

Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP  
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas – NUPEB  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

**PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA ZONA RURAL  
DO MUNICÍPIO DE VARZELÂNDIA, MINAS GERAIS, BRASIL, 2005.**

Lizziani de Vasconcelos Gomes

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA ZONA RURAL  
DO MUNICÍPIO DE VARZELÂNDIA, MINAS GERAIS, BRASIL, 2005**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

Lizziani de Vasconcelos Gomes

Orientador: George Luiz Lins Machado Coelho

Ouro Preto  
2007

Este trabalho foi realizado pelo Laboratório de Epidemiologia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, com apoio financeiro da FUNED, Secretaria Municipal de Saúde do município de Varzelândia-MG e Secretaria de Vigilância em Saúde-Ministério da Saúde.

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Aos meus pais,  
Iomar Batista Gomes e,  
Maria Givanete de Vasconcelos Gomes

Para ser  
grande, sê inteiro:  
Nada teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa.  
Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda brilha,  
Porque alta vive.

Fernando Pessoa

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor George Luiz Lins Machado Coelho, por ter me acolhido no laboratório de Epidemiologia. Pela confiança, pelos ensinamentos, pelo respeito, pela amizade, pelo apoio, pela orientação segura e pela oportunidade que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Terezinha Bahia, agradeço pela amizade, atenção dispensada e auxílio no laboratório de Parasitologia/ Histopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto.

À Professora Doutora Marta de Lana minha gratidão pelos ensinamentos, pela compreensão, paciência e apoio.

Ao Doutor João Carlos França Silva pela colaboração na execução do projeto piloto deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-graduação na pessoa do seu coordenador Professor Doutor Deoclécio Alves Chianca Jr, pelos ensinamentos.

A todos os colegas do curso de Pós-graduação, especialmente Jaila, Girley, Jerusa, Arlete, Roberta e Cláudia pelo companheirismo, ajuda e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia da escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto pela agradável convivência.

Ao Alekson Mendonça Mendes por todo apoio e colaboração concedida durante a coleta de dados no município de Varzelândia- MG.

Aos Bolsistas Jaqueline, Daniel Menezes, Cristiane Batalha, Liliane Vidal Siqueira que colaboraram com a padronização, execução dos diagnósticos sorológicos e captura dos cães positivos.

Ao Senhor Edvá de Paula Vieira, da Fundação Nacional de Saúde, pelo apoio concedido ao projeto.

À Secretaria Municipal de Saúde do Município de Varzelândia pelo apoio.

Aos agentes do programa da Saúde da Família do município de Varzelândia-MG, Nelcy e Wagner pelo apoio e trabalho árduo para coleta de dados.

Ao Laboratório de Parasitologia/ Histopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto: aos professores, técnicos e demais alunos pelo apoio e amizade.

Ao Laboratório de Sorologia da Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças da Fundação Ezequiel Dias, na pessoa da Doutora Eliane Furtado e Doutora Ildikó Delkin de Miranda Pinto, pelo apoio e pelo treinamento em métodos diagnósticos.

À professora Doutora Marilene Michalic do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais por permitir a realização de Reação de Fixação de Complemento em seu Laboratório.

Ao Professor Roney Luiz Carvalho Nicolato, pela disponibilização do laboratório de análises Clínicas para leitura de lâminas de Imunofluorescência Indireta.

Ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) – Montes Claros, na pessoa de Marília Fonseca Rocha, Lucimar Cristina Pimenta maia, Luiz Osmane Borges Ferreira pelo apoio.

À equipe de necropsia do CCZ - Montes Claros: José Carlos Soares, Jaime Ferreira Lima, Jones Pereira Santos, Wildson Geraldo Braga, Eujásio Vieira pela realização de necropsia nos cães com LV.

À Cida, pela atenção, cuidado, carinho e amizade.

À Sônia, Flávia e Gisela por, cada uma a seu modo, me mostrarem caminhos diferentes a seguir. Obrigada por tudo!

À minha família Ouro Pretana: Dona Glória, Sr. Davi, Geórgia, Dárten e Ana Gabriela.

À minha família, sempre presente nos momentos mais difíceis, sempre disposta a entender a inevitável ausência, trazendo a luz do seu carinho ao caminho percorrido ao longo desta jornada.

À minha eterna amada República Bicho do Mato, que me acolheu, me escolheu e foi escolhida por mim... Irmãs de fato, companheiras em TODOS os momentos e acima de tudo, Selvagens!!!

Ao Gustavo pelo amor, carinho, companheirismo e apoio incondicional durante todo este tempo.

**Universidade Federal de Ouro Preto**

Esta tese intitulada

**PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA ZONA RURAL  
DO MUNICÍPIO DE VARZELÂNDIA, MINAS GERAIS, BRASIL, 2005**

apresentada por

**LIZZIANI DE VASCONCELOS GOMES**

foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

**Prof. Dr. George Luiz Lins Machado Coelho**  
**Prof. Dr. Edelberto Santos Dias**  
**Prof. Dr. André Talvane**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XVII
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	XIX
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	XX
<b>RESUMO</b> .....	XXII
<b>ABSTRACT</b> .....	XXIII
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Introdução.....	2
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1. Histórico.....	4
2.2. O parasita.....	5
2.2.1. Taxonomia .....	5
2.2.2. Ciclo evolutivo.....	6
2.3. O vetor.....	6
2.4. Reservatórios.....	8
2.4.1. Homem.....	8
2.4.2. Outros Mamíferos.....	8
2.5. A doença.....	9
2.5.1. Leishmaniose visceral humana (LVH).....	9
2.5.2. Leishmaniose visceral canina (LVC).....	10
2.6. Diagnóstico laboratorial.....	11
2.6.1. Métodos parasitológicos.....	11
2.6.2. Métodos moleculares.....	13
2.6.3. Métodos imunológicos.....	14
2.7. Epidemiologia.....	18
2.8. Controle e profilaxia.....	19
2.8.1. Encaminhamento para diagnóstico e tratamento.....	20
2.8.2. Inquérito sorológico canino.....	20
2.8.3. Apreensão e eliminação dos cães soropositivos.....	21
2.8.4. Borrifação de domicílios e seus anexos com inseticida residual.....	22

2.8.5. Vacina canina.....	22
2.8.6. Programas de educação comunitária.....	24
2.9. Vigilância epidemiológica.....	25
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>26</b>
<b>4. OBJETIVO.....</b>	<b>28</b>
4.1. Objetivo Geral.....	29
4.2. Objetivos Específicos.....	29
<b>5. METODOLOGIA.....</b>	<b>30</b>
5.1. Área e população do estudo.....	31
5.2. Desenho e delineamento do estudo.....	33
5.3. Aliqüotagem, codificação e conservação de amostras.....	34
5.4. Triagem sorológica.....	34
5.5. Confirmação diagnóstica.....	35
5.5.1. Reação de imunofluorescência indireta (IFI).....	35
5.5.2. Reação de Fixação do Complemento (RFC).....	35
5.6. Dosagem de IgG <sub>1</sub> e IgG <sub>2</sub> .....	37
5.6.1. Concentração do antígeno.....	37
5.6.2. Diluição do soro.....	38
5.6.3. Diluição do conjugado.....	38
5.6.3.1. Procedimento de ELISA.....	38
5.7. Definição de positividade.....	41
5.8. Retirada e sacrifício dos cães reativos.....	41
5.9. Processamento e Análise estatística dos dados.....	44
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
6.1. Censo da população canina.....	47

6.2. Positividade para anticorpos anti-lvc de acordo com as diferentes técnicas sorológicas.....	47
6.3. Distribuição espacial da infecção por LV.....	51
6.4. Prevalência da infecção por LV segundo características individuais dos cães.....	53
6.5. Prevalência da infecção por LV segundo sintomatologia.....	56
6.6. Distribuição espacial da sintomatologia.....	57
6.7. Frequência dos sinais clínicos e sua relação com a positividade para IgG1 e IgG2.....	59
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
7.1. Soroprevalência da leishmaniose visceral canina.....	65
7.2. Controle da leishmaniose visceral canina.....	71
7.3. Soroprevalência da leishmaniose visceral canina segundo padrão racial, sexo e idade.....	72
7.4. Prevalência da leishmania visceral canina relacionada ao quadro clínico observado.....	74
7.5. Níveis de IgG1 e IgG2 observados nas reações sorológicas relacionados aos sinais clínicos observados.....	75
7.6. Limitação do estudo.....	77
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>9. RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>82</b>
10.1. ANEXO 1: Ficha epidemiológica.....	83
10.2. ANEXO 2: ELISA.....	84
10.3. ANEXO 3: IFI kit- Bio-Manguinhos.....	87

<b>11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>90</b>
--	-----------

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência da distribuição, por localidade, do total de cães examinados nos distritos do município de Varzelândia , (MG) classificados por sexo e faixa etária.....	48
Tabela 2: Positividade para anticorpos anti-Leishmania Visceral Canina observada nas reações de ELISA e IFI, em cães procedentes da área rural do município de Varzelândia, Minas Gerais, em 2006.....	49
Tabela 3: Distribuição dos resultados obtidos pela ELISA cruzados com resultados positivos e negativos obtidos pela IFI.....	49
Tabela 4: Distribuição dos resultados sorológicos para LVC obtidos pelas técnicas de RFC cruzados com resultados obtidos por ELISA-BM/ IFI.-BM.....	50
Tabela 5: Prevalência do total de cães sororreativos para LVC levando-se em conta a localidade do município de Varzelândia-MG.....	51
Tabela 6: Tabela 6: Distribuição de cães infectados de acordo com o tipo de área geográfica.....	53
Tabela 7: Prevalência de LVC em relação ao tipo de pêlo do animal.....	54
Tabela 8: Prevalência da LVC em relação à idade.....	54
Tabela 9: Prevalência da LVC em relação ao sexo.....	55
Tabela 10: Prevalência da LVC, no município de Varzelândia-MG, relacionada com a ocupação canina (caça, guarda e/ ou companhia) local.....	55
Tabela 11: Distribuição dos cães segundo classificação da presença de sinais clínicos.....	56

Tabela 12: Distribuição dos cães relacionando clínica com método diagnóstico utilizado..	57
Tabela 13: Distribuição de cães nos distritos de acordo com a sintomatologia.....	58
Tabela 14: Tabela 14: Distribuição dos cães sororreativos de acordo com a área domiciliar e sintomatologia.....	59
Tabela 15: Prevalência dos sinais clínicos observados nos cães oligossintomáticos e sintomáticos.....	60
Tabela 16: Distribuição de sinais clínicos observados nos cães reativos para LV em relação á reatividade apresentada para IgG1 e IgG2.....	60
Tabela 17: Distribuição dos resultados da dosagem de anticorpos IgG1 realizada como sorologia o método de ELISA em relação à clínica observada em cães comprovadamente positivos do município de Varzelândia, MG.....	61
Tabela 18: Distribuição dos resultados da dosagem de anticorpos IgG2 realizada como sorologia o método de ELISA em relação à clínica observada em cães comprovadamente positivos do município de Varzelândia, MG.....	61
Tabela 19: Tabela 19: Resultados de ELISA para dosagem de IgG1 em relação IgG2 dos indivíduos assintomáticos pertencentes ao município de Varzelândia, MG.....	62
Tabela 20: Tabela 20: Resultados de ELISA para dosagem de IgG1 em relação IgG2 dos indivíduos oligossintomáticos pertencentes ao município de Varzelândia, MG.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de Minas Gerais com destaque para o município de Varzelândia localizado na região Norte deste estado.....	31
Figura 2: Cão sendo pesado e medido.....	33
Figura 3: Resultado das absorbâncias a 490nm obtidas pela reação de ELISA para amostras de soros caninos positivos e negativos para infecção por <i>L. chagasi</i> , ensaiadas em diferentes concentrações dos conjugados.....	40
Figura 4: Cão sendo anestesiado.....	42
Figura 5: Realização de punção cardíaca.....	42
Figura 6: Realização de punção medular.....	43
Figura 7: Retirada de parte de tecidos: baço e orelha.....	44
Figura 8: Mapa dos distritos de Varzelândia – MG com ênfase às localidades com LVC...	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac: anticorpos

Ag: antígenos

Ag. *L. major-like*: Antígeno bruto de *Leishmania major-like*

BM: Bio-Manguinhos

CCZ: Centro de Controle de Zoonoses

CO: *cut-off*

CN: Controle Negativo

DAT: Direct Agglutination Test

DO: Densidade Ótica

DP: Desvio Padrão

EIE-BM: Ensaio imunoenzimático produzido pela Bio-Manguinhos

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FAST: Fast Agglutination Screening Test

FML: fucose-manose ligante

HI: Hemaglutinação Indireta

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

ICM: Índice Comparativo de Morbidade

IgG: Imunoglobulina da classe G

IgG1: Imunoglobulina da subclasse G1

IgG2: Imunoglobulina da subclasse G2

LIT: Liver Infusion Triptose

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LV: Leishmaniose Visceral

LVA: Leishmaniose Visceral Americana

LVC: Leishmaniose Visceral Canina

LVH: Leishmaniose Visceral Humana

NNN: meio bifásico Neal, Novy & Nicole

OPD: Ortofenilenodiamino

PBS: Tampão Fosfato/ Salina

PBS-AE: Solução Salina Tamponada - Tween  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase  
PCLV: Programa de Controle da Leishmaniose Visceral  
RFC: Reação de Fixação do Complemento  
RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta  
SDPF: Soro Dessecado em Papel de Filtro  
SFM: Sistema Fagocítico Mononuclear  
TIHR: Testes Intradérmicos de Hipersensibilidade Tardia  
TMB: Tetrametilbenzidina  
TraLd: Teste Rápido Anti-*Leishmania donovani*  
VPP: Valor preditivo positivo  
ZC: Zona Cinza

## RESUMO

O Brasil é um país endêmico para a zoonose Leishmaniose Visceral (LV) e regularmente conduz programas epidemiológicos e de controle envolvendo tratamento de casos humanos, controle do inseto vetor e a retirada de cães infectados. A cidade de Varzelândia, Minas Gerais, Brasil está situada próxima à cidade de Montes Claros, que é área endêmica para esta doença. Inicialmente era uma doença de ocorrência exclusivamente rural, mas devido a alterações no meio ambiente, vem se expandindo para centros urbanos, principalmente na região Sudeste e Centro Oeste do Brasil. O cão possui papel fundamental tanto nessa urbanização quanto na manutenção da doença em determinada área, seja ela urbana ou rural. No município de Varzelândia foi realizado um estudo visando esclarecer a situação da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) quanto à prevalência, distribuição espacial e verificar a relação das imunoglobulinas IgG1 e IgG2 com a sintomatologia apresentada. A sorologia foi realizada utilizando três métodos diferentes (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA, Imunofluorescência Indireta - IFI e Reação de Fixação do Complemento - RFC). Foram coletadas amostras sanguíneas, por punção venosa, de 571 cães distribuídos em 12 localidades do município. A prevalência da Leishmaniose Visceral encontrada foi de 10,86% no município, 14,33% em área rural e 6,4% nos conglomerados especiais. Não foi encontrada correlação entre a infecção por LVC e tipo de pêlo (largo e curto), da idade do cão, do sexo e da ocupação apresentada pelo cão no domicílio. Cães assintomáticos foram os mais prevalentes (82,26%). Os sintomas relacionados com a doença observados foram: alopecia, ulceração, descamação, conjuntivite, emagrecimento e onicogribose, sendo esta última a mais freqüente. A resposta específica a anticorpos anti-IgG1 foi variável, não estando diretamente relacionada com nenhum grupo específico enquanto a resposta anti-IgG2 foi mais elevada em animais assintomáticos (64,58%).

## ABSTRACT

Brazil is an endemic country for zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL) and that regularly conducts prophylactics and epidemiologic control programs that involving treatment of human cases, insect vector control and the removal of seropositive infected dogs. Varzelândia City, in Minas Gerais State, Brazil is next to Montes Claros City that is endemic area for visceral leishmaniasis (VL). Initially it was exclusively an occurrence on rural area, but due to alterations of the environment, it has been if expanding on urban centers, mainly in the South-east area and Center West of Brazil. Dog possesses fundamental role as much in that urbanization as in the maintenance of the disease in urban or rural area. In the municipal district of Varzelândia was accomplished a study in search of to elucidate the situation of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) a prevalence, space distribution and to verify the relationship immunoglobulin of IgG1 and IgG2 with the presented symptom. The serology was accomplished using three methods different serological (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA, Immunofluorescence antibody test - IFAT e Fixation do Complement Reactor - RFC). Blood samples were collected, for veined puncture, of 571 dogs distributed in 12 locality of the town. The prevalence to found visceral leishmaniasis was found to 10,86% in the municipality, 14,33% in rural area and 6,4% in the spatial conglomerate. There was no correlation among infection of CVL and hair type (short-fir and long-fur), age of the dog, sex and occupation presented by the dog in home. Dogs asymptomatic infection was the most prevalence (82,26%). The symptoms related with the disease observed were: alopecia, ulceration, descamation, conjunctivitis, weigh loss and onicogrifose. While as the most frequent went to onicogrifose. Specific ab response antibodies anti-IgG1 was variable, not being directly related with any specific group and the answer anti-IgG2 was more elevated in animal asymptomatic (64,58%).

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença sistêmica causada por protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) distribuí-se em países tropicais e subtropicais. A LV é uma zoonose causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* que podem infectar tanto pessoas quanto animais domésticos e silvestres no Velho e Novo Mundo, respectivamente. Estima-se que, no mundo, ocorra 2.000.000 de novos casos anuais de Leishmaniose, sendo que destes, 1.500.000 são de Leishmaniose Cutânea e 500.000 de Leishmaniose Visceral Humana (LVH) (WHO, 2006).

No Brasil a LV é causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*, é transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e atinge 19 estados, possuindo uma média de 3000 novos casos por ano (SVS, 2003), com prevalência que varia de 1,9 a 35% em áreas endêmicas (Sherlock & Almeida, 1970; Coutinho *et al.*, 1985; Evans *et al.*, 1990; Nunes *et al.*, 1991; França-Silva *et al.*, 2002).

A infecção desencadeia no hospedeiro, uma forte resposta humoral com um marcado aumento de imunoglobulinas G (IgG) (Ghose *et al.*, 1980), tendo sido observado altos níveis de IgG2 em cães assintomáticos e altos níveis de IgG1 nos sintomáticos (Deplazes *et al.*, 1995; Nieto *et al.*, 1999 e Solano-Gallego *et al.*, 2001). No entanto, Leandro *et al.* (2001) e Cordeiro-da-Silva *et al.* (2003) observaram, ao contrário, altos níveis de IgG2 em animais sintomáticos. A gravidade da doença depende da cepa do parasita, estado imune e idade do hospedeiro, bem como a carga parasitária inoculada (Neves, 2005).

A LV ocorre tanto em áreas urbanas, periurbanas, quanto em áreas rurais e, nas últimas décadas, passou a ser um problema de saúde pública em várias cidades brasileiras (Arias *et al.*, 1996). E, neste aspecto, cães domésticos infectados possuem um importante papel na manutenção do ciclo da doença, pois atuam como reservatório do parasita (Deane & Deane, 1962; Quinnel *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2001). Segundo Molina *et al.* (1994) tanto cães sintomáticos quanto assintomáticos são passíveis de infectar o vetor, constituindo-se, portanto em importante fonte de manutenção do ciclo do parasita em áreas endêmicas.

Deste modo, a detecção precoce da infecção nesses animais, através de inquéritos sorológicos, é de fundamental importância para o controle da doença em áreas endêmicas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1. HISTÓRICO

A Leishmaniose Visceral (LV) foi descrita pela primeira vez na Grécia, em 1835, onde era denominada ponos ou hapoplinakon. Foi na Índia em 1882 que recebeu o nome Calazar (Kala-jwar ou Kalazar) que quer dizer febre negra devido ao discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (Marzochi *et al.*, 1981). Também possui outras designações como: febre Dum-Dum, Barriga-d'água, entre outras denominações regionais em áreas endêmicas (Altamirano-Enciso *et al.*, 2003).

Willian Leishman, em 1900, foi o primeiro a identificar protozoários no baço de um soldado que veio a óbito, na Índia em decorrência de uma febre local conhecida como Dum-Dum ou Kala-azar. Suas anotações foram publicadas em 1903 quando Charles Donovan identificou o mesmo protozoário em outro paciente. Em 1907, Patton observou as formas amastigotas em monócitos e as formas promastigotas no intestino de insetos que eram alimentados em pacientes com Calazar (Faust *et al.*, 1974). Charles Nicole em 1908 descreveu o papel do cão na epidemiologia da doença.

O primeiro caso brasileiro ocorreu em 1913 e foi diagnosticado por Migone no Paraguai. Tratava-se de um imigrante italiano que vivia em Santos, SP e adoeceu após ter viajado para o Mato Grosso (Alencar, 1977). Em 1926, foram descritos dois casos na Argentina. Pena, em 1934, iniciou os estudos sobre a distribuição da Leishmaniose Visceral nas Américas, quando comprovaram parasitologicamente 41 casos dentre 40.000 viscerotomias examinadas para febre amarela provenientes de vários estados brasileiros. Mas o primeiro caso diagnosticado em vida ocorreu em 1936. O agente etiológico foi identificado, no Brasil, em 1937 por Cunha e Chagas, que o denominaram por *Leishmania donovani chagasi*. E, até 1953, foram diagnosticados 43 casos em vida e mais de 300 por necropsia. Estes casos ocorreram principalmente no Ceará, o que levou a criação da “Campanha Nacional contra Leishmaniose Visceral”. Deane & Mangabeira, em 1954 incriminaram a *Lutzomyia longipalpis*, como responsável pela transmissão *L. (L.) chagasi* e a partir de 1957 propuseram o uso de DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) como combate ao inseto vetor.

Nas décadas de 50 e 60 a doença foi considerada endêmica no Brasil, compreendendo 90% dos casos notificados na América Latina. Na década de 70 iniciou-se processo de

urbanização em decorrência às precárias condições de vida das populações que viviam aos arredores das cidades. Nas décadas de 80 e 90 houve registro de epidemias e em 1999 e 2000, ocorreu um novo aumento do número de casos na região Nordeste na periferia de grandes cidades como Teresina – PI - (Werneck *et al.*, 2002), São Luiz – MA - (Nascimento *et al.*, 1996; Caldas *et al.*, 2001), Fortaleza (CE) e Salvador - BA - (Cunha *et al.*, 1995) e na região Sudeste Belo Horizonte (Silva *et al.*, 2001), Montes Claros (França-Silva *et al.*, 2003) e Araçatuba (Camargo-Neves *et al.*, 2001)..

## **2.2. O PARASITA**

### **2.2.1. Taxonomia**

Em 1903, Ross definiu a primeira classificação das leishmanioses e, em 1979, Lainson e Shaw, após revisão, propuseram um novo reagrupamento das espécies. Porém, a classificação taxonômica da espécie *Leishmania chagasi* segundo Levine *et al.*, 1980 é a seguinte:

Reino: Protista (Haeckel, 1886);

Subreino: Protozoa (Goldfuss, 1817);

Filo: Sarcomastigophora (Honiberg & Balamuth, 1963);

Subfilo: Mastigophora (Diesing, 1866);

Classe: Zoomastigophora (Calkins, 1909);

Ordem: Kinetoplastida (VickKerman, 1976);

Subordem: Trypanosomatina (Kent, 1880);

Família: Trypanosomatidae (Grobber, 1905);

Gênero: *Leishmania* (Ross, 1903);

Subgênero: *Leishmania* (Saf' Janova 1982);

Espécie: *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937).

Outra revisão baseada em características bioquímicas foi proposta por Kreutzer *et al.* (1987). Neste mesmo ano, Laison e Shaw propuseram uma subdivisão no gênero baseada no tipo de desenvolvimento no intestino do inseto vetor de modo que incluíram no

subgênero *Viannia* os parasitas que possuíam desenvolvimento peripilária e no subgênero *Leishmania* os que possuíam desenvolvimento suprapilária.

### **2.2.2. CICLO EVOLUTIVO**

As fêmeas de flebotomíneo, durante o repasto sangüíneo sobre o hospedeiro infectado, ingerem formas amastigotas. Nas primeiras vinte e quatro horas as formas ingeridas, transformam-se em promastigotas, que se reproduzem rápida e intensamente através de divisão binária. Inicialmente, o sangue ingerido juntamente com as formas em divisão vão para intestino médio do inseto, protegidos pela matriz peritrófica onde permanecem durante três dias. Após esse tempo, ocorre a degeneração da matriz peritrófica e as formas promastigotas migram para o segmento anterior do tubo digestivo onde sofrem mais divisões e diferenciação tornando-se promastigotas metacíclicas infectantes (Marzochi *et al.*, 1981). Durante os próximos dias os parasitas sofrem diferenciação se transformando em paramastigotas que migram para a região do esôfago e faringe onde se aderem ao epitélio por hemidesmossomas. Posteriormente, ocorre uma nova diferenciação para promastigotas. A intensa multiplicação provoca uma obstrução mecânica, dificultando a ingestão de sangue pelo inseto (Lainson & Shaw, 1978). Após cada novo repasto sangüíneo o relaxamento dos músculos responsáveis pela sucção provoca o refluxo dos parasitas, infectando o novo hospedeiro.

Ao serem inoculadas as formas promastigotas, ainda no local de inoculação, estas são endocitadas pelos macrófagos. Dentro do macrófago, assumem a forma amastigota e, através de mecanismo de escape, passam a multiplicar-se por divisão binária até provocarem o rompimento da célula, caindo no espaço intercelular, vindo a serem endocitadas por novos macrófagos e células do Sistema Fagocítico Mononuclear (S.F.M.). Assim, os parasitas deixam a pele, sendo disseminados para o S.F.M., provocando então as lesões que vão caracterizar a doença.

### **2.3. VETOR**

O parasita *L. (L) chagasi* é considerado digenético por necessitar obrigatoriamente de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado, neste caso, um flebótomo durante seu ciclo biológico. Os flebotomos são pequenos insetos alados, de cor amarela pálido, da ordem díptera e da família Psychodidae, subfamília *Phlebotominae*, sendo o *Lu. longipalpis* a principal espécie nas Américas (Rey, 2001). São encontrados durante todo o ano, mas devido a uma variação sazonal, a densidade do *Lu. longipalpis* é maior nos períodos de abril a junho e de outubro a dezembro (Sherlock, 1996), podendo esse período variar de região para região.

O ciclo biológico do vetor se dá no ambiente terrestre, passando por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto, sendo aproximadamente 30 dias o período necessário para que o ovo se transforme em fase adulta. Os insetos adultos vivem em torno de 20 dias, sendo as fêmeas dos flebotomínios hematófogas, pois necessitam do sangue para amadurecimento dos ovários. Os ovos, normalmente, são depositados em fendas, galhos e sobre matéria orgânica com pouca umidade, os quais permanecem aderidos devido a uma substância viscosa que é liberada na desova (Rey, 1991). A postura dos ovos ocorre aproximadamente oito dias após o repasto sanguíneo.

Por serem largamente encontradas no ambiente silvestre (Lainson *et al.*, 1990), até bem pouco tempo, a *Lu. longipalpis* era incriminada como sendo a única espécie de flebotomínio responsável pela transmissão natural da leishmaniose no Brasil. Porém, Santos *et al.* (1998) após estudos em Corumbá (MS), incriminou a *Lu. chagasi* como uma nova espécie vetora. Marzochi *et al.* (1994) sugeriram que, nas áreas litorâneas no estado do Rio de Janeiro, a *Lu. intermedia* teria também um papel importante na transmissão da doença.

A *Lu. longipalpis* possui hábito alimentar crepuscular e noturno, podendo picar o homem tanto no domicílio como fora dele (Deane & Deane, 1962). Sua atividade começa logo ao entardecer, atingindo seu pico entre 21 e 23 horas e desaparece em torno das 5 horas da manhã. Dentro das residências, fêmeas podem ser encontradas mais tarde nas paredes sombrias dos quartos ou sobre quadros e frestas (Sherlock & Guitton, 1969b). Em situação de laboratório, o inseto se alimenta a qualquer hora do dia (Sherlock & Sherlock,

1961). Os machos ao contrário das fêmeas se alimentam apenas de seiva vegetal (Rey, 1991).

## **2.4. Reservatórios**

### **2.4.1. Homem**

Em 1954, Deane & Deane levantaram a possibilidade do em homem funcionar como reservatório da *L. (L.) chagasi*, porém em 1955 eles perceberam que pela escassez de parasitas na pele, comparado com cães e raposas, o homem não seria um bom reservatório e raramente serviria de fonte de infecção para flebotomíneos. Por outro lado, Badaró *et al.* (1986) contestam esta possibilidade uma vez que segundo ele, em regiões endêmicas a proporção de indivíduos assintomáticos chega a seis para cada pessoa sintomática. No entanto, Roçado (1997) demonstrou a pouca importância do homem como reservatório, e após examinar 360 indivíduos, aparentemente saudáveis, observou uma taxa de 2,8% de assintomáticos.

### **2.4.2. Outros Mamíferos**

Na natureza, a *L. (L.) chagasi* é transmitida ao hospedeiro vertebrado pela fêmea de *Lu. longipalpis* infectada durante o repasto sanguíneo. No domicílio e peridomicílio elas se alimentam no cão, na galinha, em equídeos, suínos e caprinos (Sherlock & Guitton, 1969a) deste modo, é geralmente encontrada em chiqueiros, galinheiros e estábulos (Souza *et al.* 1981).

Como também habita o interior da floresta (Lainson *et al.*, 1990), pode realizar seu repasto sanguíneo em marsupiais (Corredor *et al.*, 1989, Travi *et al.*, 1996) e canídeos silvestres, como, a raposa (*Dusicyon vetulus* e *Cerdoyium thous*) (Deane & Deane, 1954a;

Silveira *et al.*, 1982; Silva *et al.*, 2000; Lainson *et al.*, 1969, 1987<sup>a</sup> 1990; Mello *et al.*, 1988) o que torna possível a manutenção da *L. (L.) chagasi* através de um ciclo enzoótico.

Os marsupiais freqüentemente vêm sendo apontados como passíveis de infecção por *L. (L.) chagasi* (Corredor *et al.*, 1989; Travi *et al.*, 1994; Travi *et al.* 1996). São encontrados em florestas que foram alteradas pelo homem e em peridomicílios próximos a matas, aonde vão freqüentemente à procura de alimentos. Seu comportamento sinantrópico e o seu pequeno raio de deslocamento (Novak, 1991) tornam possível o compartilhamento de parasitas e vetores com o homem e cães. Estudos observaram que estes animais servem de alimentos tanto pela *Lu. longipalpis* no Brasil (Sherlock *et al.*, 1984), como pela *Lu. evansi* na Colômbia (Travi *et al.*, 1994).

## **2.5. A DOENÇA**

### **2.5.1. Leishmaniose visceral humana (LVH)**

A Leishmaniose Visceral Humana é uma doença crônica, debilitante caracterizada pela infecção do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM). A infecção é expressa por episódios febris associados a hepatoesplenomegalia grave, emagrecimento, anemia, micropoliadenia, podendo ocorrer manifestações intestinais e fenômenos hemorrágicos. A doença leva a um quadro de emagrecimento progressivo, edema, alterações na queda dos cabelos e outras manifestações associadas (Marzochi *et al.*, 1981).

Sabe-se que a desnutrição é um importante fator para o desenvolvimento de doenças parasitárias, entre elas a LVH (Harisson *et al.*, 1986; Pearson *et al.*, 1992). Cerf *et al.* (1987) buscando a associação entre a desnutrição e a LVH, através de um estudo prospectivo realizado no estado da Bahia, demonstraram que o risco relativo de desenvolver a forma grave da LVH era 8,7 vezes maior entre crianças com desnutrição grave do que entre aquelas com um status nutricional considerado normal. Apesar de não estar determinada à relação causal entre esses dois fatores, as evidências sugerem que a desnutrição venha resultar em uma resposta imune deficiente e predisponente. Do mesmo modo, foi verificado que crianças desnutridas, além de possuírem uma maior predisposição

à doença, também apresentam respostas deficientes aos testes intradérmicos de hipersensibilidade tardia (TIHR) (Salimonu *et al.*, 1982).

Nos adultos, a LVH ocorre, principalmente, como doença oportunista em pacientes imunossuprimidos de áreas endêmicas (Badaró *et al.*, 1986; Altes *et al.*, 1991; Gradoni *et al.*, 1993). Montalbán *et al.* (1989), estudando o comportamento da LVH entre pacientes imunodeprimidos pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), e por outras causas, observou algumas diferenças: pacientes portadores do HIV não apresentavam elevados títulos de anticorpos anti-LVH pela imunofluorescência durante as recidivas ou ainda no curso crônico da doença, enquanto pacientes imunodeprimidos não-HIV mantinham significantes títulos de anticorpos anti-LVH, o que poderia ser explicado pela disfunção dos linfócitos B e T nos portadores do HIV, que compromete a produção de anticorpos específicos. Outra diferença existente entre os dois grupos de imunossuprimidos é que dentre os pacientes não-HIV, em somente 10% a doença recidiva ou cronifica, enquanto que nos pacientes HIV as recidivas são bem mais frequentes (44%), seguidas da resistência do protozoário ao tratamento pelo antimonial pentavalente. As recidivas e a resistência à droga podem ser atribuídas aos mecanismos celulares de defesa já alterados pela infecção pelo HIV.

### **2.5.2. Leishmaniose visceral canina (LVC)**

Nos cães esta é uma doença sistêmica crônica que pode levar o animal à morte. A sintomatologia apresentada depende do tipo de resposta imune expressa pelo animal infectado. O diagnóstico clínico baseado na sintomatologia característica é difícil de ser realizado, pois a doença no cão possui evolução lenta, sendo grande o número de cães sem nenhum sinal (Alvar *et al.*, 1997). Do mesmo modo que em humanos, os sinais são apenas presuntivos, pois podem ser confundidos com outras patologias e quadros de desnutrição. Mesmo em cães de áreas endêmicas, tornam-se necessária à utilização de métodos laboratoriais, a fim de identificar, com maior segurança, os cães infectados.

De um modo geral, os sinais são lesões cutâneas, principalmente eczemas e descamações, localizadas em particular no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras rasas,

localizadas mais freqüentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações e pêlo opaco. Nas fases mais adiantadas da doença, observa-se, com grande freqüência, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarréia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além da hiperqueratose. Na fase final da infecção, ocorrem em geral a paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte.

Para avaliação clínica sugerida por Mancianti *et al.*, (1988) a LVC pode ser diferenciada em três formas clínicas, baseadas nas características observadas no cão infectado:

- Assintomáticos: ausência de sinais clínicos sugestivos da doença.
- Oligossintomáticos: presença de no máximo três sinais clínicos da doença, incluído pêlo opaco e/ ou alopecia localizada e/ ou perda moderada de pêlo.
- Sintomáticos: todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, perda severa de peso, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores e apatia.

## **2.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

Os exames laboratoriais são indispensáveis para o diagnóstico seguro de LVC. Estes compreendem métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares. Apesar dos avanços ocorridos nesta área nos últimos anos, nenhum deles apresenta 100% de sensibilidade e especificidade.

### **2.6.1. Métodos parasitológicos**

O método de certeza da infecção é o exame direto realizado pela visualização do parasita *L. (L.) chagasi*. Os parasitas, quando presentes, são visualizados em esfregaços e corte de tecidos, tratados com corantes derivados de Romanowski – como Leishman e Giemsa, em isolamento por cultura ou em inoculação em animais.

Os órgãos geralmente pesquisados são o baço (Giraud & Cabassu, 1933), linfonodos (Giraud & Cabassu, 1936), medula óssea (Girud & Cabassu, 1933; Alencar *et al.*, 1956), fígado (Giraud & Cabassu, 1933; Chagas *et al.*, 1938; Deane & Deane, 1954, 1955, 1955a; Brener, 1957) e pele (Giraud & Cabassu, 1932; Alencar *et al.*, 1956; Brener, 1957).

Lépine & Bifilger (1936) demonstraram o maior índice de positividade para o exame de material derivado da punção de medula óssea (90%), quando comparados com aspirados esplênicos (76,3%) e de punção hepática (38,1%). Brener (1957) observou um índice de positividade maior no material oriundo da pele do que o obtido na punção hepática. Siddid *et al.* (1988) encontraram maior índice de positividade por punção esplênica (98%) em relação à medula óssea (54 a 86%) e linfonodos (64%).

Entretanto, segundo Brener (1957), dificilmente pode se comparar resultados obtidos por diferentes autores devido à falta de uniformidade entre as diferentes técnicas empregadas. Mas, entre os autores há um consenso em relação ao baixo índice de positividade obtido por punção esplênica. Assim, tendo em vista a simplicidade operacional da biópsia de pele associada a bons índices de positividade, esta técnica tem sido mais utilizada que exames de material hepático e esplênico.

A cultura de material oriundo de biópsia, associada a exames de cortes e esfregaços de tecidos, aumenta sensivelmente os índices de positividade. A cultura, geralmente é realizada em meio bifásico Neal, Novy & Nicole (NNN) / Liver Infusion Triptose (LIT) (Mayrink, 1967), com temperatura entre 23°C e 26°C. Genaro *et al.* (1988) destacaram que a mielocultura é capaz de fornecer uma maior positividade que o mielograma e o exame de pele.

Uma alternativa usada a fim de melhorar a sensibilidade é a inoculação do material de punção de fígado, baço e medula óssea em hamsters (*Mesocricetus auratus*), facilitando o isolamento do parasito. Entretanto, esta técnica possui pouco valor prático como diagnóstico devido ao custo elevado, tempo exigido para sua realização e o avanço de novas técnicas; no entanto, é muito útil no isolamento do parasito, a partir de amostras sanguíneas positivas, tanto de seres humanos como de outros reservatórios (Guia de Vigilância Epidemiologia vol II, 2002).

Porém, métodos parasitológicos, na grande maioria das vezes, não podem ser utilizados devido ao seu caráter invasivo, devendo ser realizado em local apropriado devido ao risco de complicações, sendo impraticáveis em programas de saúde pública. Também há dificuldades operacionais e o custo envolvido, além de menor aceitação por parte dos donos de cães e dificuldade de identificar cães que apresentam discreto parasitismo e/ ou infecções no período pré-patente (Brener, 1987).

### 2.6.2. Métodos moleculares

Com o progresso da Biologia Molecular e o advento da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR - (Saiki *et al.*, 1985) por ser um método sensível e eficaz tornou possível a detecção do DNA do parasito em tecidos. Rodgers *et al.* (1990) demonstraram que a técnica de PCR é capaz de detectar o DNA de um parasito e, a partir de então, passou a ser utilizada no diagnostico da LV (Cupollillo *et al.* 1994; Degrave *et al.*, 1994), constituindo o principal método molecular, sendo validada para a pesquisa de DNA de *Leishmania* em diferentes materiais biológicos: pele (Rodrigues *et al.*, 1994; Mathis & Deplazes, 1995), medula óssea (Osman *et al.*, 1997; Mathis & Deplazes, 1995; Silva *et al.*, 2001a), sangue (Osman *et al.*, 1997; Campino *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001a) e linfonodo (Osman *et al.*, 1997). E relataram diferente sensibilidade para PCR: Mathis & Deplazes, (1995), 100%; Osman *et al.*, (1997) 52,2% em linfonodo, 66,7% na medula óssea e 70% em amostras sanguíneas; Roura *et al.*, (1999) 97,8% na medula óssea; Silva *et al.*, (2001a) 50,36% em amostras sanguíneas, que variam de acordo com o local em que a amostra foi coletada e a metodologia utilizada.

Utilizando amostras de pacientes com suspeita clínica de LV, nos quais não foi possível demonstração da infecção por microscopia direta, Osman *et al.* (1997) encontraram positividade em 52,2% utilizando aspirados de linfonodos, 66,7% com aspirado de medula óssea e 19% utilizando amostras sanguíneas.

Porém, quando utilizadas amostras de pacientes com diagnóstico parasitológico confirmado, a sensibilidade da PCR e da microscopia direta para aspirado de medula e linfonodos foram equivalentes. Ashford *et al.* (1995), avaliando a PCR em hamsters,

encontraram 100% de especificidade e sensibilidade, porém, os próprios autores afirmam que tal porcentagem não condiz com a realidade devido à presença de resultados tanto falso positivo, quanto falso negativo. A maior causa de resultados falsos positivos é a contaminação com outras amostras ou ainda com “amplicons” (produtos amplificados pós PCR) enquanto as causas dos resultados falsos negativos são decorrentes da possível presença no material em teste de substâncias como o fenol que pode inibir total ou parcialmente a reação de amplificação pelo DNA polimerase (Degrave *et al.*, 1994). Roura *et al.* (1999), utilizando aspirado de medula óssea, encontraram 97% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Apesar da PCR se mostrar potencialmente sensível e específica, o elevado custo de execução, necessidade de equipamentos sofisticados e a inadequação para condições de campo limitam sua utilização na rotina. (Reed, 1996).

### **2.6.3. Métodos imunológicos**

O diagnóstico imunológico caracteriza-se por ser feito a partir de métodos indiretos, assim chamados por não ser possível a visualização do parasito. A intensa produção de anticorpos, principalmente IgG e IgM (Tanner, 1996), causada pelo parasitismo, devido à expressão policlonal de linfócito B, faz com que os métodos sorológicos sejam amplamente utilizados e os torna de grande confiabilidade, tanto para o diagnóstico individual da doença, quanto para aplicação em inquérito epidemiológico (Magalhães *et al.*, 1980; Kar, 1995).

Os inquéritos sorológicos apresentam como vantagem o fato do procedimento para a coleta amostral ser menos invasivo. Do mesmo modo, é possível a identificação de casos assintomáticos, o que possibilita tratamento precoce em humanos e a eliminação precoce de cães infectados. Entretanto, estes testes apresentam como desvantagem a possibilidade de reação cruzada com *Trypanosoma cruzi*, dificultando a interpretação dos inquéritos epidemiológicos para LVC, uma vez que é comum a superposição geográfica das duas endemias (Camargo & Rebonato, 1969; Costa *et al.*, 1991). Portanto, no diagnóstico sorológico da LV é necessário considerar o diagnóstico diferencial com outras doenças.

Atualmente, são utilizadas várias técnicas para diagnóstico sorológico, tais como, Reação de Fixação do Complemento – RFC – (Nussenzweig, 1957); Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI – (Duxbury & Sadun, 1964); Hemaglutinação Indireta –HI – (Bray & Lainson, 1967); Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA - (Hommel, 1976; Hommel *et al.*, 1978); Direct Agglutination Test – DAT - (Harith *et al.*, 1986) e mais recente o Fast Agglutination Screening Test – FAST - (Schoone *et al.*, 2001) e o Teste Rápido Anti-*Leishmania donovani* - TraLd – (Badaró, 1996).

A RFC foi utilizada pela primeira vez em 1938 para o diagnóstico de LVH. Em 1957, Brener, utilizando como antígeno o bacilo da tuberculose, padronizou a reação para uso em inquéritos caninos. Esta técnica passou a ser amplamente difundida após a demonstração da possibilidade de sua realização em eluatos obtidos de papel de filtro (Nussenzweig *et al.*, 1957). Contudo, se tornaram limitadas devido às reações cruzada em títulos baixos com a Doença de Chagas e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (Nussenzweig, 1957; Pelegrino & Brener, 1958) e pela dificuldade de padronização de reagente prejudicando sua reprodutibilidade. Após o advento da RIFI, sua utilização passou a ser paulatinamente diminuída. Nos casos de LV são observados altos títulos de anticorpos no soro, geralmente superiores a 1:80, sendo que títulos inferiores a este necessitam de confirmação por outro método diagnóstico (Genaro, 2000).

A reação de IFI, descrita pela primeira vez em 1964 por Duxbury & Sadun, apresenta para amostras de soro, sensibilidade entre 90 a 100% e, especificidade aproximada de 80% (Mohammed *et al.*, 1986; Harith *et al.*, 1987). A baixa especificidade apresentada é devida a reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos (Mohammed *et al.*, 1986; Costa *et al.*, 1991). Apesar das reações cruzadas com Leishmaniose Tegumentar, Doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (Sundar & Raí, 2002) serem uma das principais limitações desta técnica devido à presença de resultado falso positivos para LV em humanos (Shaw & Voller, 1964; Camargo, 1966; Araújo & Mayrink, 1968; Camargo & Rebonato, 1969) e em cães (Costa *et al.*, 1991), é amplamente utilizada em inquéritos epidemiológicos (Iverson *et al.*, 1983; Marzochi *et al.*, 1985; Coutinho *et al.*, 1985; Abranches *et al.*, 1991; Costa *et al.*, 1991). O Ministério da Saúde recomenda seu uso em inquéritos sorológicos caninos amostrais e censitários, para confirmação de resultados sororeagentes no teste de ELISA ou ainda, como método sorológico de rotina

(MS, 2003). Apesar disto, reúne uma série de vantagens como: ser fácil a execução e a obtenção do antígeno, rápido, barato, apresentar sensibilidade e especificidade satisfatórias, sendo possível a padronização dos kits e realização do controle de qualidade por um laboratório central e apresentar sensibilidade superior a RFC (Mayrink *et al.*, 1967; Mansueto *et al.*, 1975).

O teste de ELISA foi descrito em 1971 (Engvall & Perlman, 1971), sendo que em 1976 (Hommel, 1976) foi introduzida no diagnóstico das leishmanioses. É o teste mais utilizado para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral, por ser automatizado, rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI. O teste é sensível permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (El-Amin *et al.*, 1986). Funciona bem para diagnóstico de LV canina (Evans *et al.*, 1990), assim, está sendo amplamente utilizada em inquéritos caninos (Ashford *et al.*, 1992).

A necessidade de uma técnica que tivesse alta sensibilidade e especificidade fez surgir, a partir da década de 70, variações da reação de ELISA, tais como: Dot-ELISA, FML-ELISA, BSM-ELISA, FAST-ELISA, micro-ELISA entre outras (Hommel *et al.*, 1978; Pappas *et al.*, 1983; Hockmeyer *et al.*, 1984; Pappas *et al.*, 1984; Nurit-Rachamin & Jaffe, 1988; Scott *et al.*, 1991; Cabrera, *et al.*, 1999; Chatterjee *et al.*, 1999).

O DAT, método alternativo para diagnóstico, foi descrito pela primeira vez em 1975 e, no final da década de 80, foi adaptado para diagnóstico humano e canino (Safi & Evans, 1989). Quando comparado com RIFI e ELISA, demonstrou possuir sensibilidade e especificidade inferior (Harith *et al.*, 1986; 1987; Montijn & Harith, 1987). Tem mostrado em vários estudos sensibilidade de 91 a 100%. A técnica combina altos níveis de validade intrínseca, facilidade de execução e baixo custo, embora apresente tempo prolongado de incubação (18 horas), problemas do antígeno e não tem valor no prognóstico da doença (Boelaert *et al.*, 1999).

O FAST é uma variação do DAT, que foi desenvolvida em 2001, (Schoone *et al.*, 2001). É um teste rápido, com reduzido tempo de incubação (3 horas) e vem sendo testada para aplicabilidade em situações epidêmicas e para inquéritos populacionais (Schoone *et al.*, 2001). O FAST, assim como o DAT, pode ter sua reprodutibilidade facilmente

comprometida por pequenas variações técnicas e a difícil padronização de reagentes o que dificulta o controle de qualidade e a comparabilidade de resultados de diferentes laboratórios.

O TraLd é um teste imunocromático simples e rápido, baseado na reação do soro ou sangue do paciente, que foi desenvolvido utilizando o rK39 fixado em papel (Reed *et al.* 1990). O rK39 é um antígeno recombinante específico para espécies do complexo *L. donovani*, que possui uma unidade repetitiva de 39 aminoácidos de formas amastigotas de *L. chagasi* (Badaró *et al.*, 1996). Este antígeno quando empregado no ELISA mostrou 100% de especificidade e 98% de sensibilidade (Burns *et al.*, 1993). Uma importante vantagem desse antígeno é que quando utilizado em paciente co-infectado com HIV, com o sucesso do tratamento para leishmaniose, os níveis de anticorpos contra rK39 declinam rapidamente (Houghton *et al.*, 1998). Este teste mostrou 100% de sensibilidade quando aplicado na Índia (Sundar, *et al.*, 2002) e 67% no Sudão (Zijlstra *et al.*, 2001). O TraLd pode apresentar reação cruzada com malária, febre tifóide e tuberculose. No Brasil quando aplicada em cães de área endêmica apresentou 92% de sensibilidade e 99,5% de especificidade, e não foi capaz de detectar infecções de animais com títulos de RIFI entre 1:40 e 1:320 (Genaro *et al.*, 1997). Apesar das limitações apresentadas, o teste parece ser promissor para uso em programas de saúde pública, pois requer pequena quantidade de sangue, a execução e leitura se fazem em torno de 10 minutos e pode ser utilizada em condições de campo. Recentemente o teste foi modificado, sendo acrescentando o antígeno rK26, que também reconhece anticorpos específicos do complexo *L. donovani* (Tavares *et al.*, 2003) e após esta modificação, os indivíduos assintomáticos que se apresentavam negativos ao rK39 mostraram-se positivos com o rk26, aumentando a sensibilidade do teste (Nakatani *et al.*, 2001).

A utilização de antígenos recombinantes ou purificados, melhoram tanto a especificidade, quanto à sensibilidade do método, porém, não descarta a possibilidade de reações cruzadas com patologias causadas por outros tripanossomatídeos (Mohammed *et al.*, 1986; Jaffe & Zalis, 1988; Badaró *et al.*, 1996; Ozenzoy, 1998).

A detecção de antígenos de parasitas é um método ideal principalmente quando os níveis de anticorpos circulantes são baixos, como no caso dos imunossuprimidos. O

complexo antigênico fucose-manose ligante (FML), descrito para o complexo *Leishmania donovani* foi testado no diagnóstico e prognóstico do calazar humano e canino. O maior componente do antígeno, uma glicoproteína de 36KDa-GP36, produz 100% de sensibilidade e 96% de especificidade, quando usado no teste de ELISA. Por se tratar de um complexo de glicoproteínas de superfície, o antígeno possui alta estabilidade, o que o torna um bom candidato para trabalhos em larga escala (Palatinick *et al.*, 1995). Entretanto, a pesquisa de antígenos em soro de pacientes com altos níveis de anticorpos é dificultada pela presença de imunocomplexos, fatores reumatóides e autoanticorpos, diminuindo a especificidade do teste.

## 2.7. EPIDEMIOLOGIA

A LV ocorre em vários países da América, do México ao norte da Argentina, e em algumas das ilhas do Caribe, como Guadalupe e Martinica (Lainson & Shaw, 1987),

A LV foi inicialmente identificada nas áreas rural, geralmente em sopés de serra ou vales, onde a densidade vetorial se encontrava aumentada (Deane, 1956), e em regiões urbanas, apesar de em menor escala (Deane & Deane, 1955; Brener, 1957). Posteriormente, novos focos de transmissão urbana foram descritos, caracterizando um processo de urbanização e de expansão da doença (MS, 1984; Marzochi *et al.*, 1983; 1985; 1987; Genaro *et al.*, 1990; Jerônimo *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1997; Tavares, 2000; Oliveira *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001; Profeta-Da-Luz *et al.*, 2001).

Esta urbanização começou a ocorrer a partir da década de 70 em associação com as precárias condições de vida das populações afetadas. A doença é cíclica e vem apresentando tendências ascendentes, com registros de epidemias nas décadas de 80 e 90. Novo aumento ocorreu entre 1999 e 2000, com cerca de 4000 casos anuais, 85% deles situado na região Nordeste principalmente na periferia de grandes cidades como Teresina – PI - (Werneck *et al.*, 2002), São Luiz – MA - (Nascimento *et al.*, 1996; Caldas *et al.*, 2001), Fortaleza (CE) e Salvador - BA - (Cunha *et al.*, 1995). Na Região Sudeste a prevalência apresentava-se em torno de 4%, ocorrendo em alguns centros urbanos, como Araçatuba (SP), Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG) e Montes Claros (MG) (Marzochi *et al.*,

1994; Tesh, 1995 e Funasa, 2001; França-Silva *et al.*, 2003). Essa urbanização da doença é facilitada pela degradação de matas nativas, migração de população rural para grandes cidades, onde, em sua maioria vivem na periferia em associação a precárias condições socioeconômicas e adaptação de determinados flebotômíneos ao ambiente alterado pelo homem (Gomes, 1994; Vieira & Coelho, 1998; Santos *et al.*, 2000).

Em áreas em que a endemia ocorre há muito tempo, a doença acomete principalmente crianças com idade inferior a dez anos ou eventualmente adultos portadores de outras patologias imunossupressoras. Em áreas onde a endemia é recente observa-se uma diferença menor na frequência do acometimento entre adultos e crianças. (Marzochi *et al.*, 1985a). Porém, de um modo geral, a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) predomina em crianças (Vieira & Coelho, 1998), reforçando a importância da transmissão peridomiciliar.

Os cães são os principais responsáveis pela manutenção da transmissão domiciliar e peridomiciliar devido ao elevado parasitismo cutâneo (Deane, 1956). Muitos pesquisadores têm concentrado esforços na identificação dos fatores de risco de infecção para a população canina. Em relação à idade dos cães, está bem estabelecido na literatura que a prevalência é superior em animais de idade avançada (Alencar & Cunha, 1963; Abranches *et al.*, 1991; Sideris *et al.*, 1996). O sexo do animal não interfere no risco de contrair a doença (Alencar & Cunha, 1963; Cabrera *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2004). Em relação à raça, não há nenhum padrão estabelecido, havendo muitas discordâncias entre diversos autores (Pozio *et al.*, 1991; Sideris *et al.*, 1996; França-Silva, 1997). Entretanto, cães de trabalho, por dormirem fora de casa e muitas vezes permanecerem longos períodos próximos a matas, estão mais susceptíveis a picadas do inseto vetor (Dye *et al.*, 1992). No que se refere ao tipo de pêlo, observou-se que a pelagem curta facilita o repasto sanguíneo de flebotômíneos, tornando cães com este fenótipo mais propensos à LVC, quando comparados com cães de pêlos longos (França-Silva *et al.*, 2003).

## **2.8. CONTROLE E PROFILAXIA**

Há três elos nos quais são focadas as medidas de controle para a doença: o cão – reservatório; o flebotômico – inseto vetor; o homem – indivíduo susceptível (Marsochi, 1992), deste modo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza cinco medidas básicas de controle para a LVA (WHO, 1996), que devem ser desempenhadas simultaneamente para a efetividade do programa de controle: 1- encaminhamento para diagnóstico e tratamento de pacientes suspeitos; 2- inquérito sorológico canino; 3- apreensão e eliminação dos cães soropositivos; 4- borrifação de domicílios e seus anexos com inseticida residual e 5- vacina canina. E, mais recentemente vem dando maior ênfase á questão do manejo ambiental que, por estar alterando as matas nativas, pode estar também alterando o ciclo silvestre do vetor.

### **2.8.1. Encaminhamento para diagnóstico e tratamento de pacientes suspeitos**

Todo indivíduo proveniente de área endêmica que apresentar febre por mais de duas semanas deve ser encaminhado para realização do diagnóstico sorológico e/ou parasitológico para LVA. Os casos positivos devem receber assistência médica, sendo os casos graves internados e tratados em hospital de referência e os casos leves assistidos em nível ambulatorial. Quando sororreativo, um agente de saúde é encaminhado ao seu domicílio para coleta de amostras de sangue dos outros moradores e também dos cães nos arredores. Em situações de surtos, é importante a realização de busca ativa (MS-FUNASA, 2002).

### **2.8.2. Inquérito sorológico canino**

Os inquéritos sorológicos caninos, utilizando a IFI e/ou ELISA, devem ser realizados em áreas consideradas de risco de transmissão, devendo-se estabelecer previamente a delimitação da área no município a ser submetida ao inquérito. Esta delimitação deve-se basear em critérios epidemiológicos, como presença do vetor, ocorrência de casos humanos, presença de reservatórios infectados, detectados em inquéritos realizados

anteriormente, além de indicadores sócio-econômicos e ambientais que devem ser construídos para cada área de risco. Tais procedimentos visam priorizar a avaliação de áreas de risco no intuito de caracterizar e localizar os focos de transmissão.

Os cães soropositivos ou com manifestações clínicas da doença devem ser eutanasiados.

### **2.8.3. Apreensão e eliminação dos cães soropositivos (WHO, 1990; 1996)**

A tentativa de tratamento de cães com antimonial pentavalente não se mostrou eficaz (Alencar, 1959; Alvar *et al.*, 1994), assim no Brasil, os órgãos de saúde pública não autorizam o tratamento de cães infectados com LVA. Isto porque os cães quando tratados, mesmo que apresentem remissão dos sinais clínicos, estão sujeitos a recidivas, além da possibilidade de seleção de cepas resistentes às drogas (Gramiccia *et al.*, 1992) empregadas nos protocolos de tratamento de casos humanos (MS, 2003). Também foi observado que cães assintomáticos se tornaram oligossintomáticos ao final do tratamento com antimonial pentavalente (Mancianti *et al.*, 1988). Além disso, Alvar *et al.* (1994) observaram que mesmo após a quimioterapia todos os cães infectados com *L. chagasi*, foram capazes de infectar flebotômíneos e em muitos casos ocorreu aumento da infectividade (Marsochi *et al.*, 1985b; Gradoni *et al.*, 1987). Medicamentos como o Berenil, a base de diaminas aromática que atuam sobre o DNA do parasita, estão sendo testados (Portugal, 1994), bem como o Alopurinol, que demonstrou regressão da sintomatologia clínica, no entanto, não foi capaz de reduzir os níveis de anticorpos circulantes (Liste & Gascon, 1995).

Assim, torna-se necessário a eliminação dos cães infectados, esperando que com essa conduta o ciclo peridomiciliar da doença seja interrompido. Porém, esta medida de controle tem sido questionada por alguns autores (Evans *et al.*, 1992; Paranhos-Silva *et al.*, 1996; D'Oliveira Jr. *et al.*, 1997; Dietze *et al.*, 1997; Ashford *et al.*, 1998). Dietze *et al.* (1997), em estudo prospectivo de intervenção realizado no Estado do Espírito Santo, não observaram eficácia da retirada dos cães infectados em três cidades endêmicas para LVA, separadas entre si por barreira geográfica (montanhas). Na cidade controle, os cães não foram sacrificados e, nas outras duas cidades realizou-se o recomendado pela OMS e,

durante 12 meses as três cidades foram monitoradas encontrando taxa de soropositividade humana aumentada de 14% para 54% na cidade controle e 15% para 54% nas cidades sob intervenção. Em 1998, na Bahia, Paranhos-Silva *et al.* realizando um estudo de coorte para avaliar o efeito da migração canina sobre a incidência da LVA, demonstrou um considerável aumento no número de notificações de casos humanos nos anos seguintes ao estudo, apesar de todos os cães sororreagentes terem sido eliminados da área de estudo. Também neste mesmo ano, Vieira & Coelho não encontraram correlação entre os casos humanos e caninos de LVA. Por outro lado, Oliveira-Lima *et al.* (1996); Oliveira *et al.* (2001) e Margonari *et al.* (2004) observaram uma nítida relação entre os casos caninos e humanos.

Apesar desses resultados contraditórios o Ministério da Saúde tem recomendado que medidas de controle relacionadas ao cão devam receber atenção especial, tais como captura e eliminação de cães errantes e uso de telas em canis (MS, 2003). Outra medida com uso de coleiras de deltametrina para proteção individual do cão contra a picada de *Lu. longipalpis* e *Lu. migonei* tem demonstrado ser bastante eficaz mesmo em cães expostos a intempéries, como sol e chuva por até 20 semanas (Killick-Kendrick *et al.*, 1997; David *et al.*, 2001).

#### **2.8.4. Borrifação de domicílios e seus anexos com inseticida residual**

Esse procedimento também se encontra entre as medidas do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) elaborado pelo Ministério da Saúde (MS, 2003). O estudo das populações de flebotomíneos, incluindo a dinâmica sazonal da densidade populacional, o grau de antropofilia e de zoofilia das espécies, bem como a importância das diferentes espécies na transmissão, constituem fatores a serem considerados para o sucesso do programa de controle (Marzochi, 1992; Dye, 1996). Assim, estes fatores devem ser analisados no planejamento da aplicação de inseticidas de efeito residual no ambiente domiciliar e em seus anexos, tais como galinheiros, chiqueiros, currais e outros (Magalhães *et al.*, 1980).

### 2.8.5. Vacina canina

Devido à ineficácia dos programas de controle para LVC e aos resultados promissores realizados por Mayrink (1986) com a vacina anti-Leishmaniose Humana, na década de 90, uma alternativa para prevenção de LV em cães era a utilização de vacinas efetivas que vem sendo estudadas por vários grupos de pesquisa. O trabalho pioneiro de Genaro *et al.* (1996), avaliando a eficácia de diferentes vacinas produzidas com antígenos brutos de *L. amazonenses*, *L. braziliense*, *L. chagasi* em relação ao grupo controle (placebo), realizado numa população canina na cidade de Montes Claros, Minas Gerais, demonstrou ausência de proteção, mas um fator limitante desse trabalho foi as grandes perdas ocorridas durante o seguimento devido à morte de cães e por mudança domiciliares de seus donos.

A vacina baseada na fucose-manose ligante obtida a partir de uma cepa de *Leishmania donovani* tem sido estudada por Borja-Cabrera *et al.*, (2002) e por Courtenay *et al.* (2002), e seus resultados comparados aos resultados obtidos na avaliação para o diagnóstico da LVH utilizando a ELISA (FML-ELISA), realizados por Palatinik-de-Sousa *et al.* (1995); Luz *et al.* (1997). A FML-ELISA apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 96% no diagnóstico humano da LV no Brasil, em pacientes infectados por *L. chagasi* (Palatinik-de-Sousa *et al.*, 1995), não sendo observada reação cruzada com outras espécies de *Leishmania*, nem com a Doença de Chagas (Palatinik-de-Sousa *et al.*, 1995). Essa vacina tem como princípio a presença de GP36 uma glicoproteína de superfície, espécie-específica, isolado de formas promastigotas de *L. donovani* (Palatinick *et al.*, 1989; Palatinick *et al.*, 1990). Ela é capaz de induzir diferente resposta humoral (Palatinik-de-Sousa *et al.*, 1996), impedindo a internalização de formas promastigotas e amastigotas durante o ciclo em hospedeiro vertebrado (Palatinik-de-Sousa *et al.*, 1993). Estudo realizado em área endêmica do Rio Grande do Norte mostrou que a vacina é imunogênica por ocasionar tanto uma forte resposta humoral, levando a soro-conversão de 97% dos animais vacinados, como a uma forte resposta celular, representada pela intradermoreação positiva em 100% dos animais vacinados (Borja-Cabrera *et al.* 2002). Entretanto, até o momento não há como distinguir os animais que possuem tais anticorpos, por terem sido vacinados, dos que os possuem por infecção natural da doença. Além disso, ainda não foram realizados estudos para avaliar a proteção efetiva contra LVC. Portanto, apesar de em 2003, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ter aprovado o

uso dessa vacina (Leishmune®) produzida pelo laboratório *Fort Dodge Animal Health Ltda*, sua aprovação tem gerado contestações por diversos pesquisadores, pois os estudos para avaliar o impacto de seu uso na incidência humana e canina foram insuficientes, assim como faltam informações sobre a sua capacidade de prevenir a transmissão do parasita para os vetores. Em resposta à comunidade científica o Ministério da Saúde exige que qualquer cão positivo independente de ser vacinado deva ser eliminado (MS, 2004).

Em 2001, Ghosh *et al.* observaram que a vacina produzida a partir de DNA-A2 contra *L. donovani* poderia aumentar seu efeito protetor a partir do aumento da resposta celular e humoral.

Melby *et al.* (2001) também estudando vacina-DNA LAKC, constataram efeito protetor devido ao aumento da resposta Th1 (IFN- $\gamma$ ). Do mesmo modo, Rezende *et al.* (2005) estudaram o potencial de proteção de vacinas a partir de DNA-LACK (receptor homólogo para ativação de proteína C quinase). O LAKC possui papel imunopatogênico em modelos murinos, e aqueles autores observaram que há certo efeito protetor devido ao estímulo vacinal por aumentar a produção de citocinas, principalmente IL-10.

Recentemente, Fujiwara *et al.* (2005), Campos-Neto *et al.* (2001); Sheik *et al.* (2002) avaliando a imunogenicidade de três antígenos recombinantes: TSA, LeIF e LmSTII, formulados à partir de dois diferentes adjuvantes (MPL-SE e AdjuPrime), demonstraram serem excelentes indutores de resposta imune em cães.

Apesar dessas propostas de desenvolvimento de uma vacina, à partir de diferentes técnicas, que possa ser comercializada com segurança, ainda não existe uma vacina que apresente realmente alta eficácia comprovada em ensaios clínicos.

#### **2.8.6. Programas de educação comunitária**

Este tipo de programa é de fundamental importância, pois de acordo com o conhecimento dos aspectos culturais, sociais, educacionais, das condições econômicas forma-se a percepção de saúde de cada comunidade. Assim, ações educativas devem ser desenvolvidas no sentido de que as comunidades atingidas aprendam a se proteger e

participem ativamente das ações de controle da doença diminuindo os riscos de transmissão da infecção (MS, 2002). Do mesmo modo, informar essa população sobre as medidas de proteção individual, como uso de repelentes (principalmente para indivíduos que necessitem ter contato direto com a mata) e mosquiteiro. Como proteção canina a utilização de coleiras impregnadas com deltametrina. Além disso, esclarecer a importância do manejo ambiental para a transmissão e manutenção do ciclo da LV. Vale ressaltar que tais medidas, não raras vezes, podem ser consideradas utópicas principalmente em países tropicais e em comunidades subdesenvolvidas (Marzochi, 1992).

## **2.9. VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA**

A vigilância epidemiológica faz parte do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), e visa reduzir as taxas de letalidade, grau de morbi-mortalidade e riscos de transmissão, controlando a população de reservatórios e de vetores (Marzochi, 1992), além do diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos da doença. Faz-se necessário à realização de melhorias diagnósticas dos municípios, com capacitação dos profissionais de saúde e apoio logístico, essencial para precocidade diagnóstica dos casos humanos (Profeta-Da-Luz *et al.* 2001).

Para que haja sucesso em tais ações todas essas medidas de controle devem ser realizadas concomitantemente, uma vez que se trata de uma doença de rápida expansão. Essa vigilância não deve ser realizada somente em áreas endêmicas, mas em todos os municípios por haver uma grande distribuição do vetor, pela presença freqüente de cães nos domicílios e pelas péssimas condições sanitárias dos subúrbios e pequenos logradouros em grande parte do país (MS, 2003). Além do mais, as áreas indenes são colocadas em risco por correntes migratórias e pelo êxodo rural (MS, 1984).

### **3. JUSTIFICATIVA**

A realização deste inquérito sorológico anti-LVC, realizado no município de Varzelândia – MG, teve como principais justificativas:

(a) Dados anteriores realizados por Dias *et al.* (2007 - comunicação pessoal) na avaliação da força de infecção dessa área, onde foi realizado um ensaio clínico anti-LTA em Varzelândia, demonstrou uma alta densidade vetorial de *Lu. longipalpis*. Por princípios éticos, associado à presença de dois óbitos na região por leishmaniose visceral Sistema Nacional de Atendimento Médico (SINAM), fez também importante avaliar a prevalência, assim como as áreas de risco para ocorrência dessa doença.

(b) Além disso, como é de fundamental importância, para o controle da doença, manter uma rede de laboratórios apta para realizar o diagnóstico da LV, faz-se necessário o controle da qualidade dos serviços realizados. Atualmente, o controle de qualidade nacional vem sendo realizado pelo Laboratório de Parasitologia da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Entretanto, para que seja efetivo o controle de qualidade, é necessária a organização de uma soroteca contendo soros padrões positivos e negativos bem caracterizados do ponto de vista sorológico e parasitológico. Portanto, esse trabalho realizado em parceria com a UFMG, CPqRR/ FIOCRUZ e FUNED, vem garantir a construção de uma soroteca como apoio no diagnóstico da LV.

(c) Contribuir para maior conhecimento do perfil sorológico (IgG1 e IgG2) relacionado aos sinais clínicos desta enfermidade na área estudada.

## **4. OBJETIVO**

#### **4.1. OBJETIVO GERAL**

Determinar a prevalência da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) no município de Varzelândia no Estado de Minas Gerais, Brasil.

#### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- A) Determinar a prevalência da LVC na área rural do município de Varzelândia;
  
- B) Comparar a prevalência da LVC utilizando diferentes técnicas sorológicas (ELISA, IFI, RFC);
  
- C) Determinar a distribuição espacial da doença na área de estudo;
  
- D) Relacionar as formas clínicas dos cães sorologicamente positivos, através de marcadores sorológicos de gravidade (IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub>).

## **5. METODOLOGIA**

## 5.1. ÁREA E POPULAÇÃO DO ESTUDO

A pesquisa foi realizada na zona rural do município de Varzelândia, localizado a 586 km de Belo Horizonte, na microrregião de Montes Claros, norte do Estado de Minas Gerais, Brasil (Figura 1).

Varzelândia possui uma área de 804 Km<sup>2</sup>, altitude variando de 483 a 893 metros acima do nível do mar, temperatura média anual de 23,6°C, podendo ultrapassar os 30°C nos meses de novembro à março, índice pluviométrico anual em torno de 1156,1mm. Faz parte da bacia do Rio São Francisco e possui como principais rios o Rio Arapaim e Rio Macaúbas (IBGE, 2000). A população humana estimada em 2005 era de 20.097 indivíduos (IBGE, censo 2000).

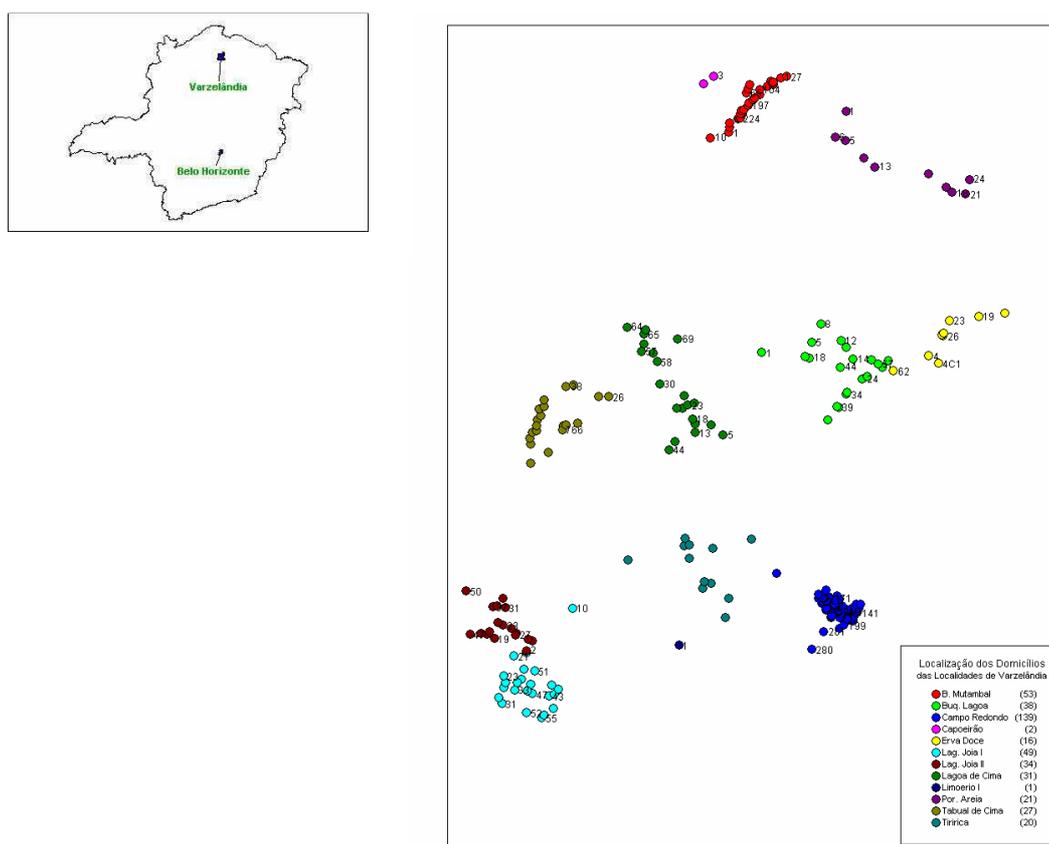


Figura 1: Localização geográfica dos domicílios com cães do município de Varzelândia, região Norte de Minas Gerais

Este estudo foi realizado em 12 localidades do município de Varzelândia. São elas: Boqueirão da Lagoa, Brejo Mutambal, Campo Redondo, Capoeirão, Erva Doce, Lagoa de Cima, Lagoa do Jóia I, Lagoa do Jóia II, Limoeiro, Porão de Areia, Tabual de Cima, Tiririca (Figura2). Destes, 10 localidades estão situados em área rural, e dois (Brejo Mutambal, Campo Redondo) são considerados aglomerados urbanos especiais.

Após a identificação topográfica de todos os domicílios da área, utilizando GPS marca Garmin modelo Etrex, foi realizado o censo da população canina.

## **5.2. DESENHO E DELINEAMENTO DO ESTUDO**

Um estudo do tipo corte-transversal foi realizado em novembro de 2005 no universo dos cães. Para a identificação do animal era preenchida uma ficha, onde constava o nome do proprietário e do cão, a idade, as medidas antropométricas (peso e comprimento vertical e longitudinal), sexo, tipo de pêlo e função do animal, endereço do dono com a respectiva latitude, longitude e altitude (Anexo1). À esta ficha foi anexada uma fotografia do cão, com nome e código.

Em seguida realizou-se a avaliação clínica através das observações de sinais clínicos externos, tais como presença de alopecia, ulceração, descamação cutânea, conjuntivite, onicogribose, e emagrecimento. E com base nestas observações o cão era considerado assintomático, oligossintomático ou sintomático segundo os critérios estabelecidos por Mancianti *et al.* (1988).

Nos animais com idade superior a 30 dias a coleta sanguínea foi realizada através de punção venosa da veia braquial da pata dianteira. Para isso, o animal ficava suspenso em uma balança (Figura 2) para dificultar seus movimentos e facilitar a coleta. Após a coleta, o material sanguíneo era transferido para um tubo de ensaio devidamente rotulado com nome do cão e código da amostra, o qual era armazenado a baixas temperaturas.

Figura 2: Cão sendo pesado e medido



Nos animais que possuíam idade inferior a 30 dias, o sangue foi coletado na orelha do cão e embebido em papel de filtro Whatman nº4, (Machado-Coelho *et al.*, 1995), devidamente identificado, com nome do cão e código da amostra. Os papéis de filtro foram dessecados à temperatura ambiente.

### 5.3. ALIQUOTAGEM, CODIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS.

Os tubos contendo sangue total foram centrifugados a 3000 rpm (rotações por minuto), por 10 minutos, com a finalidade de separação do soro. Os soros obtidos foram separados em três alíquotas e armazenados em micro-tubos devidamente identificados, à -20°C.

Os papéis de filtro foram acondicionados em sacos plásticos selados, contendo sílica-gel, a fim de protegê-los da umidade e armazenados à 4°C.

### 5.4. TRIAGEM SOROLÓGICA

A triagem sorológica de anticorpos anti-LVC da classe IgG foi realizada através da reação de ELISA executada no Laboratório de Doença de Chagas da UFOP. Foi utilizado o kit EIE – Leishmaniose Visceral Canina, produzido pela Bio-Manguinhos.

Este teste consiste em reação de soros de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* adsorvidos em cavidades de microplacas. Onde são adicionados soros controles do teste e as amostras a serem analisadas, devidamente diluídos com diluente próprio e lectina de leite, que possuindo anticorpos específicos, vão se fixar aos antígenos. Em seguida, é adicionada imunoglobulina anti-cão marcada com enzima peroxidase, que se ligará a anticorpos caso estejam presentes. A reação é evidenciada com a tetrametilbenzidina – TMB (substância cromógena), que pela ação da peroxidase com peróxido de hidrogênio, forma um composto de coloração azul turquesa que ao reagir com ácido sulfúrico 2M, utilizado para interromper a reação, passa a apresentar uma coloração amarela em caso reagente (positivo) e, sem desenvolvimento de cor nas cavidades em amostras não reagente (negativo). A leitura espectrofotométrica foi realizada a 450 nm. E todo o procedimento seguiu a metodologia recomendada pelo Kit EIE-BM (Anexo 2).

A determinação do *cut-off*, segundo especificação do kit, para cada placa foi calculada a partir da média aritmética dos controles negativos e multiplicado por dois. Para as amostras de SDPF (soro dessecado em papel de filtro) o *cut-off* foi calculado a partir da média aritmética dos controles negativos e multiplicado por três.

O teste foi considerado válido quando os valores da densidade ótica (DO) dos controles positivos estavam na faixa  $\geq 0,500$  de DO e os controles negativos na faixa entre  $\geq 0,500$  e  $\leq 0,120$  de DO.

## **5.5. CONFIRMAÇÃO DIAGNÓSTICA**

### **5.5.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)**

Para a confirmação diagnóstica da LVC foi utilizada a reação de IFI, realizada no Laboratório de Doença de Chagas da UFOP, com o kit IFI – Leishmaniose Visceral fornecido pela Bio-Manguinhos, conforme procedimento especificado no teste. (Anexo 3). Este teste consiste em uma reação de soros com os parasitos (*Leishmania*), fixados em lâminas de microscopia, e utilização de um conjugado fluorescente para evidenciar a reação. A leitura é realizada com auxílio de microscópio que utiliza incidência de luz azul e ultravioleta, sendo considerado reagente os soros que apresentam fluorescência e não reagentes os soros que apresenta ausência de fluorescência, tomando-se como referência os soros controle positivos e negativo incluídos em cada lâmina (CDC, 1961).

### **5.5.2. Reação de Fixação do Complemento (RFC)**

A RFC foi realizada, no Laboratório de Leishmaniose Visceral Canina da UFMG, seguindo metodologia sugerida por Pellegrino & Brener (1958) e Cisalpino *et al.*, (1962).

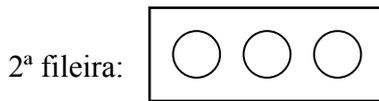
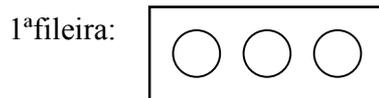
Antes do início do procedimento para RFC os soros foram colocados em banho-maria 56°C durante 30 minutos com a finalidade de inativar proteínas que poderiam interferir no resultado da reação.

A reação foi realizada em duplicata, em tubos de hemólise, e utilizaram-se três controles: um controle para o antígeno; um controle para o complemento e um controle do

sistema hemolítico, todos os controles foram diluídos em 0,1mL, 0,2mL e 0,4 mL de salina respectivamente.

O soro também foi diluído em salina na concentração 1:40.

1) Diluição do soro:



2) Adicionou-se 0,1mL de antígeno em cada tubo de hemólise da primeira fileira e no tubo em que se realizou a reação de controle do antígeno.

3) Adicionou-se 0,2 mL de complemento em cada tubo das duas fileiras, no tubo da reação de controle do antígeno e no tubo de controle do complemento.

4) Os tubos foram incubados em banho-maria 37 °C por 1 hora.

5) Os tubos foram retirados do banho-maria e, adicionou-se 0,2 mL de hemolisina em todos os tubos.

6) Todos os tubos foram incubados novamente em banho-maria a 37 °C por 30 minutos.

Após 10 minutos de incubação, fez-se a leitura dos tubos controles para saber se o teste estava adequado, para tal deve-se ter o tubo controle de antígeno e o controle do complemento hemolisados e o controle do sistema hemolítico deve estar turvo.

7) A leitura foi realizada do seguinte modo:

Fileira 1: turva                      Fileira2: hemolizada → POSITIVO

Fileira 1: hemolizada      Fileira2: hemolizada → NEGATIVO

Fileira 1: turva                      Fileira2: turvo                      → IMPEDIENTE

Em relação às amostras impiedentes, foi necessário repetir a reação utilizando diluições sucessivas do soro, normalmente até 1: 320. A leitura foi realizada do mesmo modo.

## **5.6. DOSAGEM DE IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub>**

A dosagem das imunoglobulinas IgGtotal, IgG1 e IgG2, foram realizados por ELISA, conforme técnica padronizada no Laboratório de Doença de Chagas da UFOP Voller *et al.*, (1976) modificada, utilizando placas de microtitulação com 96 poços e fundo chato da marca Corning Incorporated 3590.

### **5.6.1. Concentração do antígeno**

O antígeno utilizado foi o Ag46 de *Leishmania chagasi*, cedido pelo Departamento de Parasitologia, Laboratório de Leishmaniose da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), na concentração 2,1mg/mL.

### **5.6.2. Diluição do soro**

A diluição do soro foi previamente padronizada pelo Laboratório de Doença de Chagas UFOP e foi utilizado na diluição 1:80.

### **5.6.3. Diluição do conjugado**

Esta padronização foi realizada com a finalidade de obter concentrações ótimas de conjugado de imunoglobulinas canina que pudessem melhor distinguir amostras de soros positivas de amostras negativas, na menor diluição possível.

Para o conjugado anti-IgG1 foram testados títulos de 1:5.000; 1:10.000; 1:15.000; 1:20.000 e 1:25.000.

Para o conjugado anti-IgG2 testou-se os títulos 1:2.500; 1:5.000; 1:7.500; 1:10.000; 1:12.500 e 1:15.000.

Para conjugado anti-IgGt os títulos testados foram 1:2.500; 1:500; 1:7.500; 1:10.000; 1:12.500 e 1:15.000.

#### **5.6.3.1. Procedimento de ELISA**

1) No dia anterior à análise, adicionou-se 240 $\mu$ L de antígeno 46 (Título= 2,1 mg/ mL) à 10mL de solução tampão de ligação.

2) Adicionou-se 100  $\mu$ L desta solução de antígeno a cada poço na placa de ELISA. Esta placa foi coberta com papel alumínio e incubada por 12h a 4°C.

3) No dia da análise, a placa sensibilizada foi lavada, por quatro vezes utilizando solução de lavagem (9g de NaCl, 500 $\mu$ L de Tween 20 e 1L de água destilada), secando por inversão em papel absorvente.

4) A placa foi bloqueada utilizando uma solução de bloqueio (1000 $\mu$ L de soro fetal bovino em 19 mL de PBS) e adicionou-se 100 $\mu$ L desta solução por poço.

5) Incubou-se a placa em estufa a 37 °C por 45 minutos. A placa foi novamente lavada e seca como descrito no item 4, e adicionou 100µL de soro ou eluato diluído em cada poço. Foram adicionados 5µL dos soros a serem examinadas em 400µL de PBST (Solução de *Tween* em PBS a 0,005%) para se obter diluições de 1:80. No caso das amostras de SDPF, adicionou-se 1 picote de SDPF em 500µL em tubos de hemólise. Deixou incubando por 12h à 4°C coberto com papel alumínio Após este período, os tubos foram agitados em agitador orbital tipo Kline, por 1h. O eluato obtido equivale à diluição de 1:80 do soro. A partir deste momento o procedimento para amostras de soro e de SDPF foi o mesmo.

6) Incubou em estufa à 37 °C por 45 minutos e, após este período a placa foi novamente lavada e seca como descrito como descrito no item 4.

7) Os conjugados foram diluídos em PBS-T nas seguintes concentrações: anti-IgG1 - 1:2.500, anti-IgG2 - 1:2.500, anti-IgGtotal - 1:5.000. Estas foram, respectivamente, as menores diluições em que foi possível discriminar adequadamente soros positivos dos soros negativos conforme demonstrado na Figura 3.

8) Adicionou-se 100µL de conjugado diluído, por poço, na placa.

9) A placa foi incubada em estufa por 45 minutos à 37 °C e novamente lavada e seca como descrito no item 4.

10) Momento antes do uso preparou-se o substrato (15mL de solução de ácido cítrico e 3µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 3 mg de OPD).

11) Adicionou-se 100µL de substrato, por poço, na placa.

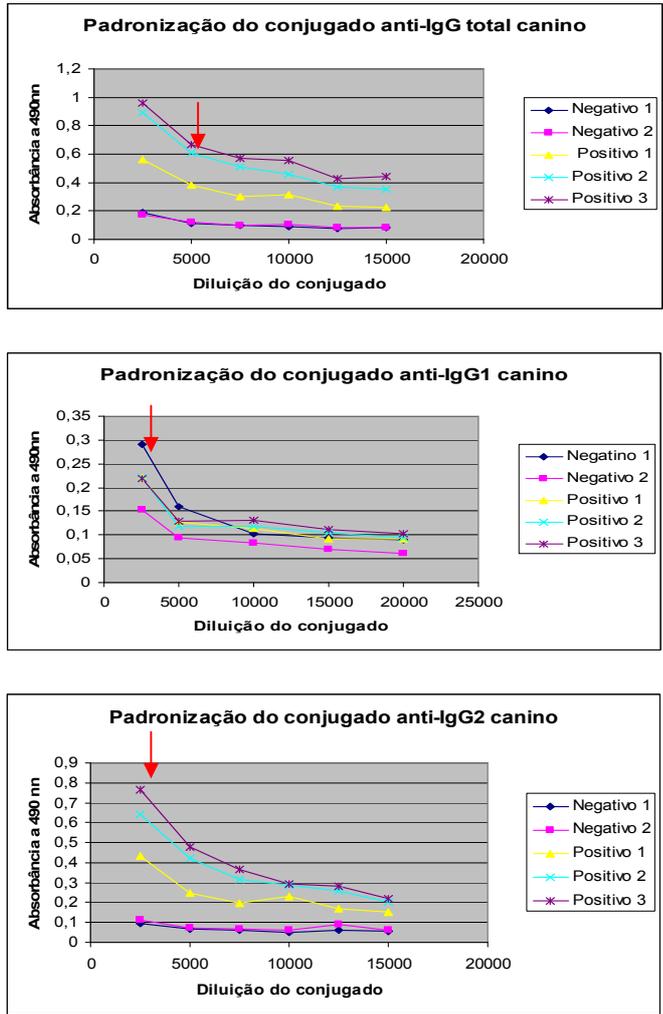


Figura 3: Resultado das absorvâncias a 490nm obtidas pela reação de ELISA para amostras de soros caninos positivos e negativos para infecção por *L. chagasi*, ensaiadas em diferentes concentrações dos conjugados.

12) A placa foi incubada em estufa 37°C por 20 minutos.

13) Adicionou-se 32µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N por poço, para parar a reação.

14) Leitura em espectrofotômetro a 490 nm.

Para o cálculo do *cut-off* foi feita a média dos controles negativos, e este valor multiplicado por dois desvios padrão:  $CO = \sum \left( \frac{CN}{n} \times 2DP \right)$

onde: CO = *cut-off*; CN = controle negativo; n = número de amostras de controle negativo; DP = Desvio padrão.

Foi definido como reativas as amostras que apresentavam a razão entre DO/CO maior ou igual a 1,1. Quando esta razão estiver no intervalo de 0,9 à 1,1 a amostra pertence à Zona Cinza e, se esse valor for inferior a 0,9, a amostra é considerada não reativa (Alquízar *et al.*, 1997).

## **5.7. DEFINIÇÃO DE POSITIVIDADE**

Os cães que apresentavam positividade em pelo menos duas das três técnicas (ELISA, IFI e RFC) utilizadas foram considerados positivos para *Leishmania* e em pelo menos uma reação como caso suspeito.

## **5.8. RETIRADA E SACRIFÍCIO DOS CÃES REATIVOS**

Os cães, cujos soros apresentaram positividade em pelo menos uma técnica sendo positivo ou suspeito foram retirados da área em estudo seis meses após a realização da sorologia, e levados até Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) na cidade de Montes Claros, MG, para serem examinados, coletar material biológico e realizar eutanásia, conforme descrição abaixo.

1) Anestesia:

Foi utilizado como anestésico Tiopental na dosagem de 0,5 mL/Kg de peso do cão por via endovenosa.



Figura 4: Cão sendo anestesiado.

## 2) Sacrifício:

O cão foi sacrificado com administração de 0,78 mL/Kg de peso de uma solução de Cloreto de Potássio (KCl) 19,1%.

## 5.9. PROCESSAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados foram digitados em banco preparado no programa Excel. As coordenadas geodésicas foram digitalizadas no programa Map Info. E as análises foram realizadas no Epi Info versão 6.4.

- A prevalência foi calculada a partir da razão entre o número de cães infectados e a população analisada. Foi utilizado o teste de qui-quadrado para a comparação de proporções observada entre os grupos. Assumiu-se como diferença significativa quando o valor do  $p$  foi menor que 5%.

- O Valor Preditivo Positivo (VPP) que determina a probabilidade de um resultado positivo ser realmente verdadeiro foi calculado dividindo o número resultados positivos confirmados pelo teste referência (RIFI) em relação ao número total de resultados positivos obtidos no teste sorológico a ser avaliado.

- O Índice Comparativo de Morbidade (ICM) foi calculado:

$$\text{ICM} = [\text{casos observados} / (\text{Taxa Global} \times \text{População da área})] \times 100$$

- Kappa ponderado foi calculado segundo :

$$Kappa_{ponderado} = \frac{cop - cep}{1 - cep}$$

onde:

cop: concordância observada ponderada

cep: concordância esperada ponderada

O valor Kappa foi classificado segundo Fleiss (1985), como sendo de excelente concordância se seu valor for igual ou maior a 0,75, de razoável concordância se estiver entre 0,40 e 0,75, e de baixa concordância quando o valor for menor que 0,40.

## **6. RESULTADOS**

## **6.1. CENSO DA POPULAÇÃO CANINA**

O censo canino determinou a presença de 571 cães domiciliares. E, como não houve recusa de nenhum dono, no inquérito sorológico para LV, este foi o número de cães avaliados.

Na Tabela 1 está apresentado o total de cães examinados, de acordo com a área geográfica, sexo e idade. O distrito de Campo Redondo apresentou a maior proporção de cães da região. A população de machos foi duas vezes maior que a de fêmeas. Cães com idade de 0 a 1 ano e 1 a 6 anos apresentaram a mesma proporção e apenas 6,8% dos cães possuíam idade superior à 6 anos (Tabela 1).

## **6.2. POSITIVIDADE PARA ANTICORPOS ANTI-LVC DE ACORDO COM AS DIFERENTES TÉCNICAS SOROLÓGICAS**

A distribuição dos resultados encontrados para os 571 soros analisados, utilizando-se como testes sorológicos ELISA e IFI, está apresentada na Tabela 2. Utilizando a reação de ELISA-BM na triagem sorológica nas amostras dos 571 cães, observou-se que destas, 17,16% (98) foram reativas para o teste, 77,75% (444) apresentaram-se não reativas e 5,07% (29) permaneceram na zona cinza. Na IFI-BM 11,55% de amostras foram reativas e 88,45% de amostras não reativas.

A fim de identificar a concordância entre as duas reações foi apresentada, na Tabela 3, a distribuição cruzada de soros reativos, indeterminados (zona cinza) e não reativos para ELISA e IFI. Os resultados demonstraram que 40,82% das amostras foram positivas apenas no teste ELISA-BM, enquanto 59,18% foram reativos para ambos os testes. Das 571 amostras analisadas, 444 não apresentaram reatividade em nenhum dos dois testes, 29 foram reativas na zona cinza pelo método de ELISA-BM. Destas 72,4% (21) não apresentaram reatividade pela IFI e 27,6% (8) apresentaram reatividade neste método.

Tabela 1: Prevalência da distribuição, por localidade, do total de cães examinados nos distritos do município de Varzelândia, (MG) classificados por sexo e faixa etária.

ÁREA GEOGRÁFICA	SEXO				IDADE					
	M (n)	%	F (n)	%	0-1a (n)	%	1-6a (n)	%	>7a (n)	%
Boqueirão da Lagoa	30	58,8	21	41,2	18	35,3	27	52,9	6	11,8
Brejo Mutambal	40	65,6	21	34,4	23	37,7	35	57,4	3	4,9
Campo Redondo	124	65,9	64	34,1	88	46,8	84	44,7	16	8,5
Capoeirão	7	87,5	1	12,5	3	37,5	4	50,0	1	12,5
Erva Doce	26	78,8	7	21,2	18	54,5	13	39,4	2	6,12
Lagoa de Cima	28	90,3	3	9,7	22	71,0	8	26,0	1	3
Lagoa do Jóia I	36	70,6	15	29,4	19	37,0	29	57,0	3	6
Lagoa do Jóia II	28	63,6	16	36,4	21	47,7	22	50	1	2,3
Limoeiro	1	100,0	0	0,0	0	0,0	1	100	0	0
Porão de Areia	25	71,4	10	28,6	25	71,4	10	28,6	0	0
Tabual de Cima	30	88,2	4	11,8	20	58,8	10	29,4	4	11,8
Tiririca	22	64,7	12	35,3	11	32,3	21	61,8	2	5,9
<b>TOTAL</b>	397	69,5	174	30,5	268	47,0	264	46,2	39	6,8
<b>Valor p</b>										

Qui-quadrado: 75,56; P< 0,005

Para comparar os resultados obtidos através de três técnicas sorológicas (ELISA-BM, IFI-BM e RFC), foi apresentado na Tabela 4 à distribuição cruzada dos resultados obtidos por estas técnicas. A Reação de Fixação de Complemento (RFC) foi realizada em um grupo de amostras que não possuíam resultados concordantes por ELISA-BM e IFI-BM (n=62); e em um outro grupo formado por amostras com resultados idênticos (n=54).

Tabela 2: Positividade para anticorpos anti-Leishmania Visceral Canina observada nas reações de ELISA e IFI, em cães procedentes da área rural do município de Varzelândia, Minas Gerais, em 2006.

<b>Teste</b>	<b>Reativo</b>	<b>%</b>	<b>Não Reativo</b>	<b>%</b>	<b>Zona Cinza</b>	<b>%</b>
<b>ELISA (571)</b>	98	17,16	444	77,75%	29	5,07
<b>IFI (571)</b>	66	11,55	505	88,45	-	-
<b>Valor p</b>		0,005		< 0,001		

Tabela 3: Distribuição dos resultados obtidos pela ELISA cruzados com resultados positivos e negativos obtidos pela IFI.

	<b>IFI*</b>		
<b>ELISA-BM</b>	<b>REATIVO</b>	<b>NÃO REATIVO</b>	<b>TOTAL</b>
<b>REATIVO</b>	58 (59,18%)	40 (40,82%)	98 (100,0%)
<b>ZONA CINZA</b>	8 (27,6%)	21 (72,4%)	29 (100,0%)
<b>NÃO REATIVO</b>	0 (0,0%)	444 (100,0%)	444 (100,0%)
<b>TOTAL</b>	66 (10,86%)	505 (89,14%)	571 (100%)

\* Método de referência

- Valor preditivo positivo da ELISA = 59,22%
- Valor preditivo positivo da Zona Cinza da ELISA = 27,58%
- Valor preditivo negativo da ELISA = 100%
- Concordância = 87,91%, Kappa ponderado = 0,738.

Em 18 amostras que apresentavam sorologia indeterminada, por apresentar resultado dentro da zona cinza pelo método de ELISA-BM e não reativo pela IFI-BM, apenas uma se confirmou reativa. Todas as oito amostras que apresentavam resultado ELISA-BM zona cinza e IFI-BM positivo foram confirmadas como negativas pela RFC. E, das 36 amostras reativas pelo método de ELISA-BM e negativa para o IFI-BM, três foram reativas pela RFC. Para as 54 amostras que apresentavam concordância para ELISA e IFI apenas 42,6% apresentavam positividade para RFC.

Tabela 4: Distribuição dos resultados sorológicos para LVC obtidos pelas técnicas de RFC cruzados com resultados obtidos por ELISA-BM/ IFI.-BM.

	RFC		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
<b>ELISA ZC/ IFI (+)</b>	0 0%	8 100,0%	8 100,0%
<b>ELISA ZC/ IFI (-)</b>	1 5,6%	17 94,4%	18* 100,0%
<b>ELISA (+)/ IFI (-)</b>	3 8,33%	33 91,67%	36 100,0%
<b>ELISA (+)/ IFI (+)</b>	23 42,6%	31 57,4%	54** 100,0%
<b>TOTAL</b>	27 23,3%	89 76,7%	116 100,0%

ZC: Zona Cinza; (+): Reação Reativa; (-): Reação Não Reativa.

\* 3 amostras sem informação

\*\* 4 amostras sem informação

Assim, baseados nos dados expostos na Tabela 3 e 4, observam-se que 62 (10,86%) das 571 amostras de soros analisados foram comprovadamente positivas para LVC uma vez que, apresentaram-se reativas em pelo menos dois dos testes sorológicos utilizados.

### 6.3. DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA INFECÇÃO POR LV

Na Tabela 5 e na Figura 5 estão apresentados o número total de cães examinados e positivos de acordo com a localidade. Os 62 (10,86%) cães infectados pela LV estão disseminados pelos distritos do município de Varzelândia - MG de maneira não uniforme, possuindo localidades, como Capoeirão e Limoeiro, que não apresentam nenhum cão positivo, e outros, como Brejo Mutambal e Lagoa do Jóia I que apresentam 4,92% a 24,49% respectivamente. O Índice Comparativo de Morbidade (ICM) nos mostra que ha regiões onde a prevalência da doença é até 4 vezes mais que outras, como é o caso de Lagoa do Jóia I comparado a Boqueirão da Lagoa.

Tabela 5: Prevalência do total de cães sororreativos para LVC levando-se em conta a localidade do município de Varzelândia - MG.

LOCALIDADE	TOTAL DE CÃES	TOTAL DE CÃES INFECTADOS*	PREVALÊNCIA	ICM***
Boqueirão da Lagoa	51	3	5,81%	0,54
Brejo Mutambal	61	3	4,92%	0,45
Campo Redondo	189	13	6,88%	0,63
Capoeirão	8	0	0,0%	0,00
Erva Doce	33	3	9,09%	0,84
Lagoa de Cima	31	3	9,67%	0,89
Lagoa do Jóia I	51	13	24,49%	2,35
Lagoa do Jóia II	44	6	13,63%	1,26
Limoeiro	1	0	0,0%	0,00
Porão de Areia	35	4	11,43%	1,05
Tabual de Cima	33	6	18,18%	1,67
Tiririca	34	8	23,53%	2,17
<b>TOTAL</b>	<b>571</b>	<b>62</b>	<b>10,86%</b>	<b>-</b>
<b>Valor p**</b>			<b>0,006</b>	

\* Foram consideradas cães infectados aqueles cujas amostras apresentaram-se reativas em pelo menos dois dos testes sorológicos realizados.

\*\* Capoeirão e Limoeiro foram excluídos da análise

\*\*\* ICM: Índice Comparativo de Morbidade

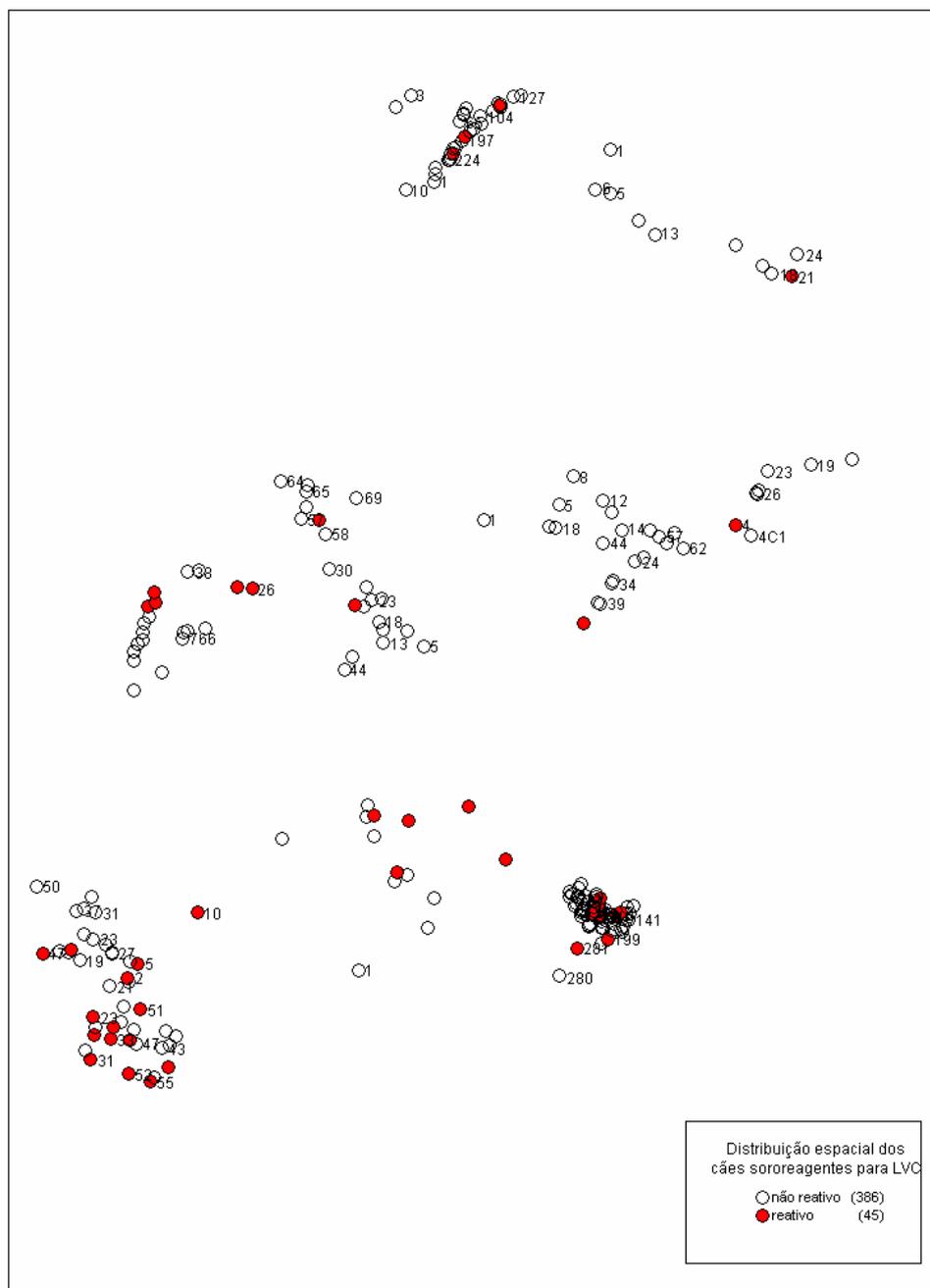


Figura 8: Mapa dos distritos de Varzelândia – MG com ênfase aos domicílios com LVC

Na Tabela 6 estão representadas as distribuições dos cães sororreativos para LVC em relação ao tipo da localidade de origem. A prevalência da doença na área rural (14,33%) foi significativamente maior ( $p= 0,002$ ) do que a observada nos conglomerados especiais (6,41%).

Tabela 6: Distribuição de cães infectados de acordo com o tipo de área geográfica.

<b>ÁREA</b>	<b>TOTAL</b>	<b>CÃES INFECTADOS</b>	<b>PREVALÊNCIA</b>
Conglomerados especiais	250	16	6,4%
Área rural	321	46	14,33%
<b>TOTAL</b>	<b>571</b>	<b>62</b>	<b>10,86%</b>

Conglomerados especiais: Brejo Mutambal e Campo Redondo

Área rural: Boqueirão da Lagoa, Capoeirão, Erva Doce, Lagoa de Cima, Lagoa do Jóia I, Lagoa do Jóia II, Limoeiro, Porão de Areia, Tabual de Cima e Tiririca.

Qui-quadrado: 9,13;  $P= 0,002$

#### **6.4. PREVALÊNCIA DA INFECCÃO POR LV SEGUNDO CARACTERÍSTICAS INDIVIDUAIS DOS CÃES**

A distribuição dos cães infectados de acordo com o tipo de pêlo, isto é, curto ou longo, está apresentada na Tabela 7. As prevalências observadas foram semelhantes ( $p=0,6$ ) de 12,3% para os animais de pêlo longo, e 10,54% em animais de pêlo curto.

Tabela 7: Prevalência de LVC em relação ao tipo de pêlo do animal.

<b>TIPO DE PÊLO</b>	<b>TOTAL</b>	<b>INFECTADOS</b>	<b>PREVALÊNCIA</b>
Longo	106	13	12,26%
Curto	465	49	10,54%
<b>TOTAL</b>	<b>571</b>	<b>62</b>	<b>10,86%</b>

Qui-quadrado: 0,27; P= 0,6

Na Tabela 8 está demonstrada distribuição da positividade de acordo com a idade estimada do cão na data da coleta. Observou-se variação não significativa ( $p=0,13$ ) prevalência da doença com o aumento da idade dos cães, onde cães com até dois anos apresentaram 7,92% de positividade, cães com idade de 2 a 4 anos a porcentagem de positivos foi de 16,66% e cães de 4-6 anos a prevalência foi de 17,03%.

Tabela 8: Prevalência da LVC em relação à idade.

<b>IDADE</b>	<b>CÃES EXAMINADOS</b>	<b>CÃES POSITIVOS</b>	<b>PREVALÊNCIA</b>
0 -  2	303	24	7,92%
2 -  4	114	19	16,66%
4 -  6	41	7	17,03%
6 -  8	23	3	13,04%
> 8,0	19	2	10,52%
SI*	71	7	9,86%
<b>TOTAL</b>	<b>571</b>	<b>62</b>	<b>10,85%</b>

\*SI: Sem idade relatada

Qui-quadrado: 8,50; P= 0,13

A prevalência da LVC nos machos (12,9%) foi semelhante ( $p=0,15$ ) às fêmeas (8,04%) estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Prevalência da LVC em relação ao sexo

<b>SEXO</b>	<b>CÃES EXAMINADOS</b>	<b>CÃES POSITIVOS</b>	<b>PREVALÊNCIA</b>
MACHO	397	48	12,09%
FÊMEA	174	14	8,04%
<b>TOTAL</b>	<b>571</b>	<b>62</b>	<b>10,86%</b>

Qui-quadrado: 2,04;  $P=0,15$

Não foi observada diferença ( $p=0,378$ ) entre as prevalências da LVC em relação à ocupação do cão (guarda, caça e/ ou companhia) estando os resultados apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Prevalência da LVC, no município de Varzelândia - MG, relacionada com a ocupação canina (caça, guarda e/ ou companhia) local.

<b>OCUPAÇÃO</b>	<b>CÃES EXAMINADOS</b>	<b>CÃES POSITIVOS</b>	<b>PREVALÊNCIA</b>
CAÇA	11	1	9,09%
COMPANHIA	19	2	10,52%
GUARDA	537	59	10,98%
GUARDA/ CAÇA*	4	0	0 %
<b>TOTAL</b>	<b>571</b>	<b>62</b>	<b>10,85%</b>

Qui-quadrado: 0,04;  $P=0,978$

\* Os dados de cão de guarda/ caça não entraram no cálculo do qui-quadrado.

## 6.5. PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR LV SEGUNDO SINTOMATOLOGIA

Na Tabela 11 está apresentada a distribuição cruzada do resultado sorológico com a classificação da sintomatologia realizada de acordo com Mancianti *et al.* (1988). O quadro clínico predominante foi a assintomática com prevalência de 94,8% (541) dos animais examinados, sendo que destes apenas 51 animais apresentavam sorologia reativa, portanto 490 foram classificados como negativos. Dos nove oligossintomáticos (1,56%), oito foram reativos (1,56%) e, dos 21 sintomáticos, apenas três foram reativos (3,64%).

Tabela 11: Distribuição dos cães segundo classificação da presença de sinais clínicos.

Sorologia	Clínica						Total
	Assintomático	%	Oligossintomático	%	Sintomático	%	
Reativo	51	82,6	8	12,9	3	4,83	62
Não Reativo	490	96,3	1	0,19	18	3,53	509
Total	541	94,8	9	1,56	21	3,64	571

Na Tabela 12 está apresentada a relação entre a clínica e a sorologia apenas para os 62 cães comprovadamente positivos. Dos 51 cães assintomáticos, 50 são positivos em pelo menos duas reações sorológicas. Em relação aos animais oligossintomáticos apresentaram reatividades em pelo menos dois testes sorológicos diferentes. Os três cães sintomáticos foram reativos para ELISA e IFI.

Tabela 12: Distribuição dos cães relacionando clínica com método diagnóstico utilizado.

<b>CLÍNICA</b>	<b>Assintomático</b>	<b>Oligossintomático</b>	<b>Sintomático</b>	<b>Total</b>
ELISA (+)/ IFI (+)	48 (94,12%)	7 (87,5%)	3 (100,0%)	58 (93,55%)
ELISA (+)/ IFI (-)/RFC (+)	2 (3,92%)	1 (12,5%)	0 (0,0%)	3 (4,84%)
ELISA ZC/ IFI (-)/RFC (+)	1 (1,96%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,61%)
<b>TOTAL</b>	51 (100,0%)	8 (100%)	3 (100%)	62 (100,0%)

ZC: Zona Cinza; (+): Reativo; (-): Não Reativo.

## 6.6. DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA SINTOMATOLOGIA

Os dados apresentados na Tabela 13 mostram que distritos como Lagoa do Jóia I e Campo Redondo apresentam a maior taxa de cães sororreativos (13 cães) e também a maior quantidade de cães assintomáticos, pois 12 destes 13 cães não apresentam nenhum tipo de sintoma, enquanto em outras localidades, a porcentagem de sintomáticos aumentou muito chegando a 25% e 50%, como no Brejo Mutambal e Porão de Areia.

A distribuição dos cães sororreativos na área de residência de acordo com a sintomatologia está apresentada na Tabela 14. Na área rural 72,5% dos cães reativos eram assintomáticos, enquanto nos conglomerados, apenas 27,4% eram assintomáticos.

Tabela 13: Distribuição de cães nos distritos de acordo com a sintomatologia.

<b>DISTRITO</b>	<b>Assintomático</b>	<b>Oligossintomático</b>	<b>Sintomático</b>	<b>Total</b>
Boqueirão da Lagoa	3 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (100,0%)
Brejo mutambal	2 (75%)	0 (0,0%)	1 (25%)	3 (100%)
Campo Redondo	12 (92,3%)	1 (7,7%)	0 (0,0%)	13 (100%)
Capoeirão	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Erva Doce	3 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (100%)
Lagoa de Cima	3 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (100%)
Lagoa do Jóia I	12 (93,2%)	1 (7,7%)	0 (0,0%)	13 (100%)
Lagoa do Jóia II	4 (66,7%)	0 (0,0%)	2 (33,3%)	6 (100%)
Limoeiro	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Porão de Areia	2 (50%)	0 (0,0%)	2 (50%)	4 (100%)
Tabual de Cima	4 (66,7%)	0 (0,0%)	2 (33,3%)	6 (100%)
Tiririca	6 (66,7%)	0 (0,0%)	2 (33,3%)	8 (100%)
<b>TOTAL</b>	51 (82,3%)	2 (3,2%)	9 (14,5%)	62 (100,0%)

Qui-quadrado: 47,65; P< 0,005

Tabela 14: Distribuição dos cães sororreativos de acordo com a área domiciliar e sintomatologia.

<b>ÁREA</b>	<b>Assintomático</b>	<b>Oligossintomático*</b>	<b>Sintomático*</b>	<b>Total</b>
Conglomerados	14 (27,45%)	1 (50,0%)	1 (11,11%)	16 (25,8%)
Rural	37 (72,55%)	1 (50,0%)	8 (88,89)	46 (74,2%)
<b>TOTAL</b>	51 (100,0%)	2 (100,0%)	9 (100,0%)	62 (100,0%)

\*Qui-quadrado foi calculado com esses valores agrupados

Qui-quadrado: 0,07 ; P= 0,79

### **6.7. FREQUÊNCIA DOS SINAIS CLÍNICOS E SUA RELAÇÃO COM A POSITIVIDADE PARA IgG1 e IgG2**

Na Tabela 15 pode ser visto a prevalência dos sinais clínicos observados pelos cães oligossintomático e sintomáticos. A onicogribose foi o sinal clínico mais frequente, estando presente em 72,72% dos cães que apresentaram algum tipo de sintoma. Emagrecimento e conjuntivite foram observados em 36,36% dos indivíduos analisados, enquanto descamação esteve presente em 27,27%, e finalmente, alopecia e ulcerações possuíram prevalências de 9,09%.

Na Tabela 16 está apresentada a positividade para IgG1 e IgG2 para os diferentes sinais clínicos e observa-se que não houve diferença entre as taxas de positividade para IgG1 e IgG2 nos diferentes sinais clínicos. E, não foi realizada reação sorológica para avaliação de IgG1 e IgG2 nos cães números 4 e 5 apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Prevalência dos sinais clínicos observados nos cães oligossintomáticos e sintomáticos.

Número do cão	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Total
Alopecia	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	9,09%
Ulceração	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	9,09%
Descamação	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	27,27%
Conjuntivite	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	36,36%
Onicogribose	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	72,72%
Emagrecimento	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	36,36%

Na Tabela 17 está apresentada a reatividade de IgG1 de acordo com a sintomatologia apresentada para LVC. Das 62 amostras reativas para anticorpos anti-*Leishmania* a ELISA para IgG1 foi realizada em 57 amostras. A reatividade para IgG1 foi observada em 27,08%, 28,57% e 100% dos cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, respectivamente.

Do mesmo modo, na Tabela 18 estão apresentados os resultados obtidos para dosagem de anticorpos IgG2 de acordo com a sintomatologia. A reatividade para IgG2 foi observada em 64,58%; 85,71% e em 100% dos cães assintomático, oligossintomático e sintomáticos, respectivamente.

Tabela 16: Distribuição de sinais clínicos observados nos cães reativos para LV em relação à reatividade apresentada para IgG1 e IgG2.

Número do cão	n	IgG1+	IgG2+
Ulceração	1	1*	1
Descamação	2	1	2
Conjuntivite	4	3	3
Onicogribose	6	2 + 1*	5
Emagrecimento	4	3	4
Total	17	9	15

\* = Zona Cinza

Tabela 17: Distribuição dos resultados da dosagem de anticorpos IgG1 realizada como sorologia o método de ELISA em relação à clínica observada em cães comprovadamente positivos do município de Varzelândia, MG.

<b>CLÍNICA</b>	<b>Assintomático</b>	<b>Oligossintomático**</b>	<b>Sintomático**</b>	<b>Total*</b>
IgG1 Reativo	13 (27,08%)	2 (28,57%)	2 (100%)	17 (29,82%)
IgG1 Zona Cinza	6 (12,5%)	1 (14,29%)	0 (0,0%)	7 (12,28%)
IgG1 Não Reativo	29 (60,42%)	4 (57,14%)	0 (0,0%)	33 (57,9%)
<b>TOTAL</b>	48 (100,0%)	7 (100,0%)	2 (100,0%)	57 (100,0%)

\*Em cinco cães não foi realizado sorologia

\*\*Qui-quadrado foi calculado com esses valores agrupados

Qui-quadrado: 1,11; P= 0,57

Tabela 18: Distribuição dos resultados da dosagem de anticorpos IgG2 realizada como sorologia o método de ELISA em relação à clínica observada em cães comprovadamente positivos do município de Varzelândia, MG.

<b>CLÍNICA</b>	<b>Assintomático</b>	<b>Oligossintomático*</b>	<b>Sintomático*</b>	<b>Total</b>
IgG2 Reativo	31 (64,58%)	6 (85,71%)	2 (100%)	39 (68,42%)
IgG2 Zona Cinza	6 (12,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	6 (10,52%)
IgG2 Não Reativo	11 (22,92%)	1 (14,29%)	0 (0,0%)	12 (21,05%)
<b>TOTAL</b>	48 (100%)	7 (100%)	2 (100%)	57 (100,0%)

\*Qui-quadrado foi calculado com esses valores agrupados

Qui-quadrado: 9,31; P= 0,01

Observa-se para os assintomáticos um maior percentual de positividade para o IgG2 em relação ao IgG1 ( $p < 0,001$ ). Apesar de não significativo, devido ao pequeno tamanho da

amostra, observa-se também uma tendência de maior percentual de positividade para IgG2 entre os oligossintomáticos. Os dois únicos cães sintomáticos da região foram positivos para outras imunoglobulinas.

Na tabela 19 estão expostos os resultados dos indivíduos assintomáticos em relação á reatividade de IgG1 e IgG2. De 48 cães assintomático, 31 foram reativos para IgG2 e 13 reativos para IgG1, sendo que apenas oito foram reativos em ambos os testes (33,3%).

Tabela 19: Resultados de ELISA para dosagem de IgG1 em relação IgG2 dos indivíduos assintomáticos pertencentes ao município de Varzelândia, MG.

		IgG2			
		Reativo	Zona Cinza	Não Reativo	Total
IgG1	Reativo	8	1	4	13
	Zona Cinza	3	2	1	6
	Não Reativo	20	3	6	29
<b>TOTAL</b>		31	6	11	48

Dos sete indivíduos oligossintomático, seis apresentam-se reativos para ELISA-IgG2 enquanto apenas dois foram reativos para IgG1. Nenhum dos soros analisados se mostrou indeterminado.

Para os indivíduos oligossintomáticos realizou-se a dosagem de IgG1 e IgG2 e, estes resultados relacionados estão expostos na Tabela 20 em que se observa que dos sete indivíduos oligossintomático, seis apresentam-se reativos para ELISA-IgG2 enquanto apenas 2 são reativas para IgG1. Nenhum dos soros analisados se mostrou indeterminado.

Tabela 20: Resultados de ELISA para dosagem de IgG1 em relação IgG2 dos indivíduos oligossintomáticos pertencentes ao município de Varzelândia, MG.

		IgG2			
		Reativo	Zona Cinza	Não Reativo	Total
IgG1	Reativo	2	0	0	2
	Zona Cinza	1	0	0	1
	Não Reativo	3	0	1	4
<b>TOTAL</b>		6	0	1	7

## **7. DISCUSSÃO**

## 7.1. SOROPREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A prevalência da LVC, observada na área rural do município de Varzelândia, de 10,8% apresenta-se dentro dos parâmetros relatados para outras regiões endêmicas, que segundo Evans *et al.* (1990) e Nunes *et al.* (1991), no Brasil, variam de 5%, no Rio de Janeiro-RJ e Montes Claros-MG (Nunes *et al.*, 1991; França –Silva *et al.*, 2003) e 39% em Itapipoca-CE (Evans *et al.*, 1992).

A doença não ocorreu de forma homogênea entre as localidades estudadas e, com base na triagem sorológica realizada pela ELISA observou positividade em onze (91,7%) das doze comunidades examinadas. Enquanto distritos como Limoeiro (que apresentava apenas um único cão) e Capoeirão não apresentaram cães positivos, outros como Lagoa do Jóia I e Tiririca apresentaram prevalência de 24,5% e 23,5%, respectivamente.

Variação semelhante foi observada por Monteiro *et al.* (2005) em Montes Claros. Nesse município a taxa de prevalência apesar de ser igual a 5%, variou de 1,8 a 9,9% de acordo com a área geográfica estuda. Também, Camargo-Neves *et al.* (2001), em Araçatuba, SP, observaram prevalência de 12,1% com variação de 4,1 a 25,8%. Grande variação na prevalência da doença também foi observada por Paranhos-Silva *et al.* (1996) em Jequié-BA.

Diferenças entre as prevalências estimadas pelos diferentes autores podem ser explicadas tanto pelo método de seleção dos cães como por variações ambientais nas áreas em estudo.

Enquanto alguns dos estudos anteriores foram censitários (Monteiro *et al.* (2005), como o realizado neste trabalho, outros foram realizados por amostragem (Camargo-Neves *et al.* (2001). Nesses últimos é sempre importante considerar a possibilidade de ocorrência de viés de seleção, que poderia levar a super ou subestimação da prevalência.

Entre os fatores ambientais, o principal fator de risco para aquisição de LV é a exposição ao inseto vetor (Shaw, 1999) e, no Brasil a *Lu. longipalpis* é a principal espécie incriminada. Segundo Deane & Deane (1955) e Shaw (1999) essa é a espécie de flebotomíneo mais sinantrópica, presente no Novo Mundo.

Santos *et al.* (2007) realizaram levantamento entomológico no município de Varzelândia durante o período de Abril de 2002 à Junho de 2005, utilizando armadilhas luminosas de CDC (Sudia & Chamberlain, 1962), em 11 dos 12 distritos avaliados neste trabalho. Os autores capturaram 21 espécies de flebótomos, das quais 20 eram do gênero *Lutzomyia* e um do gênero *Brumptomyia*. A frequência de *Lu. longipalpis*, foi de 55,13%. Na região estudada, Santos *et al.* (2007) também capturaram espécies de flebotomíneo conhecidamente transmissores de LTA, tais como *Lu. whitmani*, *Lu. migonei* e *Lu. intermedia*, esta última, segundo Gomes (1994) e Cabrera *et al.* (2003) é a espécie mais frequente em regiões onde ocorre ação antrópica.

Em Varzelândia, enquanto algumas localidades apresentam relação direta entre densidade vetorial e prevalência da LVC como em Capoeirão onde foi observada baixa frequência vetorial (3,26%), também não foi encontrado nenhum cão infectado. Do mesmo modo, áreas com maiores frequências de *Lu. longipalpis*, tais como o Brejo Mutambal (11,2%) e Boqueirão da Lagoa (13,68%) observaram prevalência para LVC de 5% em média, achado este concordante com a densidade vetorial. Erva Doce (5,31%) apesar de apresentar densidade vetorial três vezes menor que Lagoa de Cima (15,59%), foi observado taxa de prevalência para LVC (9,0%) semelhantes.

No entanto, há áreas onde não foram observadas tal relação linear como Tiririca Lagoa do Jóia I, Lagoa do Jóia II, Porão de Areia e Tabual de Cima que tiveram baixa frequência vetorial, 2,88%; 4,65%, 2,15% e 0,73% respectivamente, esperavam-se também uma baixa prevalência da doença, mas ao contrário disto a LVC possuiu as mais altas prevalências do município, 23,53%; 20,0%, 11,43% e 18, 18%.

Barata *et al.* (2004) em estudo realizado em Porteirinha estado de Minas Gerais, também não encontraram relação linear entre a presença do inseto vetor e a prevalência para LVC, em todos os bairros estudados deste município.

A prevalência da LVC foi significativamente maior na área rural (14,33%), do que nos conglomerados especiais (6,4%). Estes resultados não foram concordantes aos observados por outro autores, Amóra *et al* (2006), ao realizar estudo em área endêmica do Rio Grande do Norte, não encontrou diferença significativa quando compara as duas procedências, rural (45,2%) e urbana (34,6%); França –Silva *et al.* (2003) também não

observaram diferenças significativas, no município de Montes Claros, MG, para a prevalência da LVC quando relacionada à área, uma vez que na zona urbana a prevalência foi de 9,9% enquanto na área rural de 8,8%.

Outro motivo para a diferença na prevalência da doença observada nas diferentes regiões do Brasil pode ser devido aos diferentes momentos de realização dos estudos. Segundo Marzochi *et al.* (1994) e Barata *et al.* (2003), a população de flebotomíneos apresenta variação sazonal, predominado nos períodos do ano de mais altas temperatura e umidade relativa do ar, que coincidem com o pico de transmissão da infecção da LV.

A frequência de flebotomíneos capturados no município de Varzelândia apresentam variação sazonal em função da presença ou não de chuvas, sendo que observou aumento da densidade vetorial nos meses de Dezembro, Abril e Maio Santos *et al.* (2007). Estes meses coincidem com o início e o final dos períodos de chuva na região.

Considerando que o período de incubação para LVC tem se mostrado ser de aproximadamente 7,1 meses, em condições experimentais (Genaro *et al.*, 1992), nosso estudo foi realizado antes do início do período chuvoso da região (Outubro a Março) (Monteiro *et al.*, 2005; IBGE, 1997).

Outro motivo para as diferenças encontradas nas prevalências podem ser devido à variações nos ciclos silvestres. Como em algumas localidades de Varzelândia não foi observada uma relação linear entre a densidade vetorial e a prevalência da LVC a manutenção da *L. (L) chagasi* poderia estar sendo feita a partir de um ciclo silvestre. O ciclo silvestre da LVC tem sido confirmado por diferentes autores (Sherlock *et al.*, 1984; Lainson *et al.*, 1990; Tesh, 1995; Travi *et al.*, 1994; Cabrera *et al.*, 2003) ao terem capturado vetores infectados no ambiente silvestre. Os principais reservatórios silvestres no Brasil são marsupiais (*Didelphis marsupialis*) (Corredor *et al.*, 1989, Travi, 1996) e canídeos silvestres (*Du. vetulus* e *Serdocium thous*) (Deane & Deane, 1954a; Lainson *et al.*, 1990).

Cabrera *et al.* (2003) estudaram a importância de marsupiais na manutenção da infecção por este possuir hábitos crepusculares, noturnos e comportamento sinantrópico, tornando possível o compartilhamento de vetores e parasitas com cão e o homem. Observaram 2,5 vezes maior chance de infecção para o cão que vive em domicílios que é visitado por gambás reforçando a importância deste, como reservatório silvestre. Hipótese

que também é defendida por Sherlock *et al.* (1984); Travi *et al.* (1994), Tesh *et al.* (1995) e Travi *et al.* (1998a). Marsupiais (*Didelphis marsupialis*) também foram encontrados infectados por *L. chagasi* na Colômbia (Corredor *et al.*, 1989; Travi *et al.*, 1994) e no Brasil (*Didelphis alboventis*) (Sherlock *et al.*, 1984; Sherlock 1996).

Lainson & Shaw (1969), ao examinar vários exemplares de canídeos silvestres (*Du. vetulus* e *Cerdocyus thous*), observaram que nenhum apresentava sinais da doença, sugerindo que algum fator ainda não conhecido poderia estar interferindo na capacidade de transformar a infecção em doença ou que estas espécies de canídeo possuam uma relação parasito-hospedeiro bem sucedida.

Na Itália, há suspeitas de que o rato doméstico (*Rattus rattus*) desempenhe um papel de reservatório secundário para *L. infantum* (WHO, 1990) e na Venezuela há registro de alguns roedores infectados por *L. chagasi* (Zulueta *et al.*, 1999). Na Colômbia também foram capturados ratos (*Proechimy canicollis*) naturalmente infectados (Corredor *et al.*, 1989).

Esses dados nos dão evidências de que animais silvestres podem estar envolvidos na manutenção do ciclo silvestre de LV em Varzelândia e que poderiam ser considerados reservatórios primários do parasito na região. Pelo fato de alguns desses animais, como o rato doméstico e raposa, já terem sido encontrados naturalmente infectados em outras regiões, por possuírem hábitos sinantrópicos e fazerem parte da fauna silvestre da região, eles poderiam estar contribuindo para o processo de domiciliação da LV.

Um animal que apesar de ainda não ter sido estudado sua importância epidemiológica para a transmissão da doença, mas que pela frequência na região deve ser considerado é o mocó (*Kerodon rupestris*). Este roedor é nativo da região semi-árida brasileira frequentemente encontrada nas conformações rochosas do tipo calcária.

Como reservatório doméstico, o cão é o que apresenta a maior importância epidemiológica (Alencar, 1959). Nos domicílios visitados este papel é desempenhado principalmente pelos cães de caça e guarda uma vez que não ficam restritos somente à área da residência. Deste modo, podem circular livremente pelo peridomicílio e inclusive adentrar em matas, facilitando o contato com o ciclo silvestre. Cabrera *et al.* (2003)

encontraram um risco de infecção pela LV 2,6 vezes maior para cães residentes próximos à mata, quando comparados à cães cuja residência é mais distante.

*Lu. longipalpis* têm sido observados com grande frequência em zonas áridas e semi-áridas de ambiente rural e urbano e, embora, mais freqüente nos abrigos de animais domésticos, é numerosa no interior das habitações (Corredor *et al.*, 1989; Deane & Deane 1956, 1962). Também, é encontrada em abundância, nos ecótopos naturais, tais como: grutas, fendas de rochas, troncos e ocos de árvores (Corredor *et al.*, 1989; Deane & Deane, 1957; Mangabeira, 1969; Martins *et al.* 1956; Sherlock e Guitton, 1969). Deste modo, a região em estudo que pertence ao cerrado brasileiro apresentando vegetação típica em que se observadas árvores com troncos tortuosos, de baixo porte, ramos retorcidos, cascas espessas e folhas grossas que favorecem a manutenção do inseto vetor. Muitas casas se localizam muito próximas às formações rochosas e bem como seus anexos, como chiqueiro que ficam geralmente a poucos metros (em torno de 5 metros) desses paredões úmidos, beneficiando a reprodução do inseto vetor neste local em detrimento ao ambiente adverso característico da região semi-árida. A fêmea de flebotomíneo é freqüentemente encontrada em tais abrigos animais como chiqueiros, galinheiros e estábulos (Souza *et al.* 1981), e já encontrada se alimentando nesses animais (Sherlock & Guitton, 1969a). Essa proximidade dos domicílios observado na região pode realmente estar influenciando na variação e manutenção da doença em Varzelândia.

Outra explicação para a variação na taxa de prevalência é o uso de métodos diagnósticos com diferentes sensibilidades e especificidade para a definição de caso, ou pelo uso de lotes diferentes desses kits. Nesse estudo reação de ELISA (Bio-Manguinhos) apresentou uma taxa de positividade significativamente maior que a observada pela IFI-BM.

A triagem realizada pelo teste de ELISA (Bio-Manguinhos) no universo de 571 cães identificou 127 amostras positivas. Como contra-prova foi utilizada a reação de IFI e RFC. A IFI confirmou 66 amostras potencialmente positivas. Quando estas amostras foram submetidas à RFC, quatro amostras se confirmaram. Deste modo, 62 das 571 amostras foram reativas para pelo menos em duas das três reações utilizadas, sendo consideradas

positivas para o estudo, o que determina uma prevalência de 10,81% para LVC na região em estudo.

Estes resultados vão ao encontro aos obtidos por Ferreira *et al.* (2004) que identificaram um número maior de cães pela reação de ELISA (Bio-Manguinhos) (144 cães - 62%) do que pela IFI (Bio-Manguinhos) (119 cães - 51,7%). Ao contrário, Lira *et al.* (2004) observaram uma baixa sensibilidade (50%) e alta especificidade (100%) para a ELISA (Bio-Manguinhos) em relação à reação de IFI.

Os resultados negativos obtidos neste trabalho apresentam grande confiabilidade, pois foi utilizado um método sorológico (ELISA-BM) com sensibilidade de aproximadamente 95%, fazendo com que o valor preditivo negativo para LVC seja de 100%. Entretanto, o mesmo não ocorre com os resultados positivos, devido à alta sensibilidade associada à baixa especificidade da ELISA-BM (91,76%), produzindo resultados falso-positivos (36,7%).

Pela grande complexibilidade antigênica dos tripanossomatídeos, outro fator a ser considerado é a possibilidade de ocorrer reações cruzadas com soros de animais infectados com Leishmaniose Tegumentar, Doença de Chagas, (Sundar, 2002; Shaw & Voller, 1964; Camargo, 1966; Araújo & Mayrink, 1968 e Costa *et al.*, 1991), e outros tripanossomatídeos que compartilham vários epitopos comuns (Badaró *et al.*, 1986). Deste modo, os inquéritos caninos poderiam estar superestimando o número de cães infectados por *L. chagasi*, uma vez que existem muitas áreas de sobreposição da doença de Chagas e LV (Costa *et al.*, 1991; Corredor-Arjona *et al.*, 1999).

A RFC, apesar de ser uma técnica de difícil padronização dos reagentes utilizados e, portanto, de baixa reprodutibilidade – um dos motivos de seu desuso - é uma reação com alta especificidade. Smith *et al.* (1984) e Pappas *et al.* (1985) observaram, respectivamente, 82% e 96% de reações cruzadas com a doença de Chagas e a leishmaniose tegumentar americana (LTA) em amostras com títulos baixos. Nesse estudo das 116 amostras analisadas, e que apresentavam pelo menos uma das reações positivas, apenas 27 amostras foram positivas. No entanto, como a sensibilidade da RFC é de apenas 62%, poucos casos de co-infecção poderiam ocorrer. E, como não é conhecida a taxa de prevalência doença de

Chagas canina na região não dá para determinar se este é um motivo que interfira na alta prevalência de leishmaniose visceral canina.

## 7.2. CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

O Programa de Controle de Leishmanioses Brasileiro (PCLB) é baseado em três medidas que devem ser executadas conjuntamente: diagnóstico e tratamento dos casos humano; triagem sorológica e sacrifício dos cães sororreativos e aplicação de inseticida residual (Deane, 1956; Tesh, 1995; Alencar, 1961; Magalhães *et al.*, 1980).

Vários autores não têm observado redução de casos de LVH ao adotar apenas determinados procedimentos preconizados pelo MS. Evans *et al.* (1992) ao realizarem estudo no nordeste do Brasil, não encontraram relação entre o risco de crianças contraírem LV com a proximidade de cães. Do mesmo modo, Dietze *et al.* (1997) em ensaio comunitário realizado na região serrana do estado do Espírito Santo, Brasil, não encontrou eficácia no sacrifício isolado de cães infectados como medida de controle eficaz para LV. Queiroz *et al.* (2004), realizando estudo de coorte no período de 1997 a 2000, demonstraram a ineficiência de programas que incluem apenas a eliminação de cães infectados, uma vez que observaram intensa migração canina e não encontraram relação entre a presença de cães infectados por LV com aumento da infecção humana. Ashford *et al.* (1998) em estudo realizado em na cidade de Jacobina, Bahia, observaram também que a retirada dos cães como fator isolado de prevenção não foi eficaz devido à intensa migração canina observada.

Entretanto, apesar desses resultados contraditórios, sabe-se que o cão possui um importante papel como reservatório da doença por apresentar alta susceptibilidade à infecção, elevado parasitismo cutâneo e sua estreita relação com humanos (Ashford, 1996). Cunha *et al.* (1937), Deane (1956), Alencar (1959) e Cunha *et al.* (1995) comprovaram a intensa capacidade do cão doméstico em infectar tanto vetores, quanto pessoas, demonstrando ser um reservatório abundante e competente da LV. Na literatura brasileira não há nenhum relato, no período de 1953 a 1997, da ocorrência de epidemias de LVH sem que fosse precedida da presença de cães soropositivos na localidade (Funasa, 2002). Assim

apesar de não haver concordância sobre o papel do cão na manutenção do ciclo doméstico da LV, a maioria dos trabalhos aponta nesta direção.

Como recomendado, pelo Ministério da Saúde, neste trabalho foi executado o sacrifício de cães com sorologia positiva para LV. Entretanto, como a permanência de cães com sorologia indeterminada e/ ou falso negativo é responsável pela manutenção da infecção nas áreas (FUNASA, 2002) causando principalmente, a falha do PCLB e por se tratar de uma área predominantemente rural, em que o acesso aos serviços de saúde e vigilância é precário, problemático e difícil, também se fez o sacrifício dos cães com sorologia indeterminada para LV.

Tal decisão foi adotada pelo importante papel ocupado pelo cão como reservatório da LVH, por saber que a doença canina precede a doença humana (Oliveira *et al.*, 2001) e pelo fato de existirem cães recentemente infectados que ainda não apresentam sorologia evidentemente positiva, mas que geralmente 1 a 2 meses depois soroconvertem (Neves, 2005).

Em inquéritos epidemiológicos, apesar de ser recomendado o uso de testes com alta sensibilidade, visando obter menor taxa de cães falso negativos, pois se evita a permanência de cães positivos como fontes de infecção para o vetor e deste para o homem e outros animais, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas mais específicas para diagnóstico canino a fim de minimizar o risco de sacrificar cães falso-positivos.

Na prática, entretanto, como parte destes resultados falso-positivos podem ser decorrente de reações cruzadas com doenças que também não possuem tratamento canino eficaz, em que o cão também desempenha importante papel como reservatório, o MS recomenda o sacrifício destes animais, da mesma forma que ocorre para LVC.

### **7.3. SOROPREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA SEGUNDO PADRÃO RACIAL, SEXO E IDADE.**

A evidência da possibilidade entre a associação do tipo de pêlo e o risco de o cão adquirir infecção foi relatada por Sideris *et al.* (1996), ao observar maior prevalência da doença em animais de pêlo curto. Esse fenótipo é certamente muito mais prevalente, uma

vez que o pêlo longo oferece um tipo de proteção natural ao inseto vetor. França-Silva *et al.* (2003) Wynder *et al.* (1987) observaram risco significativamente maior para animais de pêlo curto adquirir LV quando comparado com animais de pêlo longo. Ao contrário desses autores, neste estudo, não foi observada relação entre a positividade para LVC e o comprimento do pêlo, pois a prevalência para pêlo curto foi de 10,54% enquanto para pêlo longo, 12,26%.

Existe a possibilidade de ter ocorrido neste estudo uma variabilidade nos critérios de classificação do tipo de pêlo por parte dos observadores, pois o critério utilizado para essa determinação foi subjetivo. Alguns autores classificam os animais como “pêlo longo” quando estes apresentam pêlos maiores do que três centímetros (Moreira *et al.*, 2003).

Uma outra possível explicação para o conflitante resultado pode ser devido à exclusão, por aqueles autores, dos animais que não possuem raça definida. Na região do estudo, a grande maioria dos cães (99,12%) não possui raça definida o que impossibilitou a realização de tal tipo de relação com a LVC. Ranque *et al.* (1997) observou que na França as raças mais acometidas pela LVC são Pastor Alemão e Boxer. França-Silva *et al.* (2003), observaram no município de Montes Claros, Minas Gerais a prevalência de LVC de 26,9% em Cocker e 24,6% em Boxes.

No presente estudo verificou-se que o risco de infecção pra LVC é semelhante ( $p > 0,05$ ) para os dois sexos, uma vez que 8,04% dos cães positivos para leishmaniose eram fêmeas e 12,09% eram machos. Estes resultados estão ao acordo com o relatado por Paranhos-Silva *et al.* (1996), por Feitosa *et al.* (2000); por Cabrera *et al.* (2003) e por França-Silva *et al.* (2003). Por outro lado, na França, Lanotte *et al.*, (1975) observaram uma maior prevalência em cães machos.

A soropositividade para LVC foi encontrada em todas as faixas etárias, porém não foi observada diferença de prevalência em função da idade do animal, o mesmo observado por França-Silva *et al.* (2003) em trabalho realizado em região endêmica do Norte de Minas Gerais. No Velho mundo diferentes estudos têm verificado o aumento da prevalência da LVC com o aumento da idade do cão (Lanotte *et al.*, 1975; Ranque *et al.*, 1997; Abranches *et al.*, 1991a), que pode ser explicada pelo maior tempo de exposição, assim aumentado à possibilidade de infecção.

Baseado na pesquisa realizada observa-se a grande importância dos cães na rotina da população, tanto nos conglomerados quanto na zona rural, uma vez que tais animais são utilizados frequentemente na proteção das propriedades, companhia e também nas atividades de caça. A prevalência da LVC foi semelhante de acordo com a função exercida pelo cão. Ao contrário de Amóra *et al.* (2006) que observaram maior prevalência da LV em cães de guarda procedentes das áreas e urbana.

#### **7.4. PREVALÊNCIA DA LEISHMANIA VISCERAL CANINA RELACIONADA AO QUADRO CLÍNICO OBSERVADO**

O quadro clínico de Leishmaniose Visceral Canina observado varia de cães aparentemente saudáveis a aqueles com manifestações severas da doença (Sanchis *et al.*, 1976; Lanotte *et al.*, 1979). Na avaliação clínica realizada no momento da coleta sanguínea os 571 cães foram classificados em assintomático, oligossintomáticos e sintomáticos e observou-se que 94,8% não apresentavam nenhum sinal clínico compatível com alterações causadas pela LV, 1,56% foram classificados como oligossintomáticos e, finalmente 3,64% como sintomáticos.

Ao realizar sorologia para LVC observou-se que nos cães positivos (n= 62) 12,9% cães possuíam até 3 sinais e 4,83% eram sintomáticos. Também foram observados que 82,26% não apresentavam quaisquer sinais clínicos da doença. Isto pode ser decorrente do longo período de incubação, que pode variar de 2 a 4 meses (Azevedo, 2004) e, devido a imunocompetência dos animais (Azevedo, 2004) que pode contribuir para a ocorrência de cães soropositivos e assintomáticos. Este é um grupo de extrema importância para a epidemiologia da doença, como foi demonstrado por Molina *et al.* (1994) por não haver relação da infectividade de cães para LV com o estado clínico destes animais.

A distribuição dos grupos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos variou em relação à localidade de procedência do animal. Dos nove animais considerados sintomáticos, um pertencia ao Brejo Mutambal e Lagoa do Jóia II, Porão de Areia, Tabual de Cima e Tiririca apresentaram dois indivíduos em cada localidade. As demais comunidades não apresentaram nenhum cão sintomático. Dos oligossintomáticos, um era

procedente do Brejo Mutambal e outro da Lagoa do Jóia I. Em relação aos animais que não apresentavam nenhum sinal clínico, estavam distribuídos em todas as comunidades, exceto Limoeiro e Capoeirão.

E das localidades que apresentaram cães com sintomáticos, 88,89% deles estavam em zona rural. Do mesmo modo, a prevalência de assintomáticos também foi mais elevada em áreas rural quando realizada comparação com conglomerados especiais.

As alterações clínicas apresentadas pelos animais com LVC foram anteriormente verificadas no Brasil por Feitosa *et al.* (2000). Em cerca de 20% dos animais sororreativos para LV pode-se observar algum tipo de sinal clínico compatível com alterações provocadas pela doença. Porém, segundo alguns autores (Feitosa *et al.*, 2000; Hipólito *et al.*, 1965) a onicogrifose é o sinal mais freqüente (72,72%) entre os animais soropositivos, seguido de conjuntivite e emagrecimento, ambos com 36,36%.

#### **7.5. NÍVEIS DE IgG1 E IgG2 OBSERVADOS NAS REAÇÕES SOROLÓGICAS RELACIONADOS AOS SINAIS CLÍNICOS OBSERVADOS**

A resposta imune possui papel crucial na evolução clínica da Leishmaniose Visceral Canina que é causada por protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar macrófagos e podendo desencadear uma doença crônica inflamatória envolvendo diferentes tecidos (Abbas, 2005). O cão infectado por LV pode ser assintomático, e possuir resposta imunoinflamatória do tipo Th1 (Pozio *et al.*, 1981; Abranches *et al.*, 1991; Cabral *et al.*, 1992; Pinelli *et al.*, 1994, 1995) que são responsáveis pelo controle da infecção, pois ativa células T CD4<sup>+</sup> Th1 específicas para *Leishmania* capazes de produzir IFN- $\gamma$ , assim ativando macrófagos para destruição de parasitos intracelulares. Por outro lado os animais que desenvolvem LVC possuem a doença associada a uma resposta imune predominantemente humoral associada à resposta Th-2 (Pinelli *et al.*, 1994) resultando no aumento de sobrevivência do protozoário e exacerbação das lesões devido à ação supressora de macrófagos e citocinas Th2, com produção principalmente de citocina IL-4 podem levar ao óbito.

O diagnóstico LV pode ser retardado, pois frequentemente está associado a um espectro de sinais não específicos (Blavier *et al.*, 2001). Os sinais clínicos mais comuns são lesões cutâneas, perioculares e oculares, nefropatia, disfunções musculoesqueléticas, cardiovasculares e digestivas e hipertrofia de órgãos linfóides (Ferrer *et al.*, 1988; Blavier *et al.*, 2001; Travi *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2004). Dado essa gama de sinais clínicos não específicos, técnicas laboratoriais são indispensáveis para a obtenção de diagnóstico correto para LV sendo as que utilizam sorologia as mais rápidas e práticas para realização.

Neste trabalho ao caracterizar aspectos da resposta humoral pela dosagem de subclasses de IgG (IgG1 e IgG2) específicas para *Leishmania* obteve-se maior reatividade para IgG2 do que para IgG1. IgG2 apresentou reatividade em 88,23% (15) das reações relacionadas a algum sinal clínico, enquanto IgG1 foi reativa em 52,94% (9) e indeterminada em 11,76% (2) dos 17 eventos analisados.

A proporção de anticorpos anti-IgG2 foram considerados altos em animais sintomáticos comparados com os assintomáticos como observado por Leandro *et al.*, (2001) que ao avaliar resposta imune imoral e celular em estudo com 12 beagles (naturalmente e experimentalmente infectados) observaram uma marcada resposta humoral caracterizada por altos níveis de IgG2 no grupo formado por animais sintomáticos. Estes resultados também foram encontrados por Deplazes *et al.* (1995); Rejas, em Madri, para *Leishmania infantum*. Ao contrário do observado por Bourdoiseau *et al.* (1997) que ao estudar 14 animais naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, sendo seis assintomáticos, oito apresentava sinais clínicos e 22 formava o grupo controle, detectaram IgG1 e IgG2 nos soros dos 14 animais sendo que os níveis de IgG2 foram predominantes em animais assintomáticos.

Os níveis de IgG1 foram compatíveis em todos os animais reagentes, não encontrando relação com sintomatologia como observado por Leandro *et al.* (2001), que encontraram níveis similares de IgG1 no grupo dos cães assintomáticos e no grupo dos cães sintomáticos. Ao contrário do que foi relatado por Solano-Gallego *et al.* (2003); Quinnell *et al.* (2003); Courtenay *et al.* (2002); Strauss-Ayali & Baneth (2000); Nieto *et al.* (1999) e

Deplazes *et al.* (1995) que encontraram altos níveis desses anticorpos em animais sintomáticos.

## **7.6. LIMITAÇÃO DO ESTUDO**

Como o estudo foi realizado no universo de cães o viés de seleção, tão freqüentemente observado em inquéritos de prevalência, não ocorreu neste estudo.

A única é a probabilidade da presença de resultados falso positivo, mas que foi minimizado pela adoção de critérios de infecção em pelo menos duas reações sorológicas.

## **8. CONCLUSÃO**

- A prevalência de Leishmaniose Visceral Canina no município de Varzelândia, Minas Gerais, Brasil foi de 10,86%, variando de 0,0% à 24,49%.

- A infecção por Leishmaniose Visceral Canina foi mais prevalente na zona rural (14,33%) que nos conglomerados especiais (6,4%).

- Os cães assintomáticos foram mais prevalentes na zona rural (14,33%) do que nos conglomerados (6,4%).

- Os distritos que apresentaram maior percentual de cães assintomáticos foi Campo Redondo (92,3%) e Lagoa do Jóia I (93,2%)

- Os distritos que apresentaram maior percentual de cães sintomáticos foram Lagoa do Jóia II (33,33%), Porão de Areia (50,0%), Tabual de Cima (33,33%), Tiririca (22,22%).

- A prevalência da Leishmaniose Visceral Canina não variou significativamente em função da idade (0 -| 2 anos, 2 -| 7 anos e  $\geq$  7 anos), do sexo, da ocupação (guarda, caça e companhia) e do tipo pêlo (longo ou curto);

- Sinais clínicos observados foram: alopecia, ulceração, descamação, conjuntivite, onicogribose e emagrecimento. E, entre esses, o mais freqüente foi a onicogribose.

- Não foi observada diferença na reatividade de IgG1 em relação aos sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos.

- IgG2 foi significativamente mais reativo para os animais oligossintomáticos do que para os animais assintomáticos.

## **9. RECOMENDAÇÕES:**

- Coletar amostras de sangue e realizar testes sorológicos das pessoas que residem nos domicílios e proximidades dos locais em que foram encontrados cães sororreativos para LV;

- Realizar borrifação de inseticidas com ação residual nos domicílios, peridomicílios e residências próximas àquelas em que se localizou cães com sorologia positiva para LVC;

- Monitorar as localidades onde foram encontrados casos de LVC para detecção precoce de novos casos de LV ou dos falsos negativos que realizaram a soroconversão;

- Monitorar as localidades a fim de avaliar o impacto das medidas de controles realizadas, constituída pela retirada de cães soropositivos.

## **10.ANEXOS**

## 10.1. ANEXO 1:

### Ficha epidemiológica:

<b>CONTROLE</b>					
<b>RG</b>					
<b>NOME DO DONO</b>					
<b>Código da amostra</b>					
<b>NOME DO CÃO</b>					
<b>IDADE</b>					
<b>SEXO</b>					
<b>TIPO DE PÊLO</b>					
<b>RAÇA</b>					
<b>ALOPÉCIA</b>					
<b>ULCERAÇÃO</b>					
<b>Descamação cutânea</b>					
<b>CONJUNTIVITE</b>					
<b>ONICOGRIFOSE</b>					
<b>EMAGRECIMENTO</b>					
<b>PESO</b>					
<b>ESTATURA</b>					

## 10.2. ANEXO 2:

### Procedimento ELISA utilizando kit Bio-Manguinhos:

1) O diluente de amostra /conjugado foi preparado da seguinte forma:

Tabela 17: Preparo do diluente de amostras/ conjugado:

Nº de “strips”	Nº de reações	R – 01(5X)	R – 02	Água destilada
1	até 16	3mL	0,3g	12mL
2	até 32	6mL	0,6g	24mL
3	até 48	8mL	0,8g	32mL
4	até 64	10mL	1g	40mL
5	até 80	12mL	1,2g	48mL
6	até 96	14mL	1,4g	56mL

Onde R-01 (5X) é diluente da amostra/ conjugado [5X] e o R-02 é a Lectina de leite.

2) Diluiu-se em tubos de hemólise 5µL dos controles positivos e negativos e das amostras de soros canino a serem analisadas, previamente homogeneizadas, em 500µL do diluente de amostra, a fim de obter uma diluição final de 1:100. No caso das amostras de sangue dessecado em papel de filtro (SDPF), estas foram picotadas e 1 picote (6mm) foi adicionado a 500µL do diluente de amostra em tubos de hemólise, e deixado incubar por 12 horas a 4°C. Posteriormente, tais tubos foram submetidos à agitação por 1 hora em agitador orbital tipo Kline.

3) As placas sensibilizadas e bloqueadas foram retiradas do freezer 15 minutos antes do início do procedimento para que gotículas de água presentes na superfície secassem.

4) Distribuiu-se 100µL dos controles já diluídos da seguinte forma: na colina 1 fileira “A” e “B” o controle positivo, na “C” e “D” o controle negativo, na “E” e “F” somente o diluente da amostra (sem soro) como controle de reação inespecífica do conjugado. Nos outros orifícios, distribuiu-se 100µL das amostras testes, já diluídas nos respectivos orifícios correspondentes.

5) Os “strips” foram selados com folha adesiva e incubados a 37°C por 30 minutos.

6) O tampão de lavagem foi preparado para utilização da pipeta de Pasteur da seguinte forma:

Tabela 18: Preparo do tampão de lavagem:

Nº de “strips”	Nº de reações	R – 03	Água destilada
1	até 16	3mL	12mL
2	até 32	6mL	24mL
3	até 48	8mL	32mL
4	até 64	10mL	40mL
5	até 80	12mL	48mL
6	até 96	14mL	56mL

Onde R-03 é o tampão de lavagem [20X].

7) Retirou-se cuidadosamente a folha adesiva e o conteúdo foi aspirado, e o orifício lavado por seis vezes com tampão de lavagem (200µL /orifício). Aguardou de 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

8) O conjugado foi preparado da seguinte forma:

Tabela 19: Preparo do conjugado:

Nº de “strips”	Nº de reações	R – 01 diluído	R - 10
1	até 16	5mL	5µL
2	até 32	5mL	5µL
3	até 48	10mL	10µL
4	até 64	10mL	10µL
5	até 80	15mL	15µL
6	até 96	15mL	15µL

Onde R-01 é diluente da amostra diluído e R- 10 é o conjugado

O conjugado só foi adicionado ao diluente alguns minutos antes de terminar a incubação anterior.

9) Homogeneizou-se bem e distribuiu-se 100µL da diluição do conjugado em cada orifício dos “strips”.

10) Os “strips” foram selados e incubados conforme descrito no item 4 e aspirados e lavados conforme descrito no item 6.

11) O substrato foi preparado em frasco escuro, alguns minutos antes do uso.

O substrato foi preparado da seguinte forma:

Tabela 20: Preparo do substrato:

Nº de “strips”	Nº de reações	R – 04	R - 05	R - 06
1	até 16	2,5mL	25µL	5µL
2	até 32	4mL	40µL	8µL
3	até 48	6mL	60µL	12µL
4	até 64	8mL	80µL	16µL
5	até 80	10mL	100µL	20µL
6	até 96	12mL	120µL	24µL

Onde R-04 é diluente do substrato, R-05 é o cromógeno (TMB) e R-06 é o substrato  $H_2O_2$ .

12) Foram distribuídos rapidamente 100µL de substrato por poço, em todos os orifícios.

13) Incubou-se à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos.

14) A reação foi bloqueada adicionando-se 50µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, realizou-se a leitura.

15) Leitura:

Utilizou-se espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450nm para leitura e sem utilização de filtro de referência (620-630nm).

### 10.3. ANEXO 3 IFI kit- Bio-Manguinhos

#### Titulação do conjugado

1) Para a titulação do conjugado as lamínulas foram fervidas em água destilada por 30 minutos e foram conservadas em álcool comercial até a utilização, quando foram cuidadosamente limpas e secas com auxílio de gaze.

2) Em três lâminas foram pingados 10µL de antígeno por orifício, deixou-se secar em temperatura ambiente *overnight* para uma boa fixação dos parasitas.

3) Diluiu-se o controle positivo em PBS 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 em diluição seriada, na qual, transfere-se 200µL de um tubo para o seguinte. O controle negativo foi diluído em PBS 1/40.

4) A cada uma das três lâminas foi adicionado por orifício 10µL das diluições de soro.

5) As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos em estufa à 37°C.

6) Ao término deste tempo, as lâminas foram lavadas em PBS nas cubas de lavagem, sendo que cada banho teve a duração de 5 minutos e, em seguida, 1 lavagem rápida em água destilada.

7) Após a lavagem, as lâminas foram colocadas para secar por 10 minutos em estufa 37°C.

8) A solução de PBS-Azul de Evans (PBS-AE) 0,004% foi preparada utilizando-se 120µL de Azul de Evans (0,1%) e 2880µL de PBS.

9) Para a diluição do conjugado anti-Ig humano marcado com fluoresceína 20µL de conjugado foi adicionado a 980µL de PBS-AE formando uma solução de concentração 1:50, e a seguir fez-se, em tubos distintos, diluição 1:100, 1:150, 1:200, 1:250, 1:300.

10) 15µL destas diluições foram colocadas nas lâminas. Na lâmina 1 colocaram-se as diluições 1:50 e 1:100; na lâmina 2 as diluições 1:150 e 1:200 e finalmente na lâmina 3 as diluições 1:250 e 1:300.

11) Estas lâminas foram incubadas em câmara úmida, na estufa 37°C, por 30 minutos.

12) Posteriormente as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS em cuba apropriada, com tempo de 5 minutos de duração cada lavagem e 1 lavagem rápida em água destilada.

13) Após esta lavagem as lâminas foram colocadas para secar por 10 minutos em estufa a 37°C.

14) Finalmente foi adicionado 3 gotas de glicerina tamponada sobre as lâminas, as quais foram cobertas com lamínula. Foram mantidas ao abrigo da luz até o momento da leitura que ocorreu o mais breve possível.

15) Estas lâminas foram lidas em microscópio de imunofluorescência e objetiva com aumento de 40X, e o título do conjugado foi a menor diluição em que se observou fluorescência até o título do controle positivo e ausência de fluorescência nas diluições correspondentes ao controle negativo e PBS (controle do conjugado).

16) Procedimento do IFI:

As lamínulas foram fervidas em água destilada por 30 minutos e estocadas em álcool comercial até a utilização, quando foram cuidadosamente limpas e secas com gaze.

17) Fez-se protocolo para determinar o número de lâminas a serem preparadas, considerando o número de amostras e suas diluições (1:40 e 1:80).

18) Foi adicionado 10µL do antígeno em cada orifício da lâmina, que foi deixada secar overnight à temperatura ambiente.

19) Foram diluídas 10µL de soro em 390µL de PBS obtendo uma diluição 1:40. Desta solução foi retirada 100µL e adicionadas à 100µL de PBS, obtendo uma diluição 1:80. E adicionados 10µL do controle positivo em 390µL de PBS (1:40) e 10µL do controle negativo em 390µL de PBS (1:40).

20) No caso de SDPF foram colocados 2 picotes do papel em 250µL de PBS, em tubo de hemólise para obtenção de uma solução 1:20 e, retirando 100µL desta solução 1:20 e adicionando 100µL de PBS, obteve-se diluição 1:40. Desta, retirou-se 100µL e adicionando 100µL de PBS para obter uma diluição 1:80.

21) Dessas diluições, foram retiradas 10µL e adicionadas em cada orifício da lâmina obedecendo ao protocolo elaborado previamente.

22) Estas lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e posteriormente foram lavadas 3 vezes em PBS, nas cubas de lavagem com duração de 5 minutos cada banho e lavadas rapidamente em água destilada.

23) As lâminas foram colocadas para secar por aproximadamente 10 minutos à 37°C.

24) Momento antes do uso, foi preparado uma reação de PBS-AE, na qual foi utilizado, para 6 lâminas, 1440µL de PBS e 60µL de Azul de Evans (0,1%).

25) O conjugado foi diluído com esta solução na proporção adequada de acordo com a titulação prévia e desta diluição do conjugado, foram adicionados 15µL em cada orifício da lâmina.

26) As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos em estufa à 37°C. Após este período foram lavadas 3 vezes em PBS, com duração de 5 minutos cada banho e posteriormente, as lâminas passaram rapidamente por um banho em água destilada. Foram colocadas por 10 minutos na estufa a 37°C para secagem. Depois de seca, cada lâmina recebeu 3 gotas de glicerina tamponada e foram cobertas com lamínulas.

27) Para a leitura foi utilizados um microscópio de imunofluorescência e objetiva com aumento de 40X. As amostras que se apresentaram reagentes a partir da diluição de 1:40 foram consideradas positivas. Foram consideradas negativas as amostras que não apresentaram fluorescência.

## **11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abbas, A.K & Lichtman, A.H. (2005). *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier Editora Ltda.

Abranches, P.; Silva-pereira, M.C.D.; Conceição-Silva, F.M.; Santos-Gomes, G.M. & Janz, J.G. (1991). Canine leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.*, 77:557-561.

Alencar, J.E.; Cantidio, W.M. & Cavalcante, D.N. (1956). Calazar em Fortaleza. *XIII Cong. Bras. Hyg.* Fortaleza, Ceará, Brazil.

Alencar, J.E. (1959). Calazar canino: Contribuição para o estudo da epidemiologia do Calazar no Brasil. Tese, Imprensa Oficial, Fortaleza, Ceará, Brasil, 342p.

Alencar, J.E. (1961). Profilaxia do Calazar no Ceará, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 3:175-180.

Alencar, J.E. & Cunha, R.V. (1963). Inquérito sobre calazar no Ceará – Novos resultados. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 15:391-403.

Alencar, J.E., (1977/ 1978). Leishmaniose Visceral no Brasil. *Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará.* 17/18:129-148.

Alquizar, A.S.; Luquetti, A.O.; Borges-Pereira, J; Moreira, E.F.; Gadelha, M.F.S.; Garcia-Zapata, M.T. & Arruda, A.H.S. (1997). Estudo Multicêntrico: avaliação do desempenho de conjuntos diagnósticos de hemaglutinação indireta, disponíveis no Brasil, para diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi*. *Rev. Patologia Tropical*, vol. 26(2):343-374, jul-dez.

Altamirano-Enciso, A. J.; Marzochi, M.C. A.; Moreira, J. S.; Schubach, A. O. e Marzochi, K. B. F. (2003). Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa

com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *História, Ciências, Saúde - Manguinhos*, vol. 10(3): 853-82, set.-dez.

Altes, J.; Salas, A.; Riera, M.; Udina, M.; Galmes, A.; Balanzat, J.; Ballesteros, A.; Buiades, J.; Salva, F. & Vailalunga, C. (1991). Visceral Leishmaniasis: another H.I.V. associated opportunistic infection? Report of eight cases and review of literature. *AIDS* (5): 201-207.

Alvar, J.; Molina, R.; Andrés, M.S.; Tesouro, M.; Nieto, J.; Vitutia, M.; Gonçalves, F.; Boggio, J.; Rodrigues, F.; Saintz, A. & Escacena, J. (1994). Canine parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Na. Trop. Med. Parasitol.*, vol.88,n4, 371-374.

Alvar, J.; Cañavate, C. & Guitiérrez-Solar, B. (1997). Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Rev. Clin. Microbiol.*, 10:298-319.

Amóra, S.S.A; Santos, M.J.P.; Alves, N.D.; Costa, S.C.G; Calabrese, K.S.; Monteiro, A.J.; Rocha, M.F.G. (2006). Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Ciência Rural*, v.36, n.6, 1854-1859 nov-dez.

Araújo, F.G. & Mayrink, W. (1968). Fluorescent antibody test in visceral Leishmaniasis II Studies on the specificity test *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 10, jan- fev p. 41-45.

Ashford, R.W.; Desjeux, P.; Deraadt, R.P. (1992). Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today*, 8:103-104.

Ashford, D.; Bozza, M.; Freire, M.; Miranda, J.C.; Sherlock, I.; Eulálio, C.; Lopes, U.; Fernandes, O.; Degraeve, W.; Barker, R.H.; Badaró, R. & David, Jr. (1995). Comparison of

Polymerase Chain Reaction and serology for detection of canine leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53(3):251-255.

Ashford, R.W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Derm.* 14: 523-532.

Ashford, D.; David, Jr.; Freire, M.; David, I.; Sherlock, I.; Eulálio, M.C.; Sampaio, D.P.; Badaró, R. (1998). Studies on control of visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59(1):53-57.

Azevedo, M.A.A. (2004). Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Canina no município de Poroxé – Mato Grosso, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária.* V.13.

Badaró, R.; Jones, T.C.; Carvalho, E.M.; Sampaio, D.; Reed, S.G.; Barral, A.; Teixeira, R. & Johnson, W.D.J. (1986). New perspectives on a sub clinical form of visceral leishmaniasis. *Journal of infectious diseases,* 156:1003-1011.

Badaró, R.; Benson, D.; Eulálio, M.C.; Freire, M.; Cunha, S.; Netto, E.M.; Pedral, S.D.; Madureira, C.; Burns, J.M.; Houghton, R.L.; David, Jr. & Reed, S.G. (1996). Rk39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 173:758-762.

Barata, R.A.; França-Silva, J.C.; Costa, R.T.; Fortes-Dias, C.L.; Silva, J.C.; Paula, E.V.; Prata, A.; Monteiro, E.M.; Dias, E.S. (2004). Phlebotomine sand Flies in Porteirinha, an area of American Visceral Leishmaniasis Transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro, 99(5):481-487.

Blavier, A.; Keroack, S.; Denerolle, P.; Goy-Thollot, I.; Chabanne, L.; Cadore, J.L.; Bourdoiseau, G. (2001). Atypical forms of canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal* 162, 108-120.

Boelaert, M.; El Safi, S.; Mousa, H.; Githure, J.; Mbatia, P.; Gurubacacharya, V. *et al.* (1999). Multicenter evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health.* 4:31-37.

Borja-Cabrera, G.P.; Correia Pontes, N.N.; Da Silva, V.O.; Paraguai-de-Souza, E.; Santos, W.R.; Gomes, E.M. (2002). Log-lasting protection against canine kala-azar using the FML-Quil A saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*, 20:3277-3284.

Bourdoiseau, G.; Bonnefont, C.; Hoareau, E.; Boehringer, C.; Stolle, T.; Chabanne, L. (1997). Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania*-infected treated and untreated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59:21-30.

Bray, R.S. & Lainson, R. (1967). Studies on the immunology and serology of leishmaniasis V. the use of particles as vehicles in passive agglutination tests. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61:490.

Brener, Z. (1957). Calazar canino em Minas Gerais. Tese (Fac. Med. Univ. Minas Gerais), Belo Horizonte, 90p.

Burns, J.M.; Shreffler, W.G.; Benson, D.R.; Ghalid, H.W.; Badaró, R. & Reed, S. (1993). Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:775-779.

Cabral, M.; O'Grady, J.; Alexander, D. (1992). Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunology.* 14, 531-539.

Cabrera, G.M.; Silva, V.O.; Costa, R.T. & Genaro, O. (1999). The fucose mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61:296-301.

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. (2003). Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 45 (2):79-83.

Caldas, A.J.; Silva, D.R.; Pereira, C.C.; Nunes, P.M.; Silva, B.P.; Silva, A.A.; Barral, A. & Costa, J.M. (2001). *Leishmania (leishmania) chagasi* infection in children from an endemic area of visceral leishmaniasis in the São Luis Island – MA, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34:445-451.

Camargo, M.E. (1966). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 8:224-227.

Camargo, M. E. & Rebonato, C. (1969). Cross reactivity in immunofluorescence for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 18:500-505.

Camargo-Neves, V.L.F.; Katz, G.; Rodas, L.A.C.; Poletto, D.W.; Lage, L.C.; Spínola, R.M.F. (2001). Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, 17(5):1263-1267, set-out.

Campino, L.; Cotes, S.; Pires, R.; Oskan, L & Abranches, P. (2000). Detection of *Leishmania* in immunocompromised patients us peripheral blood on filter paper and the polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19(5):396-398.

Campos-Neto, A.; Porrozzzi, R.; Greeson, K.; Coler, R.N.; Webb, J.R.; Skeiky, Y.A.; Reede, S.G. Grimaldi, G. Jr. (2001). Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and non-human primate models of the human disease. *Infect Immun.* 69:4103-4108.

Cardoso, L.; Rodrigues, M.; Santos, H.; Schoone, G.J.; Carreta, P.; Varejão, E.; Benthem, B.; Afonso, M.O.; Alves-Pires, C.; Semião-Santos, S.J.; Rodrigues, J. & Schallig, H.D.F.H. (2004). Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. Infection in the municipality Of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Vet. Parasitol.*, 121:21-32.

CDC (1961). Fluorescent Antibody Techniques, CDC nº 729, USA

Cerf, B.J.; Jones, T.C.; Badaró, R.; Sampaio, D.; Teixeira, R. & Johnson, W.D.JR. (1987) Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 156:1030-1033.

Chagas, E.; Cunha, A.M.; Castro, G.O.; Ferreira, L.C. & Romana, C. (1937). Leishmaniose Visceral Americana. Relatório dos trabalhos da comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 32:321-385.

Chagas, E.; Cunha, A.M.; Ferreira, L.C.; Deane, L.M.; Deane, G.; Guimarães, F.N.; Paumgarten, M.J.von & Sá, B. (1938). Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1937. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 33:89-229.

Chatterjee, M.; Beneth, G. & Mandal, C. (1999). Diagnostic and prognostic potential of antibodies against o-acetylated sialic acids in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70:55-56.

Cisalpino, E. O.; Mayrink, W. & Batista, S.M. (1962). Antígeno metílico em calazar. *O Hospital*, 61: 155-160.

Cordeiro-da-Silva, A.; Cardoso, L.; Araújo, N.; Castro, H.; Tomas, A.; Rodrigues, M.; Cabral, M.; Vergnes, B.; Sereno, D.; Ouaiissi, A. (2003). Identification of antibodies to *Leishmania* silent information regulatory 2 (SIR2) protein homologue during canine natural infections: pathological implications. *Immunol. Lett.* 86:155-162.

Corredor Arjona A, Alvarez Moreno CA, Agudelo CA, Bueno M, López MC, Cáceres E, Reyes P, Duque Beltran S, Güaldron LE, Santacruz MM (1999). Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* infection and risk factors in a Colombian indigenous population. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. Jul-Aug;41(4):229-34.

Corredor, A.; Gallego, J.F.; Young, D.G.; Tesh, R.B.; Morales, A.; Carrasquilla, C.F.; Kreutzer, R.D.; Boshell, J.; Palau, M.T.; Cáceres, E. & Peláez, D. (1989). Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40(5): 480-486.

Costa, C.A.; Genaro, O.; Lana, M.; Magalhães, P.A.; Dias, M.; Michalick, M.S.M.; Melo, M.N.; Costa, R.T.; Magalhães-Rocha, N.M.; & Mayrink, W. (1991). Leishmaniose Visceral Canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 24:21-25.

Coutinho, S.G.; Nunes, M.P.; Marzochi, M.C.A. & Tramontino, N. (1985). A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil), where the human disease occur. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 80:17-22.

Courtenay, O.; Quinnell, R.J.; Garcez, L.M.; Shaw, J.J.; Dye, C. (2002). Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J. Infect. Dis.* 186: 1314-1320.

Cunha, A. M. & Chagas, E. (1937). Nova espécie de protozoário do Gênero *Leishmania* patogênico para o homem (nota prévia). *O Hospital* vol. XI (2):5-9.

Cunha, S.; Freire, M.; Eulálio, C.; Cristóvão, J.; Netto, E.; Johnson, W.D.; Reed, S.G. & Badaró, R. (1995). Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89:155-158.

Cupolillo, E.; Grimaldi, G. Jr.; Momen, H. (1994). A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50:296-311.

David, J.R.; Stamm, L.M.; Bezerra, H.S.; Souza, R.N.; Killick-Kendrick, Robert & Oliveira-Lima J.W. (2001). Deltamethirin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96(6):839-847.

Deane, L.M. & Deane, M.P. (1954a). Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *Hospital*, 45 (4): 419-421.

Deane, L.M. & Deane, M.P. (1954b) Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em caso humano de leishmaniose visceral . *Hospital* 46:487-489.

Deane, L.M. & Deane, M.P. (1955). Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatório da *L. donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. *Hospital* 48: 61-70.

Deane, L.M. (1956). Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Tese, (Fac. Méd. Univ. S. Paulo), Brasil, Ed. S.N.E.S., Rio de Janeiro, 162p.

Deane, L.M. & Deane, M. P. (1957). Observações sobre abrigos e criadouros de flebotomos no noroeste do Estado do Ceará. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 9:225-46.

Deane, L.M. & Deane, M.P. (1962). Visceral Leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo* 4(3):198-212.

Degrave, W.; Fernandes, O.; Campbell, D.; Bozza, M. & Lopes, U. (1994). Use of Molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 89 (3): 463-469.

Deplazes, P.; Smith, N.C.; Arnold, P.; Lutz, H.; Eckert, J. (1995). Specific IgG1 and IgG2 antiody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol*. 17:451-458.

Dias, E. S; França-Silva, J. C., Silva, J. C.; Monteiro E. M.; Gonçalves, C. M. e Barata R. A. (2007) Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(1). Jan-fev.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R. (1997). Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis*. Nov; 25(5):1240-2.

Dietze ,R.; Barros, G.B.; Teixeira, L.; Harris, J.; Michelson, K.; Falqueto, A. & Corey, R. (1999). Effect of Eliminating Seropositives Canines on transmtion of Visceral Leishmaniasis in Brasil. *Clinical Infectious Diseases* 25:1240-1242.

D'Oliveira Jr., A .; Costa, S.R.M.; Barbosa, A.B.B.; Orge, M.G. & Carvalho,E. (1997). Assymptomatic *Leishmania chagasi* infection in Relatives Neighbors of Patients with Visceral Leishmaniasis. *Memórias do Institutuo Oswaldo Cruz* 92 (1): 15-20.

Duxbury, R.E. & Sadun, E.H. (1964). Fluorescence antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 13:525-529.

Dye, C. *et al.* (1992). Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basis reproduction number calculated from a cross – seccional serological survey on the Island of gozo. *Parasitol.*, 105:35-41.

Dye, C. (1996). The logic visceral leishmaniasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 55:125-130.

El-Amin, E.R.; Wright, E.P.; Abdel Rahman, A.M.; Kolka, A.; Laarman, J.J. & Pondman, K.W. (1986). Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Tran. R. Soc. Med. Hyg.* 80:271-274

Engvall, E. & Perlman, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* 8:871-874.

Evans, T.G.; Vasconcelos, I.A.B; Lima, J.B.; Teixeira, J.M.; Mc.Auliffe, I.T.;Lopes, U.G. *et al.* (1990). Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnosis methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42:118-123.

Evans, T.G.; Teixeira, J.M.; Mc.Auliffe, I.T.; Vasconcelos, I.A.B.; Souza, A.Q.; Lima, J.W.O. & Pearson, R.D. (1992). Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Northwest of Brazil. *Journal of Infectious Diseases* 166:1124-32.

Faus, E.C.; Russel, P.F. & Jung, R.C. (1974). Craig & Faust (ed.). *Parasitologia Clínica*. Ed. Salvat S.A. México 888p.

Feitosa, M.M.; Ikeda, F.A.; Luvizotto, M.C.R.; Perri, S.H.V. (2000). Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária*. 28:36-44.

Ferrer, L.; Rabanal, R.; Fondevilla, D.; Ramos, J.A.; Domingo, M. (1988). Skin lesions in canine leishmaniosis. *Journal of Small Animal Practice*. 29, 381-388.

Fleiss J.L. (1985). *Statistical methods for rates and proportions*, II Edition, Chapter 13.

França-Silva, J.C. (1997). Leishmaniose visceral canina no município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Dissertação de Mestrado (Universidade Federal de Minas Gerais), Belo Horizonte, 133p.

França-Silva, J.C.; Costa, R.T.; Siqueira, A.M.; Machado-Coelho, G.L.; Costa, C.A.; Mayrink, W.; Vieira, E.P.; Costa, J.S.; Genaro, O. & Nascimento, E. (2002). Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 2474: 1-13.

França-Silva, J.C.; Da Costa, R.T.; Siqueira, A.M.; Machado-Coelho, G.L.; Da Costa, C.A.; Mayrink, W.; Vieira, E.P.; Costa, J.S.; Genaro, O. & Nascimento, E. (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 111:161-173.

Fujiwara, R.T.; Vale, A.M; França-Silva, J.C.; Costa, R.T.; Quetz, J.S.; Martins Filho, O.A.; Reis, A.B.; Correa Oliveira, R.; Machado-Coelho, G.L.; Bueno, L.L.; Bethony, J.M.; Frank, G.; Nascimento, E.; Genaro, O.; Mayrink, W.; reed, S.; Campos-Neto, A. (2005). Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTII) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.* 36:827-838.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). (2002). Boletim epidemiológico número 6, ano 2.

Genaro, O.; Mayrink, W.; Michalick, M.S.M.; dias, M.; Costa, C.A. & Melo, M.N. (1988). Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 83:43.

Genaro, O.; Costa, C.A.; Willians, P.; Silva, J.E.; Rocha, N.M.; Lima, S.L. & Mayrink, W. (1990). Ocorrência de calazar em área urbana da Grande Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 23:121.

Genaro, O.; Pinto, J.A.; Costa, C.A.; França-Silva, J.C.; Silva, J.C.; Sanguinetti, L.S.R.; Vieira, E.P.; Toledo, V.P.C.P.; Mayrink, W. (1996). Phase III randomized double blind clinical trial of efficacy of a vaccine against canine visceral leishmaniasis in urban area of Montes Claros, MG, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 91:166.

Genaro, O.; Costa, R.T.; Willians, P.; França-Silva, J.C.; Reis, A.B.; Vieira, E.P. & Arias, J.R. *et al.* (1997). Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis for dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi* in Brazil. *Acta Parasitol. Turcica*. 21 Supplement 1:93.

Genaro, O. (2000). Leishmaniose visceral. In: Neves, D.P.; Melo, A.L.; Genaro, O.; Linardi, P.M., organizadores. *Parasitologia humana*. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu. P.56-72.

Ghose, A.C.; Halder, J.P.; Pal, S.C.; Mishra, B.P.; Mishra, K.K. (1980). Serological investigation on Indian Kala-azar. *Clin. Exp. Immunol.* 40:318-326.

Ghosh, A.; Zhang, W.W.; Matlashewski, G. (2001). Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/ Th2 and a humoral response wich protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine*. 20:59-66.

Giraud, P. & Cabassu, H. (1932). La Leishmaniose canine dans la region de Marseille. *Bull. Soc. Path. Exort.* 25:1040-1043.

Giraud, P. & Cabassu, H. (1933). Le chien est-il lê reservoir de virus de la leishmaniose interne? *Arch. Med. Gen. Colon.* 2:23-27.

Giraud, P. & Cabassu, H. (1936). Le diagnostic de la leishmaniose canine par la ponction ganglionnaire. *Bull. Soc. Path. Exort.* 29:958-963.

Gomes, A.C., (1994). Sand fly vectorial ecology in the sate of São Paulo. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89(3):457-460.

Gradoni, L.; Maroli, M.; Grammiccia, M; Mancianti, F. (1987). *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Medicine Veterinary Entomology*, 1:988-942.

Gradoni, L.; Scalone, A .; Gramiccia, M. (1993). HIV-Leishmania co-infections in Italy: serological data as a indication of the sequence of aquisition of two infections. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87:94-96.

Gramiccia, M.; Gradoni, I. & Orsini, S. (1992). Decreased sensivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isoled from dogs after several courses of drug treatment. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 86:613-620

Guia de Vigilância Epidemiológica. (2002). Fundação Nacional de Saúde. 5ª edição. Brasília.

Harisson, L.H.; Naider, T.G.; Drew, J.S.; Alencar, J.E. & Pearson, R.D. (1986). Reciprocal relationships between undernutrition and parasitic disease visceral leishmaniasis. *Review of Infectious Diseases*, 8:447-453.

Harith, A.E.; Kolk, A.H.J.; Leeuwenburg, J.; Mugai, R.; Kiugu, S. & Laarman, J.J. (1986). A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80:583-586.

Harith, A.E.; Kolk, A.H.J. & Laarman, J.J. (1987). Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81:603-606.

Hipólito, O.; Freitas, M.G.; Figueiredo, J.B. (1965). Doenças infecto-contagiosas de animais domésticos. *São Paulo: Melhoramentos*. P 200.

Hockmeyer, W.T.; Well de, B.T. & Sabwa, C.L.A. (1984). Complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen. *I. Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78:489-493.

Hommel, M. (1976). Enzymaimmunoassay in leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70:15-16.

Hommel, M. (1978). The genus *Leishmania*. Biology of the parasite and clinical aspects. *Bulletin du Institute Pasteur, Paris* 75: 5-102.

Hommel, M.; Peters, W.; Ranques, J.; Quilici, M. & Lanotte, G. (1978). The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniosis. *An. Trop. Med. Parasitol.* 72:213-218.

Houghton, R.L.; Petrescu, M.; Benson, D.R.; Skeiky, Y.A.; Scalone, A. & Badaró, R. *et al.* (1998). A cloned (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients undergoing drug therapy. *J. Infect. Dis.* 177:1339-1344.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil (, 1997.) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil (2000) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Iverson, L.B.; Camargo, M.E.; Villanova, A.; Reichmann, M.L.A.B.; Andrade, E.A & Tolezano, J.E. (1983). Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana do município de São Paulo - Brasil (1979-1982). *Ver. Inst. Méd. TRop. São Paulo.* 25:310-317.

Jaffe, C.L.; Zalis, M. (1988). Use to parasite proteins from *Leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 157:1212-1220.

Jerônimo, S.M.B.; Oliveira, R.M.; Mackay, S.; Costa, R.M.; Sweet, J.; Nascimento, E.T.; Luz, K.G.; Fernandes, M.Z., Jernigan, J. & Pearson, R.D. (1994). An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med, Hyg.*, 88: 386-388.

Kar, K (1995). Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical Reviews in Microbiology.* 21(2):123-152.

Killick-Kendrick, M.; Focheux, M.C.; Dereure, J.; Puech, M.P. & Cadiergues, M.C. (1997). Protection of dogs from bites of Phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Mem. Vet. Entomol.*, 11:105-111.

Kreutzer, R.D.; Souraty, N. & Semko, M.E. (1987). Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.36:22-32.

Lainson, R.; Shaw, J.J. & Lins, Z.C. (1969). Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63:741-745.

Lainson, R. & Shaw, J.J. (1978). Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. Review articles: parasitology supplement. *Nature* ,237 (22): 595-600.

Lainson, R. & Shaw, J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol 1 Biology and Epidemiology* Petter, W. and Killick-Kendrick,R. (Eds.) Academic Press Inc., London, p.1-120.

Lainson, R.; Shaw, J.J.; Silveira, F.T.; Braga, R.R. (1987a). American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 517.

Lainson, R.; Dye, C.; Shaw, J.J.; Macdonald, D.W.; Courtenay, D.O.; Souza, A.A. & Silveira, F.T. (1990). Amazonian Visceral Leishmaniasis distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relations to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85:135-137.

Lanotte, G.; Rioux, J.A.; Crosset, H.; Vollhardt, Y. (1975). Écologie des leishmanioses dans le Sur de la France. VIII. Complément à l'application épidémiologique de la technique d'immunofluorescence: les tigres géométriques et arithmétiques moines dans la Leishmaniose canina. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 50:1-5.

Lanotte, G.; Rioux, J.A.; Crosset, H.; Vollhardt, Y. (1979). Écologie des leishmanioses dans le Sud de la France. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Élaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Annales de Parasitologie*. 54: 277-295.

Leandro, C.; Santos-Gomes, L.; Campino, L.; Romão, P.; Cortes, S.; Rolão, N.; Gomes-Preira, S.; Capela Roça, M.J.; Abraches, P. (2001). Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet. Immun. and Immunopathology*. 79: 273-284.

Lépine, P. & Bilfinger, F. (1936). Recherche de la leishmaniose viscérale chez les chiens défourennés d'Athènes. *Bull. Soc. Path. Exot.* 29:131-135.

Liste, F. & Gascon, M. (1995). Allopurinol in the treatment of canine visceral leishmaniasis. *The Veterinary Record*, 1:23-24.

Lira R, Contreras LM, Rita RM, Urbina JA. (2001). Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *J Antimicrob Chemother*. May;47(5):537-46.

Luz, K.G.; Gomes, E.M.; da Silva, V.O.; Machado, F.C.S.; Araújo, M.A.F.; Fonseca, H.E.M.; Freire, T.; d'Almeida, J.B.; Palatinik, M.; Palatinik-de-Souza, C.B. (1997). Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and polytransfused hemodialyzed patients. *Am. J Trop. Med. Hyg.* 57:168-171.

Machado-Coelho, G.L.L.; Vitor, R.W.A.; Chiari, C.A.; & Antunes, C.M.F. (1995). Validity of serological for American trypanosomiasis with eluates from filter paper. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 90(1): 59-64.

Magalhães, P.A.; Mayrink, W.; Costa, C.A.; Melo, N.M.; Dias, M.; Batista, S.M.; Michalick, M.S.M. & Williams, P. (1980). Calazar na zona do Rio Doce – Minas Gerais. Resultado das medidas profiláticas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 22:197-202.

Mancianti, F. & Meciani, N. (1988). Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination and counterimmunoelectrophoresis. *Am. J. Vet. Res.* 49(8):1409-1411.

Mancianti, F.; Gramiccia, M.; Gradoni, L. & Piere, S. (1988). Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.*, 82:566-567.

Mangabeira, O. (1969). Sobre a sistemática e Biologia dos *Phlebotomus* do Ceará. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 21:3-25.

Mansueto, S.; magneto, G. & Didado, A. (1975). Confronto tra reazione di fissazione Del complemento com BCG e immunofluorescenza nella diagnostica della leishmaniosi. *An. Sclavo*. 17:272-282.

Margonari, C.S.; Freitas, C.R.; Ribeiro, R.C.; Moura, A.C.M.; Timbó, A.M.; Gripp, A.H.; Pessanha, J.E. & Dias, E.S. (2004). Epidemiologia das Leishmanioses no município de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, utilizando análises espaciais. In: *Anais da XX reunião anual de pesquisa aplicada em Doença de Chagas e VIII de Leishmanioses*, Uberaba-MG, p.26.

Margonari C.S.; Fortes-Dias C.L., Dias E.S. (2004). Genetic variability in geographical populations of *Lutzomyia whitmani* elucidated by RAPD-PCR. *J Med Entomol*. Mar; 41(2):187-92.

Martins, A.V.; Brener, Z.; Mourão, O.T.; Lima, M.M.; Souza, M.A.; Silva, J.E. (1956). Calazar autóctone em Minas Gerais. *Rev. Brasil. Malariol. D. Trop.*, 8:555-63.

Marzochi, M.C.A.; Coutinho, S.G.; Souza, W. J.; Amendoeira, M.R. (1981). Leishmaniose Visceral (Calazar). *Jornal Brasileiro de Medicina*. 41 (5): 61-84.

Marzochi, M.C.A.; Toledo, L.M.; Marzochi, K.B.F.; Coutinho, S.G. & Tramontano, N.C. (1983). Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro. Aspectos epidemiológicos humanos. In Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, Anais, p.60.

Marzochi, M.C.A.; Coutinho, S.G.; Souza, W. J.; Toledo, L.M.; Grimaldi Jr.,G.; Momen, H.; Pacheco, R.S.; Sabroza, P.C.; Souza, M.A.; Rangel Jr., F.B. & Tramontano, N.C. (1985). Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings. (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80:349-357.

Marzochi, M.C.A.; Sabroza, P.C.; Toledo, L.M.; Marzochi, K.B.F. & Rangel, F.F. (1985a). Leishmaniose Visceral na Cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, R.J. 1: 5.

Marzochi, M.C.A.; Coutinho, S.G.; Sabroza, P.C.; Souza, M.A.; Souza, P.P.; Toledo, L.M.; Rangel, F.B.(1985b).LeishmanioseVisceral Canina no Rio de Janeiro – Brasil. *Cad. de Saúde Pública*, R.J. 1(4):432-446.

Marzochi, M.C.A.; Barbosa-Santos, E.G.O. *et al.* (1987). Epidemiological survey of canine cutaneous leishmaniasis by intradermal reaction in an endemic area of Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82(1):163.

Marzochi, M.C.A. (1992). Curso – Doenças Infecto-parasitárias (DIP): Aula 39 – Leishmanioses no Brasil. *In J. Bras. Med.*, 63(5/6):82-104.

Marzochi, M.C.A. & Marzochi, K.B.F. (1994). Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil- Emerging Anthroponosis and Possibilities of their Control. *Cadernos de Saúde Pública* 10(2):359-378

Mathis, A. & Deplazes, P. (1995). PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp diagnostic samples from humans and dogs. *L. Clin. Microbiol.*, 33(5):1145-9.

Mayrink, W. (1967). Contribuição ao diagnóstico parasitológico de leishmaniose visceral. Tese, Belo Horizonte, 112p.

Mayrink W, Magalhaes PA, da Costa CA, Melo MN, Dias M, Batista SM, Michalick MS, Williams P. (1980). Kala-azar in the Rio Doce, Minas Gerais area. Results of prophylactic measures. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. Jul-Aug;22(4):197-202.

Mayrink, W. (1986). Immune response of people vaccinated with non-living vaccine against new word cutaneous Leishmaniasis. In: II Reunião da Sociedade Brasileira de Protozoologia e XIII Reunião Anual sobre Pesquisa básica em Doença de Chagas. Caxambu-MG

Melby, P.C.; Chandrasekar, B.; zhao, W.; Coe, J.E. (2001). The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J. Immunol.* 166:1912-1920.

Mello, D.A.; Rego Jr, F.A.; Oshozo, E.; Nunes, V.L.B. (1988). *Cerdocyon thous* L.(Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania (donovani) chagasi* (Cunha & Chagas, 1973) in Corumbá (Mato Grosso do Sul State, Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 259.

Ministério da Saúde – Informações epidemiológicas da SUCAM. (1984). Expansão e urbanização do calazar no Brasil. *Ministério da Saúde*, ano III, n.25.

Ministério da Saúde – Guia de Vigilância Epidemiológica (2002). Leishmaniose Visceral (Calazar). 5 ed. Vol. 2, Brasília.

Ministério da Saúde (2003). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. *Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica*, Brasília – DF, 120p.

Ministério da Saúde (2004). Nota técnica – 08/04/2004, Ministério da Saúde. In: *portal.saude.gov.br (notas técnicas)*.

Ministério da Saúde (2004). Nota técnica – 16/09/2004, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em saúde. In: *saude.gov.br/svs (destaques)*.

Mohammed, A.R.; Wright, E.P.; Abdel Rahman, A.M.; Kolk, A.; Laarman, J.J. & Pondman, K.W. (1986). Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.* 80:271-274.

Molina, R.; Amela, C.; Nieto, J., San-Andres, M.; Gonzalez, F.; Castillo, J.A.; Lucientes, J.; Avelar, J. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88: 491-493.

Montalbán, C.; Martinez-fernandez, R.; Calleja, J.L.; Garcia-Diaz, J.D.; Rubio, R.; Dronda, F.; Moreno, S.; Yebra, M.; Barros, C.; Cobo, J.; Martinez, M.C.; Ruiz, F. & Costa, J.R. (1989). Visceral Leishmaniasis (kala-azar) as an opportunistic infection in patients with human immunodeficiency virus in Spain. *Review of Infectious Diseases.* 11:655-660.

Monteiro, E.M.; França-Silva, J.C.; Costa, R.T.; Costa, D.C.; Barata, R.A.; Paula, E.V.; Machado-Coelho, G.L.L.; Rocha, M.F.; Fortes-Dias, C.L.; Dias, E.S. (2005) Leishmaniose Visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros. *Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.* 38(2): 147-152 março-abril.

Montijn, D.J. & Harith, A.E. (1987). A comparison of ELISA and Direct Agglutination Test (DAT) in the serodiagnosis of New World (muco) cutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 82:159.

Moreira Jr., E.D.; De Souza, V.M.M.; Sreenivasan, M.; Lopes, N.L.; Barreto, R.B.; De Carvalho, L.P. (2003). Peridomestic risk, factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new finding from a prospective study in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69 (4) 393-397.

Nakatani, M.; Miranda-Badaró, R.; Meirele, A.; trigo, J.; netto, E.M. & Badaró, R. (2001). Avaliação da sensibilidade do teste rápido (TraLd) para detecção de anticorpos anti-Leishmania com novo antígeno K26 adicionado ao K39. *Rev. Bras. Med. Trop.* Suplemento:10.

Nascimento, M.D.S.B.; Costa, J.M.I.; Fiori, B.I.P.; Viana, G.M.C.; Filho, M.S.G.; Alvin, A.C.; Bastos, O.C.; Nakatani, M.; Reed, S.; Badaró, R.; Silva, A.R.; Burattini, M.N. (1996). Aspectos epidemiológicos na manutenção da leishmaniose visceral no Estado do Maranhão, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 29:233-240.

Neves, D.P.; Melo, A.L.; Linardi, P.M.; Vitor, R.W.A. (2005). *Parasitologia Humana*, 11ª edição. Editora Atheneu.

Nieto, C.G.; Garcia-Alonso, M.; Requena, J.M.; Mirón, C.; Soto, M.; Alonso, C.; Navarrete, L. (1999). Análisis of the immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlacion with disease progresión in canine experimental leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67:117-130.

Nowak, R.M.; Paradiso, J.L., eds. (1991). *Walker's Mammals of the World. Marsupialia*. Volume I Fifth edition. Baltimore and London: *The Johns Hopkins University Press*. 10 – 113.

Nunes, M.P.; Jackson, J.M.; Carvalho, R.W.; Furtado, N.J.; Coutinho, S.G. (1991). Serological survey for canine cutaneous and visceral leishmaniasis in area for transmission in Rio de Janeiro where prophylactic measures had adapted. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 86: 411- 417.

Nurit-Rachamin, S. & Jaffe, L. (1988). Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 85:503-508

Nussenzweig, V. (1957). Contribuição para o estudo da reação de fixação do complemento na leishmaniose visceral com antígeno extraído de bacilos da tuberculose. Tese. Fac. Med. Univ. São Paulo, Ed. S.N.E.S., Rio de Janeiro, 119p.

Nussenzweig, V.; Nussenzweig, R.S. & Alencar, J.E. (1957). Leishmaniose visceral nos arredores de Fortaleza, Estado do Ceará: inquérito sorológico utilizando a reação de fixação do complemento com antígeno extraído do bacilo de tuberculose. Observações sobre diagnóstico e epidemiologia da doença. *O Hospital.* 52:47-69.

Oliveira, C.D.L.; Assunção, R.M.; Reis, I.A. & Proietti, F.A. (2001). Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. *Cad. Saúde Pública.* 17(5):1231-1239.

Oliveira, C.L.; Assunção, R.M.; Reis, I.A. & proietti, F.A. (2001). Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. *Cad. S. Públ.* 17(5):1231-1239.

Oliveira-Lima, J.W.; Fiúza, I.R. & Dias-Branco, F.J. (1996). Correlação entre prevalência do calazar no cão e incidência no homem, em áreas endêmicas do Estado do Ceará. *In: Resumos do XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Goiânia,* p.146.

Oliveira-Netto, M.P.; Grimaldi, G.J.R.; Momen, H.; Pacheco, R.S.; Marzochi, M.C.A. & McMahon-pratt, D. (1986). Active cutaneous leishmaniasis in Brazil induced by *Leishmania donovani* chagasi. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81: 303-309.

Osman, O.F.; Oskan, L.; Zijlstra, E.E.; Kroon, N.C.M.; Shoone, G.J.; Khalil, T.A.G.; El-Hassan, A.M. & Kager, P.A. (1997). Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 35(10):2454-2457.

Ozenzoy, S. (1998). Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.* 59:363-369.

Palatinik, C.B.; Borojevic, R.; Previato, J.O.; Mendonça-Previato, L. (1989). Inhibition of *Leishmania donovani* internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. *Infect. Immun.* 57:754-763.

Palatinik, C.B.; Previato, J.O.; Mendonça-Previato, L.; Borojevic, R. (1990). A new approach to phylogeny of *Leishmania*: species specificity of glycoconjugate ligands for promastigote internalization into murine macrophages. *Parasitol. Res.* 76:289-293.

Palatinik-de-Sousa, C.B.; Dutra, H.S.; Borojevic, R. (1993). *Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the fucose mannose ligand (FML). *Acta Trop.* 53:59-72.

Palatinick-de-Sousa, C.B.; Gomes, E.M.; Paraguai de Souza, E.; Palatinick, M.; Luz, K.G. & Borojevic, R. (1995). *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Méd. Hyg.* 89:390-393.

Palatinik-de-Sousa, C.B.; Gomes, E.M.; Paraguai de Souza, E.; Santos, W.R.; Macedo, S.R.; Medeiros, L.V.; Luz, K.G. (1996). The FML (fucose mannose ligand) of *Leishmania*

*donovani*. A new tool in diagnosis, prognosis, transfusional control and vaccination against human kala-azar. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 29:153-163.

Pappas, M.G.; Hajkowski, R.R.; Diggs, C.L. & Hockmeyer, W.T. (1983). Development of a new antigen conservative enzyme immunoassay (Dot-ELISA) for rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Méd. Hyg.* 77:425-426.

Pappas, M.G.; Hajkowski, R.R.; Cannon, L.T. & Hockmeyer, W.T. (1984). Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): comparison with standard ELISA and complement fixation assay for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 14:239-249.

Pappas, M.G.; Cannon, L.T.; Hockmeyer, W.T. & Smith, D.H. (1985). Evaluation of complement fixation procedures for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 79:147-151.

Paranhos-Silva, M.; Freitas, L.A.R.; Santos, W.C.; Grimaldi, G.; Pontes-de-Carvalho, L.C. & Oliveira-dos-Santos, A.J. (1996). A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55(1):39-44.

Paranhos-Silva M, Nascimento EG, Melro MC, Oliveira GG, dos Santos WL, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. (1998). Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Trop.* Mar;69(1):75-83.

Pearson, R.D.; Cox, G.; Jeronimo, S.M.B.; Cascatrane, J.; Drew, J.S.; Evans, T. & Alencar, J.E. (1992). Visceral Leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47(1): 8-15.

Pelegrino, J. & Brener, Z. (1958). Reação de fixação do complemento com sangue dessecado no diagnóstico do calazar canino. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.* 10:39-44.

Pinelli, E.; Killick-Kendrick, R.; Wagenaar, J.; Bernadina, W.; DelReal, G.; Ruitenber, J. (1994). Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity* 62, 229-235.

Pinelli, E.; Gonzalo, R.M.; Boog, C.J.; Rutten, V.P.; Gebhard D.; Del Real, G.; Ruitenber, E.J. (1995). *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a histocompatibility complex-restricted manner. *European Journal of Immunology*. 25, 1594-1600.

Portugal, J. (1994). Berenil acts as poison of eukaryotic topoisomerase II. *FEBS Letters*, 344:136-138.

Pozio, E. et al. (1981). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI Canine Leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop.*, 38:383-393.

Profeta-Da-Luz, Z.M.; Pimenta, D.N.; Cabral, A.L.L.V.; Fiúza, V.O.P. & Rabello, A. (2001). A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*,34(3):249-254.

Queiroz, M.J.; Alves, J.G.; Correia, J.B. (2004). Visceral leishmaniasis clinical and epidemiological features of children in an endemic area. *J. Pedit. (RJ)* (80): 141-146.

Quinneel, R.J.; Courtenay, O.; Garcez, L.; Dye, C. (1997). The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* .115:143-156.

Quinneel, R.J.; Courtenay, O.; Garcez, L.; Kaye, P.M.; Shaw, M.A.; Dye, C.; Day, M.J. (2003). IgG subclasses responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 161-168.

Ranque, J.M.; Quilici, M.; Dunan, S. (1997). The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* 115, 143-156.

Reed, S.G.; Sheffler, W.G.; Burns, J.M.; Scott, J.M.; Orge, M.G. & Ghalib, H.W. *et al.* (1990). An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43:632-639.

Reed, S.G. (1996). Diagnosis of leishmaniasis. *Clin. Dermatol.* 14(5):471-478.

Rey, L. Parasitologia.(1991). Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África. 2ª edição. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan S.A . 731p.

Rey, L. Parasitologia. (2001). Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan.

Rezende, S.A.; Gomes, D.C.O.; Vilela, M.C.; Fernández, A.P.; Afcoelho, E.; Marques, E.A.S.; Tavares, C.A.P.; Masioli, C.Z. (2005). Intramuscular immunization with p36 (LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/ c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitology Research.* 98 (1) 67-74.

Rodgers, M.R.; Popper, J.M. & Wirth, D.F. (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 71: 267-275.

Rodrigues, N.; Guzman, B.; Rodas, A.; Takiff, H.; Bloom, B.R. & Convit, J. (1994). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 32(9):2246-2252.

Roura, X.; Sanches, A.; Ferrer, L. (1999). Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain react technique. *Vet. Record*, 144(10):262-4.

Safi, S.H. & Evans, D.A. (1989). A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:334-337.

Saiki, R.K.; Sanches, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A. & Anheim, N. (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.

Salimonu, L.S.; Ojo-amaize, E.; Williams, A.I.O.; Johnson, A.O.K.; Cooke, A.R.; Adekunle, F.A.; Alm, G.V.; Wigzell, H. (1982). Depressed natural killer cell activity in children with protein-calorie malnutrition. *Clinical, immunology and Immunopathology.* 24:1-7.

Sanchis, R; Vitu, C.; Giauffre, A. (1976). Lês examens de laboratoire dans la leishmaniose canine. II. Evolution dès tests biologiques dans la maladie experimentale. *Revue Me Vet.* 127:1191-1202.

Santos JB, dos Santos F, Marsden P, Tosta CE, Andrade AL, Macêdo V. (1998). Effect of bed nets impregnated with deltamethrin on malaria morbidity in an area of the Brazilian Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop.* Jan-Feb;31(1):1-9.

Santos, J.B.; Lauand, L.; Souza, G.S. & Macedo, V.O. (2000). Socioeconomic factors and attitudes towards household prevention of American cutaneous leishmaniasis in an endemic area in Southern Bahia, Brazil. *Cad. Saúde Pública.* 16:701-708.

Schoone, G.J.; Hailu, A.; Kroon, N.C.M.; Nieuwenhuijs, J.L.; Schalig, H.D.F.H. & Oskan, L. (2001). A Fast Agglutination Screening Test (FAST) for the detection of anti-Leishmania antibodies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95:400-401.

Scott, J.M.; Shreffler, W.G.; Ghalib, H.W.; Badaró, R. & Reed, S.G. (1991). A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44:272:277.

Secretaria de Vigilância em Saúde.(2003) Ano 03, número 5 .

Shaw, J.J. & Voller, A. (1964). The detection of circulant antibody to kala-azar by means of immunofluorescent techniques. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 58:349-352.

Shaw, J.J. (1999). The relationship of sandfly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brazil. In: Burger J. Contribution to the knowledge of diptera. *Gransville, Florida: Associated Publishers.* 4: 503-517.

Sheik, Y.A.W.; Coler, R.N.; Brannon, M.; Stromberg, E.; Greeson, K.; Crane, R.T.; Webb, J.R.; Campos-Neto, A.; Reede, S.G. (2002). Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL® adjuvant, *Vaccine.* 20:3292:3303.

Sherlock, L.A. & Sherlock, V.A. (1961). Sobre a infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* pela *Leishmania donovani*. *Revista Brasileira de Biologia* 21:409-418.

Sherlock, L.A. & Guitton, N. (1969a). Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia III Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 21: 541-548.

Sherlock, I.A. & Guitton, N. (1969b). Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia IV Variação horária e estacional do *Phlebotomus longipalpis*. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 21: 715-728.

Sherlock, L.A. & Almeida, S.P. (1970). Notas sobre calazar canino no estado da Bahia. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.* 22:231-242.

Sherlock, I.A.; Miranda, J.C.; Sadigursky, M. & Grimaldi Jr. G. (1984). Natural infection in the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79: 515.

Sherlock, I.A. (1996). Ecological Interactions of the visceral leishmaniasis in the Sate of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91:671-683.

Siddig, M.; Ghalib, H.; Shillington, D.C. & Petersen, E.A. (1988). Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82:66-68.

Sideris, V.; Karagouni, E.; Papadopoulou, G.; Garifallou, A. & Dotsika, E. (1996). Canine visceral leishmaniasis in the greater Athens area, Greece. *Parasite*, 3:125-130.

Silva, A.R. *et al.* (1997). Leishmaniose visceral (calazar) na Ilha de São Luiz, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. *Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.*, 30(5):359-368.

Silva, E.S.; Pirmez, C.; Gontijo, C.M.F.; Fernandes, O.; Brazil, R.P. (2000). Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. *Veterinary Record* 147: 421-422.

Silva, E.S.; Gontijo, C.M.F.; Pacheco, R.S.; Fiúza, V.O.P. & Brazil, R.P. (2001). Visceral leishmaniasis in the Metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96(3):285-291.

Silva, E.S.; Gontijo, C.M.F.; Pirmez, C.; Fernandes, O. & Brazil, R.P. (2001a). Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65(6):896-898.

Silveira, F.T.; Lainson, R.; Shaw, J.J.; Pova, M.M. (1982). Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 76:6.

Smith, D.H.; Welde, B.T.; Sabwa, C.L.; Reardon, M.J. & Hockmeyer, W.T. (1984). A complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen II. Results in an endemic area in Kenya. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78:495-500.

Solano-Gallego, L.; Riera, C.; Roura, X.; Iniesta, L.; Gallego, M.; Valladares, J.E.; Fisa, R.; Castillejo, S.; Alberola, J.; Ferrer, L.; Arboix, M.; Portus, M. (2001). *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1, and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol.* 96, 265-276.

Solano-Gallego, L.; Rodriguez, A.; Iniesta, L.; Arboix, M.; Portus, M.; Alberola, J. (2003). Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* Sep;10(5):849-55.

Solano-Gallego, L.; Fernandez-Bellon, h.; Morell, P.; Fondevila, D.; Alberola, J.; Ramis, A.; Ferrer, L. (2004). Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *Journal of Comparative Pathology* 130, 7-12.

Souza, M.A.; Sabroza, P.C.; Marzochi, M.C.A.; Coutinho, S.G.; Souza, W.J.S. (1981). Leishmaniose Visceral no Rio de Janeiro. 1- Flebotomíneos da área de procedência de caso humano autóctone. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 76 (2): 161-168.

Strauss-Ayali, D.; Baneth, G. (2000). Canine Visceral Leishmaniasis. *International Veterinary Information Service*. Ithaca, New York, USA.

Sudia, W.A. & Chamberlain, R.W. (1962). Battery operated light trap an improved model. *Mosquitoes News*. 22: 126 -129.

Sundar, S. & Rai, M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9:951-958.

Sundar,S; Pai, K. & Sahu, M. (2002). Immunochromatographic strip test detection of anti K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 96:19-23.

Tanner, C.E. (1996). Short Analytical Review: Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopath.* 78(2):105-111.

Tavares, L.M.S.A. (2000). Avaliação do processo de urbanização da leishmaniose visceral no município de Aracajú – Sergipe. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 33(1):37.

Tavares, C.A.P.; Fernandes, A.P. & Melo, M.N. (2003). Molecular diagnosis of Leishmaniasis. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 3:657-667.

Tesh, R.B., 1995. Control of zoonotic Leishmaniasis: is it time to change strategies? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 52(3): 287-292.

Travi, B.L.; Jaramillo, C.D.; Montoya, J.; Segura, I.; Zea, A.; Gonçalves, A. & Velez, I.D. (1994). *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 50 (5): 557-565.

Travi, B.L.; Montoya, J.; Galego, J.; Jaramillo, C.; Llano, R. & Velez, I.D. (1996). Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera, Psychodidae), vector of visceral leishmaniasis in northern Colombia. *Journal of Medical Entomology.* 33 : 27.

Travi, B.L.; Ozorio,Y.; Guarín, N. & Cadena, H. (1998a). *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol.* Jan;88(1):73-5.

Travi, B.L.; Tabares, C.J.; Cadena, H.; Feroo, C.; Osorio, Y. (2001). Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *American Journal of Trop. Med Hygie.* 64, 119-124.

Vasconcelos, I.A.; Souza, A.O.; Vasconcelos, A .M.; Diogenes, M.J.; Momen, H.; Grimaldi JR.,G.; Menezes, D.B. & Sleight, A.C. (1993). Cutaneous parasitism by *Leishmania chagasi* during South America Visceral Leishmaniasis. *Boullletin de la Societé de Pathologies Éxotiques.* 86(2):101-105.

Vieira, J.B.F. & Coelho, G.E. (1998). Leishmaniose visceral ou Calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev. Bras. Méd. Trop.* 31(2):85-92.

Werneck, G.L.; Rodrigues, L.; Santos, M.V.; Araújo, I.B.; Moura, L.S.; Lima, S.S.; Gomes. R.B.; Maguire, J.H. & Costa, C.H. (2002). The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* 83:13-18.

Voller, A; Draper, C.; Bidwell, D.E. *et al.* (1976). Enzyme linked immunoassay in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull. WHO.* 53:55-65.

WHO. (1990). World Health Organization Manual on Visceral Leishmaniasis control of leishmaniasis. *Reporte of a WHO expert committee. Wld Hlth Org. Techn. Rep. Ser.* 793.

WHO. (1996). World Health Organization Manual on Visceral Leishmaniasis control. Division of Control of Tropical Diseases, Geneve.

WHO. (1999). Leishmaniasis Control. Communicable Disease Surveillance and Response (CSR).

WHO. (2006). World Health Organization Manual on Visceral Leishmaniasis control. Division of Control of Tropical Diseases.

Wynder, E.L.; Higgins, I.T.T.; Gordon, L. (1987). Workshop on guidelines to the epidemiology of weak association. *Preventive Med.* 16, 139-212.

Zijlstra, E.E.; nur, Y.; desjeux, P. Khalii, E.A.; El-Hassan, A.M. & Groen, J. (2001). Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trop. Med. Int. Health.* 6:108-113.

Zulueta, A.M.; Villarroel, E.; Rodriguez, N. *et al.* (1999) Epidemiologic aspects of American Visceral Leishmaniasis in an endemic in Eastern Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61: 945-950.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)