresentando manifestações clínicas variando entre dermatites, úlceras cutâneas, linfadenomegalia, sintomas oculares, artrite, onicogribose, podendo apresentar quadros hemorrágicos (BANETH et al., 2008). Apresentam ainda parasitismo cutâneo, mesmo em pele saudável, servindo de fonte de infecção para o flebotomíneo vetor (VEXENAT et al., 1994).

Na cidade de Campinas identificou-se no ano de 2009 um foco ativo de transmissão de LVA, com encontro de cães infectados por *L. (L.) infantum chagasi* e do vetor *Lutzomyia longipalpis* (PRESOTTO et al., 2010), o que levou à reclassificação do município limítrofe de Monte Mor para a situação de vulnerável

(COMITÊ DE LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA DA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2010).

Desde 2006 vem sendo realizado um trabalho de vigilância epidemiológica das leishmanioses caninas no município de Monte Mor com identificação de sete espécies de flebotomíneos, com maior abundância de *Nyssomyia neivai* e ausência de *Lutzomyia longipalpis* nos 16 locais avaliados. Realizou-se ainda inquérito sorológico para a presença de anticorpos IgG anti-*Leishmania* aleatoriamente em 319 cães sem encontro de animais positivos. Estes achados confirmaram a classificação do município como sendo não receptivo e de não transmissão para a LVC (CUTOLO et al., 2009).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), medidas de controle destinadas a reservatórios domésticos só são aplicáveis ao cão no caso da LVA, quando é indicada a eutanásia do animal infectado. No caso do cão com leishmaniose cutânea não existe qualquer medida de controle voltada para o animal hospedeiro, sendo proibido o tratamento do mesmo com drogas de uso humano pela possibilidade de indução de resistência medicamentosa às cepas de *Leishmania* potencialmente compartilhadas com o homem. A eutanásia somente é indicada em casos extremos, em que a doença encontra-se em estágio avançado, por razões humanitárias visando abreviar o sofrimento do animal.

Há décadas, diferentes autores confirmam a susceptibilidade do cão para a infecção por *L. (V.) braziliensis* (FALQUETO et al., 1986; PIRMEZ et al., 1988; YOSHIDA et al., 1990), com ocorrência de úlceras cutâneas de bordos elevados, de difícil cicatrização em diferentes partes do corpo, mas principalmente em bordos e face interna de orelhas, focinho e bolsa escrotal (PIRMEZ et al., 1988; PADILLA et al., 2002; MADEIRA et al., 2003), locais mais facilmente acessíveis ao flebotomíneo vetor, ocorrendo também animais infectados assintomáticos.

Diferentes métodos diagnósticos vem sendo empregados no diagnóstico da LTA canina, dentre eles os indiretos como a sorologia (ELISA e RIFI), além da prova de intradermoreação utilizada para fins de pesquisa, e os métodos parasitológicos diretos (exames de observação de lâmina, histopatológico ou cultura) (BRASIL, 2007). Tais métodos, porém, possuem limitações na

identificação específica do agente causador e diferenciação com *L. (L.) infantum chagasi*, fato esse realizável por técnicas moleculares como a PCR.

Controvérsias existem no meio científico com relação ao papel do cão na epidemiologia da LTA (FALQUETO et al., 1986; PITTNER et al., 2009; PADILLA et al., 2002; DANTAS-TORRES, 2007). Seria ele um real reservatório do parasita ou apenas uma vítima da infecção assim como o homem? A presença de cães com LTA distribuídos em áreas com ocorrência de casos humanos é fato conhecido (FALQUETO et al., 1986; YOSHIDA et al., 1990; SESSA et al., 1994; PADILLA et al., 2002) e não elucida seu papel na cadeia de transmissão (REITHINGER; DAVIES, 1999).

O cão alberga quantidade pequena de amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* nas lesões cutâneas dificultando o diagnóstico por métodos diretos da infecção como a cultura e esfregaço em lâminas avaliados por microscopia (FALQUETO et al., 1987; PADILLA et al., 2002), possuindo ainda menos amastigotas do que as lesões no ser humano (PADILLA et al., 2002). Tais achados apontam para a possibilidade do homem ser uma fonte de infecção melhor para o flebotomíneo que o cão (ROJAS; SCORZA, 1989; PADILLA et al., 2002; DANTAS-TORRES, 2007).

O diagnóstico sorológico, embora específico, por vezes pode mostrar-se pouco sensível para a identificação de animais infectados, como na RIFI (PADILLA et al., 2002). O uso de antígenos purificados pode ser uma alternativa para melhorar a sensibilidade de métodos sorológicos (PORROZZI et al., 2007).

No presente estudo, o único método sorológico capaz de diagnosticar positivamente os cães confirmadamente infectados por *L. (V.) braziliensis* foi, de forma surpreendente, o ELISA com antígeno *FML (fucose mannose ligand)*, uma glicoproteína de membrana isolada de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) donovani* (CABRERA, 1999). Esta reação positiva não era esperada uma vez que o agente infectante dos cães pertence a outro sub-gênero (*Viannia*). Porém, a ocorrência de reações cruzadas em avaliações sorológicas de cães infectados por *L. (V.) braziliensis* utilizando-se ELISA com antígenos purificados de *Leishmania (Leishmania) infantum* já foi reportada (PORROZZI et al., 2007) e a ocorrência de

considerável diversidade genética entre diferentes populações naturais de *L.(V.) braziliensis* (CUPOLILLO et al., 1998) poderia influenciar na expressão de diferentes antígenos de superfície.

Os métodos moleculares são comprovadamente eficientes na determinação da presença ou genotipagem da espécie de *Leishmania* causadora da infecção, uma vez que são extremamente sensíveis e específicos (GOMES et al., 2007; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009).

Neste trabalho obteve-se o diagnóstico molecular positivo em amostras de borda de lesão ativa, em tecido cutâneo em processo de cicatrização e também em linfonodo poplíteo de animais infectados. A persistência de *Leishmania* pode ser elevada em tecido de lesões de LTA humana cicatrizadas, confirmada tanto por técnicas moleculares como a PCR e cultura, indicando cura clínica, mas não parasitológica pós-tratamento (MENDONÇA et al., 2004; BRASIL, 2007).

Quando da punção aspirativa do linfonodo poplíteo, ressalta-se que este não se encontrava aumentado de tamanho, mostrando a sensibilidade da PCR em detectar quantidades pequenas de parasitas, quantidades inclusive incapazes de causar inflamação no tecido avaliado. A punção aspirativa de linfonodo por agulha fina é uma técnica largamente utilizada para diagnóstico da LVC e a possibilidade da presença de *L. (V.) braziliensis* neste tecido é relevante, pois pode induzir a diagnósticos errôneos uma vez que se use métodos diagnósticos não específicos.

Outra ressalva é o fato de uma das análises da PCR de borda de lesão do cão A ser negativa na primeira amostra, o que confirma a pequena quantidade ou ausência de amastigotas na lesão naquele momento. A segunda amostra apresentou resultado positivo, confirmando a presença de *Leishmania*. Estes resultados podem indicar uma alternância na quantidade de parasitas presentes na lesão em diferentes momentos, o que pode afetar a infectividade do cão para um eventual repasto sangüíneo do flebotomíneo vetor.

Tendo em vista a expansão da LVC no território paulista, é necessário sua constante vigilância epidemiológica, o que inclui levantamentos entomológicos e avaliação sanitária da população canina visando se impedir a entrada e estabelecimento da doença em novas áreas.

Os métodos sorológicos, o exame direto de aspirados e biópsias de tecidos como linfonodo e lesões de pele, as avaliações histopatológicas e o exame clínico não são capazes de promover a diferenciação das espécies de *Leishmania* que infectam o cão. Em áreas de simpatria entre *L. (L.) infantum chagasi* e outras espécies de *Leishmania*, a ausência de métodos diagnósticos capazes de diferenciar os agentes etiológicos certamente propiciará diagnósticos incorretos e eventual eutanásia desnecessária de animais falso positivos, uma vez que *L. (V.) braziliensis* pode estar presente nestes tecidos, sendo neste estudo encontrada tanto em úlcera ativa, em pele em processo de cicatrização e em linfonodo poplíteo.

Por outro lado, em áreas livres de *L. (L.) infantum chagasi* a não identificação específica do agente pode levar ao não diagnóstico de cães por ela infectados em epizootias iniciais ou recém trazidos de áreas endêmicas, potenciais introdutores da enfermidade em áreas livres com presença de vetores competentes (GOMES et al., 2007).

Apesar de realizada a inspeção clínica em apenas 76 cães das redondezas da propriedade caso e ausência de animais com lesões suspeitas de LTA, é possível que outros cães estivessem infectados. O maior número de cães infectados que aqueles que apresentam lesões cutâneas em uma determinada área é fato já observado em outros estudos (SESSA et al., 1994; PADILLA et al., 2002; ZANZARINI et al., 2005; PITTNER et al., 2009).

A ausência de outros casos caninos e humanos no entorno do foco e a concentração de dois casos caninos juntos a um caso humano de LTA demonstra a correlação da doença nestes dois hospedeiros e confirma o papel indicador ou sentinela do cão na LTA para o homem.

Embora não se possa descartar a possibilidade tanto do homem quanto dos cães servirem de fonte de infecção para flebotomíneos no local, o fato da residência e os cães estarem localizados há uma distância menor do que 20 metros da mata ciliar do Rio Capivari, aponta para um mamífero selvagem como possível reservatório do agente, sendo tanto o homem quanto os cães prováveis hospedeiros acidentais do parasita na ocorrência de um foco silvestre, de

transmissão local, que atingiu o peridomicílio. Para tanto, maiores investigações epidemiológicas do foco são necessárias, envolvendo também o exame de mamíferos silvestres habitantes do entorno.

Referências Bibliográficas

1. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2nd ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2007.
2. TOLEZANO JE. Ecoepidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, p.427-434, 1994.
3. GOMES A.C. Sand fly vectorial ecology in the State of São Paulo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.89, p.457-460, 1994.
4. CAMARGO-NEVES VLF, GOMES AC, ANTUNES JLF. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos de leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.35, p.299-306, 2002.
5. CVE - Centro De Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Divisão de Zoonoses, *Secretaria de Estado da Saúde*. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em 14 de dezembro de 2010.
6. YOSHIDA ELA, CORREA FMA, MARQUES SA, STOLF HO, DILLON NL, MOMEN H, GRIMALDI JR G. Human, canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (= *L. braziliensis braziliensis*) in the south-west region of São Paulo State, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, p.133-134, 1990

7. TOLEZANO JE, LUVIZOTTO MCR, ULIANA SRB, ARAÚJO MFL, TANIGUCHI HH, BARBOSA JAR, BARBOSA JER, PINTO PLS, FLOETER-WINTER L, SHAW JJ. Leishmaniose Visceral Americana (LVA) em Araçatuba, região Oeste do Estado de São Paulo. Investigações laboratoriais e diagnóstico de uma doença em terras paulistas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.32 (Supl), p.218, 1999.
8. TOLEZANO JE, ULIANA SR, TANIGUCHI HH, ARAÚJO MF, BARBOSA JA, BARBOSA JE, FLOETER-WINTER LM, SHAW JJ. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.149, p.280-284, 2007
9. LAINSON R, RANGEL EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, p.811-827, 2005.
10. FALQUETO A, COURA JR, BARROS GC, GRIMALDI FILHO G, SESSA PA, CARIAS VRD, JESUS AC, ALENCAR JTA. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar americana no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.81, p.155-163, 1986.
11. PITTNER E, VOLTARELLI E, PERLES TF, ARRAES SMAA, SILVEIRA TGV, LONARDONI MVC. Ocorrência de leishmaniose tegumentar em cães de área endêmica no Estado do Paraná. **Arq. Bras. Med. Vet.**, v.61, p.561-565, 2009.
12. PADILLA AM, MARCO JD, DIOSQUE P, SEGURA MA, MORA MC, FERNÁNDEZ MM, MALCHIODI EL, BASOMBRÍO MA. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. **Vet. Parasitol.**, v.110, p.1-10, 2002.

13. DANTAS-TORRES F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Vet. Parasitol.**, v.147, p.139-146, 2007.
14. CABRERA GPB, SILVA VO, COSTA RT, REIS AB, MAYRINK W, GENARO O, PALATNIK-DE-SOUZA C.B. The fucose-mannose ligand-Elisa in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**,v.61, p.296-301, 1999
15. GOMES AH, FERREIRA IM, LIMA ML, CUNHA EA, GARCIA AS, ARAÚJO MF, PEREIRA-CHIOCCOLA VL. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v.144, p.234-241, 2007. *Erratum in: Vet. Parasitol.*, v.149, p.298, 2007
16. GOMES AH, ARMELIN IM, MENON SZ, PEREIRA-CHIOCCOLA VL. *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, v.119, p.319-324, 2008.
17. COLOMBO FA, ODORIZZI RM, LAURENTI MD, GALATI EA, CANAVEZ F, PEREIRA-CHIOCCOLA VL. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitol. Res.**, *in press*, 2011.
18. BANETH G, KOUTINAS AF, SOLANO-GALLEGO L, BOURDEAU P, FERRER L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.**, v.24, p.324-330, 2008
19. VEXENAT JA, FONSECA DE CASTRO JA, CAVALCANTE R, TAVARES JP, SILVA MRB, BATISTA WH, FURTADO CAMPOS JH, HOWARD MK, FRAME IL, MCNERNEY R, WILSON S, MILES M.A. Visceral leishmaniasis in Teresina, state

of Piauí, Brazil: preliminary observations on the detection and transmissibility of canine and sandfly infections. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.89, p.131-135, 1994.

20. COMITÊ DE LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA DA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, atualizado em maio de 2010. **BEPA**, v.7, p.7-21, 2010.

21. CUTOLO AA, TRONCARELLI MZ, MACHADO JG, LUVIZOTTO MCR, VON ZUBEN CJ, LANGONI H, GIORGIO S. Vigilância epidemiológica das leishmanioses no município de Monte Mor, estado de São Paulo, Brasil. **Vet. Zootec.**, v.16, p.634-641, 2009.

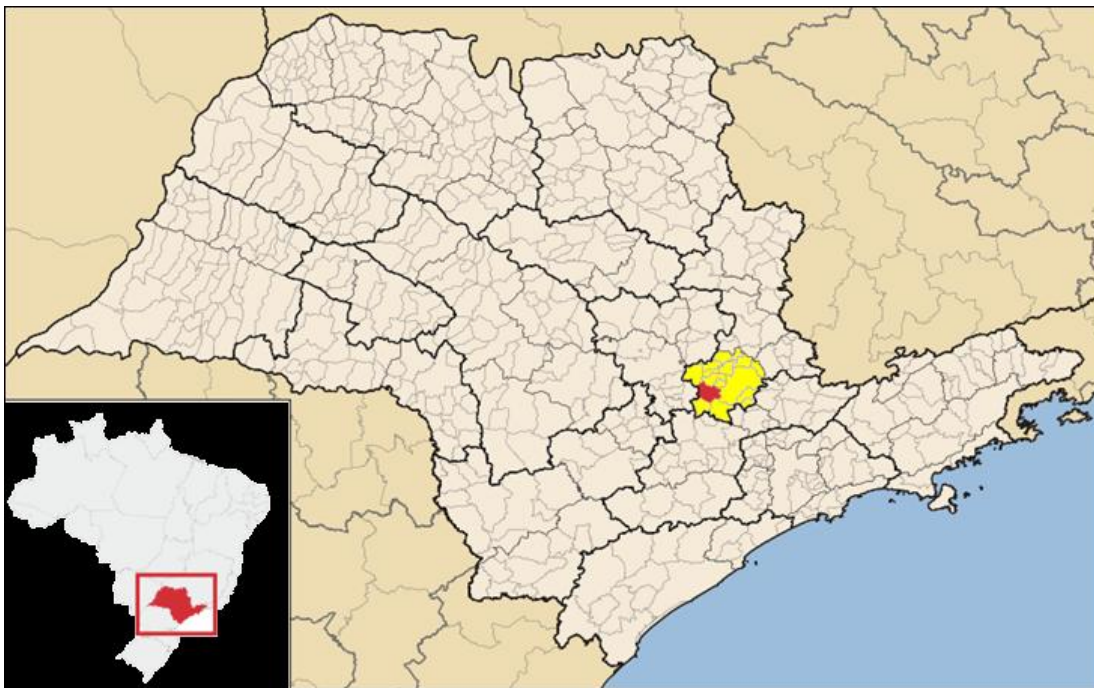


Figura 1. Localização do Município de Monte Mor (cor vermelha) e da micro-região de Campinas (cor amarela) no estado de São Paulo.



Figura 2: Leishmaniose Tegumentar Americana em humano da localidade caso.



Figura 3: Cão A, úlcera e crostas em face interna de orelhas causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, lesões estáveis durante todo período observacional.



Figura 4: Cão C, úlcera em região nasal dorsal causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, rarefação pilosa e crosta em focinho em 3 de agosto de 2010.



Figura 5: Cão C, tecido de cicatrização em região nasal e crosta substituindo antiga úlcera, positiva para DNA de *Leishmania (V.) braziliensis*, 16 de novembro de 2010.

CAPÍTULO III

Alguns Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

CUTOLO, A.A.¹; MOREIRA, M.A.B.²; NOGUEIRA, F.S.³; LUVIZOTTO, M.C.R.⁴; CARVALHO, F.G.⁵; BRAZUNA, J.M.⁵; DOMINGOS, I.⁵; MENZ, I.¹

1. Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP.
2. Hospital Veterinário, Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo, SP.
3. Fundação Educacional de Andradina, FEA, Andradina, SP.
4. Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP, Araçatuba, SP.
5. Centro de Controle de Zoonoses, Campo Grande, MS.

Introdução

No Mato Grosso do Sul, desde a década de 80, a LVA esteve presente e restrita a casos isolados em dois municípios do estado, Ladário e Corumbá. Em 1994 uma epidemia se iniciou em Corumbá, com número elevado de casos até o ano de 1998. A partir de 1995, novos municípios foram atingidos pela epidemia, chegando a Três Lagoas no ano de 2001 e Campo Grande em 2002 (ANTONIALLI et al., 2006; FURLAN, 2010).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), de 1990 a 2009 foram 2061 casos de LVA notificados no estado de Mato Grosso do Sul, sendo 1664 ocorridos a partir de 2002. Acredita-se que a rota de expansão e disseminação da LVA neste estado ocorreu do sentido leste, a partir de Corumbá na divisa com a Bolívia, até o oeste, onde se situa Três Lagoas, na divisa com o estado de São Paulo. Três diferentes empreendimentos de engenharia foram implantados no estado de Mato Grosso do Sul em diferentes momentos, interligando estes

extremos do estado: a ferrovia iniciada em 1909 e concluída em 1952, a rodovia federal BR-262 concluída na década de 80 e o gasoduto Brasil-Bolívia iniciado em 1998 (ANTONIALLI et al., 2006).

Foi em um dos trabalhadores da mencionada ferrovia que Migone, no Paraguai, identificou o primeiro caso de LVA nas Américas, em 1913 (BRASIL, 2006). Acredita-se, porém, que o principal fator antropogênico que propiciou a expansão da LVA pelo estado seria a construção do gasoduto Brasil-Bolívia que propiciou a migração de milhares de trabalhadores da cidade endêmica de Corumbá para outras cidades, inclusive à capital Campo Grande. A data de início dessa obra coincide com a identificação dos primeiros casos de LVA fora de Corumbá, em Mato Grosso do Sul (ANTONIALLI et al., 2006), e também nas cidades do oeste paulista, iniciando pela cidade de Araçatuba em 1999, posteriormente se espalhando por outras cidades do estado de São Paulo, causando 1714 casos humanos com 148 óbitos em 63 municípios distintos até o ano de 2010 (CVE, 2011).

O primeiro caso autóctone canino em Campo Grande foi registrado em 1998, neste mesmo ano, inquérito sorológico nesta espécie registrou 1,3% de prevalência dentre 6204 cães testados, porém, o vetor *Lutzomyia longipalpis* só foi identificado no ano de 2000. Em 2001, novo estudo de prevalência sorológica registrou valor de 2,1% dentre 3250 cães avaliados. Em 2002 foram notificados os primeiros casos humanos autóctones, caracterizando o início da epidemia de LVA no município (FURLAN, 2010).

No período de 2002 a 2006 foram confirmados 568 casos de LVA humana em residentes de Campo Grande, com idade que variou de três meses até 93 anos, com 28% dos casos (160/568) em menores que cinco anos e 64% (363/568) no sexo masculino. Observou-se febre (95%), esplenomegalia (85%) e hepatomegalia (78%) como manifestações clínicas principais, sendo febre e esplenomegalia presente em 69% e ausente em apenas 1% dos casos (FURLAN, 2010).

A incidência da doença variou de 3,1/100 mil habitantes em 2002 até o valor máximo de 21,3 casos/100 mil habitantes no ano de 2006. Foram registrados

no período 43 óbitos, com taxa de letalidade de 7,7%, sendo que houve 4,5% de letalidade nos casos sem infecção associada (23/447) e 16,5% (20/121) nos casos com infecção associada, destes, 28 casos (23,1%) estavam infectados com HIV, nove (7,4%) tinham tuberculose e 84 (69,4%) tinham outras infecções (FURLAN, 2010).

Houve registro da doença em todas as regiões administrativas da cidade, a incidência foi maior nas regiões Lagoa (27,4 casos/100 mil habitantes), Anhanduizinho (24,0 casos/100 mil habitantes) e Imbirussu (18,5 casos/100 mil habitantes). A letalidade foi de 5,1% no Imbirussu, 5,3% no Prosa, 6,3% na Lagoa, 6,7% no Segredo, 9,1% na Bandeira e de 15,1% no centro. Em inquéritos sorológicos caninos realizados de 2002 a 2006 pelo CCZ de Campo Grande observou-se prevalência da doença de 25,3% (29.493/116.642). De 2003 a 2006 foram borrifados 463.232 imóveis (FURLAN, 2010). Apesar das medidas de controle empregadas que consistiram em eutanásia do reservatório canino e controle do vetor, estas não se mostraram efetivas, pois se registrou aumento progressivo da incidência de casos humanos no período (FURLAN, 2010).

Falhas na eficácia dos programas de controle da LVC incluem o longo período entre o diagnóstico e a eliminação do cão reservatório, baixa sensibilidade dos testes sorológicos, acesso apenas parcial à população canina infectada (OMS, 2010), a oposição do proprietário na remoção do animal, a reposição dos cães eliminados pelos seus proprietários em função de laços afetivos (NUNES et al., 2008) e a existência de outros reservatórios animais que não o cão (SANTIAGO et al., 2007).

A falta de sustentabilidade de um sistema de vigilância permanente, devido à deficiência de recursos humanos capacitados e outros fatores operacionais por falta de recursos financeiros tem inviabilizado a execução de medidas de prevenção e controle da LVA conforme preconizado pelo Ministério da Saúde no Brasil (FURLAN, 2010).

O cão é considerado o principal reservatório da *Leishmania (L.) infantum chagasi* (ACHA & SZYFRES, 2003; LAINSON & RANGEL, 2005; BRASIL 2006), sendo a LVC uma doença multissistêmica com sinais clínicos variados, incluindo

emagrecimento, atrofia muscular generalizada, linfadenomegalia, crescimento excessivo das unhas e dermatite com descamações cutâneas. Esplenomegalia, artrites, lesões oculares e hemorragias também são observados (BANETH et al., 2008). Apresenta ainda parasitismo cutâneo, mesmo em pele saudável, servindo de fonte de infecção para o flebotomíneo vetor (VEXENAT et al., 1994).

A maioria dos estudos realizados com relação à epidemiologia da LVC são provenientes de estudos seccionais de corte transversal, que fornecem informação em um determinado momento do tempo. Tendo em vista a epidemia instalada em Campo Grande, selecionou-se uma área do município com ocorrência de casos humanos para a realização de um estudo longitudinal em um grupo de cães no decorrer do tempo, visando elucidar alguns aspectos epidemiológicos relacionados ao reservatório doméstico da LVA na área, por um período de dois anos.

Os cães selecionados eram clinicamente saudáveis, domiciliados, incluídos no estudo por conveniência, com autorização por escrito de seus proprietários. Após determinação da resposta sorológica e da doença clínica em um grupo inicial de 870 cães, 105 animais foram selecionados. Avaliaram-se estes animais periodicamente por meio de exame clínico, de sorologia (ELISA S7 e FML), por imunoistoquímica de pele de orelha, por exame de citologia aspirativa e PCR de linfonodo e medula óssea até o primeiro ano de acompanhamento. No vigésimo quarto mês realizou-se exame clínico dos animais restantes. Animais confirmadamente positivos foram eliminados de acordo com Programa Nacional de Controle da LVC pelo CCZ de Campo Grande, com aprovação do proprietário do cão.

Materiais e Métodos

Caracterização da Área Estudada

O município de Campo Grande, capital do estado de Mato Grosso do Sul, tem uma área de 8.093 km² e uma população de 787.204 habitantes (IBGE, 2011). A média anual de temperatura é de 23°C e apresenta estação chuvosa no

verão e seca no inverno. A área urbana é constituída por sete regiões administrativas: Segredo, Prosa, Anhanduizinho, Centro, Bandeira, Imbirussu e Lagoa. A urbanização é de 98,6% e caracteriza-se pela expansão horizontal e vegetação abundante (FURLAN, 2010).

O estudo foi conduzido no bairro Tarumã, sob as coordenadas 20°32'35" de latitude Sul, 54°40'20" longitude Oeste e 518 metros de altitude, caracteriza-se por ser de classe baixa à média baixa, principalmente residencial, com casas térreas. Parte do bairro era asfaltado e aproximadamente metade do mesmo com ruas sem pavimento. Observou-se na maioria do bairro adensamento das casas, com poucos terrenos baldios intercalados, exceção feita à periferia do mesmo. As casas em sua maioria eram de alvenaria, com ainda algumas poucas de madeira. Algumas delas não possuíam laje. Os quintais caracterizavam-se por possuir árvores frutíferas em sua grande maioria, predominando as mangueiras, que propiciavam os frutos e a sombra valorizada pelos moradores especialmente nos meses de calor intenso. Algumas residências possuíam galinheiros em seus quintais, com estimativa destes existirem em todos os quarteirões do bairro.

Determinação da Prevalência da Doença na Área de Estudo

Previamente ao início do estudo, buscou-se avaliar todos os cães existentes no bairro Tarumã como parte do trabalho de Controle da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Campo Grande, MS.

As casas foram visitadas por agentes de controle de zoonoses do município e, naquelas que existiam cães, após autorização do proprietário, os mesmos foram inspecionados quanto à existência de sinais clínicos compatíveis com a doença e tiveram cerca de 5 mL de sangue venoso coletado da veia jugular ou cefálica. As amostras de sangue logo após a coleta eram armazenadas em tubos *vacutainer* e mantidas em caixas isotérmicas de isopor até a chegada ao laboratório, onde eram centrifugadas para obtenção de soro. Dados como o

endereço do animal, nome, sexo e estado clínico do mesmo no momento da visita foram registrados em ficha apropriada, conforme preconizado pelo CCZ.

Os soros foram então processados por meio da técnica de ELISA Bio-Manguinhos (*L. major*), para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em quantidade considerada acima do *cut off*, que eram então considerados positivos.

Uma parcela destes cães foi testada também por método sorológico de ELISA utilizando antígeno FML (*fucoose mannose ligand*) para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*.

Da quantidade inicial de animais avaliados apenas uma parcela de conveniência de animais sem sintomas, foi selecionada para acompanhamento a longo termo, formando o grupo de animais do estudo.

Inclusão dos Cães no Estudo

Selecionou-se por meio de amostra de conveniência, 105 cães domiciliados, considerados clinicamente saudáveis, com pelo menos um resultado sorológico negativo no momento da visita inicial, para acompanhamento pelo período de 24 meses.

Os cães foram incluídos no estudo após autorização por escrito dos proprietários. Foi elaborada uma ficha individual para cada cão, contendo dados de identificação como nome; idade; sexo; raça; porte; se agressivo ou não; número de registro no CCZ; número de microchip; nome, endereço e telefone do proprietário; além de informações de cunho epidemiológico como a existência e quantidade de outros cães e outras espécies animais na casa; hábito prevalente de vida do cão (intradomiciliar ou peridomiciliar); conhecimento do proprietário quanto à existência de casos de LVC prévio em sua casa e conhecimento do proprietário quanto à ocorrência de algum caso humano de leishmaniose visceral nas redondezas de seu domicílio.

No dia inicial do estudo (Dia Zero) além do preenchimento da ficha individual, todos animais foram fotografados individualmente junto ao número de registro do cão no CCZ. Neste dia os cães foram ainda vermifugados (Cydectin®)

1%, solução injetável de moxidectina, via oral, na dose de 0,05 mL por quilo de peso vivo) e vacinados contra cinomose, hepatite infecciosa, parvovirose, traqueobronquite, parainfluenza, coronavirose e leptospiroses (Duramune® Max5-CvK/4L). Reforços anuais do vermífugo e da vacina foram dados aos animais remanescentes do estudo pelo período de dois anos. Os animais receberam microchip individual (Transponder Implantável Esterilizável AnimalTag®) subcutâneo.

Acompanhamento dos Animais do Estudo

O estudo caracterizou-se como longitudinal, com avaliação clínica e laboratorial periódica do grupo de cães por 24 meses. Neste período realizou-se exame clínico detalhado, exame parasitológico direto e detecção de DNA de *Leishmania sp.* por PCR de aspirados de medula óssea e/ou linfonodos, sorologia por ELISA com antígenos *FML (Fucose Mannose Ligand)* e *S7 (HSP70 Heat Shock Protein 70 Kd)* e prova imunoistoquímica de fragmentos de pele de orelha dos animais do estudo.

Os exames clínicos foram realizados nos dias Zero, aos 3, 6, 9, 12 e 24 meses após a seleção dos animais. As coletas de sangue para sorologia foram realizadas nos Dias Zero, meses 1.5, 2, 6, 12 e 13 meses. As punções por agulha fina de linfonodo poplíteo e de medula óssea para realização de exame parasitológico direto de citologia e detecção de DNA de *Leishmania spp.* por PCR foram realizadas no Dia Zero e no mês 12. Eventualmente algumas amostras foram coletadas para exame citológico parasitológico de linfonodo poplíteo no Dia 84. Biópsias de pele de face interna de orelha foram coletadas no Dia Zero e no mês 12. Alguns animais tiveram exames clínicos, sorológicos e citologias aspirativas realizados em outros momentos, conforme necessidade individual segundo avaliação veterinária.

O cronograma completo do estudo encontra-se na Tabela 1.

O CCZ de Campo Grande era avisado imediatamente sobre o aparecimento de animais do estudo que apresentassem sinais clínicos

compatíveis com LVC e/ou que tivessem resultados de análises laboratoriais positivos na sorologia e/ou algum exame parasitológico direto ou PCR positivo para LVC. Os proprietários dos animais também foram incentivados a comunicar o CCZ quando da suspeita da existência de cães do estudo que apresentassem sinais clínicos compatíveis com a doença. Tais animais eram então recolhidos para realização da eutanásia e quando possível realizava-se colheita de materiais biológicos dos mesmos para exame parasitológico citológico direto confirmatório.

Tabela 1: Cronograma das atividades realizadas, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

	Datas		Atividades Realizadas e Amostras Coletadas
Dia -30	Junho 2006	Junho 2006	Coleta de sangue para sorologia para ELISA Bio-Manguinhos (Antígeno <i>L. major</i> -like)
Dia Zero	Julho 3 a 6, 2006	Julho 21 a 27, 2006	Exame clínico, colocação de <i>microchip</i> sub-cutâneo, fotografia e questionário individual, coleta de sangue, biópsia de medula óssea, linfonodo e pele de orelha
3 Meses	Novembro 22 a 23, 2006		Exame clínico
6 Meses	Fevereiro 10 a 13, 2007		Exame clínico e coleta de sangue
9 Meses	Abril 28 a 29, 2007		Exame clínico
12 Meses	Julho 20 a 24, 2007		Exame clínico, coleta de sangue, biópsia de medula óssea, linfonodo e pele de orelha
24 Meses	Agosto 5 a 8, 2008		Exame clínico

Avaliação clínica, coleta, processamento e análise de materiais biológicos

a) Avaliação clínica

Os animais foram examinados detalhadamente durante as visitas domiciliares periódicas. Para tanto os mesmos eram fisicamente contidos com auxílio de focinheira plástica e contenção manual. Realizava-se inspeção externa geral do corpo do animal, avaliando-se o estado geral com relação ao escore corporal e buscando por lesões de pele e/ou quaisquer alterações dermatológicas,

especialmente úlceras em qualquer parte do corpo; dermatites e/ou alopecias em pina, extremidades articulares, face, entre outros. Inspeccionava-se as mucosas conjuntivais e gengivais, além de inspeção dos olhos. Palpava-se os linfonodos e abdômen.

Foram considerados cães sintomáticos aqueles que apresentassem pelo menos três sintomas compatíveis com Leishmaniose Visceral Canina, dentre eles caquexia, alterações dermatológicas como úlceras de pele, alopecia periocular, dermatite de pina entre outras, onicogribose, linfadenomegalia, esplenomegalia, artrite, ceratoconjuntivites, atrofia muscular, ascite, entre outros. Cães oligossintomáticos eram aqueles que apresentavam até dois dos sinais clínicos citados.

À medida que o estudo foi sendo realizado animais foram sendo perdidos por diferentes razões, incluindo mortes não relacionadas à LVC (atropelamentos, distocias no parto, doenças infecciosas outras), animais que mudavam de residência junto com os donos, animais roubados, animais que tinham morte natural. Cães que morreram por LVC, ou foram eutanasiados pelo CCZ quando da ocorrência de sintomas clássicos e/ou algum diagnóstico laboratorial positivo, tiveram seu destino devidamente registrado quando possível nas fichas de avaliações clínicas periódicas.

b) Coleta de sangue

Aproximadamente cinco mililitros de sangue foram coletados de cada animal do estudo, das veias cefálica ou jugular, utilizando-se seringas plásticas descartáveis de 5 mL e agulhas descartáveis 25x7, após anti-sepsia da pele com clorexidina alcoólica 3%.

O sangue coletado era transferido para tubo plástico *vacutainer* sem anti-coagulante devidamente identificado, permanecendo em estantes metálicas colocadas dentro de caixas isotérmicas refrigeradas por no máximo 8 horas, até a chegada ao laboratório do CCZ de Campo Grande. Neste eram centrifugadas por cinco minutos a 3.000 rpm para obtenção do soro, que era então separado em

duas alíquotas e armazenados em microtubos plásticos de polipropileno devidamente identificados. Cerca de 2,5 mL de soro era colocado em cada microtubo, sendo em seguida armazenado em sacos plásticos correspondentes ao dia da coleta e destinados a *freezer* para congelamento e manutenção a -20°C até o momento do processamento.

c) Amostras de medula óssea e linfonodo:

O material aspirado do linfonodo e medula óssea foi utilizado tanto para confecção de esfregaço, bem como para a realização de reação em cadeia pela polimerase (PCR).

Cães foram sedados com acepromazina (Acepran[®] 1%) na dose de 0,1 mg/Kg e butorfanol (Torbugesic[®]) na dose de 0,1 mg/Kg, administrados via subcutânea. No local da punção para coleta de medula óssea foi aplicada via subcutânea, solução de lidocaína 1%, cerca de 0,02 mL por quilo de peso do animal, após anti-sepsia com clorexidina alcoólica 3%. Para coleta de medula óssea foi dada preferência à cartilagem do esterno.

O aspirado de linfonodo foi realizado preferencialmente no gânglio poplíteo. As amostras coletadas de linfonodo e medula óssea foram mantidas em tubos de vidro estéreis individuais contendo salina a 0,9% e armazenados congelados a -20°C.

Para os esfregaço em lâmina de vidro, logo após a coleta, as amostras de medula óssea foram aplicadas diretamente da seringa ainda agulhada sobre a lâmina em forma de esfregaços, foram em seguida secas, e identificadas. No final de cada dia de coleta as lâminas eram fixadas em metanol e coradas com Giemsa para pesquisa do protozoário em microscópio óptico com objetiva de 100x, em imersão.

Os esfregaços foram examinados com o objetivo de identificar formas amastigotas no citoplasma dos macrófagos ou livres, como também avaliar os tipos celulares predominantes e, a reatividade das células do Sistema Fagocítico Mononuclear.

d) Amostras de pele de orelha:

Para obtenção dos fragmentos de pele os animais foram sedados com acepromazina e butorfanol, conforme já descrito. Injeção local de lidocaína 1% foi aplicada previamente a utilização de *punch* descartável de 0,3cm de diâmetro para a coleta da amostra, sempre em pele saudável. Os fragmentos foram acondicionados a temperatura ambiente em frascos de vidro devidamente identificados, contendo solução de formalina tamponada a 10%, para realização de análise imunoistoquímica.

e) Sorologias:

a. ELISA Bio-Manguinhos:

A prova de ELISA Bio-Manguinhos foi realizada no Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande. O teste foi realizado utilizando o Kit para o diagnóstico de Leishmaniose canina - Bio-Manguinhos / Fundação Oswaldo Cruz (utilizado no Programa de Controle da LVA pela Secretaria de Saúde de São Paulo e Ministério da Saúde). As reações foram realizadas seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. O ensaio consiste na reação de soros dos cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major*-like obtidos a partir de cultura, que são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas de 96 poços. As amostras e os soros controle foram diluídas 1:100, incubadas nos poços durante 30 minutos, após lavagem, adicionou-se o conjugado anti-cão (anti-IgG) marcado com peroxidase. Para revelar a reação foi acrescentado tetrametilbenzidina-TMB. A leitura da microplaca foi realizada em espectrofotômetro, equipado com filtro de 450 nm.

b. ELISA FML:

O método ELISA FML foi realizado de acordo com a descrição de Borja Cabrera (1999). Para a sensibilização das placas foi utilizado 2 µg de FML por cavidade de placa ELISA, em tampão carbonato bicarbonato (pH 9,6), incubados

por uma hora a 37°C por uma hora. Após a incubação e lavagens, os anticorpos ligados à placa foram detectados por proteína-A ligada a peroxidase, diluída a 1:20.000. Após nova incubação e lavagens, a reação cromogênica foi desenvolvida com orto-fenileno-diamina, diluído em tampão citrato e na presença de peróxido de hidrogênio, na incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro, e interrompida com ácido sulfúrico 1 N. A absorbância foi medida a 492 nm. Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O *cut off* do ELISA FML foi 0.450, correspondente à média dos valores de absorbância de soros controle negativos mais 2 desvios padrão, determinado pelo teste de Youden (1950). O processamento das amostras foi realizado na empresa Fort Dodge Saúde Animal Ltda., em Campinas, SP.

c. ELISA S7:

O *kit* ELISA S7, do Biogene Indústria e Comércio Ltda. ME, utiliza um polipetídeo recombinante, representando a fração carboxi-terminal da HSP70, denominado S7. No Brasil, o ELISA recombinante está licenciado pelo MAPA sob o número 7434/00, estando disponível para laboratórios de diagnóstico veterinário privados. O teste foi realizado de acordo com as orientações de bula. Foram utilizadas 100 µl da solução S7 em tampão carbonato (pH 9,6), por cavidade, para sensibilização da placa ELISA; as placas foram incubadas *overnight* a 4°C. A solução S7 foi desprezada e as placas lavadas três vezes com tampão PBST, e depois distribuídos 100 µl por poço de PBST mais 2% de leite em pó desnatado. As placas foram incubadas por mais 30 minutos à temperatura ambiente, a solução foi desprezada e mais três lavagens com PBST foram realizadas. Os soros testes foram diluídos em meio de coleta 1:100, incubados por quatro horas à temperatura ambiente para imunoadsorção e em seguida 100 µl de cada soro previamente imunoadsorvido foram distribuídos na placa. As placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e lavadas três vezes com tampão PBS. Anticorpos ligados aos poços foram detectados pela incubação com uma solução de proteína-A ligada a peroxidase, diluída a 1:10.000. A reação cromogênica foi desenvolvida com tetrametil benzidina e bloqueada com ácido

sulfúrico 1 N. A densidade óptica foi lida à 450nm. Controles positivos deviam mostrar $DO > 0.300$ e controles negativos < 0.100 . Para o cálculo do *cut off* a média aritmética das densidades ópticas dos soros não reagentes foi somada ao fator $R=0,142$, e para a determinação da faixa de indeterminados foi subtraído 0,03 do *cut off*.

O processamento das amostras de soro foi realizado no laboratório BioGene, em Recife, PE.

f) Imunoistoquímica de pele de orelha:

Os fragmentos de biópsia de pele foram processados em histotécnico e emblocados em parafina histológica, cortados com cinco micra e montados em lâminas previamente tratadas com 3-Aminopropiltriethoxy-Silane (SIGMA®).

Realizou-se a desparafinização a quente deixando as lâminas em estufa a 58°C. A hidratação foi realizada em banhos de três a cinco minutos em álcool etílico em concentrações decrescentes de 100%, 95%, 80%, 70%, 50%, água corrente por dez minutos e imersão em água destilada.

A recuperação antigênica dos cortes foi realizada em solução de ácido cítrico. Em seguida, a peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Após lavagem em água corrente por dois minutos, as lâminas foram imersas em água destilada.

Os cortes foram incubados com anticorpo primário policlonal anti-*Leishmania* produzido em camundongo, diluído em solução de PBS com BSA (soro albumina bovina) 1%. Após a lavagem com PBS incubou-se com anticorpo secundário biotinilado (kit LSAB, DAKO®). As lâminas foram novamente lavadas e incubadas com Streptavidina-peroxidase (kit LSAB, DAKO®).

Para a revelação foi utilizado como cromógeno a diamenobenzidina, (SIGMA®). As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris, desidratadas em soluções crescentes de álcoois, xilol e montadas com lamínula em resina sintética para observação em microscópio de luz. O processamento e

as análises das biópsias por imunistoquímica foram realizadas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba, SP.

g) Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de DNA de *Leishmania sp.*

a. Extração de DNA

As amostras de medula óssea e linfonodo foram congeladas a -20°C por vinte minutos para promover a ruptura das membranas celulares. Após este passo efetuou-se as lavagens com uma solução de SSC (1X) e centrifugou-se a 14000g por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado uma solução de lise composta de Acetato de sódio a 0,2M, SDS (Sodium dodecyl sulphate) a 10% e proteinase K. Após agitação as amostras foram incubadas a 56°C, seguido da adição de 400µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico.

Após centrifugação por seis minutos o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e transferido para tubos de polipropileno de um e meio mililitros. Às amostras foi adicionado um mililitro de álcool etílico absoluto gelado, misturando-se por reversão e colocando a -20°C por 15 minutos. Outra centrifugação foi realizada deixando escorrer todo o líquido sobrenadante. Ao sedimento foi adicionado 180µl de tampão TE (10mM TRIS base/1mM EDTA, pH 7,5), realizado agitação vigorosa e deixado em banho-maria a 56°C. Após a incubação foi adicionado, às amostras, 20µl de acetato de sódio na concentração de dois molar, seguido de agitação e centrifugação. O sobrenadante foi retirado por decantação. Ao sedimento foi adicionado 200µl de tampão TE, seguido por incubação a 56°C e após este período, as amostras foram agitadas vigorosamente por dez segundos e armazenadas a -20°C para posterior utilização do DNA.

b. Construção dos Oligonucleotídeos Iniciadores (Primers) e preparação para a amplificação

A construção dos oligonucleotídeos iniciadores foi realizada segundo RODGERS et al., (1990), com os *primers* 13A e 13B que amplificam região conservada no minicírculo do cDNA de todas as espécies de *Leishmania*.

Os reagentes básicos para reação de PCR foram: Tampão Taq (KCL 50 mM, Tris 10 mM pH=8,4), MgCl₂ concentração padronizada de um e meio miliMolar, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), os iniciadores 13A e 13B, Taq DNA polimerase e DNA das amostras, totalizando volume final de 50µl. As reações foram padronizadas em ciclador de temperatura programável (PTC-100 MJ-Research), com as seguintes condições de temperatura, 95°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 54°C por 45 segundos, 72°C por 30 segundos e um último ciclo de 72°C por cinco minutos. Os iniciadores 13A e 13B foram utilizados em conjunto possuindo a propriedade de amplificar fragmentos de aproximadamente 120 pares de bases. O material foi submetido à eletroforese em gel de agarose acrescido de brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta. O resultado positivo foi considerado quando visualizada banda de 120 pares de base. Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações. O processamento e análise das amostras foram realizados no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba, SP.

h) Análise Estatística

Os dados foram analisados em computador por meio do *software* GraphPad[®] (GraphPad, 2005), realizando-se associação de cada variável independente com o *status* clínico e/ou de infecção dos cães em comparação com cães saudáveis e/ou não infectados. Para testar a significância dos resultados utilizou-se o teste exato de Fisher com nível de significância de α menor que 5%. No caso de comparações de mais de duas variáveis, utilizou-se α com nível de significância $5\%/n$, sendo n o número de combinações possíveis entre as variáveis.

i) Bem estar animal

O protocolo do estudo foi aprovado junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Unicamp) sob o nº 2389-1, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, Lei 11794 de 8 de outubro de 2008 e o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, conforme cópia em anexo (Anexo I).

Resultados

Resultados do Dia - 30

Foram 870 os animais inicialmente inspecionados no bairro Tarumã, previamente à seleção dos 105 cães que fariam parte do estudo de longo prazo. Destes 870, apenas 477 tiveram sorologia realizada pelo método ELISA Bio-Manguinhos (antígeno *L. major*-like) utilizado na rotina de diagnóstico do CCZ de Campo Grande e 369 animais, não necessariamente os mesmos, testados pelo ELISA Bio-Manguinhos, foram avaliados pelo método de ELISA FML (antígeno glicoproteína de membrana, isolada de promastigotas de *Leishmania donovani*) (CABRERA et al., 1999).

Na Tabela 2 ilustra-se a prevalência de LVC conforme inspeções clínicas realizadas nos cães do bairro. Observa-se que 7,13% (62/870) apresentaram sintomas compatíveis com a doença.

Tabela 2: Resultados de inspeção clínica em população canina do bairro Tarumã. Junho de 2006, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

	n	%
Sintomáticos	62	7,13
Saudáveis	808	92,87
Total avaliado	870	100,00

Na Tabela 3 observa-se a proporção de animais reagentes na sorologia por ELISA Bio-Manguinhos e na Tabela 4 a proporção dos reagentes no ELISA FML. No ELISA Bio-Manguinhos 30,40% (145/477) foram reagentes para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* enquanto no ELISA FML 26,28% (97/369) foram positivos.

Tabela 3: Resultados de exame sorológico em população canina (ELISA Bio-Manguinhos). Junho de 2006, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

	n	%
Positivos	145	30,40
Negativos	332	69,60
Total Avaliado	477	100,00

Tabela 4: Resultados de exame sorológico em população canina (ELISA FML). Junho de 2006, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

	n	%
Positivo	97	26,28
Negativo	272	73,72
Total Avaliado	369	100

Foi possível avaliar também a prevalência da infecção por sorologia (ELISA Bio-Manguinhos) em conjunto com os achados das inspeções clínicas realizadas. Esses dados encontram-se na Tabela 5.

Observou-se que dos 30,40% (145/477) animais soropositivos pelo ELISA Bio-Manguinhos, 5,87% (28/477) animais estavam sintomáticos. Os 24,53% (117/477) restantes não apresentavam sinais clínicos clássicos, sendo soropositivos assintomáticos. Três animais apenas, considerados sintomáticos (0,63%), foram soronegativos. A maioria dos animais avaliados 68,97% (329/477), porém, estavam clinicamente saudáveis e sorologicamente negativos. Nas Figuras

1, 2, 3 e 4 observa-se imagens de cães sintomáticos e de algumas lesões causadas pela infecção por *Leishmania spp.*.

Tabela 5: Resultados de avaliação sorológica e clínica em população canina (ELISA Bio-Manguinhos) de cães de área endêmica para LVC. Junho de 2006, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

	n	%
Soropositivo com sintomas	28	5,87
Soropositivo sem sintomas	117	24,53
Soronegativo com sintomas	3	0,63
Soronegativo sem sintomas	329	68,97
Total Avaliado	477	100,00

Pôde-se ainda comparar os resultados dos dois métodos sorológicos utilizados, ELISA Bio-Manguinhos e ELISA FML, com relação aos animais reagentes e não reagentes pelos dois métodos em 310 soros, conforme ilustrado na Tabela 6. Houve concordância de resultados em 281 (90,64%) soros, em 280 dos resultados negativos, mas em apenas um animal positivo. Oito (2,58%) cães negativos no ELISA FML foram positivos no ELISA Bio-Manguinhos e 21 (6,77%) positivos no ELISA FML foram negativos no ELISA Bio-Manguinhos. Não houve, porém diferença significativa entre os resultados comparando-se os dois métodos diagnósticos ($p = 0,4891$).

Tabela 6: Comparação de resultados de sorologia pelo método de ELISA FML e pelo método de ELISA Bio-Manguinhos em população canina assintomática. Junho de 2006, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

		FML		
		Positivo	Negativo	Total
Bio-Manguinhos	Negativo	21	280	301
	Positivo	1	8	9
	Total	22	288	310

A prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* por ELISA *Bio-Manguinhos* e por ELISA *FML* e a prevalência de cães sintomáticos para a LVC obtida por inspeção clínica de animais do bairro, foi respectivamente de 30,4% (135/477); 26,28% (97/369) e 7,13% (62/870).

Resultados a partir do Dia Zero

A partir da avaliação realizada no Dia -30, 105 cães clinicamente saudáveis e sorologicamente negativos no ELISA FML ou no ELISA Bio-Manguinhos foram selecionados para inclusão no estudo longitudinal, por um período de acompanhamento de 2 anos.

Resultados em relação ao questionário e à demografia da população estudada

Foram 97 as residências participantes do estudo. Sete residências possuíam dois cães e uma residência possuía três animais incluídos no estudo. Nestas, um total de 94 questionários foram aplicados aos proprietários dos 105 cães do estudo, no Dia Zero.

Seis de 93 (6,45%) proprietários afirmaram ter havido casos de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) em vizinhos ou pessoas da própria casa,

previamente ao início do estudo. Destes, apenas uma residência teve confirmação de caso canino no período de 24 meses do estudo, conforme ilustrado na Tabela 9.

Não houve diferença estatística significativa entre o número de casos caninos diagnosticados em casas com e casas sem histórico de casos prévios de LVA humana ($p = 0,6616$).

Com relação à ocorrência prévia de caso de LVC na casa do cão selecionado, 15,96% (15/94) dos proprietários informaram que sim, sendo que em 46,67% (7/15) destes domicílios os cães selecionados apresentaram LVC no decorrer dos 2 anos de estudo, conforme ilustrado na Tabela 10. Não houve diferença estatística significativa entre o número de casos caninos diagnosticados em casas com e casas sem histórico de casos prévios de LVC ($p = 0,2291$).

Um total de 30 cães dos que foram à óbito foi diagnosticado até o final do estudo como infectados ou com quadro compatível de infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Vinte e quatro animais foram perdidos no decorrer do estudo por causas outras que não LVC. As porcentagens de animais mortos por LVC e os perdidos por outras razões encontram-se ilustradas na Tabela 17.

Seis (28,57%) em 21 dos cães agressivos apresentaram LVC, e 24 (28,57%) de 84 dos cães considerados dóceis apresentaram LVC ao final de 24 meses, conforme ilustrado na Tabela 11. Não houve diferença estatística significativa entre o número de casos caninos diagnosticados em animais de temperamento agressivo e os de hábito dócil, conforme avaliação clínica quando do preenchimento do questionário no início do estudo ($p = 1,000$).

Quatro (40,00%) de 10 cães com hábitos preferencialmente intradomiciliares segundo informações fornecidas pelo proprietário apresentaram LVC e 28,26% (26/92) dos cães com hábito peridomiciliar apresentaram a doença, conforme ilustrado na Tabela 12. Não houve diferença estatística significativa entre o número de casos caninos diagnosticados em animais de hábito preponderantemente intra e os de hábito peridomiciliar, segundo informado pelos seus proprietários quando do preenchimento do questionário no início do estudo ($p = 0,4747$).

Dos 105 cães, 61 (58,09%) eram fêmeas, e destas 26,22% (16/61) apresentaram LVC, enquanto que para os machos 31,82% (14/44) foram diagnosticados com a doença, conforme ilustrado na Tabela 13. Não houve, porém diferença estatística significativa entre o número de casos de LVC entre machos e fêmeas ao final do estudo ($p = 0,6620$).

A idade dos animais variou de 4 meses até 12 anos sendo que dois animais não tiveram idade determinada, conforme ilustrado na Tabela 7. Segundo informado pelos seus proprietários no início do estudo, vinte e quatro cães tinham até dois anos de idade, 59 tinham entre dois e seis anos de idade e 20 cães tinham mais que 6 anos. Visando uma melhor comparação dos resultados classificou-se os animais do estudo em três grupos conforme as faixas etárias: animais jovens (idade menor que dois anos), animais adultos (idade entre dois e seis anos) e animais idosos (idade maior que seis anos).

Com relação ao diagnóstico de LVC e a idade no início do estudo (Dia Zero) 33,34% (8/24) dos cães até dois anos de idade, 27,11% (16/59) dos que tinham entre 2 e 6 anos e 25,00% (5/20) dos cães maiores que 6 anos de idade tiveram LVC, conforme ilustrado na Tabela 14.

Não houve diferença estatística significativa entre o número de casos de LVC quando comparado a faixa etária de jovens *versus* adultos ($p = 0,6005$), jovens *versus* idosos ($p = 0,7416$) e adultos *versus* idosos ($p = 1,000$).

Foram onze as raças dos animais selecionados sendo 63,81% (67/105) sem raça definida; 17,14% (18/105) pinscher; 7,62% (8/105) poodle; 2,86% (3/105) pitbull e as demais raças correspondendo a 8,57% (9/105), conforme a Tabela 8.

Com relação às raças existentes, 32,83% (22/67) dos cães SRD, 11,11% (2/18) de pinschers e 100% (3/3) dos pitbulls apresentaram LVC. Além destes, cães das raças pastor alemão, fox paulistinha e cocker spaniel, que só possuíam um representante, também tiveram LVC diagnosticada. Cães das raças poodle, teckel, weimaraner, boxer e pequinês incluídos no estudo não apresentaram LVC diagnosticada no período.

Não houve diferença significativa quando realizada análise estatística comparando-se o número de casos de LVC diagnosticados em cães da raça SRD, a mais abundante, e o somatório das demais raças existentes ($p = 0,2623$).

Na tabela 15 ilustra-se o total de animais por raça e a ocorrência ou não de LVC ao final de 24 meses do estudo. Quando comparadas separadamente, observou-se ausência de diferença estatística significativa entre o número de casos de LVC entre as raças SRD *versus* pinscher ($p = 0,0828$), SRD *versus* poodle ($p = 0,0957$), pinscher *versus* poodle ($p = 1,000$).

Houve diferença estatística significativa entre o número de casos de LVC entre as raças pitbull *versus* SRD ($p = 0,0420$), pitbull *versus* pinscher ($p = 0,0075$) e pitbull *versus* poodle ($p = 0,0061$). As comparações entre as demais raças não foi possível devido ao número baixo de indivíduos na amostra.

Dos 97 proprietários, 94 informaram sobre a existência ou não de outros cães ou outras espécies de animais na casa do cão do estudo. Não havia outros animais na casa em 25,53% (24/94) dos entrevistados. As demais residências 21,28% (20/94) possuíam gato, 19,15% (18/94) possuíam aves e 52,13% (49/94) possuíam outros cães no domicílio, podendo também ter outros animais. Detalhando todas as associações existentes observou-se 36 casas possuíam apenas cães, 8 apenas gatos, 9 apenas aves, 7 possuíam cães e gatos, 5 cães e aves, 2 apresentavam cães, gato e aves, 2 apenas gato e aves e uma residência possuía cão e outra espécie (porquinhos-da-índia). A relação completa das associações das espécies, além do cão do estudo, nas residências dos proprietários dos mesmos, e a proporção existente de casos diagnosticados de LVC nestas, encontra-se na Tabela 16.

Dos cães oriundos de casas que não possuíam outros animais 33,33% (8/24) apresentaram LVC; dos oriundos de casas com gatos 25% (5/20) apresentaram a doença; daqueles que possuíam aves 27,78% (5/18) e os que tinham cães 36,73% (18/49) tiveram LVC em dois anos de acompanhamento.

Não houve diferença significativa quando realizada análise estatística comparando-se o número de casos de LVC diagnosticados em quaisquer das

associações possíveis de espécies animais, existentes ou não na residência, em conjunto com o animal do estudo.

Por exemplo, quando avaliados os casos de LVC em casas sem outros animais e casas contendo qualquer animal ($p = 1,000$), casas sem outros animais e casas com cães ou cães e outras espécies ($p = 1,000$, casas sem outros animais e casas com gatos ou gatos e outras espécies ($p = 0,5106$) e casas sem outros animais e casas com aves ou aves e outras espécies ($p = 0,7342$).

Quando da comparação de casos de LVC em casas contendo cães ou cães e outras espécies *versus* gatos ou gatos e outras espécies ($p = 0,5745$), casas contendo cães ou cães e outras espécies *versus* aves ou aves e outras espécies ($p = 0,7720$) e casas contendo gatos ou gatos e outras espécies *versus* aves ou aves e outras espécies ($p = 1,000$), tampouco houve diferenças estatísticas significativas.

Tabela 7: Classificação dos cães selecionados para o estudo conforme idade e sexo. Junho de 2006, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Idade (ano)	Macho	Fêmea	Total	%
< 6 meses	4	0	4	3,81
6 a 12 meses	1	3	4	3,81
1	4	9	16	15,23
2	7	10	17	16,19
3	4	6	10	9,52
4	5	6	11	10,47
5	3	9	12	11,43
6	4	5	9	8,57
7	3	2	5	4,76
8	4	2	6	5,71
9	2	1	3	2,86
10	1	4	5	4,76
12	1	0	1	0,95
Ind	0	2	2	1,90
Total	43	62	105	100,00
%	40,95	59,05	100,00	

Legenda: Ind: Indeterminado;

Tabela 8: Classificação dos cães selecionados para o estudo conforme raça e sexo. Junho de 2006, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Raça	Macho	Fêmea	Total	%
SRD	29	38	67	63,81
Pinscher	6	12	18	17,14
Poodle	2	6	8	7,62
Pitbull	3	0	3	2,86
Pequinês	1	1	2	1,90
Teckel	0	2	2	1,90
Boxer	0	1	1	0,95
Cocker Spaniel	1	0	1	0,95
Fox Paulistinha	1	0	1	0,95
Pastor Alemão	0	1	1	0,95
Weimaraner	0	1	1	0,95
Total	43	62	105	100,00
%	40,95	59,05	100,00	

Tabela 9: Presença ou ausência de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) por residência, diagnosticada ao final de 24 meses de acompanhamento em casas ou proximidades com ou sem caso de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) humana anterior ao início do estudo. Agosto de 2008, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

LVC	Residência		Total
	Com Caso	Sem Caso	
+	1	28	29
-	5	59	64
Total	6	87	93

Tabela 10: Presença ou ausência de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) por residência, diagnosticada ao final de 24 meses de acompanhamento em casas com ou sem caso de LVC anterior ao início do estudo. Agosto de 2008, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

LVC	Residência		Total
	Com Caso	Sem Caso	
+	7	23	30
-	8	56	64
Total	15	79	94

Tabela 11: Leishmaniose Visceral Canina (LVC) diagnosticada ao final de 24 meses de acompanhamento conforme classificação do temperamento do animal no início do estudo. Agosto de 2008, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

LVC	Agressivo	Dócil	Total
+	6	24	30
-	15	60	75
Total	21	84	105

Tabela 12: Leishmaniose Visceral Canina (LVC) diagnosticada ao final de 24 meses de acompanhamento conforme classificação do hábito preponderante de vida do animal no domicílio no início do estudo. Agosto de 2008, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

LVC	Intradomiciliar	Peridomiciliar	Total
+	4	26	30
-	6	66	72
Total	10	92	102

Tabela 13: Leishmaniose Visceral Canina (LVC) diagnosticada ao final de 24 meses de acompanhamento conforme sexo do animal. Agosto de 2008, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

LVC	Macho	Fêmea	Total
+	14	16	30
-	30	45	75
Total	44	61	105

Tabela 14: Leishmaniose Visceral Canina (LVC) diagnosticada ao final de 24 meses de acompanhamento conforme classificação da faixa etária do animal no início do estudo. Agosto de 2008, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

LVC	Jovem	Adulto	Idoso	Total
+	8	16	5	30
-	16	43	15	75
Total	24	59	20	105

Tabela 15: Leishmaniose Visceral Canina (LVC) diagnosticada ao final de 24 meses de acompanhamento conforme raça do animal. Agosto de 2008, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

LVC	SRD	Pinscher	Poodle	Pitbull	Pequinês	Teckel	Fox			Weimaraner	Boxer	Total
							Cocker Spaniel	Paulisti-nha	Pastor Alemão			
+	22	2	0	3	0	0	1	1	1	0	0	30
-	45	16	8	0	2	2	0	0	0	1	1	75
Total	67	18	8	3	2	2	1	1	1	1	1	105

Tabela 16: Presença ou ausência de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) por residência, diagnosticada ao final de 24 meses de acompanhamento conforme demais espécies de animais presentes no domicílio no início do estudo. Agosto de 2008, Bairro Tarumã, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

LVC	Sem	Cão	Gato	Aves	Cão e	Cão e	Cão, Gato	Gato e	Cão e	Total
	Animais				Gato	Aves	e Aves	Aves	e Outros	
+	8	13	2	1	2	3	0	1	0	30
-	16	23	6	8	5	2	2	1	1	64
Total	24	36	8	9	7	5	2	2	1	94

Tabela 17. Número de animais mortos por LVC e perdidos por outras causas no decorrer dos diferentes momentos de avaliação clínica em área endêmica para LVC, Tarumã, Campo Grande, MS, Brasil.

Mês de Avaliação	Mortos por LVC	% Mortos LVC	Perdas Outras	Perda Total	% Perdas
0	0	0,00	0	0	0,00
3	9	8,57	4	13	12,38
6	13	12,38	8	21	20,00
9	18	17,14	12	30	28,57
12	19	18,09	13	32	30,48
24	30	28,57	24	54	51,43

Resultados das Avaliações Clínicas e Laboratoriais

Dos 105 animais que iniciaram o estudo apenas 72 estavam vivos e/ou ainda no mesmo endereço no décimo segundo mês de avaliação e tiveram pelo menos um exame de sorologia e exame parasitológico direto realizados nos Dias Zero e Mês 12. Na Figura 5 observa-se exame positivo para amastigotas de *Leishmania spp.* em esfregaço de medula óssea.

No Dia +84 (Mês 3), 12 animais tiveram amostras de linfonodo coletados por meio de citologia com agulha fina com resultado de esfregaço positivo para amastigotas de *Leishmania spp.*, sendo eles os animais com número de registro 39887, 40495, 38810, 40673, 40744, 39991, 39737, 39979, 39809, 36551, 38765 e 39989.

Na Tabela 18 observam-se as diferentes categorias em que foram classificados cães do estudo de acordo com os resultados das análises laboratoriais e clínicas realizadas. Na sorologia do Dia -30 estão considerados os resultados de ELISA Bio-Manguinhos e/ou os de ELISA FML, no Dia Zero e Mês 12 estão considerados resultados de sorologia de ELISA FML e/ou ELISA S7 e nas provas parasitológicas diretas estão incluídos PCR de punções de medula óssea e linfonodo poplíteo, esfregaço de medula óssea e imunistoquímica de pele saudável de orelha. No Mês 12 estão ainda incluídos os achados clínicos

separando os animais em assintomáticos (até dois sintomas) e sintomáticos (três ou mais sintomas).

Segundo os métodos diagnósticos utilizados no período de 12 meses, 38 (52,78%) animais mantiveram-se livres de infecção e da doença clínica segundo os métodos diagnósticos utilizados pelo período de 12 meses. Os demais animais (47,22%) em algum momento apresentaram provas laboratoriais e/ou exames clínicos compatíveis com quadro de infecção ou doença clínica.

Dentre os 36 animais com provas positivas, 9 (12,5%) cães tiveram provas de sorologia e/ou diretas positivas no início do estudo (Dia-30 e Zero) e ausência de resultados positivos no Mês 12. Nas provas dos Dias -30 e Zero 15 (20,83%) cães foram negativos para as provas apresentando algum resultado positivo sorológico e/ou direto e/ou clínico no Mês 12. Os outros 10 (13,89%) animais restantes apresentaram resultados positivos tanto no início do estudo (Dia -30 ou Zero) quanto no Mês 12.

Cinco animais tiveram resultado positivo ao exame sorológico no Dia Zero sem nenhum outro resultado positivo posteriormente.

Outros cinco animais foram positivos em prova direta no Mês 12 sem apresentarem resultados positivos prévios ou simultaneamente.

Quatro animais tiveram resultados positivos em provas diretas tanto no Dia Zero quanto no Mês 12.

Três animais apresentaram sinais clínicos de LVC no Mês 12 sem ter qualquer resultado laboratorial prévio ou simultâneo positivo.

Um animal, clinicamente saudável, apresentou sorologia positiva nos três momentos avaliados D-30, Zero e Mês 12, com provas diretas também positivas no Dia Zero e Mês 12.

Dois cães tiveram prova direta, sorologia e sinais clínicos compatíveis com LVC apenas no Mês 12.

Dois cães tiveram apenas sorologia positiva no Mês 12. Dois cães tiveram sorologia e prova direta positiva no Mês 12.

Outros 10 cães foram separados em categorias individuais com um animal em cada, sendo quatro animais positivos em pelo menos uma prova diagnóstica

no início do estudo e negativos nas provas realizadas no Mês 12. Um animal negativo nas provas diagnósticas no início do estudo e positivo na sorologia do Mês 12 e cinco animais foram positivos em provas nos dois momentos de avaliação.

Analisando-se separadamente cada um dos momentos (Dia -30, Dia Zero e Mês 12) e cada tipo de exame realizado, têm-se diferentes resultados de prevalência.

Para o dia -30 em que só foi realizada sorologia a prevalência observada foi de 8,32% (6/72). Para o Dia Zero considerando-se apenas a sorologia a prevalência foi de 16,67% (12/72), somente o exame direto foi de 11,11% (8/72) e considerando-se sorologia e exame direto foi de 25% (18/72).

Para o Mês 12 considerando-se apenas a sorologia a prevalência também foi de 16,67% (12/72), somente o exame direto foi de 25% (18/72), considerando-se sorologia e exame direto foi de 30,56% (22/72), considerando só a clínica com animais sintomáticos foi de 8,32% (6/72) e considerando-se sorologia, exame direto e clínica foi de 31,94% (23/72).

A incidência de positivos na sorologia entre Dia -30 e Dia Zero foi de 11,76% (8/68), já que dentre os 12 soropositivos apenas 8 eram novos casos. Dos seis inicialmente positivos no Dia -30, dois animais não foram reagentes no Dia Zero. Um destes foi reagente também no exame direto no Dia Zero, mas tornando-se negativo em todas análises no Mês 12. O outro soropositivo no Dia -30 não mais foi reagente em quaisquer exames no Dia Zero e Mês 12.

A incidência de positivos na sorologia entre Dia Zero e o Mês 12 também foi de 11,76% (8/68), já que dentre os 12 soropositivos 8 eram novos casos. Dos 12 inicialmente positivos no Dia Zero, oito animais não foram reagentes no Mês 12. Desses 8 que se tornaram não reagentes no Mês 12, apenas um mostrou-se positivo em exame direto, o restante foi negativo também em exame direto.

Com relação aos exames diretos, a incidência entre o Dia Zero e Mês 12 foi de 18,18% (12/66). Eram oito os cães positivos no Dia Zero, porém dois destes não foram reagentes na análise subsequente, ficando um total de seis animais positivos da análise inicial que foram subtraídos dos 18 positivos no Mês 12,

ficando um total de 12 casos novos. Consideraram-se os dois animais inicialmente negativos no Dia Zero, mas que tiveram esfregaço de linfonodo no Dia +84 positivos como novos casos sendo adicionados ao momento Mês 12.

Tabela 18. Categorização dos cães do estudo conforme resultados de sorologia, exames parasitológicos diretos e clínicos pelo período de 12 meses, saudáveis no Dia -30 e Zero, em área endêmica para LVC, Tarumã, Campo Grande, Brasil.

Categoria	D-30	Dia Zero		12 Meses			Total
	Sorologia	Sorologia	Direto	Sorologia	Direto	Clínica	
1	-	-	-	-	-	-	38
2	-	+	-	-	-	-	6
3	-	-	-	-	+	-	5
4	-	-	+	-	+	-	4
5	-	-	-	-	-	+	3
6	+	+	+	+	+	-	1
7	-	-	-	+	+	+	2
8	-	-	-	+	-	-	2
9	-	-	-	+	+	-	2
10	+	+	-	+	-	-	1
11	+	-	+	-	-	-	1
12	-	+	-	-	+	-	1
13	-	+	+	-	-	-	1
14	-	-	+	+	+	-	1
15	-	-	-	+	-	-	1
16	+	+	-	+	+	+	1
17	+	-	-	-	-	-	1
18	+	+	-	+	+	-	1
Total							72

Legenda: +: exame positivo ou sintomático; -: exame negativo ou assintomático. Sorologia: ELISA FML ou Bio-Manguinhos no Dia -30; ELISA FML ou Biogene nos Dias Zero e Mês 12; Direto: PCR ou esfregaço de linfonodo ou medula óssea ou imunoistoquímica de pele;

Com relação aos animais mortos ao final do período de 12 meses, 19 destes tiveram morte natural causada pela doença ou foram eutanasiados em função de avaliação clínica e/ou resultados laboratoriais positivos para infecção e/ou LVC e tiveram pelo menos um exame de sorologia e direto realizados no Dia Zero.

Destes 19, oito (42,11%) animais foram diagnosticados com LVC sem ter resultados positivos no Dia -30 e Dia Zero. Os outros 9 (57,89%) tiveram todos

provas positivas no Dia Zero (sorologia ou exame direto) e destes dois animais foram positivos à sorologia no Dia -30, conforme ilustrado na Tabela 19.

Dos 72 animais que iniciaram o estudo e que estavam vivos e/ou ainda no mesmo endereço no décimo segundo mês de avaliação e tiveram pelo menos um exame de sorologia e parasitológico direto realizados nos Dias Zero e Mês 12, 51 animais estavam vivos no Mês 24, ao final do estudo.

Na Tabela 20 observa-se a categorização dos animais restantes, conforme os resultados dos exames realizados. Na Tabela 21 encontram-se os animais categorizados, que não concluíram o estudo por óbito devido à LVC, perda ou morte não relacionada à doença.

Mantiveram-se livres de infecção e da doença clínica 33 (74,71%) animais segundo os métodos diagnósticos utilizados pelo período de 12 meses e sinais clínicos até o Mês 24. Os demais animais (25,39%) em algum momento apresentaram provas laboratoriais e/ou exames clínicos compatíveis com quadro de infecção ou doença clínica.

Dentre os 18 animais com provas positivas, 5 (9,81%) cães tiveram provas de sorologia e/ou diretas positivas no início do estudo (Dia-30 e Zero), ausência de resultados positivos no Mês 12 e clinicamente saudáveis no Mês 24. 6 (11,76%) cães foram negativos para as provas dos Dias -30 e Zero apresentando algum resultado positivo sorológico e/ou direto e/ou clínico no Mês 12 e clinicamente saudáveis no Mês 24. Outros 6 (11,76%) animais restantes apresentaram resultados positivos tanto no início do estudo (Dia -30 ou Zero) quanto no Mês 12 e clinicamente saudáveis no Mês 24. Apenas um animal que apresentou-se sintomático foi encontrado ao final do estudo no Mês 24, este apresentava tanto provas sorológicas positivas no início do estudo como no Mês 12.

Comparando-se as Tabelas 18, 20 e 21, dos seis animais que apresentavam sintomas clínicos no Mês 12, dois cães ainda encontravam-se vivos e saudáveis no Mês 24, sendo que um se perdeu e os outros três morreram com LVC. Dos 18 animais que apresentavam exames diretos positivos no Mês 12, nove cães encontravam-se vivos e saudáveis no Mês 24, os outros 9 morreram com LVC. Dos 12 animais que apresentavam sorologia positiva no Mês 12, três

cães encontravam-se vivos e saudáveis no Mês 24, um encontrava-se sintomático, sendo que 6 morreram com LVC e dois foram perdidos. Dos 8 animais que apresentavam exames diretos e sorologia positivos no Mês 12, apenas dois cães encontravam-se vivos e saudáveis no Mês 24, sendo que 6 morreram com LVC.

Dos cinco animais que tiveram resultado positivo ao exame sorológico no Dia Zero sem nenhum outro resultado positivo posteriormente, três estavam vivos saudáveis no Mês 24, sendo um perdido por morte não relacionada à LVC e outro perdido.

Dos cinco animais positivos em prova direta no Mês 12 sem, porém apresentarem resultados positivos prévio ou simultaneamente, três encontravam-se vivos saudáveis no Mês 24 e os dois faltantes morreram com LVC.

Dos quatro animais que tiveram resultados positivos em provas diretas tanto no Dia Zero quanto no Mês 12, três estavam vivos e saudáveis no Mês 12, sendo que o faltante morreu com LVC.

Dos três animais que apresentaram sinais clínicos de LVC no Mês 12 sem ter qualquer resultado laboratorial prévio ou simultâneo positivo, dois estavam vivos e saudáveis no Mês 24, sendo que o faltante foi perdido neste interim.

Um animal, clinicamente saudável, apresentou sorologia positiva nos três momentos avaliados D-30, Zero e Mês 12, com provas diretas também positivas no Dia Zero e Mês 12, continuando vivo e saudável no Mês 24.

Dois cães tiveram prova direta, sorologia e sinais clínicos compatíveis com LVC apenas no Mês 12 e não sobreviveram até o Mês 24, morrendo com LVC.

Dois cães tiveram apenas sorologia positiva no Mês 12 e apenas um estava vivo no Mês 24, sendo que o faltante foi perdido neste meio tempo. Dois cães tiveram sorologia e prova direta positiva no Mês 12 e não sobreviveram até o Mês 24, morrendo com LVC.

Tabela 19. Categorização dos cães do estudo saudáveis no Dia -30 e Zero que morreram ou foram eutanasiados por LVC, conforme resultados de sorologia e exames parasitológicos diretos ao final de 12 meses, em área endêmica para LVC, Tarumã, Campo Grande, MS, Brasil.

Categoria	D-30	Dia Zero		Total
	Sorologia	Sorologia	Direto	
1	-	-	-	8
2	-	-	+	1
3	-	+	-	3
4	+	+	-	1
5	-	+	+	5
6	+	+	+	1
Total				19

Tabela 20. Categorização dos cães do estudo conforme resultados de sorologia, exames parasitológicos diretos e clínicos, saudáveis no Dia -30 e Zero, e vivos ao final do período de 24 meses, em área endêmica para LVC, Tarumã, Campo Grande, MS, Brasil.

Categoria	D-30	Dia Zero		12 Meses		24 Meses		Total
	Sorologia	Sorologia	Direto	Sorologia	Direto	Clínica	Clínica	
1	-	-	-	-	-	-	-	33
2	-	+	-	-	-	-	-	3
3	-	-	+	-	+	-	-	3
4	-	-	-	-	+	-	-	3
5	-	-	-	-	-	+	-	2
6	+	+	+	+	+	-	-	1
7	+	+	-	+	-	-	+	1
8	+	-	+	-	-	-	-	1
9	-	+	-	-	+	-	-	1
10	-	+	+	-	-	-	-	1
11	-	-	+	+	+	-	-	1
12	-	-	-	+	-	-	-	1
Total								51

Legenda: +: exame positivo ou sintomático; -: exame negativo ou assintomático. Sorologia: ELISA FML ou Bio-Manguinhos no Dia -30; ELISA FML ou S7 nos Dias Zero e Mês 12; Direto: PCR ou esfregaço de linfonodo ou medula óssea ou imunoistoquímica de pele;

Tabela 21. Categorização dos cães do estudo que possuíam resultados de sorologia, exames parasitológicos diretos e clínicos, saudáveis no Dia -30 e Zero, e mortos ou perdidos ao final do período de 24 meses, em área endêmica para LVC, Tarumã, Campo Grande, MS, Brasil.

Categoria	D-30	Dia Zero		12 Meses			24 Meses	Total
	Sorologia	Sorologia	Direto	Sorologia	Direto	Clínica [*]		
1	+	+	-	+	+	+	LVC	1
2	+	+	-	+	+	-	LVC	1
3	+	-	-	-	-	-	P	1
4	-	+	-	-	-	-	P e 2MN	3
5	-	-	+	-	+	-	LVC	1
6	-	-	-	+	+	+	LVC	2
7	-	-	-	+	-	-	P	1
8	-	-	-	+	+	-	LVC	2
9	-	-	-	-	+	-	LVC	2
10	-	-	-	-	-	+	MN	1
11	-	-	-	-	-	-	LVC, 2MN e 3P	5
12	-	+	-	-	+	-	MN	1
Total								21

Legenda: ^{*}Inclui animais mortos ou eutanasiados por LVC; +: exame positivo ou sintomático; -: exame negativo ou assintomático. Sorologia: ELISA FML ou Bio-Manguinhos no Dia -30; ELISA FML ou S7 nos Dias Zero e Mês 12; Direto: PCR ou esfregaço de linfonodo ou medula óssea ou imunoistoquímica de pele; LVC: morte atribuída à LVC; P: não mais localizado; MN: morte por causas outras que não LVC;

Na Tabela 22 estão compilados resultados de animais que desenvolveram a forma clínica da LVC indo ou não à óbito por morte natural ou eutanásia. Ilustre-se a data da ocorrência do primeiro diagnóstico laboratorial positivo (indireto por sorologia ou direto por PCR ou esfregaço de medula óssea e/ou linfonodo). Como os animais foram avaliados em intervalos periódicos não foi possível a determinação do momento exato do início dos sintomas, apenas o intervalo de tempo em que as manifestações clínicas apareceram culminando com a sintomatologia clássica no momento da visita ao domicílio do animal. Assim, a data do aparecimento dos sintomas é um intervalo de tempo entre a visita que considerou o cão sintomático e a imediatamente anterior. Calculou-se o período de incubação médio contando-se o número de meses entre o primeiro diagnóstico laboratorial positivo e o intervalo de tempo do aparecimento dos sintomas. Cada animal também teve registrado os demais exames laboratoriais que foram positivos e, quando relevante, informações sobre os achados clínicos também foram descritos na Tabela.

O período de incubação da doença, considerando 26 animais que tinham exames sorológicos e/ou diretos positivos prévios ao início dos sintomas foi de 6,46 meses, havendo animais com período de incubação de 1,5 mês no mínimo e no máximo de 19,5 meses.

Houve animais também que apresentaram sinais clínicos clássicos, sendo classificados como sintomáticos e que em avaliações subseqüentes haviam apresentado melhora clínica, com posterior recidiva como no caso do cão 38637 ou ainda apresentando melhora clínica permanente como o cão 39906. Alguns animais apresentaram um único episódio de resultado laboratorial positivo na sorologia ou no exame direto (PCR) como nos casos do cão 40537, 39733 e 39907, mas todo restante de animais teve pelo menos mais um exame laboratorial positivo, o que aumenta a confiabilidade deste diagnóstico estar correto, identificando a infecção destes pela *Leishmania spp.*

É interessante notar que parte dos animais que apresentaram resultados laboratoriais positivos para infecção por *Leishmania spp.* não apresentaram sintomatologia característica que os permitisse classificá-los como sintomáticos

com LVC ao final do período observacional de 24 meses do estudo. Na Tabela 23 estão listados 18 animais que pertencem a este grupo. Destes 18, nove animais tiveram outras provas diagnósticas positivas, aumentando a confiabilidade do diagnóstico com relação à infecção pelo protozoário. Se estes animais viessem a apresentar sinais clínicos clássicos de LVC, o período de incubação variaria de 12 a 25 meses. Alguns destes animais podem, porém, ter debelado a infecção inicial, especialmente aqueles que tiveram apenas um diagnóstico laboratorial positivo direto (PCR) com resultados posteriores negativos como no caso dos cães com número de registro 39989, 39991, 40495 e 40558, podem ainda ter sido incorretamente diagnosticados por falha no método laboratorial ou na coleta e processamento das mesmas, e podem ainda estar em processo de incubação da doença, atingindo momentaneamente um estado de equilíbrio com o parasita.

Tabela 22. Período de incubação aproximado para aparecimento de sinais clínicos clássicos e/ou eutanásia e/ou morte natural de cães com diagnóstico positivo para a doença em área endêmica para LVC, Tarumã, Campo Grande, MS, Brasil.

Animal	Data Primeiro Resultado Positivo	Método Diagnóstico	Data sintomas LVC em meses (média)	Incubação em meses (média)	Outros Resultados Positivos
38637	-30	Sorologia	3-6 (4,5)	4-7 (5,5)	FML Zero, 12; 9 e 12 NDN e 24 S
40568	-30	Sorologia	6-9 (7,5)	7-10(8,5)	FML Zero, 1,5, 12, 13; PCR Zero, PCR 12; IHQ 12
38675	-30	Sorologia	3-6 (4,5)	4-7 (5,5)	FML Zero, 6,12; ip 3; S7 12; ip 12; IHC 12; PCR 12
39885	-30	Sorologia	1,5 (1,5)	2,5 (2,5)	FML Zero, 1,5; ip Zero; PCR Zero
40719	-30	Sorologia	6-9 (7,5)	7-10 (8,5)	FML 1,5 e 6; PCR Zero
40744	-30	Sorologia	13-24 (18,5)	14-25 (19,5)	FML Zero, 13; ip 3; S7 12; PCR 12
41937	-30	Sorologia	2-3 (2,5)	3-4 (3,5)	FML Zero, 1,5, 6; PCR Zero
36548	Zero	esfregaço	1,5-2 (1,75)	1,5-2 (1,75)	FML Zero; PCR Zero
38220	Zero	PCR	13-24 (18,5)	13-24 (18,5)	PCR 12; ip 12
38813	Zero	Sorologia	3-6 (4,5)	3-6 (4,5)	FML 1,5
39847	Zero	PCR	6-9 (7,5)	6-9 (7,5)	FML Zero, 1,5 e 6
39906	Zero	Sorologia	1,5-2 (1,75)	1,5-2 (1,75)	PCR 12; FML 13; 3 S, 6 e 9 NDN, 12 O, 24 NDN
39907	Zero	Sorologia	12-13 (12,5)	12-13 (12,5)	-
39989	Zero	PCR	0-1,5 (1,75)	0-1,5 (1,75)	FML Zero, 1,5; ip 3
39991	Zero	PCR	2-3 (2,5)	2-3 (2,5)	FML Zero; ip 3
40495	Zero	PCR	2-3 (2,5)	2-3 (2,5)	FML Zero, 1,5; ip 3
40558	Zero	PCR	6-9 (7,5)	6-9 (7,5)	FML 6
40659	Zero	Sorologia	0-1,5 (0,75)	0-1,5 (0,75)	FML 1,5
38804	1,5	Sorologia	3-6 (4,5)	1,5-4,5 (3)	FML 1,5 e 6
39775	1,5	Sorologia	9-12 (10,5)	7,5-10,5 (8,75)	FML 6
40573	1,5	Sorologia	13-24 (18,5)	11,5-22,5 (17)	FML 6
39733	6	Sorologia	6-9 (7,5)	0-3 (1,5)	-
39746	6	Sorologia	6-9 (7,5)	0-3 (1,5)	S7 12; ip 12; PCR 12
39833	6	Sorologia	6-9 (7,5)	0-3 (1,5)	S7 12; ip 12; PCR 12
40569	6	Sorologia	13-24 (18,5)	7-18 (12,5)	FML 6, 12; S7 12; PCR 12
40472	12	Sorologia	9-12 (10,5)	0-3 (1,5)	S7 12; FML 12; ip 12; PCR 12
40537	12	PCR	13-24 (18,5)	1-11 (6)	-
Média		-	8,13	6,46	-

Legenda: FML Zero: sorologia ELISA FML; ip 3: esfregaço de aspirado de linfonodo no Mês 3; PCR Zero e PCR 12: aspirado de medula óssea e/ou linfonodo no dia zero ou aos 12 meses; FML 1,5: sorologia ELISA FML no Mês 1,5; FML 6M: sorologia ELISA FML aos 6 meses; S7 12: sorologia ELISA S7 (Biogene) aos 12 meses; FML 12: sorologia ELISA FML aos 12 meses; IHQ 12: imunoistoquímica de pele de orelha aos 12 meses; ip 12: esfregaço de aspirado de medula óssea aos 12 meses; FML 13: sorologia ELISA FML aos 13 meses; -: nenhum outro resultado positivo; NDN: saudável clinicamente; O: até dois sintomas compatíveis com LVC; S: três ou mais sintomas compatíveis com LVC;

Tabela 23. Animais com diagnóstico laboratorial de infecção por *Leishmania spp.* e ausência de sinais clínicos característicos de LVC e conseqüente período sem manifestação da doença em área endêmica, Tarumã, Campo Grande, MS, Brasil.

Animal	Data Primeiro Resultado Positivo	Método Diagnóstico	Outros Resultados Positivos	Período Sem sintomas (meses)
40620	-30	Sorologia	PCR Zero	25
40578	Zero	PCR	-	24
40471	Zero	PCR	FML Zero	24
39721	Zero	PCR	-	24
39831	Zero	PCR	ip Zero; FML 6, 12; S7 12; PCR 12	24
39800	Zero	PCR	PCR 12	24
40611	Zero	Sorologia	-	24
39992	Zero	Sorologia	-	24
38187	Zero	Sorologia	FML 1,5	24
39923	Zero	Sorologia	FML 6	24
39871	1,5	Sorologia	-	22,5
40563	1,5	Sorologia	PCR 12	22,5
40771	1,5	Sorologia	PCR 12	22,5
39881	1,5	Sorologia	-	22,5
40540	12	Sorologia	-	12
39845	12	PCR	-	12
40778	12	PCR	-	12

Legenda: FML Zero: resultado sorologia ELISA FML após seleção dos animais, no dia zero; ip 3: esfregaço em lâmina de aspirado de linfonodo no Mês 3; PCR Zero: PCR de aspirado de medula óssea e/ou linfonodo no dia zero; FML 1,5: sorologia ELISA FML no Mês 1,5; FML 6M: resultado de sorologia ELISA FML aos 6 meses; S7 12: resultado de sorologia ELISA S7 (Biogene) aos 12 meses; FML 12: resultado de sorologia ELISA FML aos 12 meses; IHQ 12; imunistoquímica de pele de orelha aos 12 meses; PCR 12: PCR de aspirado de medula óssea e/ou linfonodo aos 12 meses; -: nenhum outro resultado positivo; FML 13: resultado de sorologia ELISA FML aos 13 meses;

Com relação aos resultados das análises de imunistoquímica (IHQ) de biópsia de pele saudável, retiradas da face interna da orelha dos animais do estudo, nos momentos Dia Zero e Mês 12, observa-se maioria absoluta de resultados negativos. No momento zero nenhum animal teve amastigotas detectados na pele (0/50), enquanto que no momento Mês 12 apenas dois (2,81%) animais em 71 analisados tiveram resultados positivos, conforme ilustrado na Tabela 24. Na Figura 6 observa-se foto de resultado positivo de imunistoquímica de pele de orelha de cão do estudo.

Tabela 24. Resultados de imunistoquímica de pele de cães de área endêmica para LVC, Tarumã, Campo Grande, MS, Brasil.

	Dia Zero	Mês 12
Positivo	0	2
Negativo	50	69
Total	50	71

Com relação a estes dois animais com resultados positivos à IHQ (animais 38675 e 40568), os mesmos também apresentaram resultados positivos em outros exames.

O animal 38675 foi considerado sintomático no Mês 6, no mês 9 apresentou melhora clínica e no Mês 12 novamente foi classificado como sintomático. Apresentava resultado positivo nas provas sorológicas de ELISA FML nos Dias -30, Zero, Mês 6 e Mês 12, no ELISA S7 no Mês 12 e resultados positivos em provas diretas como esfregaço de linfonodo no Dia +84, esfregaço de medula óssea, PCR de medula óssea e linfonodo no Mês 12, sendo eutanasiado alguns dias após a última visita.

O animal 40568 foi considerado sintomático no Mês 9, apresentando melhora clínica no Mês 12, não sendo classificado como sintomático nas avaliações seguintes nos Meses 13 e 24. Apresentou resultado positivo nas provas sorológicas de ELISA FML nos Dias -30, Zero, Mês 1.5, Mês 6 e Mês 12,

no ELISA S7 no Mês 12 e resultados positivos em provas diretas como PCR de medula óssea no Dia Zero e Mês 12.

Observando-se ainda os outros resultados de provas laboratoriais, ressalta-se que no Dia Zero todos animais negativos ao exame de IHQ apresentavam-se saudáveis, sendo que oito destes apresentaram resultados positivos em outras provas diretas, sendo cinco positivos na prova de PCR de medula óssea, um positivo na prova de PCR de medula óssea e linfonodo, um positivo à prova de esfregaço e PCR de medula óssea e PCR de linfonodo e o último positivo apenas em prova de esfregaço de medula óssea.

Já no Mês 12, foram 14 os animais negativos à prova de IHQ e positivos em outras provas diretas sendo apenas dois considerados sintomáticos: nove animais positivos à prova de PCR de medula óssea (um sintomático), três positivos às provas de PCR e esfregaço de medula óssea e dois positivos às provas de PCR de linfonodo e medula óssea além de esfregaço de medula óssea (um sintomático). Dos 69 animais avaliados no momento M12 e negativos à IHQ, apenas seis foram considerados sintomáticos, sendo dois positivos em outras provas diretas, um que não teve outras provas diretas realizadas e três negativos em outras provas diretas.

DISCUSSÃO

A prevalência de animais reagentes para anticorpos anti-*Leishmania* encontrada na população canina do bairro Tarumã no momento Dia -30, comparando-se a outros dados citados em literatura foi elevada, variando de 30,40% (ELISA Bio-Manguinhos *L.major*-like) a 26,28% (ELISA FML).

Já a prevalência de cães com LVC clínica (sintomáticos) foi de 7,13% (62/870), valor menor que a prevalência de infecção detectada por sorologia (26,28% a 30,40%), sendo que 24,53% (117/477) foram soropositivos na técnica de ELISA Bio-Manguinhos e estavam sem sinais clínicos de LVC, demonstrando a quantidade elevada de cães provavelmente infectados e assintomáticos na área.

Considerando-se separadamente os diferentes momentos do estudo, em que se realizou mais de uma prova diagnóstica, observou-se diferentes resultados de prevalência de infecção: para o Dia -30 em que só foi realizada sorologia a prevalência observada foi de 8,32% (6/72); para o Dia Zero considerando-se apenas a sorologia a prevalência foi de 16,67% (12/72), somente o exame direto foi de 11,11% (8/72) e considerando-se sorologia e exame direto foi de 25% (18/72). Para o Mês 12 considerando-se apenas a sorologia a prevalência também foi de 16,67% (12/72), somente o exame direto foi de 25% (18/72), considerando-se sorologia e exame direto foi de 30,56% (22/72), considerando só a clínica com animais sintomáticos foi de 8,32% (6/72) e considerando-se sorologia, exame direto e clínica foi de 31,94% (23/72).

Tais achados vão de encontro ao já mencionado por outros autores que afirmam que o diagnóstico da enfermidade no cão deve ser feito de forma complementar, entre os achados clínicos, os métodos sorológicos e as provas diretas (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Em áreas endêmicas para a doença, a prevalência da doença clínica em cães geralmente é menor que 10%, sendo menor que a prevalência sorológica que por sua vez é menor que a prevalência de infecção (BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Em Israel, entre 122 cães avaliados encontrou-se 8,2% de prevalência de doença clínica e 11,5% de prevalência à sorologia (BANETH et al., 1998); em Portugal, de 294 cães avaliados, 3,1% apresentavam LVC e 20,4% reagentes à sorologia (CARDOSO et al., 2004); na Croácia, de 306 cães inspecionados, 8,2% apresentavam doença clínica e 15% reatividade às provas sorológicas (ZIVICNJAK et al., 2005); no Marrocos, de 1013 cães avaliados, 0,4% apresentavam LVC e 8,6% reatividade à sorologia (NEJJAR et al., 1998).

Dependendo do método utilizado a prevalência sorológica também pode variar, conforme observado no sul da França onde a prevalência encontrada à RIFI foi de 3%, no *western blotting* chegou à 67% dentro de um grupo de 30 cães aparentemente saudáveis, que também apresentaram 90% de positividade à prova de PCR (BERRAHAL et al., 1996).

No Brasil, Rondon et al. (2008) observaram que de 1381 cães avaliados na cidade de Fortaleza, estado do Ceará, 11% encontravam-se com sinais clínicos e 24% apresentaram-se reagentes à prova de sorologia. Em Montes Claros, Minas Gerais Michalsky et al. (2007) reportaram soroprevalência canina de 4,92%. Em Belo Horizonte, também em Minas Gerais, Alves & Bevilaqua (2004) reportaram 3,64% de sororeagentes à prova de RIFI dentre 415.683 cães avaliados.

Em Jacobina, no interior do estado da Bahia, encontrou-se soroprevalência canina para anticorpos anti-*Leishmania* de 23,9% no ano de 1982 e de 47,5% em 1984 quando também se reportou epidemia humana de LVA (SHERLOCK, 1996). Ainda na Bahia, em Jequié, Paranhos-Silva et al. (1996) encontraram soroprevalência de 23,5% entre a população canina avaliada.

No estado do Mato Grosso, no município de Poxoréo, área endêmica para LVC, encontrou-se entre 1.112 cães avaliados, 7,8% de soroprevalência por meio de detecção de anticorpos anti-*Leishmania* pelo método de RIFI (AZEVEDO et al., 2008).

Em Mato Grosso do Sul, no município de Anastácio, 73 cães foram aleatoriamente avaliados por meio de sorologia com relação à presença de anticorpos IgG anti-*Leishmania* por meio de técnica de RIFI, com 75,3% de reações positivas, sendo que 65% destes tiveram confirmação de infecção por exames diretos (CORTADA et al., 2004). Também no Mato Grosso do Sul, na Serra da Bodoquena, de 97 cães avaliados, 23 (23,7%) dos animais foram reagentes à sorologia com amostras do parasita sendo identificados como *Leishmania infantum chagasi* (NUNES et al., 2001).

Dentro de um grupo de 365 cães, Cabrera et al. (2003) reportaram soroprevalência variando de 25 a 29% dependendo do ponto de corte no título de anticorpos obtidos via RIFI, em área endêmica para a LVC no município de Barra de Guaratiba, estado do Rio de Janeiro.

A Secretaria Estadual da Saúde do estado de São Paulo, no período de 2000 a 2009, avaliou 59.483 amostras de soro canino provenientes de 48 municípios paulistas, com 6.260 amostras positivas (10,52%) (COMITÊ DE LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA DA SECRETARIA DE ESTADO DA

SAÚDE, 2010). Alguns municípios paulistas reportam prevalências caninas de anticorpos anti-*Leishmania* que vão de zero (SAVANI et al., 1999; CUTOLO et al., 2009; TOME et al., 2011) a 12,1% no município de Araçatuba, quando 30.291 cães foram avaliados entre os anos de 1998 e 1999 (CAMARGO-NEVES et al., 2001).

Com relação à infecção canina, estudos mostram diferentes níveis de prevalência no cão, e resultados com valores elevados estão associados a métodos de maior sensibilidade e especificidade como as provas de diagnóstico molecular, incluindo a PCR.

Em cães na ilha de Maiorca, Espanha, encontrou-se 13% de doença clínica, 26% de soroprevalência pelo método de ELISA e 67% de infecção por meio da PCR (SOLANO-GALLEGO et al., 2001). No sul da França, Lachaud et al. (2002) encontraram 26% de doença clínica, 30% de soroprevalência e 83% de infecção canina por meio de PCR. No centro da Grécia, de 73 cães aparentemente saudáveis avaliados por sorologia, 12,3% encontravam-se reagentes e 65,8% positivos à prova de PCR (LEONTIDES et al., 2002). Na Turquia, de um total de 490 cães avaliados por meio de provas sorológicas de RIFI ou de aglutinação direta, 5,3% mostraram-se reagentes a pelo menos um dos métodos, sendo que 85% destes reagentes foram positivos por métodos direto de esfregaço ou PCR de linfonodo (OZBEL et al., 2000).

Com relação às variáveis ambientais avaliadas no momento do início do estudo, por meio de questionário confeccionado por residência de moradia do cão, não houve associação estatística significativa com a ocorrência de casos caninos de leishmaniose visceral no período de 24 meses.

Sendo assim, a ocorrência prévia de casos humanos na casa e no entorno e casos caninos de leishmaniose visceral na casa do proprietário, a existência de outras espécies animais na casa, o hábito intra ou peridomiciliar do cão, o temperamento dócil ou agressivo, a idade e o sexo dos animais do estudo não influenciaram na ocorrência de LVC nestes animais.

Diferentemente do encontrado no bairro Tarumã alvo do estudo, Azevedo et al. (2008) encontraram associação positiva significativa entre a existência de

outros animais no quintal do domicílio como galinhas, na soropositividade dos cães avaliados. Outros autores ressaltam a importância de animais no peridomicílio como as galinhas, por favorecer a criação e manutenção de flebotômíneos no peridomicílio (ALEXANDER et al., 2002).

Dentre as onze raças incluídas no estudo, não houve diferença significativa na ocorrência de LVC quando se comparou os SRD, pinscher, poodle e demais raças menos freqüentes. A raça pitbull, embora com poucos indivíduos na amostra, mostrou-se mais susceptível à LVC que os cães das raças mais abundantes, os de raça SRD, pinscher e poodle ($p < 0,05$).

Abranches et al. (1991) relatam que dentre 1.823 cães avaliados na cidade de Lisboa em Portugal, 166 tiveram exame sorológico reagente à RIFI. Dentre os positivos não houve diferença com relação ao uso dos mesmos para guarda (7,7%), para caça (8,6%) e domiciliados (2,5%). Tampouco houve diferença com relação à prevalência de reagentes no sexo masculino (9,4%) ou feminino (8,5%), o que está de acordo com os dados obtidos neste trabalho.

Cabrera et al. (2003) avaliando uma população de cães em área endêmica para LVC no estado do Rio de Janeiro também não encontraram associação significativa entre o hábito de confinamento do cão, o sexo e infecções por *Leishmania infantum chagasi*. Azevedo et al. (2008) também não encontraram associação entre soropositividade para anticorpos anti-*Leishmania* e o sexo dos animais estudados, fato também mencionado por outros autores (PARANHOS-SILVA et al., 1996; FRANÇA-SILVA et al., 2003). De forma diferente, porém, Dantas-Torres et al. (2006) encontraram maior prevalência de reagentes à sorologia em machos, no estado de Pernambuco e bem como Zivicnjak et al. (2005) em cães aparentemente saudáveis na Croácia.

Com relação à idade, diferentemente do encontrado neste trabalho, Abranches et al. (1991) relataram maior prevalência em jovens adultos de 3 a 6 anos (12,2%) e em cães idosos com mais de 9 anos (14,7%).

Azevedo et al. (2008) avaliando um grupo de cães no município de Poxoréu, Mato Grosso, encontraram maior soroprevalência em cães com mais de

sete anos de idade. De forma semelhante Paranhos-Silva et al. (1996) reportaram maior soroprevalência entre cães da faixa etária dos seis aos sete anos.

Com relação às raças, Abranches et al. (1991) encontraram maior prevalência entre cães das raças pastor alemão e dobermann e atribuem este achado ao fato destas serem preferencialmente de guarda, habitando geralmente abrigos rudimentares em quintais e sítios em áreas rurais e periferias que seriam excelentes ecótopos para os flebotomíneos vetores. No bairro Tarumã, porém não se encontrou associação significativa entre a LVC e hábito preferencial de vida do cão informado pelo proprietário no início do estudo, como peri ou intradomicílio.

Embora com um número reduzido em relação ao total de animais do estudo, a raça pitbull mostrou-se significativamente mais predisposta a apresentar a doença LVC comparativamente ao restante dos animais. De forma semelhante ao mencionado por Abranches et al. (1991), a raça pitbull é utilizada para guarda ficando nos quintais das casas podendo ser mais exposta à picadas infectantes de flebotomíneos. Como além da infecção os animais também apresentaram a doença clínica, a susceptibilidade quanto à LVC merece ser melhor investigada nesta raça.

Foi baixa a quantidade de animais com detecção de formas amastigotas de *Leishmania sp.* em pele saudável da orelha durante os dois momentos de avaliação (Dia Zero e Mês 12).

A prevalência de amastigotas na pele da face interna da orelha, detectada por meio de prova de imunoistoquímica, foi de apenas dois animais positivos no Mês 12, ambos também com resultado positivo na prova de PCR. A ausência de amastigotas na pele pode ser um indicativo de um baixo tropismo do parasita por este tecido nos cães saudáveis ou portadores assintomáticos, indicando uma possível baixa transmissibilidade destas classes de animais.

Embora a confirmação somente é possível por meio de xenodiagnóstico, haveria maior transmissibilidade em função do estado clínico dos cães, que em todos momentos de avaliação (Dia Zero e Mês 12) se apresentavam saudáveis, com exceção feita a dois animais com imunoistoquímica positiva no Mês 12,

sendo que um havia sido classificado como sintomático três meses antes da biópsia de pele e o outro encontrava-se sintomático no momento da coleta.

Vários autores observaram que a quantidade de amastigotas na pele está diretamente relacionada ao estado clínico do animal, sendo que animais assintomáticos podem não apresentar amastigotas na pele enquanto polissintomáticos apresentariam maior parasitismo cutâneo. Outros autores relacionaram o estado clínico com a infecciosidade para os flebotomíneos vetores, sendo que os assintomáticos e oligossintomáticos infectariam menos os flebotomíneos comparados aos animais sintomáticos.

Mychalsky et al. (2007) realizaram xenodiagnóstico em pele interna de orelha de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum chagasi* oriundos do município de Montes Claros, Minas Gerais, e obtiveram taxas de infecção de *Lutzomyia longipalpis* de colônia de laboratório de 5,4%, 5,1% e 28,4% respectivamente para cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, referindo que cães sintomáticos tem quatro vezes mais infectivos para os flebotomíneos que as outras classes de cães.

Verçosa et al. (2008) avaliaram a infectividade de cães sintomáticos e assintomáticos por infectados por *Leishmania* oriundos de Teresina, Piauí, para *Lutzomyia longipalpis* realizando repasto sangüíneo na pele da orelha, obtendo positividade em seis de nove sintomáticos e nenhuma infectividade para cães assintomáticos. Dermatite foi encontrada em todos os animais avaliados por técnicas histopatológicas com maior intensidade em cães sintomáticos, a maior carga parasitária esteve presente na pele da orelha e das unhas de cães sintomáticos, enquanto que em cães assintomáticos não se encontraram formas amastigotas nos diferentes fragmentos de pele de diferentes partes do corpo.

Resultados semelhantes foram obtidos por Solano-Gallego et al. (2004) que avaliaram a presença e carga parasitária de amastigotas de *Leishmania sp.* em pele saudável do focinho de cães sintomáticos e assintomáticos, positivos à prova de PCR em amostra de pele. Neste estudo os autores avaliaram por meio de técnicas de histopatologia convencional e também por imunoistoquímica o grau de inflamação da pele, constatando a presença de amastigotas e lesões

microscópicas apenas nos animais sintomáticos, questionando assim o papel epidemiológico dos cães assintomáticos na transmissão do agente etiológico da LVC, o que não aconteceria para os animais sintomáticos com abundância de parasitas na pele saudável.

De forma semelhante, Sherlock (1996) afirma que a evolução da doença de assintomática para sintomática no cão infectado com *Leishmania infantum chagasi* aumentaria o parasitismo cutâneo, facilitando a infecção do vetor. O mesmo autor obteve 29% de infecção em *Lutzomyia longipalpis* que realizaram repasto em cães infectados comparado a apenas 15% de infecção quando do xenodiagnóstico no ser humano infectado.

Travi et al. (2001) realizaram xenodiagnóstico em cães infectados assintomáticos sem nenhuma infecção (0 de 5), em oligossintomáticos dois de sete infectaram *Lutzomyia longipalpis* com baixa taxa (0,9 a 5,2% das fêmeas ingurgitadas) e dentre os polissintomáticos quatro de oito de cães infectaram o vetor com alta taxa de infecção (5,0 a 22,5% das fêmeas ingurgitadas. Os autores ainda observaram que a pele da orelha foi mais infectiva que a pele do abdômen.

Por outro lado alguns autores afirmam que a parasitose cutânea e infectividade para o flebotomíneo também são importantes em animais assintomáticos, oligossintomáticos ou se a picada é realizada em pele sadia do hospedeiro.

Molina et al. (1994) obtiveram taxa de infecção de *Phlebotomus perniciosus* entre 32 a 92% sem diferença significativa na infectividade de cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Travi et al. (2001) apresentaram a hipótese de que *P. perniciosus* se infectaria com uma quantidade menor de parasitas que *Lutzomyia longipalpis*, o que a tornaria espécie vetora mais competente, esta com taxa máxima de infecção de 25,5%

Abranches et al. (1991) encontraram 20% (11/55) de resultados positivos em exames parasitológicos de pele saudável e 36,4% (12/33) em úlceras cutâneas de animais positivos à sorologia.

Em avaliação semelhante, Vexenat et al. (1994) encontraram 60% (55/92) de positividade em esfregaço de pele lesada corada por Giemsa, de cães

sintomáticos para LVC causada por *Leishmania infantum chagasi*. Animais soropositivos, mas assintomáticos, tiveram cerca de 30% (18/57) de positividade para amastigotas em esfregaço de pele de orelha. Os mesmos autores realizaram xenodiagnóstico com *Lutzomyia longipalpis* em cães naturalmente infectados em Teresina, Piauí, e notaram que os flebotomíneos que realizavam repasto sanguíneo em pele lesada se infectavam mais facilmente (35%) que aqueles que sugavam a pele sadia (6%).

Por outro lado, Tafuri et al. (2001) relatam um caso de cão naturalmente infectado em João Pessoa, no estado da Paraíba, com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* apresentando intensa reação inflamatória e abundância de amastigotas em fígado e baço, além de vasculite generalizada, porém com ausência de amastigotas na pele, mostrando que mesmo em casos de doença clínica típica e em estágio avançado pode não haver correspondência em relação a carga parasitária presente na pele.

No cão existe variação na resposta imune do animal infectado. A imunidade protetora é mediada por células T CD4, com liberação de γ -interferon, IL-2, e TNF α que induz a atividade macrófagica anti-*Leishmania*. Já a susceptibilidade à doença clínica está relacionada à marcante produção de anticorpos não protetores e à uma redução ou depressão da imunidade celular com uma mistura de respostas de citocinas Th1 e Th2 (BANETH et al., 2008), dessa maneira as apresentações clínicas podem variar de uma dermatite papular simples associada à imunidade celular específica e baixa resposta humoral até à doença severa caracterizada por lesão renal com glomerulonefrite por deposição de imunocomplexos associados à produção massiva de anticorpos não protetores (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Segundo Solano-Gallego et al. (2009) os cães de áreas endêmicas apresentam-se saudáveis ou com LVC clínica, estes apresentando sorologia com títulos elevados de anticorpos, baixa resposta celular e PCR positivo. Dos saudáveis, parte está não infectada apresentando sorologia negativa, nenhuma resposta celular e PCR negativo, outra parte está infectada, havendo cães com resistência ao aparecimento de sintomas apresentando sorologia variando de

negativa a títulos médios de anticorpos, alta resposta celular e PCR que pode ser positivo ou negativo, e cães que provavelmente irão desenvolver a doença clínica apresentando títulos elevados de anticorpos, baixa resposta imune celular e PCR positivo.

Não se sabe ao certo quais mecanismos são responsáveis pela resistência ou susceptibilidade ao aparecimento dos sintomas na LVC, nem como fatores tais como idade, sexo, nutrição, genética do hospedeiro, coinfeções ou doenças concomitantes, condições imunossupressoras, citocinas, carga parasitária, virulência da cepa infectante de *Leishmania*, infecções prévias e o método de transmissão poderiam afetar a evolução clínica da infecção canina.

Neste estudo determinou-se o período médio de incubação da doença clínica a partir da detecção da infecção por qualquer método diagnóstico e posterior constatação que o animal apresentava-se sintomático ou polissintomático (apresentando três sintomas ou mais) por meio de inspeção clínica periódica em média a cada três meses. Não se considerou para tanto os animais oligossintomáticos a menos que estes viessem a se tornar sintomáticos típicos.

O período de incubação médio encontrado no bairro Tarumã, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul no período avaliado foi de 6,43 meses. Tal dado vem de encontro com o encontrado por Oliva et al. (2006) que avaliou um grupo de 43 cães beagle naturalmente infectados por *Leishmania infantum* na Itália, mantidos restritos em canil particular, obtendo 7 meses de período médio de incubação.

Ressalta-se o fato de que alguns animais com diagnóstico positivo de infecção no início do estudo, tiveram tal infecção confirmada no Mês 12 e mantiveram-se vivos e saudáveis até a última inspeção clínica no Mês 24. Oliva et al. (2006) relatam a ocorrência de cães infectados que mantiveram-se assintomáticos por períodos de até 21 meses, sendo que alguns destes animais chegaram a apresentar provas diagnósticas negativas em período intermediário, mas ao final apresentaram a doença clínica.

Neste trabalho todas ações a campo foram acompanhadas em paralelo pelo corpo técnico do CCZ de Campo Grande. Além disso, avaliações independentes de sorologia e esfregaços de punção de linfonodos dos animais do

bairro, inseridos no estudo ou não, eram conduzidas pelo CCZ a qualquer momento e no caso do encontro de animais infectados estes eram retirados. A prova sorológica conduzida pelo CCZ era a oficial recomendada pelo Ministério da Saúde (MS), os Kits de ELISA e RIFI de Bio-Manguinhos. As provas sorológicas realizadas neste estudo eram de ELISA FML e S7, com resultados que nem sempre coincidiam com os resultados obtidos pelo CCZ.

É importante ressaltar também que ao final do Mês 12 do estudo, todos cães do bairro, inclusive os do estudo longitudinal, foram avaliados por sorologia pelo CCZ e, sendo não reagentes, receberam coleira de Deltametrina a 4%, procedimento que se manteve e foi observado até o final do Mês 24, quando se realizou a última inspeção clínica nos cães.

A remoção de animais soropositivos na prova oficial realizada pelo CCZ e a colocação em massa de coleiras inseticidas/repelentes nos animais pode ter influenciado no número destes que foram observados ao final de estudo no Mês 24.

Estudos longitudinais com acompanhamento de cães expostos à infecção por *Leishmania* são raros na literatura. O elevado custo e o aspecto laborioso de acompanhamento periódico desestimula a realização deste tipo de trabalho por longo tempo.

O fato da enfermidade ser de notificação compulsória e o diagnóstico de animais infectados desencadear ações que levam à eutanásia dos mesmos é um entrave ainda maior. Desta maneira acredita-se que as informações obtidas durante os 24 meses de acompanhamento desta coorte de cães são de considerável relevância para o melhor conhecimento da epidemiologia da LVC, na área endêmica estudada, podendo auxiliar ações de controle no local e também em demais territórios do país.



Figura 1: Cão sintomático com dermatite descamativa, rarefação pilosa, conjuntivite



Figura 2: Cão sintomático apresentando dermatite, úlcera em pina, rarefação pilosa



Figura 3: Onicogribose em cão sintomático



Figura 4: Úlcera de pele em cão infectado

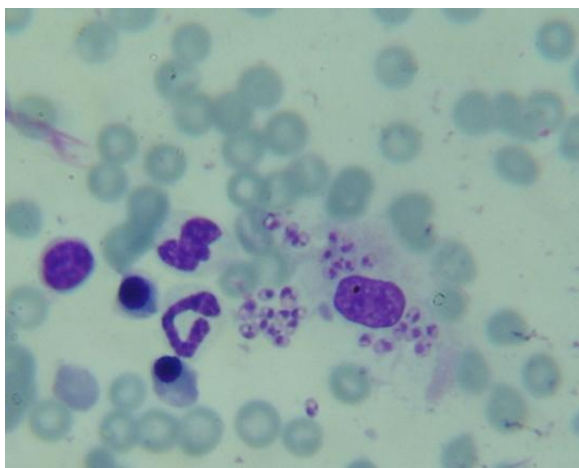


Figura 5: Fotomicrografia de exame citológico de medula óssea apresentando formas amastigotas de *Leishmania* spp. AO 100x

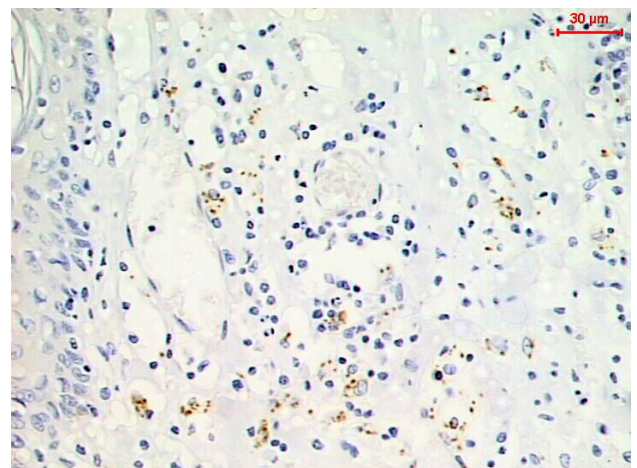


Figura 6: Fotomicrografia de tecido de pele, avaliado por imunohistoquímica apresentando formas amastigotas de *Leishmania* spp. coradas AO 40x

COMENTÁRIOS FINAIS

A incidência das leishmanioses tegumentar (LTA) e visceral americanas (LVA) em hospedeiros caninos e humanos encontra-se em crescente expansão no Brasil. A LTA é endêmica em todo território brasileiro, com ocorrência de casos esporádicos e/ou ocasionais epidemias em todos estados da nação. Por ser de natureza silvestre ou peridoméstica, associada à reservatórios silvestres, e de natureza benigna na maioria dos casos, seu controle é menos problemático uma vez que tem o foco principal no tratamento e cura do paciente humano.

A LVA, enfermidade potencialmente fatal, é emergente no Brasil em especial nos estados de Mato Grosso do Sul (MS) e São Paulo (SP). No MS, com exceção de Corumbá e Ladário com autoctonia de casos já na década de 1980, a doença se espalhou velozmente no sentido oeste-leste com ocorrência de epidemias em grandes centros urbanos como Campo Grande e Três Lagoas nos idos dos anos 2000. De forma semelhante observa-se expansão no sentido oeste-leste da enfermidade em SP, com início em Araçatuba com primeiro caso humano autóctone registrado em 1999 e posteriormente em demais municípios vizinhos com ocorrência de casos humanos em Bauru no ano de 2002.

Acredita-se que tal expansão esteja ligada à migração de populações humanas que carregariam consigo cães infectados com a *Leishmania infantum chagasi*. A associação com alterações do ambiente como a construção do gasoduto Brasil – Bolívia é cogitada. A facilidade e a velocidade dos transportes de pessoas e mercadorias entre áreas distantes na atualidade é realidade. Uma vez que existam populações de vetores competentes, a introdução de cães infectados propicia o estabelecimento do agente etiológico em determinada área, com ocorrência de epidemia perante populações susceptíveis de hospedeiros, com tendência ao permanecimento na forma de endemia. Uma vez introduzido o agente etiológico em uma área receptiva, a erradicação da doença se faz praticamente impossível.

Mas estariam as populações de vetores também migrando por grandes distâncias ? Tal pergunta ainda continua sem resposta definitiva. Sabe-se da

pouca capacidade de dispersão dos flebotomíneos, que em sua maioria é inferior à 100 metros. A capacidade de dispersão das larvas terrícolas altamente ativas, fato que dificulta o encontro dos criadouros naturais destes insetos, é desconhecida, mas provavelmente também é curta. Existem hipóteses de que o vetor migraria por etapas, com novas gerações se estabelecendo em locais cada vez mais distantes do local original de criação dos progenitores. A migração passiva tanto de adultos (no interior de móveis, de veículos) e de larvas (em vasos de plantas, no lixo, esterco ou matéria orgânica transportada) também é possível mas ainda não foi provada, fato este capaz de explicar a introdução de *Lutzomyia longipalpis* em novas áreas tão distantes umas das outras (por exemplo Araçatuba e Bauru).

Lutzomyia longipalpis é conhecida do estado de São Paulo desde a década de 1970 nos trabalhos realizados por Forattini em áreas rurais como Pirapora do Bom Jesus e Cássia dos Coqueiros (FORATTINI et al., 1970). Foi encontrada em Espírito Santo do Pinhal e Socorro nos idos de 1990 e registrada em área urbana por primeira vez na cidade de Araçatuba em 1997 (COSTA et al., 1997).

Em Campo Grande *Lutzomyia longipalpis* só foi descrita em 2001, embora tenha sido coletada já no ano de 1999. A existência do vetor, mesmo que em áreas rurais, bem anterior à ocorrência de casos humanos levanta dúvidas quanto à existência antes não percebida do mesmo, supondo falhas nos levantamentos entomológicos realizados previamente. Em coletas realizadas em área rural dos municípios de Itirapina, Ipeúna e Analândia, Cutolo et al. (2009) encontraram *Lutzomyia longipalpis* associada à áreas de mata preservada e afloramentos rochosos arenítico basálticos. Cutolo et al. (2008) reportam o encontro desta espécie em Itirapina no ano de 2006, alertando sobre a receptividade da área para o estabelecimento do agente etiológico da LVA, fato ocorrido no município vizinho de São Pedro em 2008, hoje com transmissão canina da doença.

Estariam as mudanças climáticas globais, como o aquecimento da temperatura, influenciando na dispersão e colonização de novas áreas pelo vetor ? Trabalhos realizados na cidade de Campo Grande antes (OLIVEIRA et al., 2003) e posteriormente à ocorrência de casos humanos de LVA (OLIVEIRA et al., 2006)

mostra que entre o período de 1999-2000 e o de 2004-2005 foi observado um aumento de 60 vezes na densidade de *Lutzomyia longipalpis*. Levando-se em conta que a variação na abundância destes insetos está ligada diretamente à umidade dos micro-*habitat* que ocupam, que é influenciada pelas condições macroclimáticas como secas e períodos de chuva prolongados e assim dificultando comparações pois não são homogêneas de ano para ano, tal aumento de densidade ainda sim é extremamente relevante.

Vários autores mencionam o fato de que *Lutzomyia longipalpis* trata-se de um complexo de espécies incluindo várias outras sem diferenças morfológicas, exceto por *Lutzomyia cruzi* passível de diferenciação pelo sexo masculino, suspeita de vetorial *L. infantum chagasi* na região de Corumbá, MS. Existem diferenças quanto aos tipos de feromônios produzidos por cada espécie, além da emissão de sons copulatórios diferenciados que propiciaria isolamento reprodutivo entre as mesmas. No estado de São Paulo tal diferença já foi observada por pesquisas realizadas pelo grupo do Dr. Casanova, diferenciando populações de áreas de transmissão de *L. infantum chagasi* que produzem o feromônio 9 metilgermacreno B, oriundas de Araçatuba, Dracena, Promissão e Bauru, e outra população de Espírito Santo do Pinhal e São Pedro produtoras do feromônio Cembreno 1 (CASANOVA et al., 2011).

O Ministério da Saúde por meio do Programa Nacional de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (BRASIL, 2006) preconiza a condução de ações integradas com relação à identificação e tratamento precoce dos casos humanos, o combate ao vetor, a eutanásia de cães infectados e a realização de atividades de educação para a saúde. O crescimento do número de casos e a expansão territorial da doença mostra, porém a ineficácia do programa, conforme reconhecido pelo próprio Ministério da Saúde.

O estabelecimento da LVA e o óbito de humanos em áreas que eram indenes para a doença em período por vezes inferior a dez anos mostra a importância da realização de atividades de Vigilância Epidemiológica. Tais atividades devem ocorrer preventivamente ao aparecimento de casos caninos e humanos com a condução de inquéritos entomológicos ao nível municipal. É

necessário também a vigilância canina, com realização de inquéritos sorológicos periódicos nesta espécie e conscientização da classe médica veterinária com relação à identificação de animais suspeitos, especialmente em municípios receptivos onde *Lutzomyia longipalpis* já foi identificada.

Não existe hoje qualquer controle ou fiscalização com relação ao transporte de cães entre municípios de um mesmo estado. No transporte interestadual é obrigatório que o proprietário do cão viaje com laudo médico veterinário atestando a saúde do animal. Tal procedimento é falho pois não existe fiscalização adequada nos postos de divisa entre os estados, além de muitos animais infectados por *L. infantum chagasi* estarem totalmente assintomáticos no momento do exame clínico. Caso houvesse uma fiscalização adequada por parte das autoridades sanitárias, a posse de resultado de exame sorológico negativo auxiliaria na contenção da dispersão da doença, embora este teste também não detecte 100% dos casos de infecção.

A ocorrência da LVA na maioria dos estados brasileiros, incluindo o Rio Grande do Sul, mostra a facilidade de dispersão da doença. Uma alternativa possível porém trabalhosa quanto à sua introdução em áreas indenes seria associar a vigilância da LVA aos Programas de Saúde da Família implantados com auxílio do governo federal em muitos municípios brasileiros. Tal programa permite que agentes de saúde oriundos do bairro visitem periodicamente famílias do local. Tais famílias são cadastradas junto à uma Unidade Básica de Saúde (UBS) da área e em caso de problemas de saúde contam com acesso à profissionais como médicos, dentistas e enfermeiros. O conhecimento detalhado das famílias pode envolver também os animais de estimação que possuem. Uma vez que estes animais estejam cadastrados é possível uma monitoração ao longo do tempo com relação a diferentes zoonoses, inclusive da LVA. A chegada de novas famílias ao bairro pode então ser facilmente identificada e, no caso de serem provenientes de áreas endêmicas para a LVA e trazerem consigo cães, uma pronta inspeção dos animais por médico veterinário ligado à UBS ou ao Serviço de Controle de Zoonoses do município pode auxiliar no bloqueio à introdução de *L. infantum chagasi*.

As leishmanioses são enfermidades de difícil controle. O fato de ser endêmica em países ricos e desenvolvidos como a Europa mediterrânea ilustra tal argumento. Nestes países porém a ocorrência de casos humanos é rara, estando em sua maioria associados à hospedeiros imunodeprimidos. Existem divergências quanto a origem da *Leishmania infantum* que ocorre no Brasil, havendo autores que acreditam na introdução da mesma nas Américas junto com os colonizadores europeus nos séculos passados e outros que acreditam ser uma subespécie nativa do continente americano. O fato, porém das características e susceptibilidade da doença clínica em cães serem semelhantes tanto no Velho Mundo como no Neotrópico, leva a crer que a diferença na ocorrência dos casos de doença humana estejam ligadas à condições que não a virulência do agente etiológico, e sim às condições sócio-econômicas das populações em geral, residentes nestas diferentes áreas.

Portanto, para controle e vigilância da LVA e de várias outras endemias ainda presentes em território brasileiro, é necessário além da integração das várias ações específicas já mencionadas e preconizadas pelo Ministério da Saúde, a melhora nas condições de vida da população brasileira, em especial daquelas mais pobres (ALVAR et al., 2006), com provimento de condições que permitam acesso à moradia, alimentação, educação e à uma rede de atendimento em saúde eficiente e de qualidade.

CONCLUSÕES

1. Encontrou-se prevalência sorológica elevada para anticorpos anti-*Leishmania* na população canina na área, prévio ao início do estudo, variando de 30,40%(145/477) no ELISA Bio-Manguinhos (*L.major*-like) a 26,28% (97/369) no ELISA FML conforme o método sorológico empregado, porém não houve diferença significativa do ponto de vista estatístico, quando os dois métodos foram comparados ($p = 0,4891$). A caracterização da área como endêmica de alta prevalência permitiu a escolha da mesma como local ideal para o estudo longitudinal.

2. A prevalência de cães com LVC clínica (sintomáticos) foi de 7,13% (62/870), valor menor que a prevalência de infecção detectada por sorologia (26,28% a 30,40%), sendo que 24,53% (117/477) foram soropositivos na técnica de ELISA Bio-Manguinhos e estavam sem sinais clínicos compatíveis com LVC, demonstrando a quantidade elevada de cães infectados assintomáticos na área.

3. Não houve associação estatística significativa entre diferentes variáveis ambientais avaliadas no início do estudo e a ocorrência de casos caninos de leishmaniose visceral no período de 24 meses. Sendo assim, a ocorrência prévia de casos humanos na casa e no entorno e casos caninos de leishmaniose visceral na casa do proprietário, a existência de outras espécies animais na casa, o hábito intra ou peridomiciliar do cão, o temperamento dócil ou agressivo, a idade e o sexo dos animais do estudo não influenciaram na ocorrência de LVC nestes animais.

4. Dentre as onze raças incluídas no estudo, não houve diferença significativa na ocorrência de LVC quando se comparou os SRD, pinscher, poodle e demais raças menos freqüentes. A raça pitbull, embora com poucos indivíduos na amostra, mostrou-se mais susceptível à LVC que os cães das raças mais abundantes, os de raça SRD, pinscher e poodle ($p < 0,005$). Tais resultados merecem confirmação em estudo semelhante com maior quantidade de cães da raça pitbull.

5. O diagnóstico da infecção por *Leishmania infantum chagasi* é complexo e deve ser realizado de forma complementar entre os achados clínicos, os métodos sorológicos e as provas diretas. Os métodos diagnósticos utilizados de forma isolada são menos sensíveis e mais sujeitos a erros, sendo ideal a associação dos mesmos para uma maior precisão como observado nos diferentes resultados de prevalência de infecção obtidos em diferentes momentos de avaliação: para o Dia -30 em que só foi realizada sorologia a prevalência observada foi de 8,32% (6/72); para o Dia Zero considerando-se apenas a sorologia a prevalência foi de 16,67% (12/72), somente o exame direto foi de 11,11% (8/72) e considerando-se sorologia

e exame direto foi de 25% (18/72). Para o Mês 12 considerando-se apenas a sorologia a prevalência também foi de 16,67% (12/72), somente o exame direto foi de 25% (18/72), considerando-se sorologia e exame direto foi de 30,56% (22/72), considerando só a clínica com animais sintomáticos foi de 8,32% (6/72) e considerando-se sorologia, exame direto e clínica foi de 31,94% (23/72).

6. A incidência de novas infecções detectada pelos métodos sorológicos foi de 11,76% (8/68) entre o Dia -30 e o Dia Zero, repetindo-se o mesmo valor para o período do Dia Zero ao Mês 12. Para os métodos diretos a incidência de novas infecções para o período do Dia Zero ao Mês 12 foi de 18,18% (12/66).

7. A mortalidade natural e induzida via eutanásia de animais doentes e/ou infectados foi de 28,57% (30/105) para o período de 24 meses.

8. O período de incubação médio aproximado, observado nos cães, desde o momento do primeiro diagnóstico laboratorial (indireto ou direto) até o aparecimento desintomasclássicos de LVC foi em média de 6,46 meses, variando de no mínimo 1,5 ao máximo de 19,5 meses em média.

9. Alguns animais considerados infectados por apresentarem resultados positivos em prova diagnóstica direta de PCR e/ou prova indireta de sorologia no início do estudo não apresentaram novos resultados positivos após 12 meses, inclusive à prova de PCR, indicando uma possível cura ou não estabelecimento inicial da infecção.

10. Observou-se que alguns poucos animais permanecem com infecção assintomática por período de 24 meses, como acontecido com os cães 39800 que apresentou PCR positivo no Dia Zero e no Mês 12 e o cão 39831 que apresentou PCR e esfregaço positivo no Dia Zero, sorologia positiva nos Meses 6 e 12 e PCR positiva no Mês 12, estando todos estes clinicamente saudáveis no Mês 24 de avaliação.

11. A prevalência de amastigotas na pele da face interna da orelha, detectada por meio de prova de imunistoquímica, foi baixa com apenas dois animais positivos no Mês 12, ambos com resultado positivo também na prova de PCR e sintomáticos em algum momento do estudo. A ausência de amastigotas em cães portadores assintomáticos indica que os mesmos podem não ter papel importante na transmissão de parasitas ao flebotomíneo vetor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.M.; SANTOS-GOMES, G.M.; JANZ, J.G. Canine Leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J. Parasitol.**, v. 77, p.557-561, 1991.

ACHA, P.; SZYFRES, B. *Visceral Leishmaniasis*. In: *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals*. **PAHO**, Washington, USA, 3rd Edition, Vol 3, 2003, p. 86-95.

ALEXANDER, B., CARVALHO, R.L., McCALLUM H., PEREIRA, M.H. Role of domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Em. Inf. Dis.**, v.8, p.1480-1485, 2002.

ALVAR, J., YACTAYO, S., BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol.**, v.22, p.552-557, 2006.

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

ANDRADE FILHO, J.D., BRAZIL, R.P. Relationships of new world phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) based on fossil evidence. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.98 (Suppl.I), p.145-149, 2003.

ANTONIALI, S.A.C.; TORRES, T.G.; PARANHOS FILHO, A.C.; TOLEZANO, J.E. Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. **J. Inf.**, v.54, p.509-514, 2006.

ASHFORD, D.A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M.C.; LOPES, U.; SAMPAIO, D.P.; BADARÓ, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dogs control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p.53-57, 1998.

AZEVEDO, M.A.A., DIAS, A.K.K, PAULA, H.B., PERRI, S.H.V., NUNES, C.M. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréo, estado do Mato Grosso, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.17, p.123-127, 2008.

BANETH, G., DANK, G., KEREN-KORNBLATT, E., SEKELES, E., ADINI, I., EISENBERGER, C.L., SCHNUR, L.F., KING, R., JAFFE, C.L. Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.59, p.722-725, 1998.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.**, v.24, n.7, pp. 324-330, 2008.

BECK, A.M., MEYERS, N.M. Health enhancement and companion animal ownership. **An. Rev. Public Health**, v.17, p.427-257, 1996.

BERRAHAL, F., MARY, C., ROZE, M., BERENGER, A., ESCOFFIER, K., LAMOUREUX, D., DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.55, p.273-277, 1996.

BRAGA, R.R., LAINSON, R., ISHIKAWA, E.A.Y., SHAW, J.J. *Leishmania (Viannia) utingensis* n.sp., a parasite from the sandfly *Lutzomyia (Viannamyia) tuberculata* in Amazonian Brazil. **Parasite J. Soc. Franç. Parasitol.**, v.10, p.111-18, 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília. Editora do Ministério da Saúde. 2006. 120p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília. 2ª Ed. Editora do Ministério da Saúde. 2007. 180p.

CABRERA, G.P.B.; SILVA, V.O.; COSTA, R.T.; REIS, A.B.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; PALATNIK-DE-SOUZA, C.B. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.61, n.2, p.296-301, 1999.

CABRERA, G.P.B., CORREIA PONTES, N.N., SILVA, V.O., PARAGUAI DE SOUZA, E., SANTOS, W.R., GOMES, E.M, LUZ, K.G., PALATNIK, M., PALATNIK DE SOUSA, C.B. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in na endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v.20, p.3277-3284, 2002.

CABRERA, M.A.A., PAULA, A.A., CAMACHO, L.A.B., MARZOCHI, M.C.A., XAVIER, S.C., SILVA, A.V.M., JANSEN, A.M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.45, p.79-83, 2003.

CAMARGO-NEVES, V.L., KATZ, G., RODAS, L.A.C., POLETTO, D.W., LAGE, L.C., SPÍNOLA, R.M.F., CRUZ, O.G. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cad. Saúde Pública**, v.17, p.1263-1267, 2001.

CÂNDIDO, T.C., PERRI, S.H.V., GERSZOSCHIKWITZ, T.O., LUVIZOTTO, M.C.R., LIMA, V.M.F. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. **Vet. Parasitol.**, v.157, p.175-181, 2008.

CASANOVA, C., HAMILTON, J.G.C., COLLA-JACQUES, F.E., BRAZIL, R.P., SHAW, J.J. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* populations by sex pheromone analysis in São Paulo State, Brazil. *In*. **ISOPS 7 International Symposium on Phlebotomine Sand flies**. p.130-131, 2011.

CARDOSO, L., RODRIGUES, M., SANTOS, H., SCHOONE, G.J., CARRETA, P., VAREJAO, E., van BENTHEM, B., AFONSO, M.O., ALVES-PIRES, C., SEMIÃO-SANTOS, S.J., RODRIGUES, J., SCHALLIG, H.D. Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijo (Alto Douro, Portugal). **Vet. Parasitol.**, v.121, p.21-32, 2004.

COLOMBO FA, ODORIZZI RM, LAURENTI MD, GALATI EA, CANAVEZ F, PEREIRA-CHIOCCOLA VL. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitol. Res.** 2011, *in press*.

COMITÊ DE LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA DA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, atualizado em maio de 2010. **BEPA**, v.7, p.21-40, 2010.

CORTADA, V.M.C.L., DOVAL, M.E.C., SOUZA LIMA, M.A.A., OSHIRO, E.T., MENESES, C.R.V., ABREU-SILVA, A.L., CUPOLILLO, E., SOUZA, C.S.F., CARDOSO, F.O., ZAVERUCHA DO VALLE, T., BRAZIL, R.P., CALABRESE, K.S.,

GONÇALVES DA COSTA, S.C. Canine visceral leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Vet. Res. Comm.**, v.28, p.365-374, 2004.

COSTA, A. I. P., CASANOVA, C., RODAS; L. A. C., GALATI, E. A. B. Galati. 1997. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v.31, p.632-633, 1997.

COSTA, C.H.N. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.34, p.223-228, 2001.

COSTA, C.H.N., TAPETY, C.M.M., WERNECK, G.L. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.40, p.415-419, 2007.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M.; SHAW, J.J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p.1314-1320, 2002.

COUTINHO, M.T.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R.T.; BOTELHO, J.R.; De MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v.128, p.149-155, 2005.

COUTINHO, M.T.Z., LINARDI, P.M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Vet. Parasitol.**, v.147, p.320-325, 2007.

CUTOLO, A.A.; CAMARGO, D.A.; CUTOLO, A.A.; VON ZUBEN, C.J.; GALATI, E.A.B. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) em Cuesta Basáltica na bacia

hidrográfica do Rio Corumbataí, Região Centro-leste do Estado de São Paulo. **Rev. Bras. Epid.**, v.11, p.336-339, 2008.

CUTOLO A.A., TRONCARELLI M.Z., MACHADO J.G., LUVIZOTTO M.C.R., VON ZUBEN C.J., LANGONI H., GIORGIO S. Vigilância epidemiológica das leishmanioses no município de Monte Mor, estado de São Paulo, Brasil. **Vet. Zootec.**, v.16: 634-641, 2009.

CUTOLO, A.A., CAMARGO, D.A., VON ZUBEN, C.J. Novos Registros de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae) na Região Centro-leste, do estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol.**, v. 18, p.65-69, 2009.

DANTAS-TORRES, F., BRANDÃO FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and controle. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.48, p.151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F., BRITO, M.E.F., BRANDÃO-FILHO, S.P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from a urban area of Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.140, p.54-60, 2006.

DESJEAUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**, v.27, p.30-318, 2004.

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, AL.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v.25, p.240-242, 1997.

FRANÇA-SILVA, J.C., COSTA, R.T., SIQUEIRA, A.M., MACHADO-COELHO, G.L.L., COSTA, C.A., MAYRINK, W., VIEIRA, E.P., COSTA, J.S., GENNARO, O.,

NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.111, p.161-173, 2003.

FRANCINO, O., ALTET, L., SÁNCHEZ-ROBERT, E., RODRIGUEZ, A., SOLANO-GALLEGO, L., ALBEROLA, J., FERRER, L., A. SÁNCHEZ, ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v.137, p.214-221, 2006.

FORATTINI, O.P., RABELLO, E.X., PATTOLI, D.G.B. Sobre o encontro de *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912) no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 4, p. 99-100, 1970.

FURLAN, M.B.G. Epidemia de leishmaniose visceral no município de Campo Grande, MS, 2002 a 2006. **Epid. Serv. Saúde.**, v.19, n.1, p.15-24, 2010.

GOMES AH, FERREIRA IM, LIMA ML, CUNHA EA, GARCIA AS, ARAÚJO MF et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. **Vet Parasitol.**, v.144, p.234-241, 2007. *Erratum in: Vet. Parasitol.*, v.149, p.298, 2007.

GRAPHPAD PROGRAM – Programa Graphpad
<http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency2.cfm>, 2002-2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Cidades*. Acessado em: www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1 em 15 de janeiro de 2011.

JENSEN, P. The behavioural biology of dogs. CAB International, Oxfordshire, UK, 2007. 277p.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Med. Vet. Entomol.** v.4, p.1-24, 1990.

LACHAUD, L., CHABBERT, E., DUBESSAY, P., DEREURE, J., LAMOTHE, J., DEDET, J.P., BASTIEN, P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, v.125, p.197-2002, 2002.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.77, p.569-596, 1983.

LAINSON, R., SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: W. Peters, R. Killick-Kendrick (eds) **The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Volume I, Biology and Epidemiology**. London: Academic Press Inc., 1987. p.1-120.

LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J.J.; MACDONALD, D.W.; COURTENAY, O.; SOUZA, A.A.A.; SILVEIRA, F.T. Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the Fox *Cerdocyon thous* (Linn) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.85, p.135-137, 1990.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. Ecologia das leishmanioses: *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil. In. E. F. Rangel & R. Lainson R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 311-336.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, p. 811-827, 2005.

LANGONI, H.; LUCHEIS, S.B.; DA SILVA, R.C.; CASTRO, A.P.B.; PAES, A.C. American Visceral Leishmaniasis: a case report. **J. Ven. Animals Toxins include. Trop. Dis.**, v.11, p.361-372, 2005.

LEONTIDES, L.S., SARIDOMICHELAKYS, M.N., BILLINIS, C., KONTOS, V., KOUTINAS, A.F., GALATOS, A.D., MYLONAKIS, M.E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Vet. Parasitol.**, v.109, p.19-27, 2002.

LEWIS, D.J. The biology of phlebotomidae in relation to leishmaniasis. **Ann. Rev. Entomol.**, v.2, p.363-384, 1974.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.82, p.566-567, 1988.

MICHALSKY, E.M., ROCHA, M.F., LIMA, A.C.V.M.R., FRANÇA-SILVA, J.C., PIRES, M.Q., OLIVEIRA, F.S., PACHECO, R.S., SANTOS, S.L., BARATA, R.A., ROMANHA, A.J., FORTES-DIAS, C.L., DIAS, E.S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sandflies. **Vet. Parasitol.**, v.147, p.67-76, 2007.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitol.**, v.24, p.371-377, 2008.

MOLINA, R., AMELA, C., NIETO, J., SAN-ANDRES, M., GONZALES, F., CASTILLO, J.A., LUCIENTES, J., ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.88, p.491-3, 1994.

MOMEN, H., GRIMALDI Jr., G, DEANE, L.M. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American Visceral Leishmaniasis (AVL)? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.82, p.447-8, 1987.

MONTEIRO, S.G.; STAINKI, D.R.; DALMOLIN, F.; BRACCINI, E.T.; FILHO, S.T.L.P.; GAIRA, M.S.; MELLO, F.P.S.; QUARESMA, P.F.; GONTIJO, C.M.F. Detecção de *Leishmania infantum* em cão no município de Uruguaiana, RS: uma contribuição para a discussão das leishmanioses na região sul do Brasil. **Vet. Zootec.**, v.17, p.497-501, 2010.

MONTOYA-LERMA, J.; CADENA, H.; OVIEDO, M.; READY, P.D.; BARAZARTE, R.; TRAVI, B.L.; LANE, R.P. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. **Acta Trop.**, v.85, p.19-29, 2003.

MOREIRA, M.A.; LUVIZOTTO, M.C.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.; LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet. Parasitol.**, v.145, p.245-252, 2007.

NEJJAR, R., LEMRANI, M., MALKI, A., IBRAHIMY S., AMAROUCH, H., BENSLIMANE, A. Canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum* MOM-1 in northern Morocco. **Parasite**, v.5, p.325-330, 1998.

NICOLAS, L., PRINA, E., LANG, T., MILON, G. Real-time PCR for detection and quantification of *Leishmania* in mouse tissues. **J. Clin. Microb.**, v.40, p.1666-1669, 2002.

NUNES, V.L.B., GALATI, E.A.B., NUNES, D.B., ZINEZZI, R.O., SAVANI, E.S.M.M., ISHIKAWA, E., CAMARGO, M.C.G.O.C., D'ÁURIA, S.R.N.,

CRISTALDO, G., ROCHA, H.C. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.34, p.301-302, 2001.

NUNES, C.M.; LIMA, V.M.F.; PAULA, H.B.; PERRI, S.H.V.; ANDRADE, A.M.; DIAS, F.E.F.; BURATTINI, M.N. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.153, p. 19-23, 2008.

NUNES, C.M.; PIRES, M.M.; SILVA, K.M.; ASSIS, F.D.; GONÇALVES FILHO, J.; PERRI, S.H.V. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Vet. Parasitol.**, doi: 10.1016/j.vetpar.2010.01.044, 2010.

OLIVA, G., SCALONE, A., MANZILLO, V.F., GRAMICCIA, M., PAGANO, A., DI MUCCIO, T., GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p.1318-1322, 2006.

OLIVEIRA, A.G., ANDRADE FILHO, J.D., FALCÃO, A.L., BRAZIL, R.P. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Cad. Saúde Públ.**, v.19, p.933-944, 2003.

OLIVEIRA, A.G., GALATI, E.A.B., OLIVEIRA, O., OLIVEIRA, G.R., ESPÍNDOLA, I.A.C., DORVAL, M.E.C., BRAZIL, R.P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, p.869-874, 2006.

OWENS, S.D.; OAKLEY, D.A.; MARRYOTT, K.; HATCHETT, W.; WALTON, R.; NOLAN, T.J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English Foxhounds to anemic dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 219, p.1076-1083, 2001.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L.A.R., SANTOS, W.C., GRIMALDI Jr, G., CARVALHO, L.P., OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.55, p.39-44, 1996.

PARANHOS SILVA, M.; NASCIMENTO, E.G.; MELRO, M.C.B.F.; OLIVEIRA, G.G.S.; SANTOS, W.L.C.; PONTES DE CARVALHO, L.; OLIVEIRA DOS SANTOS, A.J. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in na endemic área for American visceral leishmaniasis implication for the disease control. **Acta Trop.**, v.69, p.75-83, 1998.

PORROZZI, R.; COSTA, M.V.S.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.D.; FERNANDES, A.P.; GAZZINELLI, R.T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI JR., G. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clin. Vaccine Immunol.**, v.14, n.5, p.544-548, 2007.

RANGEL, E.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 177-183.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection diagnosis of *Leishmania*. **Exp. Parasitol.**, v.71, p. 267-275, 1990.

RONDON, F.C., BEVILAQUA, C.M., FRANKE, C.R., BARROS, R.S., OLIVEIRA, F.R., ALCANTARA, A.C., DINIZ, A.T. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.91, p.970-972, 2008.

ROSYPAL, A.C.; TROY, G.C.; ZAJAC, A.M.; FRANK, G.; LINDSAY, D.S. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **J. Parasitol.**, v. 91, p.970-972, 2005.

SACKS, D.; KAMHAWY, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Rev. Microbiol.**, v.55, p. 453-483, 2001.

SÁLOMON, O.D., SINAGRA, A., NEVOT, M.C., BARBERIAN, G., PAULIN, P., ESTEVEZ, J.O., RIARTE, A., ESTEVEZ, J. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.103, p.109-111, 2008.

SALOMÓN, O.D.; QUINTANA, M.G.; BEZZI, G.; MORÁN, M.L.; BETBEDER, E.; VALDÉZ, D.V. *Lutzomyia migonei* as a putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. **Acta Trop.**, v.113, p.84-87, 2010.

SANTIAGO, M.E.B.; VASCONCELOS, R.O.; FATTORI, K.R.; MUNARI, D.P.; MICHELIN, A.F.; LIMA, V.M.F. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Vet. Parasitol.**, v. 150, p. 283-290, 2007.

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. **Med. Vet. Entomol.**, v.12, p. 315-317, 1998.

SAVANI, E. S. M. M., GALATI, E. A. B., CAMARGO, M. C. G. O., D'AURIA, S. R. N., DAMACENO, J. T., BALDUINO, S. A. Inquérito sorológico sobre leishmaniose

tegumentar americana em cães errantes no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saude Pub.**, v.33, p.629-31, 1999.

SAVANI, E.S.M.M.; CAMARGO, M.C.G.O.; CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; SANTOS, M.G.; D'AURIA, SHAW J.J.; FLOETER-WINTER, L.M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.120, p.229-233, 2004.

SAVANI, E.S.M.M.; ALMEIDA, M.F.; CAMARGO, M.C.G.O.; D'AURIA, S.R.N.; SILVA, M.M.S.; OLIVEIRA, M.L.; SACRAMENTO, D. Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. **Vet. Parasitol.**, v.168, p.5-10, 2010.

SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.89, p.471-478, 1994.

SHAW, J.J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American Visceral Leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, n.5, p.577-579, 2006.

SHAW, J.J. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, p.541-547, 2007.

SHAW, S.E., LANGTON, D.A., HILLMAN, T.J. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? **Vet. Parasitol.**, v.163, p.281-285, 2009.

SHERLOCK, I. Ecological interactions of Visceral Leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.91, p.671-683, 1996.

SHIMABUKURO, P.H.F., GALATI, E.A.B. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotrop.**, v.11, p.1-20, 2011.

SILVA, F.L., OLIVEIRA, R.G., SILVA, T.M.A., XAVIER, M.N., NASCIMENTO, E.F., SANTOS, R.L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 160, p.55-59, 2009.

SILVA, S.M.; RIBEIRO, V.M.; RIBEIRO, R.R.; TAFURI, W.L.; MELO, M.N.; MICHALIK, M.S. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 166, p.159-162, 2009.

SILVA, S.M.; RABELO, P.F.B.; GONTIJO, N.F.; RIBEIRO, R.R.; MELO, M.N.; RIBEIRO, V.M.; MICHALIK, M.S.M. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.174, p.150-154, 2010.

SILVEIRA, F.T., ISHIKAWA, E.A.Y., SOUZA, A.A.A., LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belem, Para State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n.sp. – A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite J. Soc. Franç. Parasitol.**, v.9, p.43-50, 2002.

SINAN. Secretaria de Vigilância à Saúde. Ministério da Saúde. www.saude.gov.br. Acesso em 15 de abril de 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Thei ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet. Parasitol.**, v.90, p.37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L., MORELL, P., ARBOIX, M., ALBEROLA, J., FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J. Clin. Microb.**, v.39, p.560-563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L., FERNÁNDEZ-BELLON, H., MORELL, P., FONDEVILLA, D., ALBEROLA, J., RAMIS, A., FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **J. Comp. Path.**, v.130, p.7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v.165, p.1-18, 2009.

SOUZA, G.D., 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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, p.1181-1182, 2009.

SOUZA, N.P., ALMEIDA, A.B.P.F., FREITAS, T.P.T., PAZ, R.C.R., DUTRA, V., NAKAZATO, L., SOUSA, V.R.F. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no estado de Mato Grosso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.43, p.333-335, 2010.

TAFURI, W.L., OLIVEIRA, M.R., MELO, M.N., TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.96, p.203-212, 2001.

TOME, R.O., GAIO, F.C., GENEROSO, D., MENOZZI, B.D., LANGONI, H. Active surveillance of canine visceral leishmaniasis and American trypanosomiasis in rural dogs from non endemic area. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.20, p.63-66, 2011.

TRAVI, B.L.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONÇALVES, A.; VELEZ, I.D. *Didelphis marsupialis*, na important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.50, p. 557-565, 1994.

TRAVI, B.L., TABARES, C.J., CADENA, H., FERRO, C., OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.64, p.119-124, 2001.

TRAVI, B.L.; FERRO, C.; CADENA, H.; MONTOYA-LERMA, J.; ADLER, G.H. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. **Res. Vet. Science**, v.72, p.83-86, 2002.

TRAVI, B.L.; LANE, R.P. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. **Acta Trop.**, v.85, p.19-29, 2003.

VERÇOSA, B., MELO, C., MENDONÇA, I., SILVA, S., CARVALHO, S., GOTO, H., COSTA, F. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitismo f symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Vet. Res.**, v.4, <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/4/45>, 2008.

VEXENAT JA, FONSECA DE CASTRO JA, CAVALCANTE R, TAVARES JP, SILVA MRB, BATISTA WH, FURTADO CAMPOS JH, HOWARD MK, FRAME IL, MCNERNEY R, WILSON S, MILES M.A. Visceral leishmaniasis in Teresina, state

of Piauí, Brazil: preliminary observations on the detection and transmissibility of canine and sandfly infections. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.89, p.131-135, 1994.

WHO, World Health Organization. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em 20 de julho de 2011.

ZIVICNIJAK, T., MARTINKOVIC, F., MARINCULIC, A., MRLJAK, V., KUCER, N., MATIJATKO, V., MIHALJEVIC, Z., BARIC-RAFAJ, R. A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. **Vet. Parasitol.**, v.131, p.35-43, 2005.

YOU DEN, W.J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, v.3, p.32-25, 1950.

APÊNDICE

Identificação numérica, nome, sexo, raça, hábito domiciliar, conhecimento do proprietário com relação a casos prévios caninos na casa e casos humanos na residência ou em casas vizinhas, existência de outras espécies animais na casa, idade, classificação etária e endereço dos 105 cães do estudo conforme situação no Dia Zero, em área endêmica para LVC, Tarumã, Campo Grande, MS, Brasil.

Reg CCZ	Número Microchip	Nome	Sexo	Raça	Temperamento	Hábito domiciliar	Outro cão com LVC na casa?	Pessoa na casa/vizinhos com LVA ?	Outras espécies animais na casa	Idade	Mês/Ano	Faixa Etária	Rua	Nº
39881	255617	Gotinha	m	SRD	Dócil	Intra	Não	Não	Não	10	a	Idoso	Abaeté	108
40478	245163	Menina	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Sim	A	3	a	Adulto	Abaeté	208
41937	211660	Guri	m	pinscher	Dócil	n/c	n/c	n/c	n/c	8	a	Idoso	Acaiá	52
38631	240131	Jade	f	SRD	Dócil	Peri	Sim	Não	C e G	adulta	-	Adulto	Acaiá	254
39932	175584	Max	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	Não	1	a	Jovem	Acaiá	611
38804	233859	Pingo	m	pitbull	Dócil	Peri	Não	n/c	C	4	m	Jovem	Acaiá	714
38879	214200	Neguinho	m	SRD	Dócil	Intra	Não	Não	Não	1,5	a	Jovem	Acaiá	753
40718	213533	Capitu	f	pinscher	Agressiva	Peri	Não	Não	C	6	a	Adulto	Acaiá	765
40461	208681	Chiquinha	f	pinscher	Dócil	Peri	Não	Não	C	10	a	Idoso	Acaiá	865
38888	203313	Kiko	m	pinscher	Dócil	Intra	Não	Não	C	6	a	Adulto	Acaiá	865
40460	237061	Pirulito	m	pinscher	Dócil	Peri	Não	Não	C	2,6	a	Adulto	Acaiá	865
40573	193038	Neguinha	f	SRD	Dócil	Intra	Não	Não	C	4	a	Adulto	Acaiá	1001
39956	168703	Fadinha	f	pinscher	Dócil	Peri	Não	Não	G e A	2	a	Adulto	Acaiá	1051
36548	195447	Pink	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C e A	2,6	a	Adulto	Acaiá	1076
39887	236161	Cravo	m	pinscher	Dócil	Intra	Sim	Não	Não	2	a	Adulto	Acaiá	1139
39885	196802	Shakira	f	PA	Agressiva	Intra	Não	Não	G	10	a	Idoso	Acaiá	1163
39866	241271	Tininha	f	SRD	Agressiva	Peri	Não	Não	C	8	a	Idoso	Acaiá	1315
39848	244413	Pirinoso	m	SRD	Agressiva	Peri	Não	Não	C	6	a	Adulto	Acaiá	1340

Reg CCZ	Número Microchip	Nome	Sexo	Raça	Temperamento	Hábito domiciliar	Outro cao com LVC na casa?	Pessoa na casa/ vizinhos com LVC ?	Outras espécies animais na casa	Idade	Mês/Ano	Faixa Etária	Rua	Nº
38872	176667	Natasha	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C	1	a	Jovem	Acaíá	877
40005	208269	Bidu	m	SRD	Agressiva	Peri	Não	Não	G	4	a	Adulto	Acuã	258
39906	201552	Pirulito	m	SRD	Agressiva	Peri	Não	Não	C	5	a	Adulto	Ademir Bertoni	55
39907	235701	Tina	f	SRD	Agressiva	Peri	Não	Não	C	6	a	Adulto	Ademir Bertoni	55
40754	240217	Talia	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C	9	a	Idoso	Aguará	84
40719	171124	Belo	m	SRD	Agressiva	Peri	Não	Não	Não	8	a	Idoso	Aguará	309
39899	226505	Xuxa	f	pinscher	Dócil	Intra	Não	Não	C	1	a	Jovem	Antonio L. Freitas	445
39871	191525	Xuxinha	m	SRD	Dócil	Intra	Não	Não	C e G	2	a	Adulto	Antonio L. Freitas	658
40010	170494	Belinha	f	SRD	Agressiva	Peri	Não	Não	Não	2	a	Adulto	Araí	324
39801	168798	Bolinha	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C	3	a	Adulto	Araí	481
39800	209996	Neguinha	f	pinscher	Dócil	Peri	Não	Não	C	8	a	Idoso	Araí	481
39699	228787	Sol	f	pequines	Dócil	Peri	Suspeito	Não	C	11	m	Jovem	Coqueirinho	195
40570	200066	Lessie	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	Não	10	m	Jovem	Coqueirinho	261
40569	211219	Bob	m	SRD	Agressiva	Peri	Não	Não	C e A	7	a	Idoso	Coqueirinho	273
40568	228158	Costelinha	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C e G	7	a	Idoso	Coqueirinho	273
40578	236373	Cindy	f	pinscher	Dócil	Peri	Não	Não	C	4	a	Adulto	Coqueirinho	286
40495	237363	Tiquinho	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	G	5	a	Adulto	Coqueirinho	309
38810	169729	Jade	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	Não	5	a	Adulto	Coqueirinho	185/195
40683	214681	Sarita	f	poodle	Dócil	Peri	Não	Não	Não	10	a	Idoso	Coxilhas	161
40673	189971	Tony	m	SRD	Dócil	Peri	sim	Não	C e A	3	a	Adulto	Coxilhas	246
40512	195892	Bequinha	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C	3	a	Adulto	Coxilhas	368
38217	234117	Lupe	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	A	3	a	Adulto	Coxilhas	425
38220	240973	Leão	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Sim	G e C	2	a	Adulto	Coxilhas	530
40567	203871	Bambi	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C e A	8	a	Idoso	Delamare	20

Reg CCZ	Número Microchip	Nome	Sexo	Raça	Temperamento	Hábito domiciliar	Outro cao com LVC na casa?	Pessoa na casa/ vizinhos com LVC ?	Outras espécies animais na casa	Idade	Mês/Ano	Faixa Etária	Rua	Nº
40472	205232	Tarzan	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C e A	2	a	Adulto	Delamare	20
40744	207196	Meg	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C	1	a	Jovem	Delamare	117
38884	171399	Nico	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C	12	a	Idoso	Delamare	206
40470	243496	Molly	f	pinscher	Dócil	Peri	Não	Não	C	4	a	Adulto	Delamare	253
40471	199318	Safira	f	teckel	Dócil	Peri	Não	Não	C	7	m	Jovem	Delamare	253
40494	189096	Pantera	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	G	1	a	Adulto	Delamare	348
40620	188582	Poof	m	pinscher	Dócil	Peri	Não	Não	A	3	a	Adulto	Delamare	519
39861	221509	Tinoco	m	SRD	Dócil	Peri	sim	Não	C	4	m	Jovem	Delamare	628
40659	196579	Bonus	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C e G	9	a	Idoso	Delamare	817
39709	203185	Cindy	f	pinscher	Dócil	Intra	Não	Não	C e G	1	a	Jovem	Delamare	817
39718	201856	Melissa	f	SRD	Agressiva	Peri	Não	Não	A	1	a	Jovem	Fanorte	209
38859	232316	Lulu	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	G	6	a	Adulto	Florão	170
39833	225347	Dick	m	fox paulistinha	Dócil	Peri	Não	Não	C	4	a	Adulto	Florão	576
39721	204535	Ralf	m	SRD	Agressiva	Peri	sim	Não	G	8	a	Idoso	Florão	751
38813	210159	Lessie	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	Não	2	a	Adulto	Florão	1056
39847	191670	Tutuca	f	SRD	Agressiva	Peri	sim	Não	G e A	1	a	Jovem	Florão	1272
40020	176802	Dolly	f	poodle	Dócil	Peri	Não	Sim	C	1	a	Jovem	Flórida	333
40611	241142	Belinha	f	pinscher	Dócil	Peri	Não	Não	Não	1,5	a	Jovem	Flórida	436
39841	236848	Pandora	f	poodle	Dócil	Peri	Não	Não	G	3	a	Adulto	Franca	49
39746	195010	Brad	m	pitbull	Dócil	Peri	Não	Não	Não	1	a	Jovem	Franca	62
39845	173248	Pitoca	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	Não	3	a	Adulto	Franca	149
39992	201423	Hany	f	poodle	Dócil	Peri	Não	Não	C	7	a	Idoso	Guajá	258
39991	213776	Neguinha	f	pinscher	Dócil	Peri	Não	Não	C	n/c	n/c	Adulto	Guajá	258
39733	170277	Rex	m	pitbull	Dócil	Peri	sim	Não	Não	1	a	Jovem	Igapó	178

Reg CCZ	Número Microchip	Nome	Sexo	Raça	Temperamento	Hábito domiciliar	Outro cao com LVC na casa?	Pessoa na casa/ vizinhos com LVC ?	Outras espécies animais na casa	Idade	Mês/Ano	Faixa Etária	Rua	Nº
38169	247030	Chaolin	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	Não	5	a	Adulto	Igapó	325
38643	176085	Pandora	f	SRD	Agressiva	Peri	Não	Não	C e G	2	a	Adulto	Ijuí	175
38637	225390	Lili	f	poodle	Agressiva	Peri	Não	Não	C e G	10	a	Idoso	Ijuí	199
38634	244931	Tuti	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C	1,6	a	Jovem	Ijuí	290
38181	190983	Neguinha	f	SRD	Dócil	Peri	sim	Não	C	5	a	Adulto	Ijuí	335
38222	226851	Tatinha	f	SRD	Dócil	n/c	n/c	n/c	n/c	5	a	Adulto	Itabaiana	100
39942	189720	Tiquinha	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	G	2	a	Adulto	Itabaiana	139
36774	228018	Piky	f	SRD	Dócil	Intra	Não	Não	C e outros	5	a	Adulto	Itaoca	107
39735	172781	Priscila	f	poodle	Dócil	Peri	Não	Não	A	6	a	Adulto	Itaoca	159
39743	201181	Neguinho	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	Não	4	a	Adulto	Itaoca	195
40778	230717	Neguinha	f	SRD	Agressiva	Peri	Não	Não	A	4	a	Adulto	Itaoca	307
36539	203443	Shira	f	SRD	Dócil	Peri	sim	Não	A	6	a	Adulto	Itaoca	476
39826	225283	Toy	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	Não	2,7	a	Adulto	Juquiá	84
40486	203042	Bebê	f	pinscher	Dócil	Peri	Não	Não	Não	7	a	Idoso	Juquiá	396
39775	216248	Princesa	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	Não	5	a	Adulto	Juquiá	443
39831	175555	Estrelinha	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Sim	C	2	a	Adulto	Juquiá	523
39920	205754	Lilica	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C e A	2	a	Adulto	Marechal Deodoro	7460
40537	240863	Kamala	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C	5	a	Adulto	Maristela	277
39760	209625	Kiko	m	cocker	Dócil	Peri	sim	Não	C	6	m	Jovem	Modelo	66
40558	206198	Marrom	f	SRD	Agressiva	Peri	sim	Não	C	6	a	Adulto	Modelo	326
40563	242764	Joinha	f	teckel	Dócil	Peri	Não	Não	Não	4	a	Adulto	Modelo	349
40540	198661	Bolinha	f	SRD	Agressiva	Peri	Não	Não	A	5	a	Adulto	Nova Europa	381
40598	215748	Neguinho	m	poodle	Dócil					2	a	Adulto	Nova Europa	399
39819	211178	Neguinho	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	Não	10	m	Jovem	Nova Europa	466
37396	196148	Lola	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Sim	C, G, A	4	a	Adulto	Pamir	314

Reg CCZ	Número Microchip	Nome	Sexo	Raça	Temperamento	Hábito domiciliar	Outro cao com LVC na casa?	Pessoa na casa/ vizinhos com LVC ?	Outras espécies animais na casa	Idade	Mês/Ano	Faixa Etária	Rua	Nº
40013	241649	Pedrinho	m	SRD	Dócil	Peri	sim	Não	C	6	m	Jovem	Pampas	141
39999	217119	Bidu	m	pinscher	Agressiva	Peri	sim	Não	C e G	4	a	Adulto	Pampas	181
40012	188678	Rambinho	m	poodle	Dócil	Peri	sim	Sim	C	3	a	Adulto	Pampas	275
38187	241701	Guri	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C	7	a	Idoso	Santa Malvina	275
38838	212723	Raissa	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C	2	a	Adulto	Sertaneja	92
38675	211507	Lassie	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C	2	a	Adulto	Sertaneja	228
41960	167579	Urso	m	pequinês	Dócil	Peri	Não	Não	Não	9	a	Idoso	Taiamã	313
40686	215704	Duda	f	boxer	Agressiva	Peri	Não	Não	C	5	a	Adulto	Teixeira de Freitas	118
39923	199059	Miúcha	f	weimaraner	Dócil	Peri	Não	Não	Não	3	a	Adulto	Teixeira de Freitas	276
39996	227308	Tamy	f	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C	5	a	Adulto	Teixeira de Freitas	290
39989	223042	Maylon	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C	6	a	Adulto	Tiquiri	402
40548	239514	Pluto	m	SRD	Dócil	Peri	Não	Não	C,G,A	4	a	Adulto	Verdes Mares	27
40771	194266	Pingo	m	SRD	Agressiva	Peri	Não	Não	A	1	a	Jovem	Verdes Mares	149
40528	196528	Menina	f	pinscher	Dócil	Peri	Não	Não	Não	1	a	Jovem	Verdes Mares	334

Legenda: Cor cinza: animais que morreram de LVC no período de 24 meses; m: macho; f: fêmea; SRD: sem raça definida; PA: pastor alemão; Peri: peridomicílio; Intra: intradomicílio; C: cão; G: gato; A: aves; m: mês ou meses; a: ano(s); n/c: não coletada; LVC: leishmaniose visceral canina; LVA: leishmaniose visceral americana. Jovem: menor que 2 anos de idade; Adulto: de 2 até 6 anos de idade; Idoso: mais que 6 anos de idade;

Resultados dos exames de sorologia Bio-Manguinhos, FML e S7, imunistoquímica, esfregaço de aspirado de medula óssea, PCR de aspirados de linfonodo e medula óssea e avaliações clínicas em diferentes momentos dos 105 cães do estudo, durante os 24 meses de acompanhamento em área endêmica para LVC, Tarumã, Campo Grande, MS, Brasil.

CCZ No	FML D-30	Bio D-30	FML D0	S7 D0	IHQ D0	ip MO D0	PCR D0 LN	PCR D0 MO	CI 3M	FML 6M	CI 6M	CI 9M	S7 12M	FML 12M	ip MO 12M	IHQ 12M	CI 12M	PCR MO 12M	PCR LN 12M	CI 24M
39881	N	N	N	N	N	-	N	-	NDN	N	O	NDN	-	N	-	-	NDN	-	-	NDN
40478	N	N	N	N	N	-	N	N	NDN	-	O	O	-	N/C	N	N	NDN	N	N	NDN
41937	N	P	P	-	N	-	N	P	S	P	S(+)	Pe(+)					Pe(+)			Pe(+)
38631	N	N	N	-	N	N	N	N	O	N	NDN	M(O)					M(O)			M(NR)
39932	N	N	N	-	-	-	N	N	M(NR)		M(NR)	M(NR)					M(NR)			M(NR)
38804	N	N	N	-	N	N	-	N	O	P	S	E(+)					E(+)			E(+)
38879	N	N	N	N	N	N	-	N	S	N	S	E(S)					E(S)			E(S)
40718	N	N	N	N	N	-	N	-	O	N	NDN	O	N	N	N	N	O	N	N	NDN
40461	N	N	N	-	-	-	N	N	O	N	O	O	N	N	N	N	NDN	N	N	O
38888	N	N	N	-	-	-	N	N	O	N	NDN	NDN	N	N	N	N	NDN	N	N	NDN
40460	N	N	N	-	-	-	N	N	O	-	O	O	N	N	N	N	O	N	N	M(NR)
40573	N	N	N	-	N	N	N	N	O	P	NDN	NDN	N	N	I	N	O(-)	N	N	E(S)
39956	N	ND	N	N	N	-	N	-	O	N	O	O	P	N	N	-	O	N	N	Pe
36548	N	N	P	-	-	P	N	P	E(+)		E(+)	E(+)					E(+)			E(+)
39887	N	N	N	N	N	I	N	N	E(+)		E(+)	E(+)					E(+)			E(+)
39885	P	N	P	-	N	P	N	N	M(+)		M(+)	M(+)					M(+)			M(+)
39866	P	N	P	N	-	N	N	N	O		M(NR)	M(NR)					M(NR)			M(NR)
39848	N	N	N	N	N	N	N	N	NDN	N	NDN	O	N	N	N	N	O	N	N	Pe
38872	N	-	-	-	N	N	-	N	M(NR)		M(NR)	M(NR)					M(NR)			M(NR)
40005	N	N	N	N	-	-	N	N	O	N	O	NDN	N	N	N	N	NDN	N	N	O
39906	N	ND	P	P	-	-	N	N	S	N	NDN	NDN	N	N	N	N	O(+)	P	N	NDN
39907	N	ND	N	P	-	-	N	N	O	N	O	O	N	N	N	N	O	N	N	M(NR)
40754	N	ND	-	-	-	-	N	N	O	N	NDN	O	-	-	N	N	NDN(-)	N	N	M(S)

CCZ No	FML D-30	Bio D-30	FML D0	S7 D0	IHQ D0	ip MO D0	PCR D0 LN	PCR D0 MO	CI 3M	FML 6M	CI 6M	CI 9M	S7 12M	FML 12M	ip MO 12M	IHQ 12M	CI 12M	PCR MO 12M	PCR LN 12M	CI 24M
40719	P	N	N	ND	-	-	-	P	O	P	O(+)	M(+)					M(S)			M(S)
39899	N	N	N	-	-	N	-	N	NDN	N	NDN	NDN	N	N	N	N	NDN	N	N	NDN
39871	N	N	N	N	N	N	-	N	NDN	N	NDN	NDN	N	N	N	N	NDN	N	N	NDN
40010	N	P	N	N	N	-	N	N	NDN	N	NDN	NDN	N	N	I	N	NDN	N	N	Pe
39801	N	N	N	N	N	-	N	N	NDN	N	NDN	O	N	N	N	N	NDN	N	N	O
39800	N	N	N	N	N	-	P	N	O	N	NDN(+)	O(+)	N	N/C	I	N	NDN(+)	P	N	NDN
39699	N	N	N	-	N	N	-	N	Pe		Pe	Pe					Pe			Pe
40570	N	N	N	-	-	-	N	N	O	N	NDN	O	N	N	I	N	NDN	N	N	NDN
40569	N	N	N	N	-	-	N	N	NDN	P	O	NDN	P	N	P	N	NDN(+)	P	N	M(+)
40568	P	N	P	-	-	-	N	P	NDN	P	NDN(+)	S(+)	P	P	-	P	NDN(+)	P	N	O
40578	N	N	N	-	-	-	N	P	NDN	N	NDN(+)	O(+)	-	N/C	N	N	NDN(-)	N	N	NDN
40495	N	N	P	-	-	-	P	-	E(+)		E(+)	E(+)					E(+)			E(+)
38810	N	N	P	N	-	N	-	N	E(+)		E(+)	E(+)					E(+)			E(+)
40683	N	N	N	N	-	-	N	N	M(NR)		M(NR)	M(NR)					M(NR)			M(NR)
40673	N	N	N	N	-	-	N	N	O		E(+)	E(+)					E(+)			E(+)
40512	N	N	N	-	N	-	N	N	O	N	O	NDN	N	N/C	N	N	O	N	N	NDN
38217	N	N	-	-	N	-	N	N	O	N	NDN	O	N	N	N	N	O	N	N	NDN
38220	N	N	N	N	-	-	N	P	NDN	N	NDN(+)	NDN(+)	N	N	P	N	NDN(+)	P	N	M(+)
40567	N	N	N	-	-	-	N	N	O	N	NDN	O	N	N	N	N	NDN	N	N	NDN
40472	N	N	N	-	-	-	N	N	O	N	NDN	NDN	P	N	-	N	S (-)	N	N	NDN
40744	P	N	P	-	-	-	N	N	NDN	N	NDN(+)	O(+)	P	N	N	N	O(+)	P	N	M(+)
38884	N	N	N	-	-	N	-	N	O	N	NDN	NDN	N	N	-	N	NDN	N	N	NDN
40470	N	N	N	-	-	-	N	N	NDN	N	NDN	NDN	-	N/C	N	N	NDN	N	N	NDN
40471	N	N	P	-	-	-	N	P	NDN	N	NDN(+)	O(+)	N	N	-	N	NDN(-)	N	N	NDN
40494	N	N	P	-	-	-	N	N	O		Pe	Pe					Pe			Pe
40620	P	N	N	-	-	-	N	P	O	N	O(+)	NDN(+)	-	N	N	N	O(-)	N	N	NDN
39861	N	N	N	N	N	N	N	N	O	N	NDN	O	N	N	N	N	NDN	N	N	Pe
40659	N	N	P	-	-	-	N	N	M(S)		M(S)	M(S)					M(S)			M(S)
39709	N	N	N	N	-	-	N	N	NDN	N	NDN	NDN	N	N	N	N	NDN	N	N	NDN
39718	N	N	N	N	N	N	N	N	E(S)		E(S)	E(S)					E(S)			E(S)

CCZ No	FML D-30	Bio D-30	FML D0	S7 D0	IHQ D0	ip MO D0	PCR D0 LN	PCR D0 MO	CI 3M	FML 6M	CI 6M	CI 9M	S7 12M	FML 12M	ip MO 12M	IHQ 12M	CI 12M	PCR MO 12M	PCR LN 12M	CI 24M
38859	N	N	N	-	N	N	-	N	NDN	N	NDN(-)	NDN(-)	N	N	N	N	NDN(-)	N	N	O
39833	N	N	N	N	N	-	-	N	NDN	P	NDN	S	P	N	P	N	NDN(+)	P	P	M(+)
39721	N	N	N	N	-	N	N	P	O	N	NDN(+)	NDN(+)	N	N	N	N	NDN(-)	N	N	O
38813	N	N	P	N	-	-	N	N	O	E(S)		E(S)	E(S)				E(S)			
39847	N	N	P	-	-	-	P	N	NDN	P	NDN(+)	S(+)	E(+)				E(+)			
40020	N	N	N	-	-	-	N	N	O	N	O	M(NR)					M(NR)			M(NR)
40611	N	N	P	N	N	-	-	N	NDN	N	NDN	NDN	N	N	I	N	NDN	N	N	NDN
39841	N	N	N	-	-	-	N	N	O	N	NDN	NDN	P	N	N	N	NDN	N	N	Pe
39746	N	N	N	-	-	-	N	N	O	P	NDN	E(+)		E(+)				E(+)		
39845	N	N	N	-	-	-	N	N	NDN	N	NDN	NDN		N/C	S	N	NDN(+)	P	N	NDN
39992	N	N	P	-	N	-	N	N	NDN	-	NDN	O	N	N	N	N	O	N	N	NDN
39991	N	N	P	N	-	-	N	P	E(+)		E(+)	E(+)	E(+)				E(+)			
39733	N	N	N	-	N	N	N	N	O	P	O	S	P	P	P	N	S(+)	P	P	M(+)
38169	P	N	P	N	-	N	N	N	O	P	NDN	NDN	-	-	N	-	Pe	-	-	Pe
38643	N	N	P	N	N	N	-	N	NDN	N	NDN	O	-	N	-	N	Pe	-	-	Pe
38637	P	N	P	N	-	N	-	N	O	N	S	NDN	N	P	N	N	NDN	N	N	S
38634	N	N	N	-	N	N	-	N	NDN	N	O	NDN	N	N	N	N	NDN	N	N	NDN
38181	N	N	N	-	N	N	-	N	NDN	N	NDN	S	N	N	-	N	NDN(+)	P	N	M(+)
38222	N	N	N	N	N	-	N	N	NDN	N	NDN	NDN	N	N/C	I	N	NDN	N	N	NDN
39942	N	P	N	N	N	-	N	P	NDN	Pe(+)		Pe(+)					Pe(+)			Pe(+)
36774	N	N	N	-	N	N	N	-	O	-	O	O	-	N	-	N	S	-	-	O
39735	N	N	N	N	N	-	N	-	O	P	NDN	NDN	N	N	N	N	NDN	N	N	M(NR)
39743	N	N	N	-	-	N	-	N	NDN	N	NDN	O	N	N	I	N	NDN	N	N	NDN
40778	N	N	N	N	-	-	N	N	O	N	NDN	NDN	N	N	N	N	O(+)	P	N	NDN
36539	N	N	N	N	-	-	-	N	NDN	-	NDN	NDN	N	N	N	N	NDN	N	N	O
39826	N	N	N	-	-	-	-	N	O	N	S	O	N	N	N	N	S(-)	N	N	M(NR)
40486	N	N	N	N	N	-	-	N	NDN	N	NDN	NDN	N	N	N	N	O	N	N	NDN
39775	N	N	N	-	N	N	-	N	O	P	O	O	P	P	N	N	S(+)	P	N	M(+)
39831	N	N	N	N	N	P	P	P	NDN	P	NDN(+)	NDN(+)	P	P	N	N	NDN(+)	P	N	O
39920	N	N	N	ND	-	-	N	N	O	P	O	M(NR)					M(NR)			M(NR)

CCZ No	FML D-30	Bio D-30	FML D0	S7 D0	IHQ D0	ip MO D0	PCR D0 LN	PCR D0 MO	CI 3M	FML 6M	CI 6M	CI 9M	S7 12M	FML 12M	ip MO 12M	IHQ 12M	CI 12M	PCR MO 12M	PCR LN 12M	CI 24M
40537	N	N	N	N	-	-	N	N	NDN	N	O	NDN	N	N	P	N	NDN(+)	P	N	M(+)
39760	N	N	N	-	N	N	N	N	E(S)		E(S)	E(S)					E(S)			E(S)
40558	N	N	N	N	N	N	-	P	NDN	P	NDN(+)	M(+)					M(+)			M(+)
40563	N	N	N	N	Susp	N	-	N	O	N	NDN	NDN	N	N	S	N	O(+)	P	N	NDN
40540	N	N	-	-	N	-	N	N	O	N	O	NDN	P	N	-	N	NDN	N	N	NDN
40598	N	P	N	N	N	-	N	P	M(NR)		M(NR+)	M(NR+)					M(NR+)			M(NR+)
39819	N	N	N	N		-	N	N	O	N	NDN	NDN	N	N	-	N	NDN	N	N	NDN
37396	N	N	N	-	N	N	-	N	NDN	N	NDN	NDN	-	N/C	N	N	O	N	N	NDN
40013	N	N	N	-	-	-	N	N	O	N	S	NDN	N	N	N	N	S(-)	N	N	O
39999	N	N	N	N	-	-	N	N	O	N	NDN	NDN	N	N	-	N	O	N	N	NDN
40012	N	N	N	N	N	-	N	N	O	N	NDN	NDN	N	N	I	N	NDN	N	N	NDN
38187	N	N	P	-	-	N	-	-	O	N	NDN	NDN	N	N	N	N	NDN	N	N	Pe
38838	N	N	N	N	-	N	-	N	NDN	N	NDN	O	N	N	-	N	NDN	N	N	NDN
38675	P	N	P	N	N	-	-	-	NDN	P	S(+)	O(+)	P	P	P	P	S(+)	P	P	E(+)
41960	N	N	N	-	N	-	N	N	O	N	O	O	N	N	-	N	O	-	N	NDN
40686	N	N	N	N	-	-	N	N	O	N	NDN	NDN	-	N/C	N	N	O	N	N	NDN
39923	N	ND	P	N	-	-	N	N	O	P	NDN	O	-	N	-	N	NDN	-	-	NDN
39996	N	N	N	-	N	-	N	N	S		E(+)	E(+)					E(+)			E(+)
39989	N	N	P	-	N	-	N	P	M(+)		M(+)	M(+)					M(+)			M(+)
40548	N	N	N	N	N	-	N	N	O	N	S	NDN	N	N	I	N	NDN	N	N	NDN
40771	N	N	N	N	N	-	N	N	NDN	N	NDN	NDN	N	N	I	N	NDN	N	-	NDN
40528	N	N	N	N	N	I	N	N	NDN	N	NDN	NDN	N	N	-	N	NDN	N	N	NDN

Legenda: Cor cinza: animais perdidos ou mortos por causas que não LVC; Cor preta: animais mortos ou eutanasiados por LVC; N: negativo; P: positivo; ND: indefinido; I: material insuficiente; Susp: suspeito; NDN: nada digno de nota; O: oligossintomático (até dois sintomas compatíveis com LVC); S: sintomático (três ou mais sintomas de LVC); M: morto; NR: não relacionada; E: eutanasiado; +: exame direto positivo para *Leishmania*; Pe: perdido; -: exame direto negativo; N/C: não coletado; CCZ No: Número de registro; FML D-30: resultado sorologia ELISA FML pré-seleção dos animais; Bio D-30: resultado sorologia ELISA Bio-Manguinhos pré-seleção dos animais; FML DZero: resultado sorologia ELISA FML após seleção dos animais, no dia zero; S7 D0: resultado sorologia ELISA S7 (Biogene) após seleção dos animais, no dia zero; IHQ D0: imunistoquímica de pele de orelha no dia zero; ip MO D0: esfregaço em lâmina de aspirado de medula óssea no dia zero; PCR D0 MO: PCR de aspirado de medula óssea no dia zero; PCR D0 LN: PCR de aspirado de linfonodo poplíteo no dia zero; CI 3M: avaliação clínica de três meses; FML 6M: resultado de sorologia ELISA FML aos 6 meses; CI 6M: avaliação clínica de 6 meses; CI 9M: avaliação clínica de 9 meses; S7 12M: resultado de sorologia ELISA S7 (Biogene) aos 12 meses; FML 12M: resultado de sorologia ELISA FML aos 12 meses; IHQ M12: imunistoquímica de pele de orelha aos 12 meses; ip MO m12: esfregaço em lâmina de aspirado de medula óssea aos 12 meses; PCR MO 12m: PCR de aspirado de medula óssea aos 12 meses; PCR LN M12: PCR de aspirado de linfonodo poplíteo aos 12 meses; CI 12M: avaliação clínica de 12 meses; CI 24M: avaliação clínica de 4 meses; -: exame não realizado;

Resultados dos exames de sorologia ELISA FML e avaliações clínicas em diferentes momentos dos 105 cães do estudo aos 1,5, 2 e 13 meses de estudo, em área endêmica para LVC, Tarumã, Campo Grande, MS, Brasil.

CCZ No	CI 1.5 M	FML 1,5M	CI 2M	FML 13M	CI 13M
39881	NDN	P	NDN		NDN
40478	O	N	NDN	N	O(-)
41937	O	P	O		Pe(+)
38631	NDN	N	NDN		M(NR)
39932	M(NR)		M(NR)		M(NR)
38804	NDN	P	O		E(+)
38879	NDN	N	O		E(S)
40718	NDN	N	NDN	N	NDN(-)
40461	O	N	O	N	O(-)
38888	O	N	NDN	N	NDN(-)
40460	O	N	O	N	O(-)
40573	NDN	P	O	N	NDN(-)
39956	NDN	N	NDN		O(-)
36548	NDN	N	E(+)		E(+)
39887	S	N	O		E(+)
39885	S	P	M(+)		M(+)
39866	NDN	P	O		M(NR)
39848	NDN	N	NDN	N	NDN(-)
38872	M(NR)		M(NR)		M(NR)
40005	NDN	N	NDN	N	NDN(-)
39906	O	N	S	P	NDN(+)
39907	O	N	O	N	S(-)
40754	NDN	N	NDN		NDN(-)
40719	O	P	O		M(S)
39899	NDN	N	NDN	N	NDN(-)
39871	O	P	NDN	N	O(-)
40010	NDN	N	NDN	N	NDN(-)

CCZ No	CI 1.5 M	FML 1,5M	CI 2M	FML 13M	CI 13M
38810	O	N	O		E(+)
40683	NDN	N	NDN		M(NR)
40673	O	N	O		E(+)
40512	O	N	S		NDN(-)
38217	O	N	O	N	O(-)
38220	O	N	O	N	NDN(+)
40567	O	N	O	N	O(-)
40472	O	N	NDN	N	O(-)
40744	NDN	N	NDN	P	O(+)
38884	NDN	N	O	N	NDN(-)
40470	NDN	N	NDN	N	NDN(-)
40471	O	N	NDN	N	NDN(-)
40494	O	N	O		Pe
40620	NDN	N	NDN	N	O(-)
39861	NDN	N	NDN	N	NDN(-)
40659	S	P	S		M(S)
39709	NDN	N	O	N	NDN(-)
39718	O	N	S		E(S)
38859	NDN	N	O	N	NDN(-)
39833	NDN	N	O	P	O(+)
39721	O	N	O	N	O(-)
38813	O	P	O		E(S)
39847	O	P	O		E(+)
40020	NDN	N	O		M(NR)
40611	NDN	N	NDN	N	NDN(-)
39841	NDN	N	O		NDN(-)
39746	O	N	S		E(+)

CCZ No	CI 1.5 M	FML 1,5M	CI 2M	FML 13M	CI 13M
38181	NDN	N	NDN	N	S(+)
38222	NDN	N	NDN	N	O(-)
39942	NDN	N	NDN		Pe(+)
36774	NDN	N	NDN		S
39735	NDN	N	NDN		M(NR)
39743	O	N	O	N	O(-)
40778	NDN	N	NDN	N	O(+)
36539	NDN	N	NDN	N	O(-)
39826	O	N	O		M(NR)
40486	O	N	O	N	O(-)
39775	O	P	O		M(+)
39831	O	N	NDN	N	O(+)
39920	NDN	P	NDN		M(NR)
40537	NDN	N	NDN	N	NDN(+)
39760	O	N	O		E(S)
40558	O	N	O		M(+)
40563	O	P	O		O(+)
40540	NDN	N	NDN	N	NDN(-)
40598	M(NR)		M(NR)		M(NR+)
39819	NDN	N	NDN	N	NDN(-)
37396	NDN	N	NDN		O(-)
40013	O	N	O	N	O(-)
39999	O	N	NDN	N	NDN(-)
40012	NDN	N	O	N	NDN(-)
38187	NDN	P	O	N	O(-)
38838	O	N	O	N	NDN(-)
38675	NDN	N	NDN		M(+)

CCZ No	CI 1.5 M	FML 1,5M	CI 2M	FML 13M	CI 13M
40570	NDN	N	NDN	N	NDN(-)
39801	NDN	N	O	N	O(-)
39800	NDN	N	O	N	NDN(+)
39699	NDN		NDN		Pe
40569	NDN	N	O		NDN(+)
40568	O	P	NDN	P	O(+)
40578	NDN	N	O		NDN(-)
40495	O	P	O		E(+)

CCZ No	CI 1.5 M	FML 1,5M	CI 2M	FML 13M	CI 13M
39733	NDN	N	O		S(+)
39845	O	N	O	N	NDN(+)
39992	O	N	NDN	N	NDN(-)
39991	O	N	O		E(+)
38169	NDN	N	O		Pe
38643	O	N	O		Pe
38637	NDN	N	NDN	N	O(-)
38634	O	N	NDN		NDN(-)

CCZ No	CI 1.5 M	FML 1,5M	CI 2M	FML 13M	CI 13M
39996	S	N	S		E(+)
41960	NDN	N	O	N	O(-)
40686	NDN	N	O	N	O(-)
39923	O	N	O		NDN
39989	S	P	S		M(+)
40548	NDN	N	O	N	NDN(-)
40771	NDN	P	NDN	N	NDN(-)
40528	NDN	N	NDN	N	NDN(-)

Legenda: Cor cinza: animais perdidos ou mortos por causas que não LVC; Cor preta: animais mortos ou eutanasiados por LVC; N: negativo; P: positivo; ND: indefinido; I: material insuficiente; Susp: suspeito; NDN: nada digno de nota; O: oligossintomático (até dois sinais clínicos compatíveis com LVC); S: sintomático (três ou mais sinais clínicos de LVC); M: morto; NR: não relacionada; E: eutanasiado; +: exame direto positivo para *Leishmania*; Pe: perdido; -: exame direto negativo; N/C: não coletado; CCZ No: Número de registro; FML 1,5M: resultado sorologia ELISA FML com 1,5 mês de estudo; CI 1,5M: avaliação clínica de 1,5 mês; CI 2M: avaliação clínica de 2 meses; FML 13M: resultado de sorologia ELISA FML aos 13 meses; CI 13M: avaliação clínica de 13 meses; -: exame não realizado;

CÓPIA DE QUESTIONÁRIO APLICADO A PROPRIETÁRIO DE ANIMAL

GRUPO VACINAL: (3)



Nome do Animal: Brad Sexo: M
 Raça: pit bull Idade: -1a
 Porte: SS () S () M () L SL ()
 Número CCZ: 39746
 Número Microchip: 195010
 Temperamento: Dócil Agressivo ()

Proprietário:

Nome: Jelson Soares Mateus
 Endereço: Rua França, 62
 Bairro: Tauma
 Telefone: 3373-2004 e-mail: _____

Aspectos Epidemiológicos

Hábito do cão: domiciliar () peridomiliar
 Possui cão nesta casa que veio à óbito ou foi eutanasiado com Leishmaniose? sim () não
 Já teve parentes ou vizinhos próximos que contraíram a Leishmaniose? sim () não
 Possui outras espécies de animais (nº): cães () gatos () aves () suínos () outros () não
 Última visita ao veterinário: se vacina!
 Nome do veterinário, clínica e telefone: Almidup
 Nome e data do último medicamento administrado: -

Vacinação:

	1ª	2ª	3ª	Booster 1	Booster 2
Data	<u>24/07/06</u>	<u>14/08/06</u>	<u>08/09/06</u>		
Aplicador	<u>andrey</u>	<u>andrey</u>	<u>andrey</u>		

Local de Aplicação da Vacina



Bioquímica Sérica:

	D0	6MPV2	12MPV2	24MPV2
Data Coleta				
Proteínas Totais				
Albumina				
Globulina				

PCR e IHQ

	D0	12MPV2	24MPV2
Data Coleta			
Linfonodo PCR			
Medula Óssea PCR			
Pele IHQ			

Sorologia

	D-30	D0	D42	D63	6MPV2	12MPV2	13MPV2	18MPV2	24MPV2
Data Coleta									
ELISA CCZ	<u>Negativo</u>								
ELISA FML									
R.I.F.I.									



UNICAMP



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Alguns Aspectos Epidemiológicos das Leishmanioses Caninas nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul" (protocolo nº 2389-1), sob a responsabilidade de Dra. Ingrid Menz / Andre Antonio Cutolo, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 04 de abril de 2011.

Campinas, 04 de abril de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS LEISHMANIOSES NO MUNICÍPIO DE MONTE MOR, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

André Antonio Cutolo^{1,2*}
Marcella Zampoli Troncarelli³
Juliana Giantomassi Machado³
Maria Cecília Rui Luvizotto⁴
Claudio José Von Zuben⁵
Helio Langoni³
Selma Giorgio¹

RESUMO

As leishmanioses tegumentar (LTA) e visceral americana (LVA), em caninos e humanos, encontram-se em crescente expansão no Estado de São Paulo. Para a vigilância epidemiológica dessas endemias, é fundamental o conhecimento da distribuição e ecologia das diferentes espécies vetoras de flebotômíneos e, para a LVA, o conhecimento da prevalência da enfermidade no cão, seu principal reservatório. Objetivou-se assim verificar a abundância e distribuição de flebotômíneos e pesquisar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em uma amostra da população canina do município de Monte Mor, SP, visando identificar possíveis cães infectados. Nas capturas de flebotômíneos utilizaram-se armadilhas automáticas luminosas do tipo CDC em 16 pontos diferentes do município, no período noturno (18h às 8h), de abril de 2006 a abril de 2008, com posterior processamento e identificação dos espécimes. Um total de 319 amostras de soro canino foi processado pelas técnicas de ELISA e RIFI com utilização de *Leishmania major* como antígeno. Em 14 dos 16 locais avaliados encontraram-se flebotômíneos, num total de 86 exemplares, com identificação de sete espécies: *Nyssomyia neivai*, *N. whitmani*, *Pintomyia monticola*, *P. pessoai*, *Migonemyia migonei*, *Brumptomyia brumpti* e *Evandromyia termitophila*. *N. neivai*, considerada a principal espécie vetora de LTA no Estado de São Paulo, mostrou-se a mais abundante com 48,84% do total capturado e presente em dez dos 14 locais com flebotômíneos. Todas as 319 amostras caninas apresentaram-se negativas para anticorpos anti-*Leishmania*. A abundância de *N. neivai*, aliada à presença de espécies vetoras secundárias como *N. whitmani*, *M. migonei* e *P. pessoai*, ilustra risco de transmissão da LTA no município. A ausência de *Lutzomyia longipalpis* e de cães reagentes para leishmaniose, indicam até o momento ausência da LVA canina, com baixo risco de estabelecimento desta doença no município. Ressalta-se, porém, a necessidade da manutenção das ações de vigilância epidemiológica, ampliando-se os pontos de captura de flebotômíneos, bem como se

¹ Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", s/nº, CEP 13083-970. Campinas, SP.

² Departamento de Vigilância à Saúde, Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal de Monte Mor. Rua Jorge Calil, 85, Jd. Nossa Senhora de Fátima, CEP 13190-000. Monte Mor, SP. Telefone/Fax (019)-38892577 cutoloandre@yahoo.com (Correspondência).

³ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, CEP 186180-000. Botucatu, SP.

⁴ Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Odontologia, UNESP. Rua Clóvis Pestana, 793. CEP 16050-680. Araçatuba, SP.

⁵ Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP. Av. 24-A, 1515, Bela Vista, CEP 13506-900. Rio Claro, SP.

mantendo a avaliação clínica e laboratorial periódica da população canina, visando-se assim impedir a introdução e estabelecimento desta grave enfermidade no município.

Palavras-chave: *Leishmania*, epidemiologia, leishmaniose canina, flebotômíneos, sorologia, região metropolitana de Campinas.

LEISHMANIASIS EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE IN MONTE MOR CITY, SAO PAULO STATE, BRAZIL

ABSTRACT

Cutaneous (LTA) and Visceral (LVA) American Leishmaniasis incidences are increasing in human and canine, especially LVA, which is expanding its range through São Paulo State. Distribution and ecology knowledge of different sand fly species, and in case of LVA, the prevalence of *Leishmania* infection in dogs, its main reservoir, are essential for leishmaniasis epidemiology vigilance. Considering this, it was studied sand flies abundance and distribution, and also the presence of anti-*Leishmania* IgG antibodies in dogs, from different areas of Monte Mor county, São Paulo State. Sand flies were trapped in urban and rural areas between April 2006 and April 2008. CDC automatic light traps were used from 18h to 8h, during 16 nights. 319 canine sera samples were processed by ELISA and RIFI techniques, using *Leishmania major* as antigen. 86 phlebotomines were found in 14 out of 16 evaluated places, resulting in seven different sand fly species identified: *Nyssomyia neivai*, *Pintomyia monticola*, *P. pessoai*, *N. whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Brumptomyia brumpti* and *Evandromyia termitophila*. *N. neivai*, pointed out as the main LTA vector in São Paulo State, was the most abundant species (48.84% of the total captured), being found in 10 out of 14 places where sand flies were captured. All 319 canine sera were negative in serological tests. The finding of *N. neivai* and also the presence of secondary vector species as *N. whitmani*, *M. migonei* and *P. pessoai*, indicates the risk of LTA transmission in different places of Monte Mor county. The absence of *Lutzomyia longipalpis* sand fly species and also the absence of dogs with anti-*Leishmania* IgG antibodies indicates, in the moment no occurrence of canine LVA in the city, with low risk of establishment of this disease in the studied area. Due to the high importance of leishmaniasis in the public health context, epidemiological vigilance actions must be continuously performed.

Key words: *Leishmania*, sandfly, epidemiology, Campinas metropolitan region, serology, canine leishmaniasis.

VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DE LAS LEISHMANIOSIS EN EL MUNICIPIO DE MONTE MOR, ESTADO DE SAO PAULO, BRASIL

RESUMEN

La incidencia de las leishmaniosis tegumentaria (LTA) y visceral americanas (LVA) en hospederos caninos y humanos se encuentra en creciente expansión en el estado de São Paulo, Brasil. Para la vigilancia epidemiológica de tales endemias, es fundamental el conocimiento de la predominancia y ecología de las diferentes especies vectores de flebotomos y, para la LVA, el conocimiento de la prevalencia de la enfermedad en el perro, su principal reservorio. Se buscó verificar la abundancia y distribución de flebotomos y pesquisar la presencia de

anticuerpos IgG anti-*Leishmania* en sueros de una muestra de la población de perros, para el eventual encuentro de perros infectados, en la ciudad de Monte Mor, estado de São Paulo. Para las capturas de los insectos se utilizaron trampas automáticas luminosas del tipo CDC, en 16 puntos diferentes de la ciudad, en el período nocturno (18h a las 8h), desde abril de 2006 hasta abril de 2008, con posterior procesamiento e identificación de los flebotomos hacia el nivel de especie. El total de 319 muestras de sueros fueron procesados por las técnicas de ELISA y RIFI con utilización de *Leishmania major* como antígeno. En 14 de 16 locales evaluados se encontró flebotomos, totalizando 86 ejemplares, con identificación de siete especies: *Nyssomyia neivai*, *Pintomyia monticola*, *P. pessoai*, *N. whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Brumptomyia brumpti* y *Evandromyia termitophila*. *N. neivai*, considerada el principal vector de la LTA en el estado de São Paulo, fue la especie más abundante con 48,84% del total capturado y presente en 10 de 14 locales con flebotomos. Todas las 318 muestras de sueros caninos se presentaron negativas para anticuerpos IgG anti-*Leishmania*. La abundancia de *N. neivai* junto a la presencia de especies vectores secundarios de leishmaniosis como *N. whitmani*, *M. migonei* y *P. pessoai*, enseña el riesgo de transmisión de la LTA en el municipio. La ausencia de *Lutzomyia longipalpis* y de perros portadores de anticuerpos anti-*Leishmania*, indican hasta el presente momento la ausencia de la LVA canina, con bajo riesgo de establecimiento de esta enfermedad en el municipio. Todavía, las acciones de vigilancia epidemiológica deben de ser continuamente adoptadas, siendo de extrema importancia desde el punto de vista de la salud pública regional.

Palabras-clave: *Leishmania*, epidemiología, flebotomos, región metropolitana de Campinas, leishmaniosis canina, serología.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é causada pela *Leishmania chagasi* e é uma zoonose grave, potencialmente fatal, que atinge principalmente crianças desnutridas (1). É uma doença transmitida por flebotomíneos do complexo *Lutzomyia longipalpis* (2).

A LVA encontra-se em franca expansão no Estado de São Paulo, com 1.431 casos humanos notificados e registro de 122 óbitos no período de janeiro de 1999 até março de 2009 (3), apresentando letalidade de 8,52%. Das 645 cidades do Estado de São Paulo 63 (5,8%) registraram casos de LVA humana e/ou canina até fevereiro de 2008, sendo que 361 municípios (55,9%) apresentam-se receptivos para a doença, com encontro do vetor *Lutzomyia longipalpis* (4). A enfermidade já foi diagnosticada em 54 municípios pertencentes a seis regionais de saúde (DRS) distintas (3).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é conhecida no Estado de São Paulo desde 1895. No início do século passado era conhecida pelo seu caráter ocupacional, acometendo trabalhadores associados a atividades de desmatamento, sendo uma zoonose silvestre, e o homem hospedeiro acidental do protozoário (5). A enfermidade é importante tanto pela extensa distribuição geográfica no Brasil como pelas graves lesões cutâneas e mucocutâneas que provoca, com efeitos psicológicos no paciente com conseqüências no campo social e econômico (6). É causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, sendo o agente principal para o Estado de São Paulo a *Leishmania braziliensis* (7). Os principais transmissores são flebotomíneos do complexo *Nyssomyia intermedia* (*N. intermedia* no litoral e *N. neivai* no interior), associadas ainda à *N. whitmani* e *Migonemyia migonei* como possíveis espécies vetoras secundárias (8). De 1993 a 2008 foram notificados 7.826 casos humanos no Estado de São Paulo, oriundos de mais de 400 cidades distintas (3), incluindo um caso ocorrido em 2002 no município de Monte Mor.

Cutolo, A.A., et al. Vigilância epidemiológica das leishmanioses no município de Monte Mor, Estado de São Paulo, Brasil. *Vet. e Zootec.*, p.634-641, v.16, n.4, dez., 2009.

Assim sendo, objetivou-se investigar a situação epidemiológica de Monte Mor com relação às leishmanioses, por meio da avaliação da prevalência da infecção canina e também por meio do levantamento da fauna flebotomínica em diferentes áreas do município.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição do Município

Monte Mor situa-se na microrregião de Campinas (Figura 1) estando entre 22°56'48" de latitude sul, 47°18'57" de longitude oeste e 560 metros de altitude. O clima é considerado tropical de altitude Cwa. A cidade é cortada pelo Rio Capivari, pertencente à bacia hidrográfica do Rio Tietê. A população estimada é de 43.290 habitantes. A área do município é de 241 km² (9). Faz divisa com as cidades de Campinas, Hortolândia, Santa Bárbara D'Oeste, Sumaré, Indaiatuba, Elias Fausto e Capivari, situando-se a 122 quilômetros da cidade de São Paulo. Juntamente com outros 18 municípios forma a Região Metropolitana de Campinas, que possui um total aproximado de 3.200.000 habitantes, distribuídos em uma área de 3.645,6 km² (9).



Figura 1. Localização do Município de Monte Mor (cor vermelha) e a micro-região de Campinas (cor amarela) no Estado de São Paulo.

Captura de Flebotomíneos

Durante o período de abril de 2006 a abril de 2008, realizaram-se 16 capturas de flebotomíneos no município de Monte Mor, SP, sendo uma coleta por noite em locais diferentes, em datas aleatórias, num total aproximado de 225 horas. Foram amostradas áreas dos três setores do município conforme divisão utilizada para o Programa Nacional de Combate à Dengue (PNCD). As coletas foram realizadas com armadilhas automáticas luminosas do tipo CDC, posicionadas a uma distância de 30 a 50 cm do solo, das 18 às 8 horas do dia seguinte. Os locais de captura situavam-se em área urbana ou rural, e foram escolhidos por apresentarem uma ou mais das seguintes características: 1) proximidade a áreas de mata; 2) histórico prévio de LTA humana nas redondezas; 3) presença de abrigos de animais domésticos como aves e/ou suínos. Um inseto capturado manualmente no intradomicílio de uma residência também foi identificado. As armadilhas foram posicionadas

Cutolo, A.A., *et al.* Vigilância epidemiológica das leishmanioses no município de Monte Mor, Estado de São Paulo, Brasil. *Vet. e Zootec.*, p.634-641, v.16, n.4, dez., 2009.

em área de mata, peridomicílio ou quintal de residências. Os insetos capturados foram mortos, clarificados, corados e montados em lâmina, conforme técnicas usuais para flebotomíneos e foram identificados ao nível de espécie de acordo com Galati (10).

Seleção dos animais, colheita de sangue e sorologia

Trezentos e dezenove cães, de 42 bairros distintos, oriundos dos três setores da divisão do PNCD municipal, foram selecionados ao acaso durante a Campanha de Vacinação anti-rábica de 2006, sendo colhido de cada um cerca de 5 mL de sangue da veia braquial, após contenção física apropriada. Um animal foi selecionado e examinado por apresentar sintomas compatíveis com Leishmaniose Visceral Canina (LVC), tais como úlceras cutâneas, caquexia e linfadenomegalia. Este foi eutanasiado em janeiro de 2008, com realização de necropsia e colheita de fragmentos de órgãos para diagnóstico diferencial. Dos demais animais, 116 soros foram testados apenas pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), e os 203 soros restantes pela técnica de ELISA como triagem, com posterior realização da RIFI nas reagentes.

As amostras de sangue foram centrifugadas, o soro acondicionado em microtubos identificados, e posteriormente congelado a -20°C . Para a técnica de RIFI as amostras foram diluídas a partir de 1:20 em Solução Salina Tamponada (SST), assim como os controles positivos e negativos. O conjugado antiimunoglobulina de cão foi diluído segundo seu título em azul de Evans a 20 mg%. Um volume de 10 μL de cada diluição do soro foi distribuído em cada célula de lâminas esmaltadas de vidro, impregnadas com promastigotas de *Leishmania major* e incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. O material foi examinado sob microscópio de fluorescência com aumento de 400x. O título de anticorpos foi determinado como a última diluição apresentando fluorescência na célula promastigota, quando comparada aos controles positivo e negativo.

O ELISA foi conduzido utilizando-se placas de poliestireno sensibilizadas com antígeno de *Leishmania major* sonicadas. O soro dos cães foi diluído a 1:80 em solução tampão fosfato salina caseína tween, e como conjugado antiimunoglobulina de cão, fração IgG marcada com peroxidase (Sigma-Company, USA) com a reação lida em espectrofotômetro a 492 nm. Utilizaram-se dois controles positivos e dois controles negativos por placa e o ponto de corte definido pela média dos valores negativos, multiplicado pelo fator 2,4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A relação de espécies de flebotomíneos capturados no município de Monte Mor, SP, encontra-se na Tabela 1. Nenhum flebotomíneo foi capturado na Fazenda Bordon e na mata do Bairro Estância das Águas. Os 86 insetos capturados pertencem a sete espécies distintas, sendo que 42 (48,84%) destes são da espécie *Nyssomyia neivai*, considerada a principal vetora da LTA no Estado de São Paulo (8). Esta foi a espécie mais dispersa no município, sendo encontrada em dez dos catorze locais positivos para flebotomíneos. Ressalta-se o encontro significativo das espécies *Pintomyia pessoai*, *Nyssomyia whitmani* e *Migonemyia migonei*, respectivamente em quatro, quatro e dois locais diferentes do município. Estas espécies são também consideradas importantes na transmissão de leishmanioses (2).

Inicialmente na prova de ELISA, quatro cães apresentaram título elevado próximo ao ponto de corte, sendo considerados suspeitos, outros cinco animais apresentaram-se positivos e todos os demais negativos. Os soros reagentes foram re-examinados pela RIFI apresentando-se então negativos para leishmaniose.

Tabela 1: Flebotomíneos capturados em área urbana, periurbana e rural do município de Monte Mor, SP, por espécie e sexo. Abril de 2006 a Abril de 2008.

Espécie	F	M	Total (F+M)	%
<i>Nyssomyia neivai</i> ^a	35	7	42	48.84
<i>Pintomyia monticola</i> ^b	13	1	14	16.28
<i>Pintomyia pessoai</i> ^c	3	9	12	13.95
<i>Nyssomyia whitmani</i> ^d	3	3	6	6.98
<i>Migonemyia migonei</i> ^e	3	3	6	6.98
<i>Brumptomyia brumpti</i> ^f	-	3	3	3.49
<i>Evandromyia termitophila</i> ^g	1	-	1	1.16
<i>Nyssomyia spp.</i> ^{h+}	1	-	1	1.16
<i>Brumptomyia spp.</i> ⁱ⁺	1	-	1	1.16
Total	60	26	86	100
%	69.77	30.23	100	

Legenda: F: fêmeas; M: machos; F+M: soma de fêmeas e machos; *a*: Sítio Paulo Milani, Chácara José Brisque, Sítio Guaiuvira, Chácara Ora, Intradomicílio Rua Siqueira Campos (Centro), Margem Rio Capivari (Centro), Sítio São Lázaro, Granja Barone, Sítio Quitzau; *b*: Fazenda Cacinha, Granja Barone, Mata do Lobo, Área Verde, Quinhões do Boa Esperança; *c*: Sítio do Morro, Sítio São Lázaro, Mata do Lobo, Sítio Quitzau; *d*: Fazenda Cacinha, Sítio do Morro, Sítio São Lázaro, Granja Barone; *e*: Sítio Barroço, Fazenda Cacinha; *f*: Sítio Guaiuvira, Mata do Lobo; *g*: Sítio Paulo Milani; *h*: Sítio do Morro; *i*: Fazenda Cacinha.

⁺ Exemplares danificados não permitindo a identificação da espécie.

Um dos cães soropositivo ao ELISA apresentava-se com sintomas compatíveis com quadro de LVA. Este cão, da raça boxer, fêmea, de cinco anos de idade, era oriundo do município de Vinhedo, residindo no município de Monte Mor há dois anos. Como sintoma apresentava poliúria, polidipsia, emagrecimento, feridas em extremidades dos membros com descolamento de coxins plantares, unhas e perda das falanges distais dos dedos, além de dermatite necrosante de extremidade da pua. Após algumas semanas recebendo tratamento a base de antibióticos sem melhora, o animal foi eutanasiado e necropsiado. Os principais achados à necropsia foram: dermatite necrótica de extremidades, gastrite, enterite hemorrágica, pancreatite, nefrite, linfadenomegalia, cistite, neoplasia vaginal por TVT (Tumor Venéreo Transmissível). Amostras dos órgãos foram fixadas em formol tamponado a 10% e analisadas por técnica de imunistoquímica, pelo Departamento de Patologia Veterinária, da FOA, UNESP - Campus de Araçatuba. Não foram encontradas formas amastigostas de leishmanias em nenhum dos órgãos examinados. Como o animal apresentou sorologia positiva no ELISA, negativa na RIFI, e resultado imunistoquímico negativo, considerou-se o resultado final negativo para LVA canina.

Baseando-se na existência de casos humanos ou caninos de LVA um município pode ser classificado em silencioso (sem transmissão) ou com transmissão. Baseado na presença ou ausência do vetor *Lutzomyia longipalpis* é classificado em receptivo ou não receptivo para o estabelecimento da doença. Dependendo da proximidade e/ou fluxo de transporte e/ou migratório com outros municípios com transmissão de LVA canina ou humana é classificado em vulnerável ou não vulnerável à introdução da LVA, considerando-se o risco de expansão por contigüidade e por saltos (11).

Estima-se que a população canina do município de Monte Mor seja de 9.263 cães, distribuídas pelos três setores do PNCD, resultando em uma média de aproximadamente 3000 cães por setor. A Secretaria de Estado da Saúde (11) preconiza no caso de inquérito sorológico canino amostral com um nível de significância de 5%, no caso da prevalência da

doença esperada inferior à 1% como no caso de Monte Mor, um número mínimo de 916 cães avaliados por setor. Isto resultaria em amostragem de 2.748 cães no total, correspondendo à 29,67% dos cães do município.

Tal inquérito é recomendado, porém, apenas em casos de municípios receptivos (com a presença de *Lutzomyia longipalpis*) ou em municípios com transmissão canina confirmada da LVA, o que não se aplica à Monte Mor. O inquérito canino realizado no município avaliou 319 cães, correspondendo a cerca de 3,44% da população estimada. Quantidade esta atingida com os recursos humanos, de equipamento e de apoio laboratorial disponíveis no momento do estudo. No caso de confirmação da presença de *Lutzomyia longipalpis* ou da transmissão da LVA canina, um inquérito sorológico com número amostral mais elevado deverá ser realizado.

Segundo o Grupo de Estudos em Leishmanioses (4), o município de Monte Mor é classificado como silencioso, não receptivo e não vulnerável, fato confirmado com os resultados obtidos neste trabalho.

CONCLUSÕES

A abundância de *Nyssomyia neivai* aliada à presença de espécies vetoras secundárias como *N. whitmani*, *M. migonei* e *P. pessoai*, confirma o risco de transmissão de LTA no município. A ausência de *Lutzomyia longipalpis* e de cães portadores de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, indicam até o momento ausência da LVA canina, com baixo risco de estabelecimento desta doença no município. Assim sendo, as informações obtidas neste trabalho confirmam a classificação atual do município como sendo silencioso, não receptivo e não vulnerável para a LVA.

Ressalta-se, porém, a necessidade da manutenção das ações de vigilância epidemiológica, ampliando-se os pontos de captura de flebotômíneos, bem como se mantendo a avaliação clínica e laboratorial periódica da população canina, visando-se assim impedir a introdução e estabelecimento desta grave enfermidade no município.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários do Setor de Controle de Zoonoses e Vetores da Prefeitura Municipal de Monte Mor pelo auxílio nas capturas de flebotômíneos e na contenção dos cães durante as colheitas de sangue.

REFERÊNCIAS

1. Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature*. 1978; 273: 595-600.
2. Rangel EF, Lainson R. Transmissores da leishmaniose tegumentar americana. In: Rangel EF, Lainson R. *Flebotômíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p.291-305
3. CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Divisão de Zoonoses. Secretaria de Estado da Saúde. [acesso 2009 Abr 23]. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>.
4. Grupo de Estudos em Leishmanioses CCD. Atualização da classificação epidemiológica dos municípios para a Leishmaniose Visceral Americana. *Bol Epidemiol Paul.* 2008; 5: 18-25.

5. Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89: 427-34.
6. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária. Guia de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília; 1994.
7. GOMES AC. Sand fly vectorial ecology in the State of São Paulo. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89: 457-60.
8. Camargo-Neves VLF,, Gomes AC,, Antunes JLF. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos de leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35: 299-306.
9. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [acesso 2008 dec 25]. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>.
10. Galati EAB. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p.53-175.
11. Secretaria de Estado da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN. Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD. São Paulo; 2006.

Recebido em: 11/02/2009

Aceito em: 05/08/2009