



**MESTRADO EM CIÊNCIAS DO AMBIENTE**  
**Pro-Reitoria de Pesquisas e Pós Graduação**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS**

**ENZOOTIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM PALMAS-  
TOCANTINS: PERFIL EM FOCOS URBANOS**

Lucilândia Maria Bezerra

Palmas  
2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Lucilândia Maria Bezerra

**ENZOOTIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM PALMAS-  
TOCANTINS: PERFIL EM FOCOS URBANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do ambiente da Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para obtenção do título Mestre em Ciências do Ambiente.

Orientador: Aparecido Osdimir Bertolin

Co-orientadora: Lourdes Maria Garcez

Palmas  
2008

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Biblioteca da Universidade Federal do Tocantins**  
**Campus Universitário de Palmas**

B574 Bezerra, Lucilândia Maria  
Enzootia da Leishmaniose Visceral Canina em Palmas-Tocantins: perfil em focos urbanos: / Lucilândia Maria Bezerra - Palmas, 2008.  
85f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente, 2008.  
Orientador: Aparecido Osdimir Bertolin  
Co-orientador: Lourdes Maria Garcez .

1. Leishmaniose. 2. visceral 3. transmissão intensa. I. Título.

**CDD 636**

**Bibliotecária: Heloisa dos Santos Brasil**  
**CRB/2:1158**

**TODOS OS DIREITOS RESERVADOS** – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Lucilândia Maria Bezerra

**Enzootia da Leishmaniose Visceral Canina em Palmas-TO: perfil em focos urbanos**

Trabalho apresentado à disciplina de Dissertação do Curso de Mestrado em Ciências do Ambiente da Universidade Federal do Tocantins,  
Palmas, 2008.

---

Dr. Aparecido Osdimir Bertolin (Orientador) UFTO

---

Dra. Lourdes Maria Garcez - IEC/UEPA

---

Dra. Hiro Goto (USP)

---

Dr. Claudio Henrique Clemente Fernandes (UNITINS)

## *Dedicatória*

*A Deus, acima de tudo  
Pelo dom da vida e pela graça de  
me conceder tantos amigos  
que muito me ajudaram nessa tarefa  
A meu filho, Luis Felipe  
Dedico não apenas este trabalho,  
mas todo meu amor,  
Pelo apoio, paciência e sacrifício  
ao longo desse período, com a minha ausência.  
Ao meu filho querido, o melhor presente de Deus pra mim..*

## ***AGRADECIMENTOS***

*A Deus, o Grande Autor,*

*Que do alto de Sua Sabedoria, me deu forças pra continuar este trabalho,  
Me mostrou o caminho que deveria percorrer para encontrar pessoas tão importantes  
durante essa jornada; ao meu Deus, muito obrigada.*

*Aos meus orientadores,*

*Dr. Aparecido Osdimir Bertolin pela confiança e apoio em todos os momentos,  
e Dra. Lourdes Maria Garcez, que não deixou em nenhum momento de me conduzir  
com competência e profissionalismo*

*À Dra. Hiro Goto pela compreensão disponibilidade e colaboração*

*Aos meus colegas de trabalho,*

*Pedro Heber Estevan Ribeiro e*

*Solange Alves Oliveira pela força, incentivo e colaboração.*

*Às professoras Erminiana, Romaine e Leandra, pelo carinho e apoio  
durante minhas viagens a trabalho*

*Aos meus alunos queridos,*

*Pelo apoio e contribuição, especialmente,*

*Josué Pereira da Silva e*

*Joselita Monteiro de Moura Macedo, que estiveram comigo até o fim.*

*A toda equipe da Leishmaniose do*

*Instituto Evandro Chagas, especialmente,*

*Joyce Favacho Cardoso, Luis Antônio Dickson e*

*Eduardo Mota, pela grandiosa colaboração no laboratório.*

*À Dona Oscarina, tão especial, meu colega Valceli e toda sua família, pelo carinho em  
me receber sempre tão bem todas as vezes que estive em Belém*

*A todos que de alguma forma colaboraram comigo*

*O meu eterno agradecimento.*

## EPÍGRAFE

“Para aquele que está entre os vivos há esperança; porque mais vale um cão vivo do que um leão morto”.

Eclesiastes, 09:04



## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) encontra-se em expansão em Palmas, onde transformações ambientais influenciam o padrão de transmissão e favorecem sua disseminação. A sorologia para LV no cão é o método mais usado pelos serviços de vigilância para orientar a eliminação desse reservatório, mas os antígenos brutos têm sensibilidade e especificidade limitadas. Investigou-se o desempenho de diferentes antígenos por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA-lisado e ELISA-rHsp83) durante inquéritos sorológicos caninos em localidades urbanas de transmissão intensa (AURENY III) e esporádica (ARSO). Determinaram-se casos prevalentes e níveis de IgG na população canina. Coletou-se sangue e aspirado linfático da maioria dos cães em AURENY (275; N=476) e ARSO (131; N=162), de junho a dezembro de 2007. Casos prevalentes foram mais freqüentes em AURENY (ELISA-Hsp83: 50% e ELISA-lisado: 45%). O ELISA-lisado detectou em AURENY similares altos níveis de IgG em cães parasitologicamente positivos ( $1088 \pm 407$ ) ou não ( $1078 \pm 317$ ), diferente do observado em ARSO, onde níveis de IgG foram mais elevados em cães parasitologicamente positivos ( $1131 \pm 1046$ ) do que naqueles com lâminas negativas ( $560 \pm 343$ ). O ELISA-Hsp83 detectou em AURENY baixos níveis de IgG, contudo mais elevados em cães parasitologicamente positivos ( $569 \pm 272$ ) do que negativos ( $403 \pm 211$ ), diferente do observado em ARSO onde cães parasitologicamente negativos ( $244 \pm 86$ ) tiveram títulos mais altos que os demais ( $136 \pm 17$ ). Os índices de desempenho dos antígenos variaram nas duas localidades. A sensibilidade dos dois antígenos foi igualmente baixa em ARSO ( $\leq 29\%$ ), mas o Hsp83 foi mais sensível em Aurenny (74%) que o lisado (60%). Se consideradas em conjunto ARSO e AURENY os índices de desempenho foram melhores com Hsp83. A sensibilidade dos diferentes antígenos variou em função da classificação da área de transmissão.

## ABSTRACT

The visceral leishmaniasis (VL) is expanding in Palmas where environmental changes influence the transmission pattern and favor its dissemination. The serology for VL in dog is the most used method by the surveillance services to allow the culling of this reservoir, but the crude antigens have limited sensibility and specificity. The performance of different antigen was investigated by means of ELISA (ELISA-lysate e ELISA-rHsp83) through out a canine serological screening in urban localities of high (AURENY III) and low transmission (ARSO). Prevalent cases and IgG levels were determined in canine population. Blood and lymph aspirate was collected of most dogs in AURENY (275; N=476) and ARSO (131; N=162), from June to december, 2007.

Prevalent cases were mor frequent in AURENY (ELISA-Hsp83: 50% and ELISA-lysate: 45%). O ELISA-lysate detected in AURENY similar high IgG levels in parasitologically positive ( $1088 \pm 407$ ) or negative ( $1078 \pm 317$ ) dogs, different from observed in ARSO, where IgG levels were higher in dogs parasitologically positive ( $1131 \pm 1046$ ) then those negative ( $560 \pm 343$ ). The ELISA-Hsp83 detected in AURENY low IgG levels, but higher in parasitologically positive dogs ( $569 \pm 272$ ) than those negatives ( $403 \pm 211$ ), different from observed in ARSO where parasitologically dogs had higher titres ( $244 \pm 86$ ) than the others ( $136 \pm 17$ ). The performance index of the antigens varied in the both localities. The sensibility was equally low in ARSO ( $\leq 29\%$ ), but the Hsp83 was more sensitive in AURENY (74%) then in ARSO (60%). If considered together ARSO and AURENY the ELISA performance indexes were better with Hsp83. The sensibility of the different antigens varied according the classification of each transmission area.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> dados de leishmaniose visceral canina entre 2001 e 2006 na cidade de Palmas –TO .....	39
<b>Tabela 2:</b> Situação da leishmaniose nos municípios do estado do Tocantins, segundo dados da Secretaria de Saúde do Estado Os exames foram realizados no LACEN de Palmas, utilizando ELISA e RIFI. ....	47
<b>Tabela 3.</b> Desempenho de duas apresentações antigênicas para a sorologia da leishmaniose visceral canina (ELISA) em bairros de transmissão intensa (AURENY, N=275) e esporádica (ARSO, N=131) em Palmas-TO, 2007. ....	67
<b>Tabela 4:</b> características das quadras estudadas levando em consideração aspectos clínicos dos animais do estudo e aspectos ambientais das áreas. ....	69

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Áreas endêmicas de leishmaniose distribuídas no mundo .....	19
<b>Figura 2:</b> Distribuição da Leishmaniose Visceral no Velho e Novo Mundo .....	20
<b>Figura 3:</b> Uma visão da cidade de Palmas capital do Estado quanto aos ecótonos .....	24
<b>Figuras 4:</b> Demonstração da distribuição das co-infecções de HIV/Leishmania no mundo...	25
<b>Figura 5:</b> Distribuição do Velho Mundo e Novo Mundo leishmaniose cutânea .....	25
<b>Figura 6:</b> <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	28
<b>Figura 7:</b> Área urbana de uma região considerada endêmica e de transmissão intensa para LVC .....	33
<b>Figura 8:</b> evolução da cidade, segundo dados extraídos da Secretaria de Desenvolvimento Urbano e Habitação de Palmas -TO .....	36
<b>Figura 9:</b> Cão apresentando dermatose periocular bilateral, com LVC .....	39
<b>Figura 10:</b> Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> – extraído do Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose .....	40
<b>Figura 11:</b> Forma visceral da LVC em humanos .....	41
<b>Figura 12:</b> Forma visceral da LVC em caninos também aumento considerável do baço.....	41
<b>Figura 13:</b> formas amastigostas de <i>Leishmania</i> em linfonodo de cão. ....	46
<b>Figura 14:</b> Cão apresentando quadro de linfadenopatia generalizada .....	52
<b>Figura 15:</b> Descrição Geral da Área do Estudo .....	53
<b>Figura 16:</b> Levantamento censitário realizado no período de abril a junho de 2007 em Palmas-TO .....	56
<b>Figura 17:</b> Colheita de linfa em linfonodos palpáveis .....	58
<b>Figura 18:</b> Animal com mordada após contenção física e química. ....	60
<b>Figura 19:</b> Colheita de sangue utilizando a veia femural em cão. ....	61
<b>Figuras 20:</b> Rompimento das Leishmanias em 10 ciclos de congelamento e descongelamento .....	62
<b>Figuras 21:</b> Rompimento das Leishmanias em 10 ciclos de congelamento e descongelamento .....	62
<b>Figura 22:</b> Placas de ELISA com amostras reativas e não reativas (Lab.do IEC) .....	64

<b>Figura 23:</b> comparação entre a sorologia pelo ELISA utilizando proteína Hsp 83 e lisado cru em animais confirmados com o exame parasitológico em áreas de transmissão intensa .....	65
<b>Figura 24:</b> comparação dos testes sorológicos pelo ELISA utilizando lisado cru e Hsp 83, com amostras testadas também pelo parasitológico na área de transmissão esporádica. .....	66
<b>Figura 25:</b> Cálculo de valores preditivos e negativos das áreas em estudo. ....	66
<b>Figura 26:</b> demonstração dos níveis de anticorpos na área de transmissão intensa e esporádica, mostrando diferenças na titulação com a Hsp83 e lisado cru quando comparados ao padrão ouro. ....	67

## **LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS**

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

LVA – Leishmaniose Visceral Americana

PCLV – Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

MS – Ministério da Saúde

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida

SMV – Sistema de Vigilância em Saúde

ELISA – Enzima Imuno Ensaio (Enzima-Linked Imunosorbent Assay)

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Leishmaniose Visceral.....	15
1.2 Objetivos .....	18
1.2.1. Geral .....	18
1.2.2. Específicos.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Características epidemiológicas da LVC.....	19
2.1.1. Agente etiológico da leishmaniose visceral .....	26
2.1.2. Vetor.....	27
2.1.2.1 Ecologia do inseto.....	27
2.1.2.2 Reservatórios.....	29
2.1.2.2.1 O ser humano.....	29
2.1.2.2.2 O cão doméstico e outros reservatórios silvestres.....	30
2.1.3 Leishmaniose visceral e o processo de urbanização.....	31
2.1.4 Transmissão .....	34
2.1.5 Ciclo de vida da <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i> .....	37
2.2. Definição da doença, diagnóstico e tratamento.....	40
2.2.1 A doença em humanos e caninos.....	40
2.2.2 Diagnóstico.....	42
2.2.3 Tratamento.....	47
2.2.4. Controle e prevenção da doença.....	48
2.3. Importância da epizootia no cão .....	50
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.1. Área de estudo.....	53
3.2. Desenho do Estudo.....	54
3.3. Levantamento censitário.....	55
3.4. Comitê de Ética .....	57
3.5. Colheita de sangue e linfa.....	57
3.5.1. Método parasitológico direto.....	57
3.5.2. Contenção do animal .....	58
3.5.3. Colheita de sangue para exames sorológicos.....	60
3.5.4 Testes sorológicos: obtenção de antígenos.....	61

3.5.4.1 Obtenção do antígeno - Lisado Cru de Promastigotas de <i>Leishmania</i> .....	62
3.5.4.2 Antígeno Recombinante Hsp83 de <i>Leishmania (L.) infantum infantum</i> .....	62
3.6 Testes sorológicos.....	63
3.6.1 Enzime-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	63
3.6.1.1 ELISA com Lisado Cru de Promastigotas.....	63
3.6.1.2 ELISA com a Proteína Recombinante Hsp83.....	64
4 RESULTADOS .....	65
5 DISCUSSÃO .....	70
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74





# ENZOOTIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM PALMAS- TOCANTINS: PERFIL EM FOCOS URBANOS

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa crônica, sistêmica, caracterizada por apresentar febre, anemia, e atingir vários órgãos vitais como fígado, baço, linfonodos e medula óssea. Considerada uma zoonose, pode acometer o ser humano quando em contato com o ciclo de transmissão do parasito; atualmente encontra-se entre as seis endemias consideradas como prioridade em saúde pública (GONTIJO & MELO 2004; MELO 2004; BRASIL 2006).

Mundialmente a leishmaniose visceral é considerada a terceira mais importante doença transmitida por vetor e as estimativas é que existam de 1,5 a 2 milhões de casos, com até 350 milhões de pessoas com risco da infecção e doença (REITHINGER & DUJARDIN, 2007).

Considerada endêmica em vários países, tem ampla distribuição na Ásia, Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, onde é comumente denominada leishmaniose visceral americana (LVA); já foi descrita em pelo menos 12 países da América Latina onde o Brasil detém 90% dos casos (BRASIL, 2006).

Nas Américas a LV é causada pelo protozoário pertencente ao gênero *Leishmania* cuja espécie envolvida é a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, Rioux et al. 1990; recentemente sua nomenclatura foi revista, sendo denominada de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*; (SHAW 2006).

A transmissão para o homem e outros hospedeiros vertebrados ocorre pela picada da fêmea do inseto *Lutzomyia longipalpis*, podendo a doença ocorrer em diferentes formas clínicas, incluindo a visceral (LAINSON & RANGEL, 2005, CELESTE et al., 2004).

Trata-se primariamente de uma zoonose de animais silvestres, transmitida por insetos flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (Psycodidae: Phlebotominae),

que acomete animais domésticos e seres humanos de forma acidental. O flebótomo está sempre presente onde tem a doença, sendo, portanto, o mais importante na epidemiologia da leishmaniose visceral no Brasil (LAINSON & RANGEL 2005)

A leishmaniose visceral já foi descrita como doença esporádica do ambiente silvestre ou rural, do Nordeste brasileiro, mas nas últimas décadas tem sido relatada como reemergente, de transição epidemiológica, com incidência crescente em áreas antes consideradas indenes ou esporádicas (BEVILÁQUA E ALVES, 2004).

A expansão da doença vem associada a mudanças no padrão de transmissão; após o processo de ruralização, várias cidades de diferentes regiões do país experimentam o processo de urbanização no interior do país.

Esse processo de urbanização da LV foi primeiro alertada por Deane (1956) em seu clássico estudo sobre a doença e a partir de então foi constatada em várias cidades de pequeno e médio porte. Tem sido descritos casos em ambientes urbanos, como Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (BH), Campo Grande (MS), Araçatuba (SP), Palmas (TO), entre outros (Brasil, 2006).

Devido à expansão da doença com números significativos de casos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a considerar a leishmaniose uma das prioridades entre as doenças tropicais (BEVILÁQUA & MELO 2004).

Diante desse quadro, percebe-se a necessidade de medidas de diagnóstico e controle mais eficazes, de forma a elucidar melhor os casos positivos especialmente nos reservatórios domésticos, onde o cão é considerado o principal foco para infecção humana, atualmente sendo o grande problema em áreas urbanas, visto que convive muito próximo do homem e em muitos casos, fazendo parte da família, como uma peça importante de várias atribuições para os humanos, como animais de companhia, de trabalho ou de lazer.

De acordo com Beviláqua & Alves (2004), buscar um teste com alta sensibilidade para os inquéritos caninos, permitiria uma menor taxa de cães negativos, evitando a permanência de cães positivos como fonte de infecção para o vetor e desse para os seres humanos e animais.

O diagnóstico imunológico tem sido utilizado em diferentes formas tanto na leishmaniose humana quanto canina; os testes diferem na sua sensibilidade e especificidade, na sua aplicação prática, considerando as condições de campo e disponibilidade de reagentes. Apresentam limitações, e podem se mostrar positivos durante um longo período após tratamento, e em casos de doença subclínica nem sempre a positividade tem significado de doença (GONTIJO & MELO 2004).

De acordo com os autores o teste de ELISA (Enzime-Linked Imunosorbent Assay) é o mais utilizado nos diagnósticos imunológicos, embora nos inquéritos populacionais a RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) seja o teste de escolha, não sendo contudo indicado para estudos em larga escala; o ELISA apresenta –se mais sensível, permitindo detecção de baixos níveis de anticorpos, apesar de ser pouco preciso em doenças subclínicas; no entanto tem bom desempenho na leishmaniose visceral canina.

Esse trabalho pretende elucidar o desempenho do ELISA para o diagnóstico da infecção canina em focos urbanos com diferentes intensidades de transmissão e se um antígeno molecularmente definido (Hsp83), apresentaria vantagens sobre um antígeno bruto (lisado de *L. infantum chagasi*). Essas informações também seriam úteis para orientar melhor as estratégias de controle tomando por base o perfil desses focos em ambientes urbanos.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1. Geral**

Investigar o comportamento da leishmaniose visceral em diferentes focos urbanos de enzootia canina na cidade de Palmas - Tocantins.

### **1.2.2. Específicos**

- Descrever a soroprevalência da infecção canina em áreas onde a transmissão da doença aos humanos é considerada intensa e baixa.
- Comparar índices de desempenho de diferentes apresentações antigênicas ( lisado cru e rHsp83) por meio do Ensaio Imunoenzimático (ELISA).
- Utilizar como teste padrão ouro o exame parasitológico nas duas áreas de estudo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características epidemiológicas da LVC

Atualmente a leishmaniose visceral americana é endêmica em populações tropicais e subtropicais e vem sofrendo alterações com a evolução; as degradações ambientais, migração populacional, fator determinante para a predominância da pobreza nas periferias dos grandes centros urbanos determinaram sobremaneira o processo de urbanização da doença; com essas perspectivas a leishmaniose visceral vem apresentando um caráter endêmico epidêmico no Brasil (CABRERA 1999).

Esses fatores podem ser observados nos seguintes mapas.



Figura 1: Áreas endêmicas de leishmaniose distribuídas no mundo - Fonte: [www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index2.htm](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.htm)

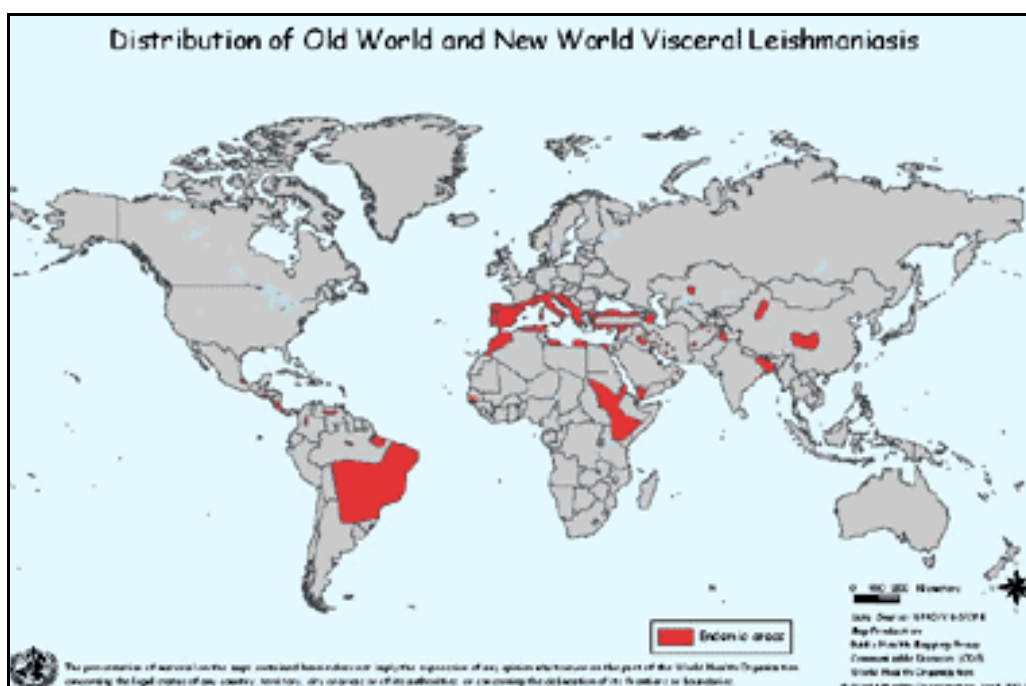


Figura 2: Distribuição da Leishmaniose Visceral no Velho e Novo Mundo - Fonte: [www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index2.htm](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.htm)

A expansão geográfica em diferentes regiões contribuem para a distribuição da doença no mundo; as regiões Nordeste, Sudeste, Norte e Centro-Oeste do Brasil já vivenciaram ou vivenciam epidemias de leishmaniose visceral canina (LVC) e humana (BEVILÁCQUA & MELO, 2004).

A epidemiologia organiza-se para ser utilizada como ferramenta de trabalho para lidar com a saúde/doença em âmbito populacional; no século XVIII na Europa o movimento da Medicina Social influenciou muito a estruturação da epidemiologia; nesse contexto, a vigilância epidemiológica articula-se às práticas sanitárias e compreende o acompanhamento de doenças consideradas prioritárias, o monitoramento ambiental e das condições de trabalho (MENEGHEL, 2002).

A epidemiologia ambiental teve início na França em 1789 e tem como principal objetivo relacionar os processos produtivos como fontes de risco para o ambiente e

A expansão geográfica em diferentes regiões contribuem para a distribuição da doença no mundo; as regiões Nordeste, Sudeste, Norte e Centro-Oeste do Brasil já vivenciaram ou vivenciam epidemias de leishmaniose visceral canina (LVC) e humana (BEVILÁCQUA & MELO, 2004).

A epidemiologia organiza-se para ser utilizada como ferramenta de trabalho para lidar com a saúde/doença em âmbito populacional; no século XVIII na Europa o movimento da Medicina Social influenciou muito a estruturação da epidemiologia; nesse

contexto, a vigilância epidemiológica articula-se às práticas sanitárias e compreende o acompanhamento de doenças consideradas prioritárias, o monitoramento ambiental e das condições de trabalho (MENEGHEL, 2002).

A epidemiologia ambiental teve início na França em 1789 e tem como principal objetivo relacionar os processos produtivos como fontes de risco para o ambiente e conseqüentemente, para a saúde humana; vem contribuir para evidenciar a relação entre ambiente e agravos à saúde. O modelo básico de análise epidemiológica mantém-se baseado no modelo etiológico (FUNASA, 2002).

No Brasil a leishmaniose visceral apresenta-se como uma doença de importância epidemiológica relevante e atinge pessoas de todas as faixas etárias; é mais freqüente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo que 41% dos casos são em menores de 5 anos (BRASIL, 2006; GONTIJO *et al.*, 2004). Essa susceptibilidade em crianças, segundo o Ministério da Saúde está relacionada à imaturidade imunológica, a desnutrição principalmente nas regiões endêmicas e à maior exposição ao vetor no peridomicílio.

De acordo com o Ministério da Saúde (2006), entre 1984 a 2002 os casos de leishmaniose visceral somaram um total de 48.455, sendo que desse número, 66% ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí; o estado do Tocantins e Pará (região Norte) tiveram uma influencia significativa nas estatísticas da leishmaniose no Brasil, assim como Mato Grosso do Sul (região Centro Oeste), Minas gerais e São Paulo (região Sudeste).

A taxa de incidência da doença para o país variou entre 1 e 3 casos por 100.000 habitantes, sendo que esses valores são mais elevados para região Norte e Nordeste, embora se encontre em expansão também nas regiões Centro-Oeste e Sudeste (BRASIL, 2006).

O Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) analisa a situação epidemiológica da doença no país. Seus principais objetivos são diminuir a taxa de letalidade, o grau de morbidade e os riscos de transmissão, tomando medidas com relação ao agente transmissor e reservatórios (BRASIL, 2006).

No entanto, para que essas medidas sejam colocadas em prática, deve haver a colaboração da população, um bom treinamento para os agentes de saúde e um bom relacionamento entre os setores de saúde privados e públicos. O PCLV atribuiu como critérios de avaliação uma metodologia baseada na classificação das áreas com e sem transmissão, objetivando também incorporar os municípios silenciosos, ou seja, aqueles sem ocorrência de casos humanos (BRASIL, 2006).



Ainda segundo o Ministério da Saúde (2006), para realizar essa classificação é necessário que seja feita uma média de casos dos últimos cinco anos, tendo como base os dados emitidos pelas Secretarias de Saúde, os quais passam por uma seleção e em seguida uma estratificação segundo a média de casos. Posteriormente, as áreas de transmissão são identificadas da seguinte maneira:

Como áreas de transmissão esporádica a média menor que 2,4.

Áreas de transmissão moderada com uma média maior ou igual a 2,4 e menor que 4,4.

Áreas de transmissão intensa, com uma média maior ou igual a 4,4.

A doença tem se distribuído em algumas regiões do Brasil, principalmente nas favelas das cidades, como Santarém-Pará e Teresina no Piauí; a doença não é considerada urbana, sendo endêmica da zona rural; no entanto, trabalhos recentes têm sido descritos sobre a Leishmaniose Visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais Araçatuba e São Paulo (SILVA *et al.*, 2001; CAMARGO - Neves *et al.*, 2001; SHAW, 2007).

O Ministério da Saúde (2006), mostrou o quadro da situação da leishmaniose visceral relacionada a periurbanização e urbanização destacando os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luis (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA), Três Lagoas (MS) Campo Grande (MS) e Palmas (TO).

A doença é conhecida como própria de áreas de clima seco com precipitações pluviométricas anuais inferior a 800 mm, ambientes com aspecto fisiográfico composto por montanhas e vales; no entanto, esse perfil começou a mudar; observando-se casos nas periferias dos grandes centros urbanos, provocados provavelmente pelas transformações ambientais, pela migração intensa e pressões sócio-econômicas (BRASIL 2006).

O Brasil apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, devido sua ampla dimensão geográfica, envolvendo especialmente as regiões Norte, Nordeste, Centro Oeste e Sudeste. Devido às extensas áreas dessas regiões, do nosso país, as leishmanioses têm se expandido, sendo a visceral mais restrita ao Nordeste e Sudeste (BORGES *et al.* 1999).

O estado do Tocantins, é um dos estados mais jovens do Brasil, criado pela Constituição de 1988; está localizado na região Norte do país e apresenta uma área de 278.420 km<sup>2</sup> com uma população de 920.116 habitantes distribuídos em 126 municípios agrupados em 8 microregiões (IBGE 2006).

Geograficamente faz fronteira com os estados do Maranhão, Pará e Goiás; atualmente vem apresentando muitos casos de leishmaniose visceral canina (LVC), especialmente em Palmas, capital do Estado e Araguaína, um dos maiores municípios do Estado (SESAU 2008).

Dentre os municípios avaliados pela Secretaria Estadual de Saúde nos últimos três anos, foi observado uma evolução importante de casos; no período de 2005 a 2007, em 76 municípios do Estado, onde foi feito inquérito em humanos, 9 são considerados de transmissão intensa, 06 de transmissão moderada, 48 de transmissão esporádica e os demais entre vulnerável a receptivo e sem transmissão, considerando o estrato de classificação epidemiológica

Em 2005, Palmas, apresentava uma média de casos dos últimos cinco anos de 37,8; atualmente, nos últimos três anos, apresenta uma média de casos de 35,7, índice menor apenas que Araguaína que apresenta uma média de 90,6 casos no mesmo período. Portanto, o Município é considerado de transmissão intensa para a doença (SINAN /SESAU, 2008).

De acordo com dados da Secretaria de Saúde do Município de Palmas, no período de 2001 a 2006, algumas regiões da cidade já são consideradas de transmissão intensa para leishmaniose humana, por apresentar estrato 3 de referência para vigilância e controle da leishmaniose visceral, com média maior ou igual a 4,4 dentro dos critérios de classificação epidemiológica da Vigilância em Saúde. Dentre elas destaca-se a quadra Aurenny III, uma das regiões utilizadas neste estudo.

Entre os cinco diferentes tipos de vegetação encontrados no Brasil, Tocantins tem dois: a Floresta Amazônica caracterizada por apresentar terra firme ou Floresta Ombrófila e a Savana, ambos denominados Bioma Amazônia e Bioma Cerrado respectivamente. Isso está justificado devido o Estado se encontrar localizado em uma zona de transição geográfica entre o cerrado e a floresta amazônica (SILVA, 2007).

Segundo dados do IBGE (2007) o Bioma Amazônia ocupa 9% do território do Estado e o restante (91%) está ocupado pelo Bioma Cerrado; dentro do aspecto fitoecológico, a área ecológica dos cerrados seria menor que a atual e as populações indígenas tem um papel fundamental na sua expansão.

De acordo com Silva (2007) ultimamente, a ocupação humana e a construção de estradas vem descaracterizando essa paisagem do cerrado e transformando-o em ilhas inseridas em agroecossistemas; essa transformação antrópica promove grandes perdas da biodiversidade, assim como contribui para a enorme heterogeneidade do bioma.

O desmatamento, provocado pela implantação de grandes projetos de abertura de estradas, como por exemplo, a Belém-Brasília, hidrelétricas e expansão da atividade agropecuária, também vêm desenvolvendo um importante papel na desestruturação do bioma, do seu mosaico paisagístico diferenciado fitofisionomicamente em cerrado sentido restrito, cerradão, mata ciliar, mata de galeria, campo sujo, campo rupestre, campo limpo, parque de cerrado, palmeiral e vereda (SILVA, 2007).

Hidasi Filho (2002, p.10) citando Nascimento 1986, mostra as características fitofisionômicas do estado de Goiás, caracterizado principalmente por matas de galerias ou ciliar, nas proximidades de vales fluviais, com árvores de médio porte, fechadas, criando um microclima favorável à presença de flebotomíneos.

No Tocantins, segundo Silva 2007, as matas ciliares são definidas como vegetação florestal, encontrada às margens dos rios de médio e grande portes, formando galerias fechadas sobre os cursos d'água. O cerrado no sentido restrito é caracterizado por árvores baixas, inclinadas, tortuosas, retorcidas com evidências de queimadas.

As áreas de cerrado, galeria e campo são bem visualizadas na figura 4, mostrando o perfil físico do município de Palmas – TO.

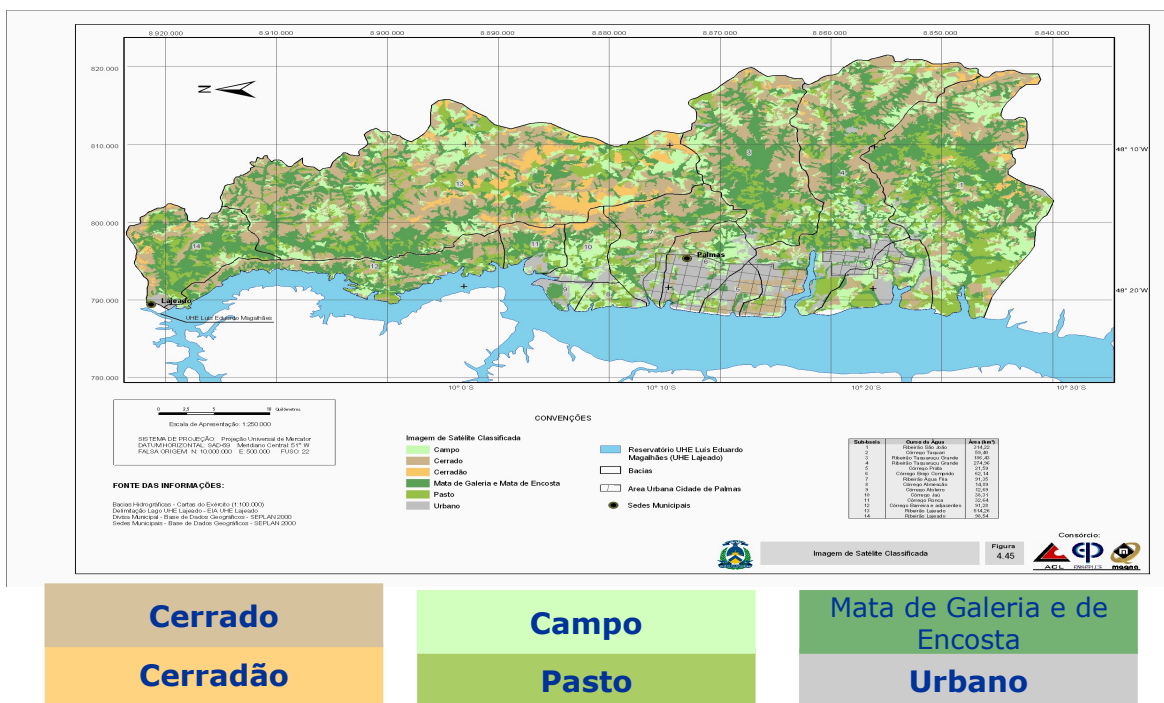


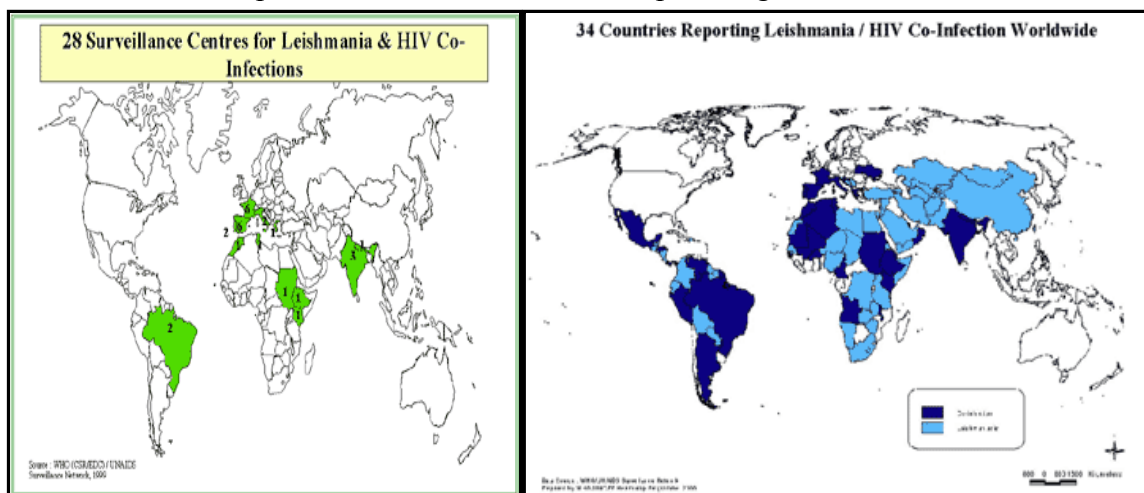
Figura 3: Uma visão da cidade de Palmas capital do Estado quanto aos ecótonos. Site: [www.palmas.to.gov.br/secretarias/sduh/dados/multifinalitarios/perimetro\\_urbano\\_de\\_palmas](http://www.palmas.to.gov.br/secretarias/sduh/dados/multifinalitarios/perimetro_urbano_de_palmas)

Nos países europeus, localizados às margens do Mediterrâneo, a co-infecção HIV/*Leishmania* tem sido relatada, podendo ocorrer em 2% a 5% dos pacientes com

Imunodeficiência Adquirida (AIDS); também foram relatados casos na Espanha, França e Itália Ferreira & Borges 1996 citado em Hidasi Filho (2002, p.09).

Nesse contexto, o aumento de casos de leishmaniose visceral atualmente, pode ser explicado pela melhora no diagnóstico e pelo aumento da notificação, mas também a outros fatores importantes como controle de reservatórios e aumento na detecção de casos associados a outras doenças, entre elas, HIV/AIDS (RUTHINGER & DUJARDIN 2007a).

Esse perfil está demonstrado nos mapas a seguir.



Figuras 4 e 5 : Demonstração da distribuição das co-infecções de HIV/Leishmania no mundo (WHO 2003; Distribuição do Velho Mundo e Novo Mundo leishmaniose cutânea Fonte: [www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index2.htm](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.htm)

A evolução da tecnologia e a globalização tem promovido mudanças importantes na vida das pessoas; o movimento do comércio no mundo inteiro, as constantes migrações de pessoas que necessariamente permanecem em locais endêmicos por longos períodos, e que junto aos seus familiares levam seus cães consigo; o grande movimento turístico favorece o trânsito de pessoas a diferentes lugares, e faz com que a doença as vezes apareça em locais antes nunca detectada (SHAW, 2007).

Os mesmos pesquisadores alertam para uma infinidade de fatores envolvidos no processo de transmissão da doença no mundo, devido aos diferentes tipos de contato reservatório/homem e vetor, o que pode determinar uma mudança no nível de imunidade, predispondo a presença ou não da doença clínica. O cenário que tem se evidenciado atualmente com as infecções em indivíduos imunossuprimidos, tem demonstrado um maior número de casos notificados da leishmaniose visceral.

Segundo Desjeux (2004), essas situações denotam as dificuldades encontradas para o controle da doença e mostra a necessidade de mais estudos para avaliação da eficácia e efetividade das medidas de controle atualmente implantadas.

### 2.1.1. Agente etiológico da leishmaniose visceral

Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral são protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, parasitas intracelulares obrigatórios de macrófagos, com uma forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, encontrada nos tecidos de vertebrados domésticos, silvestres e humanos (BRASIL, 2006).

No Mediterrâneo, a leishmaniose visceral é causada pela *Leishmania (L.) infantum*, transmitida por insetos do gênero *Phlebotomus*. Na América Latina a leishmaniose é denominada Leishmaniose Visceral Americana (L.V.A.), causada pela *Leishmania chagasi* anteriormente conhecida como *Leishmania donovani* (WHO, 1996).

Em estudos realizados por Cunha e Chagas em 1937, no estado do Pará foi isolada uma nova espécie de *Leishmania*, a *L. chagasi*; posteriormente, Cunha 1942 citado por Lainson & Rangel (2005 ) em estudos mais aprofundados com exames sorológicos demonstrou que a *L. chagasi* era idêntica a *L. infantum* do Mediterrâneo; ainda existem divergências entre os pesquisadores com relação à taxonomia da *Leishmania chagasi*, hoje taxonomicamente denominada *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (SHAW, 2006).

Segundo os mesmos autores a *L. chagasi* é na verdade a *L. infantum*, e foi introduzida nas Américas através de cães que acompanhavam colonizadores europeus. A posição taxonômica do parasito *Leishmania* está descrito no anexo.

O estágio de amastigota do agente etiológico da leishmaniose é de 2,0 a 6,0 µm de comprimento por 1,5 a 2,0 µm de largura; a forma promastigota tem uma dimensão de 14 a 20 µm de comprimento por 1,5 a 4,0 µm de largura e o flagelo com 30 µm de comprimento *Urquhart, G.M. et al, 1992* citado em Cabrera (1999, p.10).

O parasito tem como hospedeiro, o homem, o cão e uma ampla variedade de animais silvestres e hospedeiros intermediários os insetos flebotomíneos (WHO 2003).

A preferência pelo Sistema Monocítico Fagocitário (SMF) do vertebrado infectado pelo protozoário *L.(L.) i. chagasi* determina o quadro de doença crônica e infecciosa da leishmaniose visceral, associado a episódios febris, emagrecimento progressivo, hepatoesplenomegalia grave, anemia e micropoliadenia (CABRERA, 1999).

### 2.1.2. Vetor

O vetor responsável pela transmissão da leishmaniose, é um inseto do gênero *Lutzomya*, conhecido popularmente como mosquito-palha; pertence à família Psychodidae, espécie *Lutzomya (L.) longipalpis* LUTZ & NEIVA (1912). Apenas as fêmeas são hematófagas, e preferem se alimentar à noite; são as fêmeas as principais vectoras do agente da leishmaniose visceral na região neotropical, atualmente apresentando ampla distribuição geográfica, ocorrendo com frequência no peridomicílio (ANDRADE FILHO, *et al.*, 2001).

A leishmaniose visceral têm portanto, como hospedeiros invertebrados espécies de flebotomíneos hematófagos, pertencentes ao gêneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo, onde três espécies têm sido incriminadas, a *L. longipalpis*, *L. evansi* e a *L. cruzi*. Entretanto, a *L. longipalpis* tem o mais destacado papel epidemiológico na transmissão da doença (TRAVI *et al.*, 1996; GALATI *et al.*, 1997) citados em Ribeiro ( ).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2006) a distribuição geográfica de *L. longipalpis* é ampla e está em expansão, principalmente em quatro regiões: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste e as espécies que estão relacionadas com a transmissão da leishmaniose visceral são a *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, sendo esta última incriminada como vetora no Estado do Mato Grosso do Sul.

#### 2.1.2.1 Ecologia do inseto

Segundo Rey 1991, citado em Cabrera (1999), as fêmeas estão implicadas na transmissão do parasito, as quais são hematófagas, apesar de se alimentarem também de sucos vegetais, alimentação regular dos insetos machos. As fêmeas são bastante ecléticas com relação às suas preferências alimentares, o que justifica sua presença em galinheiros e em locais onde vivem suínos caprinos e eqüinos.



Figura 6: *Lutzomyia longipalpis* - Foto: cortesia de Luis Dickson (Instituto Evandro Chagas)

Evandro Chagas, em 1936 observou a presença do flebótomo *Lu. Longipalpis* em focos de calazar no Nordeste brasileiro (LAINSON & RANGEL 2005); de acordo com os autores a presença do inseto sempre está relacionada à ocorrência da leishmaniose visceral; no entanto outros vetores também já foram citados no estado do Mato Grosso do Sul (*Lutzomyia cruzi*) e na Colômbia e Venezuela (*Lu. Evansi*), segundo Santos et al., 1998.

Os flebátomos são designados como pequenos insetos alados da Ordem Díptera e da família Psychodidae; a *L.(L.) chagasi* é considerado um parasito digenético, ou seja, obrigatoriamente deve passar por um hospedeiro invertebrado. Os flebotomíneos são os insetos de escolha pelo parasito transmissor da leishmaniose visceral (CABRERA 1999).

Segundo Sherlock 1996 citado em Cabrera (1999 p.12) há uma variação sazonal da densidade de *Lu. Longipalpis*; segundo o autor, a espécie apesar de ocorrer durante todo o ano é mais abundante de abril a junho e de outubro a dezembro.

Nas Américas a transmissão para o homem também ocorre por insetos vetores do complexo *L. longipalpis* (Psychodidae:Phlebotominae); nos vertebrados os parasitos têm preferência pelo sistema monocítico fagocitário, afetando especialmente o baço, fígado e medula óssea Lainson & Rangel 2006 citados em Garcez *et al.* (2007).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2006) a distribuição geográfica de *Lutzomyia longipalpis* é ampla e está distribuída em quatro das cinco regiões implicadas na manifestação da doença: são as regiões Nordeste, Norte, Sudeste e Centro Oeste. Especialmente nas regiões Norte e Nordeste este inseto era encontrado participando do sítio primário de transmissão nas matas; sua adaptação às áreas rurais foi incriminada à presença de animais silvestres sinantrópicos.

No final da década de 80, observou-se a adaptação do inseto aos ambientes urbanos, preferencialmente aos grandes centros, nas periferias, onde são encontrados tanto no peridomicílio como no intradomicílio. A *L. longipalpis* adapta-se facilmente aos peridomicílios, à temperaturas variadas e pode também ser encontrada em abrigos de animais domésticos (BRASIL, 2006).

No interior das florestas, o *Lu. longipalpis* realiza seu repasto sanguíneo em marsupiais e canídeos silvestres, tornando assim possível manter o parasito *L.(L.) infantum chagasi* em um ciclo enzoótico (Lainson *et al.*, 1990). Segundo o Ministério da Saúde (2006), a atividade dos flebotomíneos é crepuscular e noturna; durante o dia ficam em repouso, preferencialmente em locais sombreados e úmidos.

## **2.1.2.2 Reservatórios**

### **2.1.2.2.1 O ser humano**

De acordo com Brandão Filho (2006), acredita-se que as pessoas infectadas sejam apenas hospedeiros acidentais de *L. infantum*, mas já existem evidências de que pessoas infectadas também possam vir a ser reservatório da infecção por flebotomíneos. Segundo o autor, algumas dúvidas ainda devem ser esclarecidas sobre os portadores assintomáticos (humanos); seriam eles reservatórios nas áreas urbanas?

Cabrera 1999 comenta sobre a discussão de alguns autores com relação à possibilidade do homem vir a ser reservatório da leishmaniose visceral; foi verificado a pequena parasitemia na pele de humanos em 1956 por Deane, e por isso ele não seria um bom reservatório e não serviria como fonte de infecção para o vetor, principalmente se levar em



consideração o grande número de parasitos encontrados na pele de outros invertebrados em áreas endêmicas.

Segundo o Ministério da Saúde (2006) não existe susceptibilidade em humanos com relação a idade, sexo e raça; no entanto, as crianças e idosos são os mais susceptíveis. Apenas uma pequena parcela de indivíduos desenvolvem a doença, apresentando sinais e sintomas.

Com relação à imunidade no homem, caso não desenvolva a doença o ser humano permanece reativo aos exames por longos períodos; isso significa que a *Leishmania* ou alguns de seus antígenos pode permanecer no organismo infectado por longos períodos após a infecção (BRASIL, 2006).

#### **2.1.2.2.2 O cão doméstico e outros reservatórios silvestres**

O cão é considerado o principal reservatório doméstico da doença e os programas de controle no Brasil, têm como principal foco, a eliminação de cães soropositivos. No entanto, a eliminação dos animais parece não ter associação com a redução da doença em humanos, (BEVILAQUA & MELO 2004).

A despeito de alguns estudos inferirem a efetividade dessa medida um dos principais problemas está relacionado à limitada precisão no diagnóstico sorológico, portanto é necessário que sejam avaliados métodos de diagnóstico mais sensíveis e eficientes nos serviços de saúde pública (PALATINIK *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2007).

Segundo o Ministério da Saúde (2006) e Gontijo & Melo (2004), a enzootia canina tem precedido a ocorrência da leishmaniose em humanos; o cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório doméstico, e no ambiente silvestre tanto a raposa (*Dusycion vetulus* e *Cerdocyon thous*) quanto os marsupiais (*Didelphis albiventris*) têm sido os principais vertebrados incriminados como reservatórios.

As duas espécies de raposas estudadas e que se apresentaram naturalmente infectadas foram encontradas no Ceará (*Lycalopex vetulus*) no Pará e Minas Gerais (*Cerdocyon thous*), segundo Gontijo & Melo, 2004. Alguns autores, entre eles, Courtenay *et al.*, (1996), no entanto questionam a espécie *Lycalopex vetulus* como reservatório da *L. chagasi*; eles acreditam que apenas a espécie *Cerdocyon thous* tem o parasito.

Já os marsupiais têm sido encontrados com mais frequência infectados por protozoários flagelados como *Trypanossoma* e *Leishmania* os quais tem maior importância em Saúde pública; a espécie *Didelphis marsupialis* (Marsupialia, Didelphidae) tem sido

relatada no Rio de Janeiro (CABRERA, 1999). Segundo o autor, esses animais são encontrados facilmente em quintais de residências oriundos de florestas alteradas por ação antrópica.

No entanto o cão vem sendo incriminado como o principal reservatório do parasita da leishmaniose visceral e é o grande responsável pelo ciclo no ambiente domiciliar e peridomicilar, uma vez que os reservatórios não mantêm um contato maior com o peridomicílio. Sendo, portanto, o cão a principal fonte de infecção para o homem a Organização Mundial de Saúde preconiza seu sacrifício em áreas endêmicas (LAINSON, (1990), LEÃO (1996), WHO (1996) E BOBASCHI E NUNES (2007).

Segundo Gontijo & Melo (2004), tanto os marsupiais quanto os canídeos silvestres podem promover uma importante ligação entre o ambiente doméstico e silvestre por apresentarem hábitos sinantrópicos e apesar de ser o cão considerado a fonte de infecção mais importante para o homem, é necessário mais estudos para se determinar o papel desses animais na manutenção da transmissão da leishmaniose visceral.

### **2.1.3 Leishmaniose visceral e o processo de urbanização**

A leishmaniose é uma doença que apresenta um importante significado clínico e epidemiológico, envolvendo diferentes espécies do gênero *Leishmania*; tanto vetores flebotomíneos quanto reservatórios hospedeiros estão envolvidos nos ciclos de transmissão antroponótico e zoonótico (TORRES & BRANDÃO FILHO, 2006).

A urbanização da leishmaniose visceral em muitas regiões do Brasil é real; entre outras razões, está a adaptação do principal vetor, *Lutzomyia longipalpis* e o próprio desenvolvimento urbano (SHAW, 2007).

Nos países em desenvolvimento da América do Sul o controle da Leishmaniose Visceral é mais complexo do que nos países do Mediterrâneo; nos países em desenvolvimento fatores ecológicos, epidemiológicos e sócio-econômicos reduzem o impacto dos programas de controle (TORRES & BRANDÃO FILHO, 2006).

Existem fortes evidências do aparecimento de infecções concomitantes com o HIV (vírus da imunodeficiência humana) e *Leishmania*, proporcionando à co-infecção HIV-*Leishmania* um caráter de doença também emergente. O fato de existirem sobreposição de áreas geográficas de ocorrência de Leishmaniose e HIV/AIDS tem sido intensificada pela urbanização de uma e ruralização da outra, respectivamente (WHO 1997).

O fato de ser o cão doméstico no Brasil (*Canis familiaris*) incriminado como um importante reservatório da infecção por *Leishmania infantum chagasi* ( ), ocorre porque é altamente susceptível à infecção; freqüentemente são observados altos índices de parasitismo na pele desses animais, e são considerados fonte de infecção para humanos principalmente devido à estreita relação com o homem nas áreas urbana e rural ( TORRES & BRANDÃO FILHO, 2006).

Em áreas endêmicas as condições sócio-econômicas, ambientais e hábitos de vida da população, são fatores importantes na epidemiologia da leishmaniose visceral; essas condições são fatores essenciais para o desenvolvimento da doença em áreas rurais e periurbanas onde predomina a população com baixo nível econômico e moradias precárias; em São Luis do Maranhão, Brasil, os focos da doença foram mais observados em regiões periurbanas invadidas e ocupadas após desmatamento (NASCIMENTO *et al.*, 2005).

Estudo realizado por Jeffrey Shaw (2007) ilustra a epidemiologia da leishmaniose se expandindo em áreas territoriais não mais relacionadas à fenômenos naturais e sim pela atividade humana; segundo o autor, parece não haver mais nenhuma dúvida de que todas as espécies de leishmania têm origem zoonótica. Muitos fatores têm sido incriminados na expansão da leishmaniose; Dujardin (2006) considera que as mudanças ambientais, imunossupressão, falha no tratamento são as principais causas da emergência e re-emergência da disseminação da doença; isso varia de região para região. Segundo o autor muitos profissionais também tem sido vítimas da doença principalmente nas forças armadas, quando são enviados à áreas endêmicas.



Figura 7: Área urbana de uma região considerada endêmica e de transmissão intensa para LVC Foto: Lucilândia M. Bezerra (2007)

No entanto, a presença do cão no domicílio e peridomicílio parece não ser um fator de risco primordial para a infecção, como a presença do vetor; segundo Nascimento (2005), o controle vetorial é mais efetivo no controle da doença. Um estudo realizado em São Luis do Maranhão pela mesma autora, verificou que a presença do cão não esteve associada à infecção por *L.infantum chagasi* na Ilha.

Pereira *et al.*, (2004) ressaltam a importância da identificação da espécie vetora e a determinação da taxa de infecção natural nas regiões endêmicas na entomologia médica; um estudo realizado pelos mesmos autores na Amazônia maranhense em 2004 mostrou uma taxa de infecção de 0,4% de *L.whitmani* demonstrando a participação dessa espécie na transmissão de leishmania em mamíferos em Buruticupu no Maranhão.

Em diversas regiões do Brasil, tem se verificado a urbanização da doença, em diferentes períodos do ano; sua evolução tem sido verificada não apenas nas periferias, mas também nas regiões centrais dos municípios estudados.

A distribuição geográfica da leishmaniose visceral na Bahia é ampla, especialmente na região central do estado; no período entre 1985 a 1998 a Bahia foi responsável pela notificação do maior número de casos da doença no Brasil, exceto nos anos

de 1993 e 1994; entretanto, estudo realizado entre 1995 e 2000 sobre as ações de controle em uma área endêmica, não foi observada associação entre a prevalência de cães soropositivos e a incidência de casos humanos (OLIVEIRA & ARAÚJO, 2003).

No Rio de Janeiro, apesar de ter sido capturado flebotomíneos em 18 regiões do Município, o *L.Longipalpis* predominou em apenas uma delas (Barra de Guaratiba, 46,80%), permanecendo ausente nas outras localidades, o que permite concluir que outros flebotomíneos como *L.migonei* e *L.firmatoi* pertencentes ao mesmo grupo parafilético da espécie vetora na cadeia de transmissão, são capazes de transmitir a Leishmaniose Visceral na região (SOUZA *et al.*, 2003).

#### 2.1.4 Transmissão

A cadeia de transmissão da leishmaniose visceral possui três componentes importantes: o vetor, o reservatório e o homem susceptível, sendo o cão o principal reservatório doméstico e importante fonte de infecção para o vetor; a principal condição de transmissibilidade em novos ambientes está relacionada à presença de reservatórios, circulação do parasita e adaptação do vetor ao peridomicílio, condição esta favorecida por fatores que ainda deverão ser esclarecidos (BRASIL, 2008).

No continente americano a leishmaniose visceral é transmitida ao homem por insetos flebótomos (Psychodidae: Plebotominae) da espécie *Lutzomyia longipalpis*, conhecidos na Amazônia como “tatuquiras”; os flebótomos adquirem o parasito ao se alimentarem em animais infectados, especialmente canídeos domésticos e silvestres; os animais silvestres são reservatórios naturais de *Leishmania* e não desenvolvem a doença, ao contrário do homem e cão doméstico, hospedeiros acidentais que desenvolvem os efeitos patológicos da infecção (LAINSON *et al.*, 1983, LAINSON, 1996).

A transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios de todas as regiões do Brasil, com exceção da Região Sul, sendo descrita inicialmente em ambientes rurais e periurbanos e mais recentemente em centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros; atualmente a Leishmaniose Visceral no Brasil está registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, com aproximadamente 1600 municípios apresentando transmissão autóctone (BRASIL, 2006).

A transmissão da leishmaniose visceral hoje, tem um significado importante nos procedimentos hospitalares, como transfusões de sangue (SHAW, 2007); o autor alerta para o fato de que nenhum banco de sangue pesquisa anticorpos anti-leishmania, e mesmo que

fosse feito, a detecção de anticorpos em pacientes saudáveis é difícil; como medida preventiva, segundo o autor, seria importante não utilizar sangue de pessoas que tenham visitado áreas endêmicas.

O autor ainda aborda as atividades turísticas como uma possibilidade importante na disseminação da doença, uma vez que muitas famílias acabam viajando com seus animais de estimação e os períodos de quarentena não são mais necessários para esses animais, com o advento de vacinas eficientes para outras doenças. Os cães infectados podem ficar por um longo período despercebidos e servir de fonte de infecção para o vetor.

Em Palmas, capital do estado do Tocantins, tem sido verificado um aumento significativo da incidência da doença desde 1999, constatado a partir da implantação do Centro de Controle de Zoonoses; as modificações ambientais decorrentes do processo de urbanização, a migração intensa de pessoas oriundas de regiões endêmicas e a melhoria no sistema de informações sobre a notificação dos casos pode ter sido a principal causa da detecção da incidência da doença no Município (SANTOS, 2003).

A cidade de Palmas faz parte da Região Norte, com uma área de 2.218 Km<sup>2</sup> de extensão territorial, localizada à margem direita do rio Tocantins; apresenta um clima tropical em todo território do Município, com uma distribuição sazonal das precipitações pluviais bem estabelecidas, acusando no ano, duas estações bem definidas: a estação chuvosa de outubro a abril, com temperatura média variando entre 22° e 28° e a estação seca nos meses de maio a setembro, com temperatura média que varia entre 27° e 32°; apresenta como temperatura máxima, 41° (SEDUH, 2007).

Segundo dados da Secretaria de Saúde do Município, entre 2001 e 2006 analisando os cinco anos recomendados pela vigilância em saúde, algumas quadras foram consideradas de transmissão intensa para leishmaniose humana, por apresentar estrato 3 de referência para vigilância e controle da leishmaniose visceral.

Esses parâmetros de avaliação estão previstos como classificação epidemiológica para determinar a classificação de áreas endêmicas de transmissão em esporádica, moderada e intensa (BRASIL, 2006).

Entre 1991 até 2003 Palmas passou por um crescimento urbano muito intenso, com o incentivo do governo para desenvolver mais o Estado e a cidade; muitas pessoas de todo Brasil, especialmente do Nordeste foram atraídos pela cidade mais jovem do país, como pode ser observado no mapa a seguir.

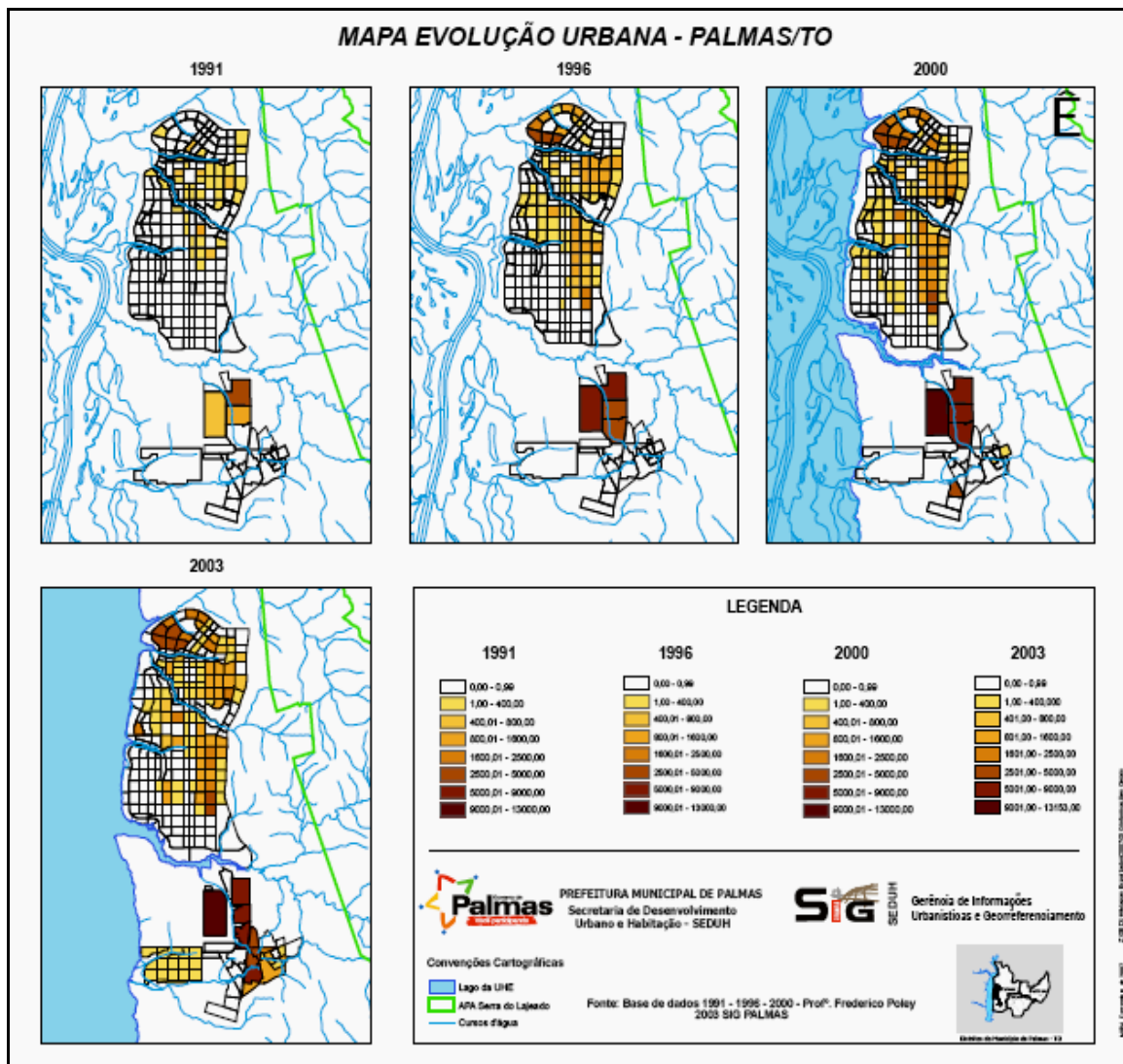


Figura 8: evolução da cidade, segundo dados extraídos da Secretaria de Desenvolvimento Urbano e Habitação de Palmas - TO; site: [www.palmas.to.gov.br/secretarias/sduh/dados/multifinalitarios/perimetro\\_urbano\\_de\\_palmas\\_/rede de saude](http://www.palmas.to.gov.br/secretarias/sduh/dados/multifinalitarios/perimetro_urbano_de_palmas_/rede_de_saude)

Em decorrência da urbanização da leishmaniose visceral ser um fator relativamente novo, se conhece pouco sobre a epidemiologia em focos urbanos; o processo de transmissão da doença no cenário urbano parece ser mais complexo e variado do que no rural; tem-se observado que a estrutura agrária no Brasil mudou muito nos últimos anos, com a migração populacional da zona rural para os grandes centros, o que contribuiu para o favorecimento de doenças emergentes e reemergentes nas cidades, inclusive o calazar (GONTIJO & MELO, 2004).

Uma estimativa de mais de 600 soldados americanos contraíram leishmaniose no Iraque, desde 2003; no Reino Unido, verificou-se também um grande número de casos diagnosticados, quadruplicados nos últimos 10 anos. O aumento de co-infecções

associadas à doença, a urbanização e desmatamento, conflitos armados e turismo, são fatores que contribuem para o aumento de pacientes com leishmaniose em áreas onde a doença não é endêmica (RUTHINGER & DUJARDIN 2007).

### 2.1.5 Ciclo de vida da *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*

As *Leishmanias* são parasitos intracelulares obrigatórios do sistema monocítico fagocitário. Apresentam-se com uma forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada ou amastigota nos tecidos dos vertebrados; são protozoários tripanossomatídeos, do gênero *Leishmania* e no Novo Mundo, a espécie comumente isolada é a *Leishmania (Leishmania) chagasi* (BRASIL, 2006), hoje, denominada *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (SHAW, 2006).

Esses parasitos têm sofrido pressões seletivas a milhões de anos determinadas por mudanças ecológicas; estas transformações interromperam as relações entre hospedeiro e vetor. No entanto, as devastações feitas pelo homem são bem maiores se comparadas às que ocorrem normalmente na Natureza. A velocidade com que essas alterações ocorreram nos últimos 50 anos provocaram rápidas mudanças em diferentes ecótonos naturais (SHAW, 2007).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2006) a distribuição geográfica de *L. longipalpis* é ampla e está em expansão, principalmente em quatro regiões: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste e as espécies que estão relacionadas com a transmissão da leishmaniose visceral são a *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, sendo esta última incriminada como vetora no Estado do Mato Grosso do Sul.

Após a transmissão do parasito pelo vetor, o período de incubação é variável tanto no homem quanto no cão; no homem variando de 10 dias a 24 meses, com uma média de 2 a 6 meses; no cão é bem mais variável, de 3 meses a vários anos, com média de 3 a 7 meses. Como já descrito anteriormente, apesar de não haver susceptibilidade entre raça, idade e sexo, no homem a doença ocorre com mais frequência em crianças e idosos (BRASIL, 2006).

Ainda segundo o Ministério da Saúde (2006) em cães a susceptibilidade também não está relacionadas a raça, sexo ou idade; em cães susceptíveis após a infecção na pele, a doença se dissemina por todo corpo apresentando –se de forma aguda ou crônica dependendo das propriedades tanto do parasito quanto do hospedeiro.





Figura 9: Cão apresentando dermatose periocular bilateral, com LVC - Foto: Lucilândia M. Bezerra (2007)

A *L. longipalpis* era encontrada originalmente, nas regiões Norte e Nordeste, em áreas de matas, participando do primeiro ciclo de transmissão; progressivamente o inseto passou a adaptar-se ao ambiente urbano, em periferias de grandes centros, podendo ser encontrado em peridomicílios (canis, galinheiros, chiqueiros) e intradomicílio; há evidências de que o período de maior transmissão da leishmaniose visceral ocorra durante e logo após a estação chuvosa, quando há um aumento da densidade populacional do inseto (BRASIL, 2006).

De acordo com o IBGE (2007), a maior parte da população (85%) vive nas cidades; isso favorece o aparecimento de doenças emergentes e reemergentes, entre as quais está a leishmaniose ou calazar. Outros fatores acabam influenciando este problema, como as mudanças ambientais climáticas e antrópicas, além de pouco investimento em educação, saúde e principalmente adaptação do vetor nesse ambiente modificado pelo homem (GONTIJO & MELO 2004).

Palmas têm demonstrado um perfil de desenvolvimento urbano intensificado pelo desmatamento e expansão geográfica; foi verificado um aumento do índice da doença de dezembro de 2000 a janeiro de 2001, associado ao período chuvoso, segundo Santos (2003); de acordo com a autora, no período de 1999 a 2002, foi observado um

aumento do número de casos no Município, devido às condições ambientais favoráveis ao aumento da população de insetos no período chuvoso.

Tabela 1: dados de leishmaniose visceral canina entre 2001 e 2006 na cidade de Palmas –TO – fornecidos pelo Centro de Controle e Zoonoses do Município no ano de 2006. Os dados se referem até o mês de junho do mesmo ano.

	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Nº de amostras coletadas	353	934	300	415	905	463
Nº de cães soropositivos	30	69	468	90	203	27

O ciclo biológico da *L.longipalpis* ocorre no ambiente terrestre e inclui quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto; as fêmeas colocam seus ovos sobre um substrato úmido com alto teor de matéria orgânica no solo, onde os ovos eclodem entre 7 e 10 dias após a postura; a atividade dos flebotomíneos é noturna ou crepuscular e a infecção ocorre quando as fêmeas, ao sugarem sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados com o parasito na forma amastigota (BRASIL, 2006).

Ao picar um animal parasitado, o vetor retira com o sangue ou linfa, as Leishmanias, que passam a evoluir no interior do seu tubo digestivo; as formas amastigotas passam para a forma flagelada ou promastigota, que aumentam consideravelmente em número; na pele do vertebrado, ao serem fagocitados pelos macrófagos, retornam à forma amastigota intracelular sobrevivendo dentro dos fagolisossomos onde se multiplicam, rompem a célula e vão infectar outros macrófagos (MELO, 2007).

Após serem inoculadas, as promastigotas no local da inoculação são endocitadas pelos macrófagos onde assumem a forma amastigota; ao romperem a célula por intensa multiplicação por divisão binária, caem no espaço intercelular sendo novamente fagocitadas por macrófagos do Sistema Monocítico Fagocitário, posteriormente provocando lesões que vão determinar a doença (CABRERA, 1999).

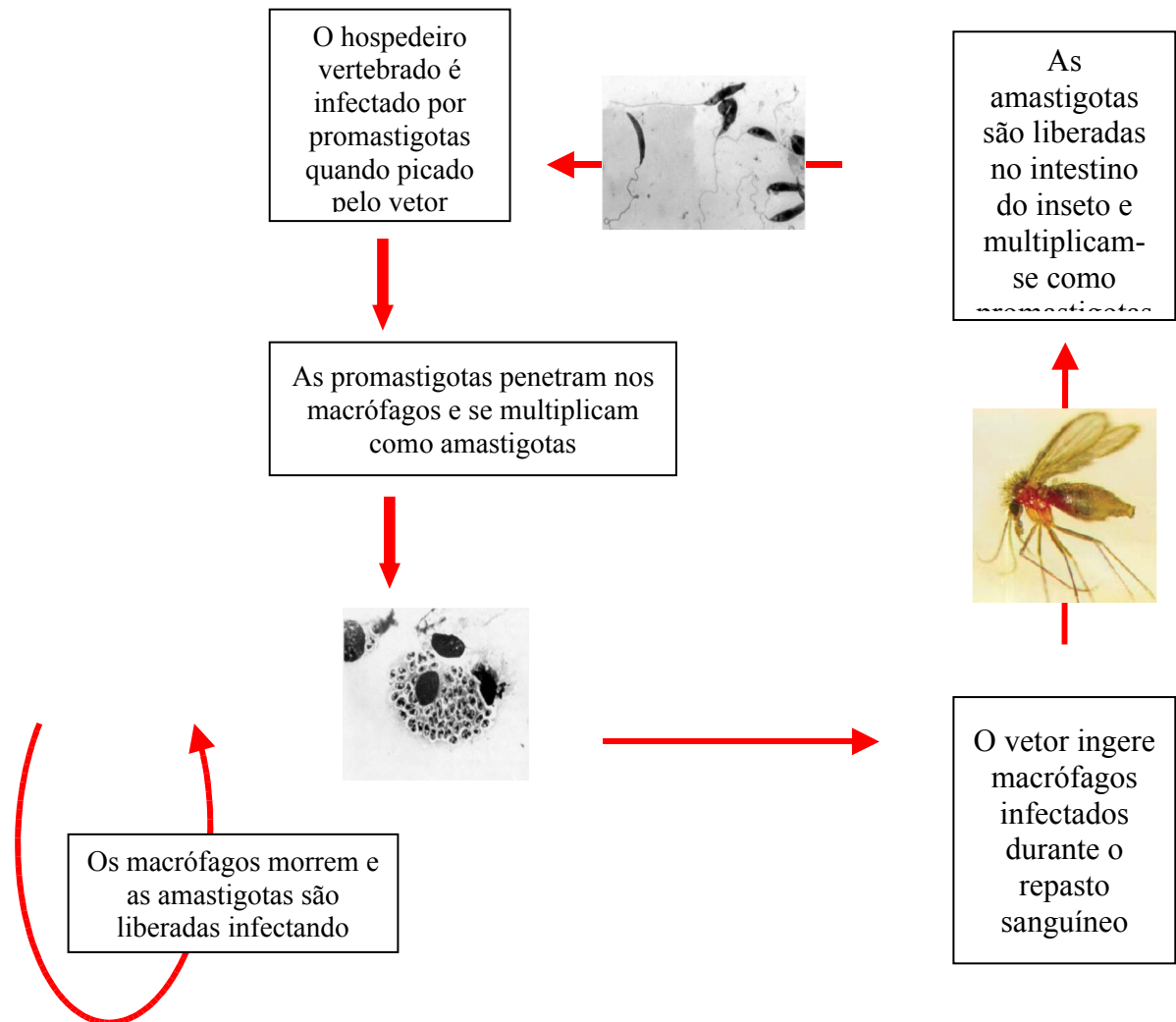


Figura 10 – Ciclo de vida da *Leishmania* – extraído do Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral-MS -2003.

## 2.2. Definição da doença, diagnóstico e tratamento

### 2.2.1 A doença em humanos e caninos

Segundo o Ministério da Saúde (2006), a leishmaniose visceral é uma doença de notificação compulsória e seu diagnóstico deve ser feito o mais precoce possível; tanto o diagnóstico, quanto o tratamento e acompanhamento dos pacientes deve ser implantado em todas as áreas com transmissão ou em risco.

A forma visceral é demonstrada pelo intenso dano em órgãos vitais como fígado e baço; a febre está presente e anemia grave. Se não tratada pode levar à morte e a taxa de mortalidade é alta nos países em desenvolvimento (WHO, 2003).

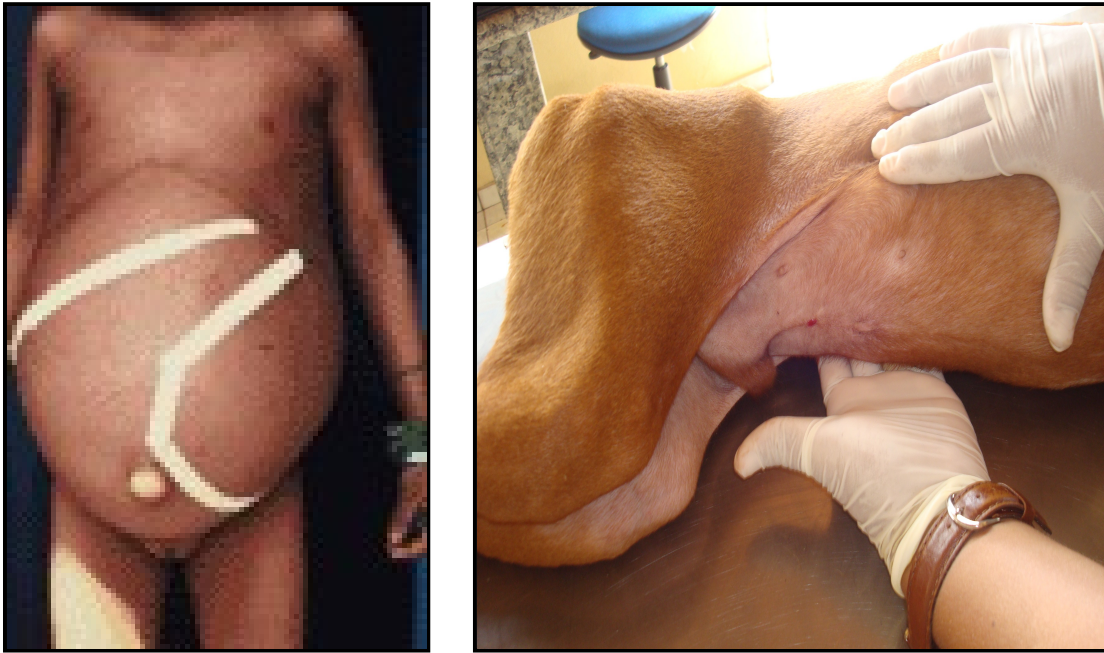


Figura 11 e 12: Forma visceral da LV em humanos (site: [www.who.leishmaniasis.en](http://www.who.leishmaniasis.en)) e em caninos também aumento considerável do baço (Foto/Lucilandia /2007)

Considerada uma doença crônica, a leishmaniose visceral ou calazar, é potencialmente fatal para o homem quando não tratada e sua letalidade pode chegar a 10%. Altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone e a ocorrência da doença depende da presença do vetor susceptível e conseqüentemente, de um hospedeiro igualmente susceptível (GONTIJO & MELO, 2004).

De acordo com o Ministério da Saúde (2006), nos últimos anos a letalidade da leishmaniose visceral tem aumentado gradativamente; de 1994 a 2003 houve um aumento de 6,7%, e numa análise parcial dos dados obtidos, em 2004, demonstrou um aumento de 26% de letalidade.

Os principais fatores de risco que podem evoluir para a morte em humanos são as complicações infecciosas e hemorrágicas, portanto, o diagnóstico precoce é um fator muito importante para a redução da mortalidade e implantação de medidas de controle e tratamento; os sinais e sintomas da doença, assim como a evolução clínica desfavorável em pacientes com LV tem sido pouco estudados (BRASIL, 2006).

No cão, a doença apresenta evolução lenta de forma sistêmica e as manifestações clínicas estão normalmente dependentes do sistema imunológico do animal infectado. O quadro clínico varia de um aparente estado sadio a um estágio final severo, com comprometimento de vísceras e alterações dermatológicas (BRASIL, 2006).

A leishmaniose visceral canina pode apresentar-se classicamente com alterações na derme, como lesões cutâneas, descamação e pequenas lesões eczematosas nas regiões periféricas como orelhas, focinho, caudas e articulações; num estágio mais avançado da doença o animal pode apresentar linfadenopatia, esplenomegalia, ceratoconjuntivite, edemas de extremidades e até paresia posterior, assim como pode também o animal não apresentar nenhum sinal da doença, embora infectado (BRASIL, 2006)

### 2.2.2 Diagnóstico

A incidência da infecção pode ser medida apenas quando se consegue distinguir os cães infectados dos não infectados; para tanto, é necessário usar a presença do parasito para se detectar a infecção. Os métodos existentes para essa detecção são o parasitológico, cultura ou inoculação em animais de laboratório, os quais são conhecidos por suas variabilidades e insensibilidade, Schnur & Jacobson, 1987 citados por Quinzel *et al.*,(1996).

O diagnóstico clínico em cães torna-se difícil devido a grande quantidade de animais assintomáticos ou oligossintomáticos, ou seja, aqueles que apresentam sinais muito discretos da doença; pode em muitos casos assemelhar-se a outros quadros clínicos de doenças infecciosas, e sua complexidade aumenta onde os padrões sócio econômicos são baixos, modificando ainda mais esse quadro ( BRASIL, 2006).

Com relação ao diagnóstico laboratorial, tanto em humanos quanto em caninos, diferentes técnicas podem ser utilizadas, no entanto, apesar dos avanços ocorridos nos últimos anos, nenhum apresenta 100% de especificidade e sensibilidade; nos casos humanos, o diagnóstico é baseado na clínica e epidemiologia, mas para confirmação definitiva, é necessário a demonstração do parasita nos métodos parasitológicos (GONTIJO & MELO, 2004).

Segundo os mesmos autores, o diagnóstico clínico é complexo em humanos por apresentar sintomas comuns a outras doenças, como Malária, Doença de Chagas, Esquistossomose, Febre Tifóide e Tuberculose; todas essas patologias cursam com febre prolongada, hepatoesplenomegalia, anemia, hipergamaglobulinemia, dor abdominal, perda de peso e caquexia, sintomas verificados também na leishmaniose visceral.

Em cães, a variabilidade de sintomas e o fato dos animais apresentarem-se assintomáticos e oligossintomáticos, aumenta a complexidade do problema para a leishmaniose visceral canina; por apresentar-se sistêmica e crônica pode levar o animal à

morte, e dependendo da fase da doença e das condições imunológicas, muitos cães podem se apresentar sem sintomas, mas como fonte de infecção para os flebotomíneos (PALATINICK *et al.*, 2001; BRASIL 2006).

O diagnóstico clínico em cães, como já foi exposto, acaba sendo dificultado pela diversidade de sinais, e a grande quantidade de animais assintomáticos (GONTIJO & MELO, 2004, BRASIL 2006). Os testes imunológicos, parasitológicos e moleculares são os mais indicados para confirmação da doença.

Embora os testes parasitológicos tenham uma especificidade de 100% sua sensibilidade é muito variável, devido a distribuição do parasito não ser homogênea no mesmo tecido; por se tratar de procedimentos invasivos, por punção esplênica e medular, não é um método utilizado em inquéritos epidemiológicos (GONTIJO & MELO, 2004).

O Ministério da Saúde (2006) considera que assim como nos humanos, o diagnóstico laboratorial é baseado no exames sorológico e parasitológico, sendo este último, o método mais seguro, porque se baseia na demonstração do parasito no material examinado, obtido por punção da medula óssea, linfonodos palpáveis, punção aspirativa do baço, biópsia e escarificação da pele.

Ressalta ainda que para a realização dos exames laboratoriais é importante que se conheça a área de transmissão, suas limitações e interpretação clínica.

Outros exames podem ser utilizados, como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA), que expressam os níveis de anticorpos circulantes; atualmente, são os exames de eleição para os inquéritos epidemiológicos caninos; o primeiro, muito utilizado para diagnóstico de várias doenças parasitárias, levando a reações cruzadas com a leishmaniose tegumentar e outras hemoparasitoses, Mohammed *et al.*, 1986 e Costa *et al.*, 1991, citados em Alves & Bevilaqua (2004).

Os testes sorológicos muito utilizados para o diagnósticos da leishmaniose visceral apresentam limitações, e o exame parasitológico tem sido utilizado para confirmação de diagnóstico com a visualização do parasito em material de biopsia ou punção aspirativa de baço, linfonodos e medula óssea; a sensibilidade desse teste é mais alta (98%) quando se usa aspirado de baço, procedimento pouco utilizado por ser invasivo e de difícil execução (GONTIJO & MELO, 2004).

Segundo Bevilaqua & Alves (2004) os testes diagnósticos para a leishmaniose visceral, considerados pelo Ministério da Saúde os exames de referência para inquéritos epidemiológicos, são a Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). No entanto, esses testes diferem em sua especificidade e

sensibilidade na sua aplicação prática em condições de campo e na disponibilidade de reagentes (GONTIJO & MELO, 2004).

Outros testes imunológicos como teste de aglutinação direta (DAT) têm mostrado em vários estudos uma sensibilidade de 91% a 100% e 72 a 100% de especificidade; embora seja um teste de fácil execução apresenta problemas de padronização e controle de qualidade do antígeno (BOELAERT *et al* , 1999).

Em situações epidêmicas e inquéritos populacionais o FAST ( Fast Agglutination Screening Test), uma variação do DAT tem sido testada, segundo Schoone *et al.*, (2001) citados em Gontijo & Melo,(2004). No entanto, no Brasil, os testes de escolha para inquéritos e diagnóstico da leishmaniose visceral são RIFI e ELISA, de acordo com estes autores.

As técnicas de ELISA utilizam vários antígenos crus e molecularmente definidos na busca por um diagnóstico mais sensível e específico para leishmaniose visceral canina (LVC), entre os quais estão os antígenos recombinantes e as proteínas de choque térmico (heat shock proteins –Hsp) de *Leishmania*, às quais pertencem às famílias 60,70,83 e 90 (GARCEZ *et al.*, 2006).

As proteínas de choque térmico são descritas como antígenos imunodominantes em vários processos autoimunes infecciosos e tumorais; as Hsp 70 e Hsp 83 de *L.infantum* têm um importante papel como antígenos imunodominantes; são proteínas imunoestimuladoras da resposta humoral frente a um antígeno fusionado a elas (RICO *et al.*, 2002).

Em 2004, Celeste *et al.*, observaram em um ensaio sorológico, utilizando o antígeno Hsp 83 recombinante em ELISA para diagnóstico de leishmaniose cutânea e mucocutânea um bom desempenho do antígeno mostrando inclusive a ausência de reações cruzadas com Doença de Chagas. Segundo os autores reações falso positivas são freqüentes, quando utilizado antígenos de formas promastigotas de *Leishmania*.

Os antígenos crus em testes sorológicos demonstraram que o ELISA é altamente sensível para detectar a infecção em cães sintomáticos (93,1% a 94,1%), mas pouco sensível em infecções subclínicas em torno de 71%. (QUINNEL *et al.*, (2001).

Segundo Gontijo & Melo (2004) é necessária a pesquisa de antígenos purificados que possam ser utilizados como ferramenta para um diagnóstico mais específico nos testes sorológicos, determinando maior especificidade e sensibilidade; têm sido identificados vários antígenos, como o Anti-66KDa ( especificidade de 100%, mas sensibilidade de 37% ), o L.major-like ( com 100% de especificidade e 92% de sensibilidade)

para diagnóstico canino e humano, e o rK39, bem estudado e testado no Brasil, bem específico para o complexo *L. donovani*.

O diagnóstico diferencial da leishmaniose visceral é importante devido a grande quantidade de doenças com aspectos clínicos muito semelhantes (a tuberculose, malária, esquistossomose em humanos) , geralmente presentes em áreas endêmicas; o diagnóstico parasitológico é considerado o teste padrão para leishmaniose tanto tegumentar, quanto visceral pela sua alta especificidade; estes exames são realizados pela coloração de Giemsa da biopsia da lesões (cutânea) e punção aspirativa de linfonodo e medula óssea (visceral), ( GONTIJO & MELO, 2004; REITHINGER & DUJARDIN, 2007).

De acordo com os mesmos autores, outros métodos de exames laboratoriais são também utilizados no diagnóstico das leishmanioses, como o cultivo em combinação com eletroforese enzimática e os exames moleculares, muitas vezes não utilizados devido às dificuldades de implantação em áreas endêmicas, apesar de sua aplicação prática ser muito segura.

Para Reithinger & Dujardin (2007) e Quinnel *et al.*, (1996) a microscopia é o método mais utilizado pela sua especificidade embora tenha baixa sensibilidade; no entanto, dentro dos níveis de saúde terciário, secundário e até primário, são utilizados em áreas endêmicas, porque as técnicas mais sofisticadas são caras e pouco disponíveis.

No método parasitológico é possível visualizar os parasitos em esfregaços de linfa dos linfonodos ou sangue de medula óssea, com podemos ver na figura 13.



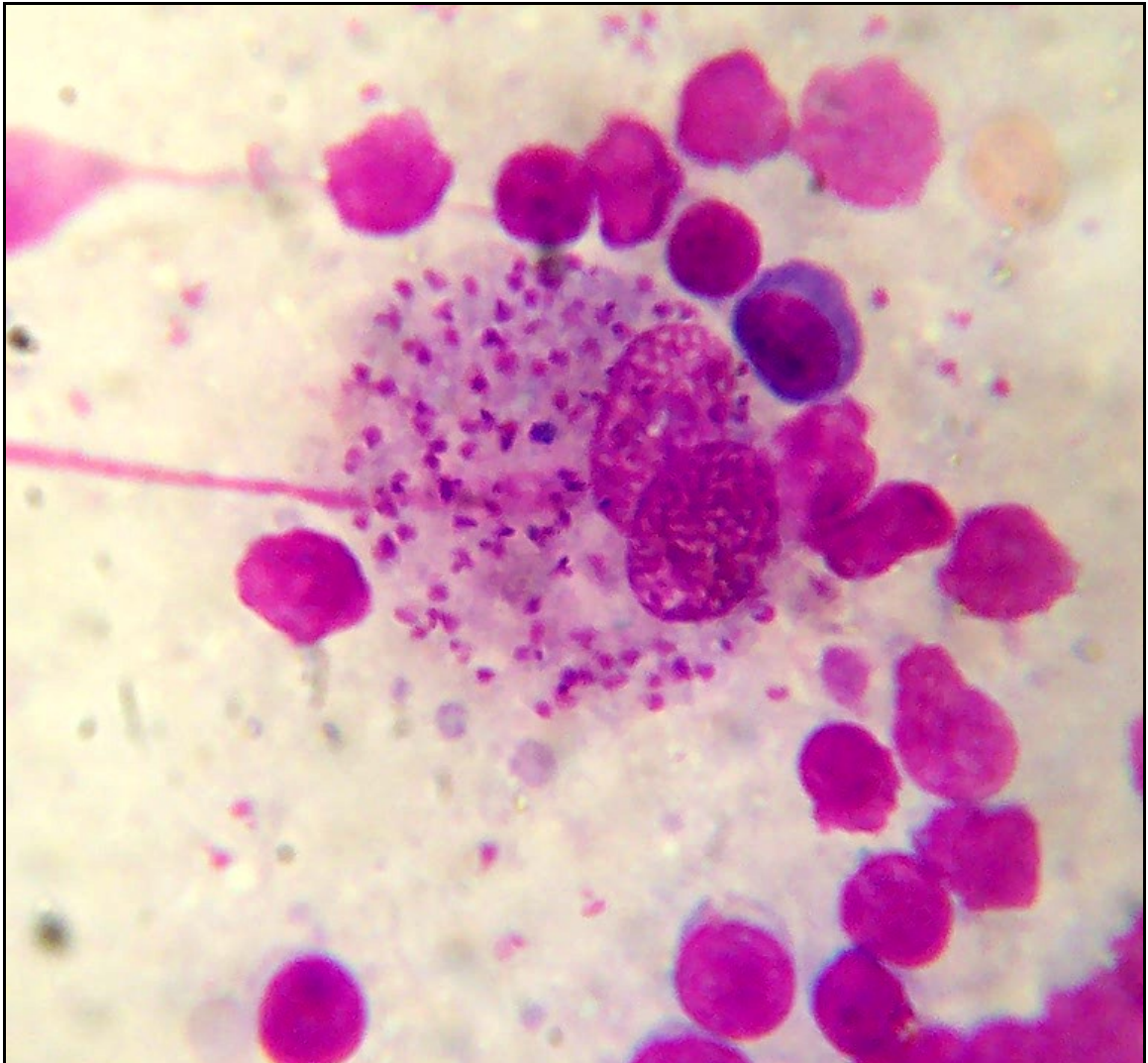


Figura 13: formas amastigostas de Leishmania em linfonodo de cão. Cortesia: Arca dos Bichos Clínica Veterinária. Foto: Pedro Heber

O estado do Tocantins atualmente vem apresentando muitos casos de leishmaniose visceral canina (LVC), especialmente em Palmas, capital do Estado; segundo dados da Secretaria Estadual de Saúde, nos últimos três anos algumas regiões do Estado vem apresentando casos da doença em humanos de forma crescente e significativa.

No ano de 2007 foram realizados inquéritos epidemiológicos em várias cidades do Estado, destacando-se entre elas aquelas que tiveram o maior números de soropositivos e valores indeterminados, como mostra a tabela 2.

Tabela 2: Situação da leishmaniose nos municípios do estado do Tocantins, segundo dados da Secretaria de Saúde do Estado Os exames foram realizados no LACEN de Palmas, utilizando ELISA e RIFI.

CIDADES	SR	IND	TOTAL
ANANAS - LSPA	45	9	54
ARAGUAINA - LSPA	2339	496	2835
ARAGUATINS	70	33	103
ARAGUATIN S - LSPA	81	31	112
AUGUSTINPOLIS - LSPA	50	16	66
BURITI - LSPA	175	78	253
COLINAS	32	28	60
CRISTALANDIA	172	32	204
GUARAI	180	34	214
PALMAS - SEMUS	626	181	807
PARAISO	459	76	535
PORTO NACIONAL	442	89	531
TOCANTINOPOLIS - LSPA	375	169	544
WANDERLANDIA - LSPA	12	13	25

Legenda: SR – sororeagentes; IND – indeterminado

### 2.2.3 Tratamento

O tratamento para leishmaniose foi instituído pela primeira vez no Brasil, por Gaspar Vianna em 1913, utilizando compostos antimoniais sob a forma de sais trivalentes; somente na década de 40 os derivados pentavalentes ( $Sb^{+3}$ ) foram utilizados e desde então considerados como drogas de escolha pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

Pacientes com leishmaniose visceral devem ser tratados em hospitais de referência, e inclui tratamento específico e de suporte, após a confirmação da doença, em pacientes com sinais de alerta, como crianças entre seis meses a um ano e idosos acima de 60 anos. O medicamento proposto pelos médicos credenciados, deve ser feito com antimoniato de N-metil glucamina, conforme normas descritas no Manual de Controle da Leishmaniose Visceral (BRASIL, 2006).

Os antimoniais pentavalentes, no Brasil, são consideradas as drogas de escolha para o tratamento em humanos, em virtude de sua comprovada ação terapêutica, segundo Santos *e cols*, 2002, citados em Brasil (2006); a anfotericina B está entre as drogas indicadas para gestantes e crianças menores de seis meses, pacientes com quadro de desnutrição grave e co-morbidades (BRASIL, 2006).

Essas drogas são tóxicas, e nem sempre efetivas; são utilizadas em leishmaniose visceral em esquemas prolongados, com restrição em pacientes gestantes nos primeiros meses de gestação. Estudos recentes mostram resistência aos antimoniais na Índia e Sudão, mas apesar dos problemas de toxicidade, o desenvolvimento da anfotericina B lipossomal (AmBisome) tem mostrado bons resultados na Índia (GONTIJO & MELO, 2004).

Em cães o tratamento ainda é muito discutido no meio clínico veterinário e apesar de muitas tentativas ainda não se conseguiu um protocolo de tratamento efetivo para que os cães não continuem como fonte de infecção para os flebótomos. O Ministério da Saúde proíbe o uso de antimoniatos em cães para evitar possíveis resistências do parasito em humanos.

Segundo o Ministério da Saúde (2006) o tratamento em cães não diminui a importância desses animais como reservatório do parasito; as drogas utilizadas, como os antimoniatos de meglumina, anfotericina B e outros fungicidas tem tido baixa eficácia na cura da doença no cão, induz a remissão temporária dos sinais clínicos, e não previne a ocorrência de recidivas.

Algumas experiências com antimoniatos de glucantime em cães em 1988 por Manciante *et al.*, Marzochi *et al.*, em 1985, Gradoni *et al.*, em 1987 e o uso do alopurinol estudado por Liste e Gascon, 1995 citados em Cabrera (1999) não demonstraram resultados satisfatórios.

São necessários ainda maiores estudos no campo terapêutico em cães para que se consiga um protocolo que mantenha o cão livre dos parasitos e negativo nos exames sorológicos, tornando-o não infectante para o vetor, e que possa desvincular a cadeia de transmissão.

#### **2.2.4. Controle e prevenção da doença**

Com o objetivo de diminuir as taxas de letalidade e morbidade da doença, o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), vem implementando ações de vigilância e assistência aos pacientes, alertando sempre para que os casos suspeitos ou confirmados devem ser notificados obrigatoriamente e visa reduzir as taxas de letalidade e o grau de morbidade através do diagnóstico precoce dos casos humanos e do controle de reservatórios e vetores (BRASIL, 2006).

Avanços recentes de drogas no tratamento da leishmaniose, associada a testes rápidos sorológicos como o rK39 permitiram a formulação de programas de controle da

leishmaniose na Índia. Os programas até então empregados, como a eliminação de cães requer aumento de novas pesquisas (CHAPPPUIS *et al.* 2007).

Modelos matemáticos já foram estudados com o objetivo de medi de controle do calazar canino. Paltinik *et al.*, (2004) contesta Dye 1996 que considerou as campanhas de controle de leishmaniose canina ineficaz; na opinião dos autores a ineficácia só acontece quando se utiliza valores baixos do índice de remoção de cães infecciosos.

O Ministério da Saúde (2006) recomenda como medidas para o controle da doença em humanos, o diagnóstico e tratamento precoces dos casos, redução da população de vetores, eliminação de reservatórios e atividades de educação em saúde. Estas medidas seriam justificadas principalmente pelo conhecimento ainda insuficiente dos vários elementos que compõem a cadeia de transmissão da leishmaniose visceral.

São das secretarias Estaduais e municipais de saúde a responsabilidade pela implementação dessas medidas de acordo com a Portaria No 1.399, de 15 /12/99.

O controle da doença considerando o número de cães infectados deveria, de acordo com Quinnell *et al.* (1997) primeiro passar por estimativas quantitativas de variáveis epidemiológicas que descrevem as taxas de transmissão entre indivíduos em uma população; essas quantidades definiriam a magnitude do problema de controle.

O desenvolvimento de técnicas para detecção de antígenos que sejam menos invasivas para diagnóstico primário da leishmaniose visceral especialmente em pacientes co-infectados com HIV, tratamento mais eficiente com investimento em drogas menos agressivas, combinação de terapias com monitoramento de resistência de drogas , associadas ao controle de reservatórios em áreas endêmicas são medidas necessárias para o controle da leishmaniose (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Para o Ministério da Saúde, o tratamento da leishmaniose em cães não apresenta eficácia é muito precoce no Brasil e há necessidade de maiores estudos e discussão sobre o assunto. O antimoniato de N-metil glucamina é utilizado em altas doses no cão (10 vezes maior que em humanos) e isso pode determinar fatores de resistência ao parasita.

O Ministério em nota técnica (2008) enviada aos demais órgãos de saúde reforça a necessidade de busca científica por um protocolo melhor elaborado para o tratamento em cães utilizando novas drogas efetivas e específicas ( BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE-NT NR 02/08).

As medidas preventivas utilizadas para controle nos reservatórios domésticos incluem coleiras impregnadas com inseticida em áreas endêmicas e em humanos o uso de mosquiteiros impregnados também com inseticidas a (CHAPPUIS *et al.* 2007) .

As vacinas têm sido empregadas como medidas preventivas em cães embora sua utilização em áreas endêmicas seja muito discutida ainda. O Ministério da Saúde não recomenda sua utilização em massa por questionar a eficiência da resposta imune no cão e propõe mais estudos sobre a utilização dessas vacinas (BRASIL, 2006; TORRES & BRANDÃO FILHO 2006).

Em 2004 foi introduzida no mercado a vacina FML (Fucose Manose Ligand) com o aval do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com o nome de Leishmune, pela Fort Dodge Saúde Animal. Considerada uma vacina de segunda geração, foi desenvolvida na Universidade Federal do Rio de Janeiro, testada em campo, foi capaz de proteger 92-95% dos cães vacinados, segundo Borja-Cabrera (2002) citados em Gontijo & Melo (2004).

O Ministério da Saúde não autoriza o uso da vacina como medida de controle da leishmaniose visceral no Brasil, por considerar a vacina referida com eficácia canina e por não ter sido realizado ainda estudos com relação ao impacto na incidência humana e canina. Segundo Torres (2006) a vacina Leishmune é destinada para cães e pode ser uma importante solução para a doença em animais; no entanto não se conhece ainda o impacto na incidência da doença em humanos.

Segundo Torres & Brandão Filho (2006) as estratégias de controle atualmente utilizadas não têm sido eficazes no sentido de prevenir a expansão geográfica da doença e existe uma grande necessidade de definir melhor as áreas prioritárias e monitorar melhor as atividades de controle e vigilância epidemiológica.

### **2.3. Importância da epizootia no cão**

A epidemiologia da doença tem se expandido em territórios onde foram relatados fenômenos naturais provocados pela atividade humana; o homem inadvertidamente domesticou algumas espécies durante o curso de sua evolução sócia o que desencadeou fatores comuns que podem ter influenciado o aumento de casos de leishmaniose, como a grande variedade de diferentes contatos reservatório/homem e vetor, o que molda o nível de imunidade, determinando se haverá ou não doença clínica (SHAW, J. 2007).

O cão tem sido incriminado como o principal reservatório doméstico da leishmaniose visceral; os programas de controle da doença no Brasil, que tem como principal foco, a eliminação de cães soropositivos; no entanto, não apresentou até agora, associação com a redução da doença em humanos. É necessário, que sejam avaliados métodos de

diagnóstico mais sensíveis e eficientes nos serviços de saúde pública (BEVILÁQUA & MELO, 2004).

No Brasil, a presença do cão (*Canis familiaris*) soropositivo nas residências é visto como um fator de risco possível para a infecção para a *Leishmania infantum*; é considerado o principal reservatório desse protozoário por causa da alta suscetibilidade à infecção e ao alto parasitismo cutâneo observado, e também devido sua íntima relação com o homem, Cunha, S., 1995, Ashford, RW., 1996, citados em Torres & Brandão Filho (2006).

Dentro dessas considerações, Torres & Brandão Filho (2006) num estudo sobre a leishmaniose visceral no Brasil, propõem as seguintes questões: os portadores assintomáticos (humanos) também podem estar agindo como reservatórios em áreas urbanas? Os cães domésticos são a única fonte de infecção em todos os focos de leishmaniose visceral no Brasil? Os mesmos autores consideram que este é um assunto complexo e as opiniões podem variar muito.

Um fator importante associado à epidemiologia da doença, está associado à famílias que viajam com seus cães; a eficiência das vacinas contra doenças caninas dispensam o uso de quarentenas e o passaporte de saúde animal. Devido o período de incubação da leishmaniose visceral canina ser variável, muitas vezes eles apresentam sinais clínicos após deixarem as zonas endêmicas e isso pode servir como fonte de infecção para o vetor em outras regiões (SHAW, 2007).



Figura 14: Cão apresentando quadro de linfadenopatia generalizada Fonte: Lucilândia M.Bezerra (ARCA/2008)

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudo

O trabalho foi realizado no município de Palmas, capital do estado do Tocantins, situada na região Norte do Brasil no centro do Estado; sua sede municipal tem como coordenadas geográficas  $-10^{\circ}12'46''$  de latitude Sul,  $48^{\circ}21'37''$  de longitude Oeste e altitude média de 330m acima do nível do mar; apresenta um clima tropical, com duas estações bem definidas durante o ano, uma temperatura média de 26 a  $30^{\circ}\text{C}$ , com umidade relativa do ar média de 76%, altitude média de 700 metros; entre as capitais brasileiras é a que apresenta a menor população com aproximadamente 178.386 habitantes e uma área física de 2.219  $\text{km}^2$  segundo dados do IBGE (2007).

A cidade é cortada pelo rio Tocantins, o qual na época seca (de junho a setembro) forma excelentes praias, muito freqüentadas por turistas; é contornada pela Serra do Lajeado com 9.9 hectares de área de preservação onde estão situadas 100 cachoeiras, 13 grutas, oito sítios arqueológicos e uma fauna muito rica em espécies (SEDUH 2008).

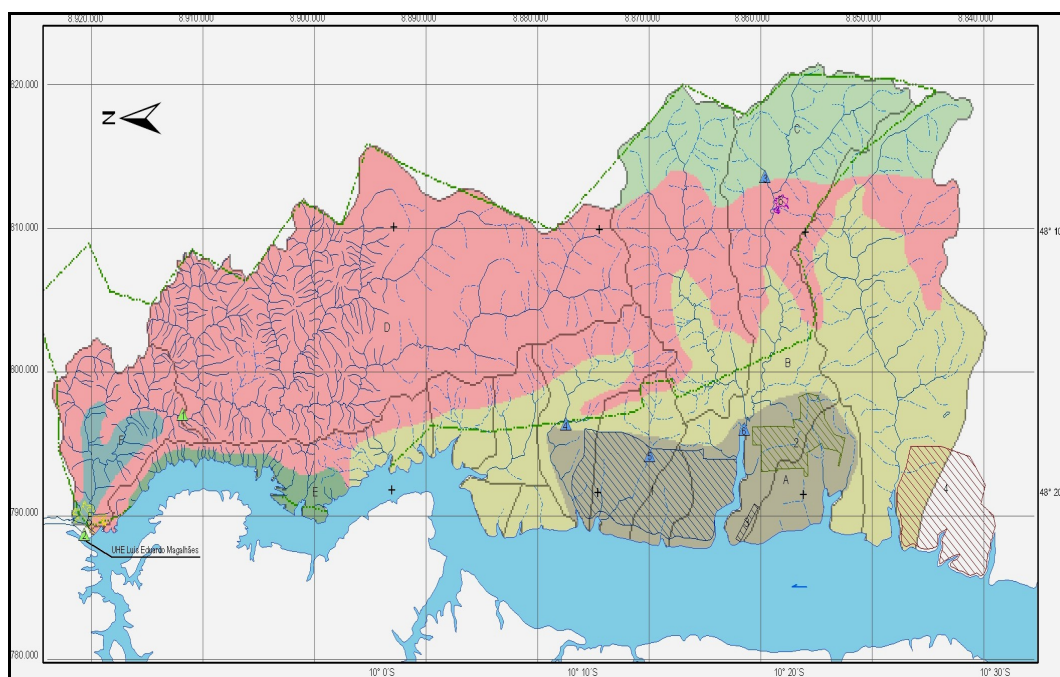


Figura 15: Descrição Geral da Área do Estudo. Legenda: azul – rio Tocantins (lago); Verde – Matas; Azul = área urbana de Palmas – site: [www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index\\_2.html](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index_2.html)



### 3.2. Desenho do Estudo

As áreas selecionadas para este estudo, foram duas quadras da cidade; uma situada ao sul, considerada de transmissão intensa para leishmaniose visceral em humanos, AURENY III, outra na região sudoeste, ARSO 1203 sul, considerada de transmissão esporádica também para humanos, segundo informações da SESAU (2006). A quadra 1203 sul encontra-se localizada na área sudoeste (ARSO) da cidade mais localizada ao sul em relação às outras quadras e a AURENY III, é dividida em três etapas – I, II e III; neste trabalho, foi selecionada a primeira etapa localizada no início da quadra mais próxima do centro da cidade.

A situação epidemiológica das duas quadras refere-se à população humana segundo informação da Secretaria Municipal de Saúde de Palmas-TO, cedidas pelo Centro de Controle e Zoonoses. A média de casos de leishmaniose em humanos em ARSO nos últimos três anos é zero, considerada então sem transmissão e em AURENY é de 9,3 casos, considerada portanto de transmissão intensa. Foi avaliada toda população canina das áreas citadas, através de um levantamento censitário, coleta de sangue, punção de linfonodos palpáveis e exames dos cães coletados.

Os cães envolvidos nesse trabalho, passaram por avaliação clínica no momento da coleta e posteriormente o material coletado foi submetido à exames laboratoriais sorológicos e parasitológico: o método utilizado para exames sorológicos foi o Imunoensaio Enzimático (ELISA), utilizando lisado cru de *Leishmania chagasi*, a proteína de choque térmico 83 e exame parasitológico direto.

Nos exames sorológicos pela técnica do ELISA foram avaliados o desempenho dos dois antígenos (lisado cru e a proteína Hsp 83) nas duas quadras descritas com características epidemiológicas diferentes. O período entre o levantamento censitário, coleta de material biológico e realização dos exames foi de 12 meses.

A seqüência de atividades nesse período seguiu da seguinte maneira:

1. Primeira fase - Levantamento censitário (verificação do número de cães e humanos residentes nos domicílios)
2. Segunda fase: estimativa da população canina, avaliação clínica dos animais, colheita de sangue por venopunção, colheita de linfa em linfonodos palpáveis e marcação de pontos por GPS.
3. Terceira fase - realização dos testes sorológicos e parasitológico

#### 4. Quarta fase - confecção do banco de dados

Cada fase citada do trabalho foi realizada dentro das condições estabelecidas em campo, como aceitação pelo proprietário, acesso ao animal, residências fechadas, o que predispôs vários retornos aos locais de coleta, estabelecendo um esforço de coleta muito grande para se conseguir uma amostragem mais segura.

### **3.3. Levantamento censitário**

O levantamento censitário foi realizado durante 3 meses (abril, maio e junho de 2007) e incluiu 5 quadras previstas no pré-projeto situadas na segunda etapa das ARSOs mais ao sul da cidade. Embora tenha sido realizado o censo em todas as quadras apenas a Aureny III primeira etapa e a 1203 sul permaneceram como foco do estudo.

A população de cães na primeira etapa da Aureny III foi de 457 cães e na 1203 sul a população estimada foi de 162 animais. No momento da realização do censo, foi observado também as condições físicas do domicílio e o número de pessoas residentes.

As outras quadras consideradas de transmissão esporádica e que não entraram no estudo, foram as ARSOs 1003 sul, ARSO 1005 sul e ARSO 1007 sul, somando um total de 168 animais. Ao todo, o número de cães nas cinco quadras, totalizaram 787 animais.

Após avaliação da logística e esforço de coleta para conseguir amostra de todos os animais, optamos por apenas duas quadras, sendo uma classificada como área de transmissão intensa e outra classificada como área de transmissão esporádica (Aureny III-1ª etapa e 1203 sul respectivamente).

As quadras foram percorridas de acordo com os mapas da Secretaria de Desenvolvimento e Habitação (SEDUH), sendo contadas apenas as casas que tinham animais, considerando o número de moradores da residência e o número de animais residentes. Foi elaborado previamente um crachá com identificação da equipe envolvida no censo, com nome completo, identificação da Universidade e objetivo da visita.

Foram visitados todos os domicílios das quadras em estudo, seguindo os mapas registrando todas as informações em uma ficha preliminar de inquérito epidemiológico elaborada dentro das necessidades do trabalho, pela coordenação de pesquisa em parasitologia do Instituto Evandro Chagas em Belém-Pará (anexos/ mapas e ficha).

Após a avaliação do censo nas cinco quadras percorridas, foi verificada uma amostragem muito grande para o período disponível para a conclusão do trabalho; a opção por se trabalhar em apenas duas quadras, considerando a estratificação epidemiológica foi determinada pela amostragem e pelo grau de dificuldade nas coletas em ambientes urbanos; isso ficou constatado num trabalho piloto realizado nas duas quadras propostas, em julho de 2007, após a realização do censo; o numero de animais nas duas quadras foi de 619 cães, (162 animais na 1203 sul e 457 animais na Aurenny III).



Figura 16: Levantamento censitário realizado no período de abril a junho de 2007 em Palmas-TO - Foto: Lucilândia M. Bezerra (2007)

O trabalho de coleta geral foi iniciado em agosto de 2007 até início de janeiro de 2008, embora a previsão inicial fosse de agosto a novembro de 2007; houve um imenso esforço para a realização das coletas, devido às dificuldades em campo e muitas casas fechadas. Nas casas fechadas foram feitos vários retornos em fins de semana ou feriados para se conseguir as amostras, uma vez que a mesma só poderia ser realizada com autorização e presença de um responsável.

No entanto, algumas amostras não foram coletadas porque os proprietários não estavam nas residências, nem no momento da coleta, nem nos retornos. Nesse caso, foram apenas registrados o ponto no GPS.

### **3.4. Comitê de Ética**

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Luterano de Palmas (parecer No762/2008), à Comissão de Pesquisa de Avaliação e Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde (parecer 42-03/08), por se tratar de um trabalho envolvendo seres humanos e seus animais de estimação .(anexos)

### **3.5.Colheita de sangue e linfa**

#### **3.5.1. Método parasitológico direto**

O exame parasitológico é indicado como teste de comprovação quando há suspeita clínica da leishmaniose visceral ou tegumentar e pode ser realizado através de citologia de esfregaços de linfa e sangue da medula óssea, por aspirado linfonodos, medula óssea, fígado e baço, através de biópsia e imprints de pele ou por escarificação em ferimentos cutâneos. O exame citológico consiste na observação direta dos parasitas, corados com o corante May Grunwald Giemsa e a contagem das formas amastigotas é feita em objetiva de imersão 400x (SANTOS, 1999)

Neste trabalho os exames parasitológicos foram realizados a partir de amostras coletadas pelo aspirado de gânglios linfáticos palpáveis ou punção aspirativa de medula óssea; no trabalho em campo, optou-se pelo aspirado linfático pela maior facilidade e colaboração dos proprietários dos animais nas coletas no domicílio. Quando realizado na clínica a opção foi de medula óssea utilizando-se o osso esternal.

O aspirado nos linfonodos foi feito utilizando-se agulha fina, de calibre 25x07 e seringas de 10 ml; a agulha utilizada para o aspirado de sangue medular foi de calibre 40x16; os gânglios linfáticos de escolha foram os linfonodos poplíteos palpáveis, utilizados pela praticidade anatômica e pelo menor risco de acidentes durante a coleta.



Figura 17: Colheita de linfa em linfonodos palpáveis. Fonte: Lucilândia M. Bezerra (ARCA/2008)

### 3.5.2. Contenção do animal

Para o aspirado de linfonodo em campo, não foi necessária a utilização da contenção química, apenas a contenção física com mordaca de plástico, coleira e guia, preferencialmente com a mordaca cobrindo os olhos do animal para minimizar o stress no ato da coleta.

Após a contenção com a guia a mordaca era colocada preferencialmente pelo proprietário do animal, que a seguir era posicionado em pé ou deitado lateralmente; a linfa era aspirada com a seringa posicionada num ângulo de 45° em relação à perna do animal, após limpeza e assepsia do local onde seria introduzida a agulha.

Utilizando pressão negativa, a agulha era direcionada em vários pontos do gânglio e o aspirado coletado após várias trações com o êmbolo da seringa; as lâminas para

microscopia estavam sempre próximas, limpas e desengorduradas para a confecção dos esfregaços; foram confeccionadas duas lâminas de cada animal.

As lâminas eram posicionadas numa superfície plana e firme (para isso utilizamos a própria caixa de material pra coletas) dispensando uma gota de linfa na extremidade da lâmina; com o uso de uma lamínula extensora realizou-se o esfregaço o mais uniformemente possível.

Após realizar a extensão do material na lâmina os esfregaços foram fixados com álcool metílico PA (metanol)  $\text{CH}_3\text{OH}$  por 1,5 minuto e corados pelo May-Grunwald-Giemsa, por 30 minutos. A seguir foram lavadas rapidamente com água tamponada (composta por uma solução tampão: pH 7,2 constituída a partir das soluções fosfato de potássio monobásico anidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e fosfato de sódio dibásico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), e secas em temperatura ambiente e observadas ao microscópio em objetivas de imersão (400x).

A leitura dos esfregaços foi feita observando todos os campos e considerando positiva a lâmina que tivesse pelo menos uma forma amastigota do parasito no campo observado e negativa a que não era visto nenhum parasito em todo esfregaço percorrido.

O Ministério da Saúde recomenda contar 1200 campos e o resultado final descrito em média por campo; no entanto, a contagem de todos os campos cuidadosamente, é um método seguro para avaliação diagnóstica. São observadas as formas amastigotas no esfregaço, que se coram em roxo pelo Giemsa, visualizando bem o cinetoplasto e o núcleo dos parasitos.



Figura 18:Animal com mordaca após contenção física e química. Foto: cortesia de Eduardo Mota (2008)

### 3.5.3. Colheita de sangue para exames sorológicos

As amostras para o exame sorológico foram coletadas, com todos os cuidados de assepsia local; a contenção do animal feita sob a supervisão de um Médico Veterinário da equipe sempre contou com a presença do proprietário ou responsável; a colheita de sangue foi feita por venopunção, utilizando seringas de 3 ml e agulhas de calibre 30x08. As veias de eleição foram a cefálica, femoral ou jugular.

Em animais de pequeno porte, é preferível a colheita na veia jugular para se obter um maior volume de sangue e menos risco de hemólise no soro. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rotações por minuto para separação do soro, a seguir, aliquotados em ependorf de 2 ml, identificados e armazenados em freezer a  $-20^{\circ}$  para posteriormente serem enviados ao laboratório, onde foram realizadas as análises sorológicas.

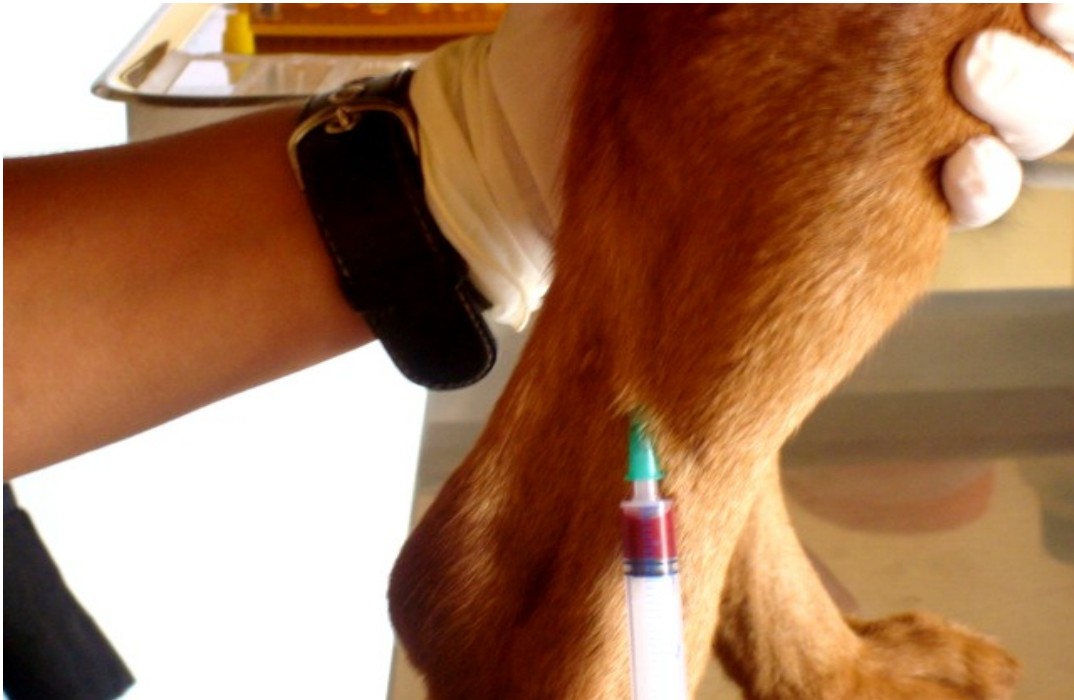


Figura 19: Colheita de sangue utilizando a veia femural em cão. Fonte: Lucilândia M.Bezerra (ARCA/2007)

### **3.5.4 Testes sorológicos: obtenção de antígenos**

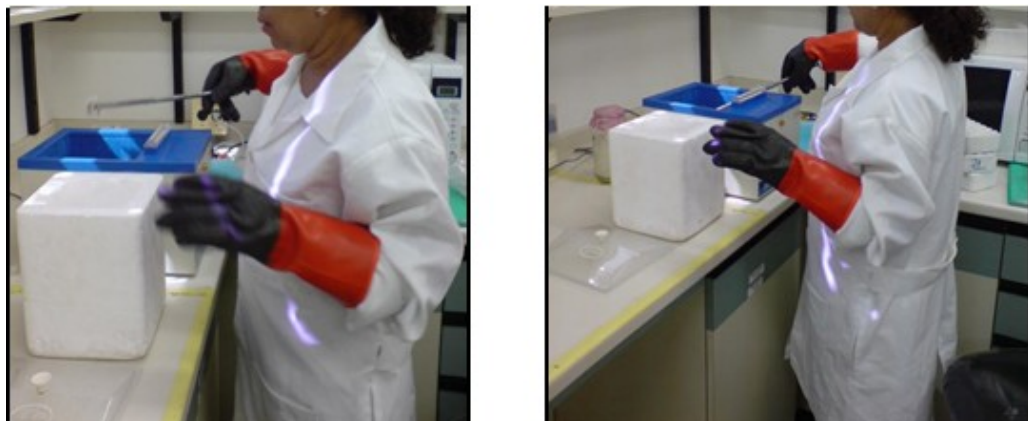
Os testes sorológicos, como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), são de grande importância como ferramentas nos inquéritos epidemiológicos da leishmaniose e como auxílio no diagnóstico da doença. O teste de ELISA é o mais utilizado para imunodiagnóstico da leishmaniose visceral, por ser um teste rápido, de fácil execução e leitura, sendo mais sensível e pouco menos específico que o RIFI; permite, através de sua alta sensibilidade detecção de baixos títulos de anticorpos (GONTIJO & MELO 2004).

Neste trabalho, foram realizados os testes sorológicos utilizando o Imunoensaio Enzimático (ELISA) com lisado cru de promastigotas de *Leishmania (L) i. Chagasi* SHAW, 2006 e a proteína de choque térmico 83. As amostras de soro foram coletadas em campo, processadas e congeladas para posterior análise laboratorial.



### 3.5.4.1 Obtenção do antígeno - Lisado Cru de Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*

Promastigotas de *Leishmania (L.) i. chagasi* (MCER/BR/1981/M6445) serão cultivadas em meio bifásico NNN (Agar - sangue/BD) e posteriormente transferidas para meio RPMI (GIBICO), para o crescimento em massa. Após seis dias de cultivo estas células irão se encontrar na fase final de crescimento, momento ideal para serem reunidas por centrifugação (4000g/15'/4°C) e submetidas a dois processos de lavagens com Phosphate Buffer Saline (PBS) por suspensão e centrifugação (3200g/10'/4°C). Os parasitas serão então contados e resuspendidos a 10<sup>9</sup> promastigotas/mL em PBS estéril. Em seguida, as promastigotas de *Leishmania* serão lisadas por dez ciclos de congelamento (-182°C) e descongelamento (56°C) e o lisado antigênico será estocado a -70°C, onde será mantido até o momento de uso (Quinnel *et al.*, 2001).



Figuras 20 e 21: Rompimento das Leishmanias em 10 ciclos de congelamento e descongelamento Foto: cortesia de Jefferson Miranda (2007)

### 3.5.4.2 Antígeno Recombinante Hsp83 de *Leishmania (L.) infantum infantum*

A Heat shock protein 83 (Hsp83) consiste em produto purificado por cromatografia de afinidade Ni-NTA (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com o método de Angel *et al.* (1996), com anticorpo anti-Hsp 83 detectado pelo ELISA. Esta proteína recombinante será gentilmente cedida pela Dra. Hiro Goto do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

A proteína é purificada em 0,66 mg/ml em 100mM de imidazole, 50 mM de sulfato de sódio monobásico, 300 mM de cloreto de sódio e 0,04% de azida sódica; deve ficar na concentração de 1 ul de TCO-3 a partir de 6.590 ul de TCO-3 para 10ul de Hsp 83 por placa, na realização dos testes (USP).

### 3.6 Testes sorológicos

#### 3.6.1 *Enzime-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

##### 3.6.1.1 ELISA com lisado Cru de Promastigotas

A técnica de ELISA utilizando lisado cru foi realizada segundo Quinzel *et al.* (2001) no laboratório de Imunologia Humoral do Departamento de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas (IEC) em Belém-Pa.

Na etapa de sensibilização 10 µl do antígeno total de *Leishmania* foram diluídos em 10 ml de tampão Carbonato/Bicarbonato 0.06M pH 9.6 (diluição 1/1000; concentração inicial 10<sup>9</sup> parasitas/mL e final 10<sup>6</sup> parasitas/mL) para que alíquotas de 100 µl/well desta diluição antigênica fossem adicionadas na placa de ELISA (Costar®, Polystyrene, 96 well, médium Binding) devendo ser mantida em câmara úmida a 4°C overnight. Em seguida, a placa deverá ser lavada três vezes com PBS-Tween 20 (0.05%) pH 7.2 e bloqueadas com 150 µl/well de PBS-Tween com 2,5% de bovine serum albumin- BSA (Sigma,USA) em câmara úmida a 37°C/1h. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com PBS-Tween 20 (0.05%) pH 7.2. Após as lavagens, 2 µl do plasma foram diluídos em 198 µl de PBS-Tween 20 (0.05%) pH 7.2 contendo 1% de BSA (diluições em serie: 1/100 a 1/12800) para que 100 µl/well da diluição do plasma fossem adicionadas na placa teste, sucedendo incubação em câmara úmida a 37°C/2h. Posteriormente, a placa foi lavada três vezes conforme já mencionado. Após as lavagens, foram adicionados na placa 100 µl/well da diluição do conjugado peroxidase anti-IgG canina (Sigma,USA) mantida em câmara úmida a 37°C/1h (diluição 1/1000 em PBS-Tween 20 0.05% pH 7.2 contendo 0.5% de BSA). Após lavar a placa como já mencionado à cima, foram adicionados 100 µl/well do cromógeno Orthophenilenodiamino – OPD (Sigma, USA) para a revelação do teste durante 6 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz. A reação é interrompida com 100 µl/well de Ácido Sulfúrico 2M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a leitura realizada em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan EX/type 355) a 492 nm. O *Cut-off* do teste foi a media dos controles negativos mais duas vezes o desvio padrão. (QUINNEL *et al.* 2001).

### 3.6.1.2 ELISA com a Proteína Recombinante Hsp83

Na etapa de sensibilização 10 µl do antígeno recombinante Hsp83 foram diluídos em 6,640 ml de tampão Carbonato/Bicarbonato 0.06M pH 9.6 (concentração inicial 665 µg/mL e final 1µg/mL) para que alíquotas de 50 µl/well desta diluição antigênica fossem adicionadas na microplaca de ELISA (Costar®, Polystyrene, 96 well), devendo ser mantida em câmara úmida a 4°C overnight. Em seguida, a microplaca foi lavada três vezes com PBS-Tween 20 (0.05%) pH 7.2. Após as lavagens, 2 µl do plasma foram diluídos em 198 µl de PBS-Tween 20 (0.05%) pH 7.2 contendo 1% de BSA (diluições em serie: 1/100 a 1/12800) para que 50 µl/well da diluição do plasma sejam adicionadas na placa teste, sucedendo incubação em câmara úmida a 37°C/1h. Em seguida, a microplaca foi lavada três vezes conforme já mencionado. Após as lavagens, foram adicionados na microplaca 50 µl/well da diluição do conjugado peroxidase anti-IgG canina (Sigma,USA) mantida em câmara úmida a 37°C/1h (diluição 1/1000 em PBS-Tween 20 0.05% pH 7.2 contendo 1% de BSA). Após lavar a placa como já mencionado acima, foram adicionados 50 µl/well do cromógeno Ortophenilenodiamino – OPD (Sigma, USA) para a revelação do teste durante 10' a temperatura ambiente e protegido da luz. A reação é interrompida com 50 µl/well de Ácido Sulfúrico 2M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a leitura realizada em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan EX/type 355) a 492 nm. O *Cut-off* do teste será a media dos controles negativos mais duas vezes o desvio padrão; o ponto de corte utilizado no laboratório é de 1:100.

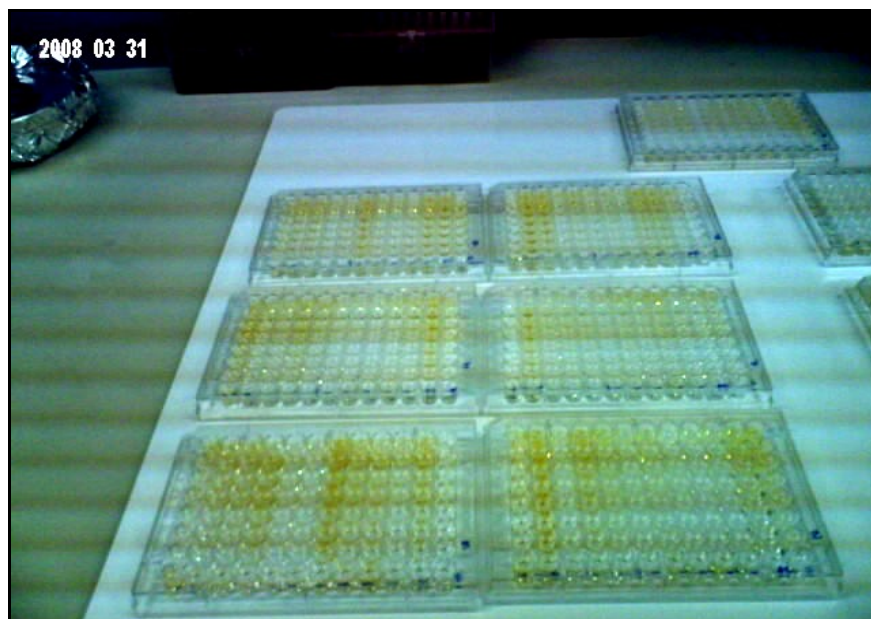


Figura 22: Placas de ELISA com amostras reativas e não reativas (Lab.do IEC)

Foto: Lucilândia M. Bezerra (2008)

#### 4 RESULTADOS

O censo da população canina determinou a existência de 619 cães , sendo 162 em área de transmissão esporádica (ARSO 1203 sul) e 457 da aureny III etapa I.. A amostra desse estudo no entanto, foi de 406 cães; para todos, realizou-se a sorologia utilizando o lisado bruto de *L.(L.)i.chagasi* e o exame parasitológico direto em linfonodo.

A população referida pelo censo realizado em junho de 2007 em Aureny III foi de 457 animais; entre agosto e dezembro de 2007 o número de residências e animais contactados para coleta foi de 476; desse número foram contabilizadas 275 exames sorológicos e parasitológicos realizados, representando um percentual de amostras analisadas de 76,81% ( 275; N=476).

Na área de transmissão esporádica o censo contabilizou 162 animais, foram coletados 151 amostras e realizados exames sorológicos e parasitológicos de 131 animais, com um percentual de amostras examinadas de 86,75% (131; N=162).

Quando comparados os resultados obtidos nas duas áreas não existe uma diferença significativa entre os dois antígenos quanto à detecção de verdadeiros positivos e falsos negativos (figura 23 e 24 ).

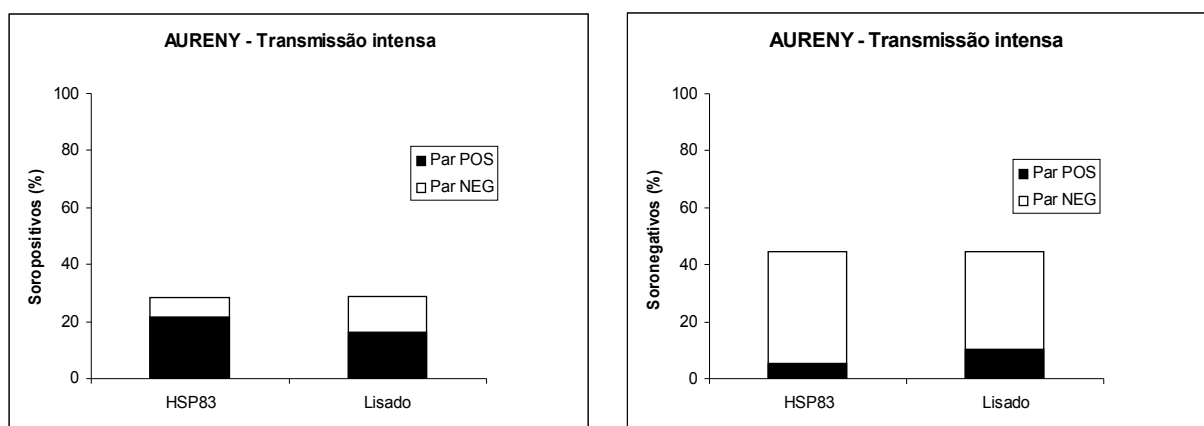


Figura 23: comparação entre a sorologia pelo ELISA utilizando proteína Hsp 83 e lisado cru em animais confirmados com o exame parasitológico em áreas de transmissão intensa.

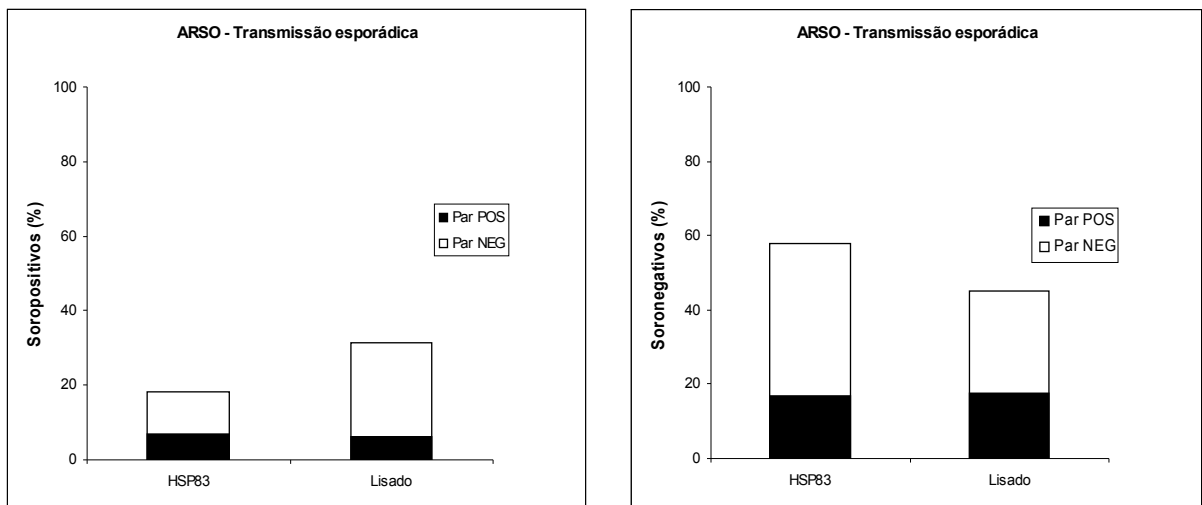


Figura 24: comparação dos testes sorológicos pelo ELISA utilizando lisado cru e Hsp 83, com amostras testadas também pelo parasitológico na área de transmissão esporádica.

Quando comparados os resultados obtidos nos testes utilizando os dois antígenos, lisado cru e proteína Hsp 83 observa-se que não existe uma diferença significativa com relação aos animais soropositivos e soronegativos confirmados pelo padrão ouro nas áreas em estudo.

Na área esporádica, nota-se que os animais positivos no parasitológico apresentam um título menor de anticorpos quando testados pela Hsp 83 comparados aos negativos. No lisado cru, quando comparados os positivos e negativos pelo parasitológico nota-se um nível bem maior de anticorpos nos positivos.

Os valores preditivos positivos são obtidos em áreas onde o índice de infecção está presente e os valores preditivos negativos melhor avaliados onde a infecção está ausente; a figura mostra o cálculo dos valores preditivos tanto positivos quanto negativos relacionando a população das duas áreas onde existe ou não a infecção.

		Infecção*		
		Presente	Ausente	
TESTE**	Positivo	<b>a</b>	<b>b</b>	$VP^+ = \frac{a}{a+b}$ $VP^- = \frac{d}{c+d}$
	Negativo	<b>c</b>	<b>d</b>	
		$E = \frac{d}{b+d}$	$P = \frac{a+c}{a+b+c+d}$	

\*Exame parasitológico: PADRÃO OURO

\*\* Ponto de corte: 100

Figura 25: Cálculo de valores preditivos e negativos das áreas em estudo.

Os índices de desempenho dos antígenos variaram nas duas localidades estudadas. A sensibilidade dos dois antígenos foi baixa em ARSO ( $\leq 29\%$ ), mas a Hsp83 foi mais sensível em Aureny (74%) que o lisado (60%).

Portanto nos índices de desempenho destacam-se a baixa sensibilidade da sorologia com os dois antígenos em área de transmissão esporádica, enquanto que em área de transmissão intensa destacou-se a superior sensibilidade do Hsp 83 (tabela 3).

Tabela 3. Desempenho de duas apresentações antigênicas para a sorologia da leishmaniose visceral canina (ELISA) em bairros de transmissão intensa (AURENY, N=275) e esporádica (ARSO, N=131) em Palmas-TO, 2007.

Padrões	AURENY		ARSO		ARSO + AURENY	
	Hsp83	Lisado	Hsp83	Lisado	Hsp83	Lisado
Sensibilidade	<b>79</b>	60	<b>29</b>	<b>26</b>	<b>64</b>	30
Especificidade	61	60	76	59	66	77
VPP*	43	36	27	16	40	50
VPP**	89	80	77	71	84	60

\* Valor de predição positivo - \*\* Valor de predição negativo

Os níveis de anticorpos IgG com ELISA lisado foram igualmente altos para cães parasitologicamente negativos ou positivos em Aureny III. Em ARSO, diferentemente, cães parasitológicamente positivos tiveram títulos mais altos de IgG com este antígeno.

Quando usado rHsp83 os níveis de IgG foram significativamente mais baixos em cães de ambas as áreas, com maior sensibilidade em Aureny.

Essas duas situações estão demonstradas na figura 26.

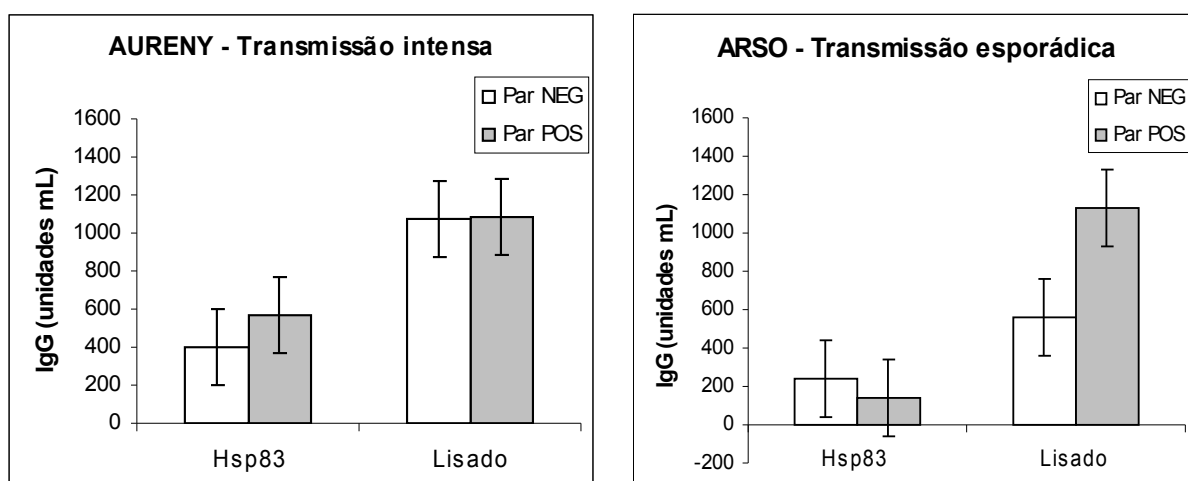


Figura 26: demonstração dos níveis de anticorpos na área de transmissão intensa e esporádica, mostrando diferenças na titulação com a Hsp83 e lisado cru quando comparados ao padrão ouro.

O ELISA-lisado detectou em Aureny altos níveis de IgG em cães parasitológicamente positivos ( $1088 \pm 407$ ) ou não ( $1078 \pm 317$ ), diferente do observado em

ARSO, onde níveis de IgG foram mais elevados em cães parasitologicamente positivos (1131<sup>±</sup>1046) do que naqueles com parasitológico negativo (560<sup>±</sup>343). O ELISA Hsp83 detectou em Aurenny baixos níveis de IgG, contudo mais elevados em cães parasitologicamente positivos (569<sup>±</sup>272) do que negativos (403<sup>±</sup>211), diferente do observado em ARSO em cães parasitologicamente negativos (244<sup>±</sup>86) apresentaram títulos mais altos (136<sup>±</sup>17).

Características gerais da população de cães e da área de estudo: Aurenny III e ARSO 1203 sul.

### AURENRY III

Com base nas observações feitas durante o censo e coletas, os animais apresentam-se na grande maioria com estado nutricional ruim, magros, com rarefação pilosa, com ectoparasitos, alopecia e secreção ocular uni ou bilateral; vivem na rua apesar de ter dono, ou presos em longas cordas e arame, em constante condição de *stress*.

As residências não têm muro ou qualquer tipo de proteção nas casas especialmente nas áreas mais próximas ao limite da quadra; os quintais normalmente têm lixo acumulado, água acumulada próximo à área de serviço, há geralmente presença de galinheiros em pequenos cercados ou livres no quintal junto aos cães.

Com relação ao local onde os cães vivem, geralmente dormem em locais próximos à casa mas úmidos e escuros. A alimentação na grande maioria é caseira (sobras de comida) ou ração de menor custo.

Aproximadamente metade da quadra não é asfaltada e há áreas com vegetação e lixo a céu aberto.

### ARSO 1203 SUL

A quadra é limpa, organizada, com coleta de lixo regular.

As residências são todas protegidas com muros e portões; os cães normalmente não saem de casa, se alimentam de ração e são levados regularmente ao veterinário. Não apresentam sinais clínicos de doença, mostrando-se totalmente assintomáticos na grande maioria.

A tabela 4 classifica de ausente (0) a severo (3) as características mais relevantes na avaliação dos cenários apresentados em cada quadra.

Tabela 4: características das quadras estudadas levando em consideração aspectos clínicos dos animais do estudo e aspectos ambientais das áreas.

	Aureny III	ARSO 1203 sul
Animais com sinais clínicos de LV	2	0
Sinais de deficiência nutricional	2	0
Fatores de risco para LV	3	1

0 = ausente

3 = severo



## 5 DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral encontra-se em expansão no Brasil, com tendências a urbanização, fato que já se observa não somente em Palmas, mas em outras 15 cidades do estado do Tocantins, dentre as quais apresentam maior número de casos nos últimos três anos: Araguaína (2835), Tocantinópolis (544), Porto Nacional (531), Paraíso (535) e Buriti (253). O Problema também atinge várias outras cidades brasileiras (Santarém-PA, Teresina-PI, Belo Horizonte - MG, etc) (SESAU 2008).

Pela falta de informações mais precisas sobre a epidemiologia diante da mudança no padrão de transmissão da doença e o seu avanço aos núcleos urbanos o fenômeno de difícil controle vem desafiando a saúde pública.

A eliminação de cães sororeagentes é uma das medidas recomendadas pelo Ministério da Saúde para o controle da leishmaniose visceral humana. Apesar de não haver relação positiva entre a aplicação dessa estratégia e a redução da doença em seres humanos (Vieira & Coelho, 1998; Dietze *et al.*, 1997), a sorologia de cães tem sido muito utilizada por consistir no método capaz de ser operado pelos níveis locais do sistema de saúde para tornar possível a formulação de um diagnóstico das condições de transmissão da leishmaniose visceral.

Outra ação recomendada é a vigilância entomológica objetivando o controle químico do vetor, mas esta exige expertise, recursos humanos e financeiros e, muito embora seja capaz de produzir maior efetividade no controle da leishmaniose visceral (Brasil, Ministério da Saúde, 2003), não costuma ser executada nos municípios.

Considerando esse cenário utilizou-se o método de ELISA para avaliar o desempenho de diferentes antígenos em localidades urbanas com características epidemiológicas muito distintas.

Empregaram-se espaços urbanos classificados como áreas de transmissão intensa e esporádica da leishmaniose visceral humana na cidade de Palmas. A população canina dessas localidades foi submetida a exames sorológicos e parasitológico e o desempenho dos antígenos recombinante Hsp83 e Lisado bruto de *L. (L.) i. chagasi* foram comparados em relação ao padrão ouro, o exame parasitológico dos aspirados linfáticos.

Quando determinada a prevalência de cães sororeagentes para LV em cada quadra, em ambas as localidades AURENY e ARSO se identificou percentuais semelhantes de verdadeiros positivos e de falsos negativos nas duas populações caninas (figura 1), mas a sensibilidade da sorologia foi muito baixa em ARSO, de transmissão esporádica, se comparada a sensibilidade observada em AURENY, de transmissão intensa (tabela 2).

É interessante notar que os índices de desempenho variam em função da classificação da área e que o ELISA-Hsp83 adicionou vantagem em termos de sensibilidade sobretudo quando considerada a população canina das duas quadras na execução do *screen test*.

Uma análise mais cuidadosa dos níveis de anticorpos revelou, contudo que altos títulos de IgG no ELISA-lisado, que costumam ser indicativos de LV de modo praticamente inequívoco, foram observados tanto em cães parasitologicamente positivos quanto parasitologicamente negativos em AURENY. Em ARSO, diferentemente, os níveis de anticorpos IgG de cães parasitologicamente negativos foram reduzidos a metade daqueles níveis observados nos cães de AURENY nas mesmas condições (figura 3).

Níveis de anticorpos quando usado o ELISA-Hsp83 foram mais baixos nas duas situações, contudo, na ARSO foram mais elevados em animais parasitologicamente negativos do que nos positivos.

Registros da Secretaria Municipal de Saúde indicam a média de 9,3 casos humanos de leishmaniose visceral nos últimos três anos na AURENY enquanto nenhum caso humano da doença foi detectado na ARSO.

A sensibilidade dos métodos de diagnóstico (sorológico e parasitológico) é bastante variável ao longo do curso da infecção canina (Quinnell *et al.*, 2003) e como consequência um único método não seria capaz de revelar todos os positivos, mas dentre todos os disponíveis o ELISA como método de triagem parece ser o mais adequado (Courtenay *et al.*, 2002). Há de se considerar, contudo, as variações de sensibilidade do método em função das diferentes áreas de transmissão para evitarem-se os erros de interpretação.

Os fatores ambientais exercem influência direta na disseminação da LV na medida em que contribuem para a proliferação do vetor *Lutzomyia longipalpis* e para o estado de saúde do cão, reservatório do parasito (Dietze *et al.* 1997; Melo, 2004). Em AURENY as condições de saúde dos cães e os fatores de risco para transmissão de LV prevalecem claramente se comparados com aqueles observados em ARSO. Apesar de uma análise detalhada sobre fatores de risco não ter sido realizada nesse estudo os diferentes cenários são

descritos na tabela 2. Sendo assim, o significado da sorologia positiva em AURENY, área de transmissão para humanos, pode ser distinto do significado da sorologia positiva em ARSO, onde não há registro de casos humanos nos últimos três anos.

Nesse sentido seria interessante em áreas de transmissão esporádica ou onde não há transmissão aos humanos buscar-se o segmento da população canina por meio de inquéritos sorológicos no sentido de se identificarem elevações nos níveis de anticorpos de cães com baixos títulos de IgG antes de se proceder a eliminação dos animais, pois é sabido que cães podem controlar a infecção em áreas onde não ocorre transmissão aos humanos e que tornam-se infecciosos (competentes como fonte de infecção aos flebotômíneos) somente após seis meses (COURTENAY *et al.*, 2003)

Por não haver registro de casos humanos da doença nos últimos três anos, ARSO poderia ser considerada uma área vulnerável onde fatores ambientais estariam dificultando a transmissão da leishmaniose visceral aos humanos. A sorologia neste caso só deveria indicar a ação de imediata eliminação se detectados altos níveis de IgG.

Ainda que os resultados tenham revelado altos níveis de IgG em animais parasitologicamente negativos, a sensibilidade do exame parasitológico é também muito limitada (QUINNELL *et al.* 1996; REITHINGER & DUJARDIN 2007) e altos níveis de IgG estão normalmente relacionados a infecção no cão.

Na Aureny, portanto, os altos níveis de anticorpos podem ser indicativos de LV na população canina, com o agravante de haver vários casos notificados da doença em humanos. A situação peri-urbana desta localidade indica que os fatores ambientais envolvidos são muito distintos daqueles influenciando o risco de transmissão do parasito na ARSO.

Na hipótese dos baixos títulos de anticorpos nos cães refletirem infecção oculta e a despeito do sugestivo equilíbrio na relação parasito-hospedeiro em cães da ARSO (dadas às boas condições clínicas dos cães) o significado da sorologia confere a esta quadra o *status* de “área vulnerável”, onde a vigilância em cães, humanos e a vigilância é prioritária, além da vigilância do vetor por meio de levantamentos.

Além disso, levantamentos entomológicos em outras localidades peri-urbanas e urbanas próximas e este foco devem ser conduzidos no sentido de mapear outras áreas de risco e, assim, procurar conter a urbanização da doença.

Quando a sorologia para leishmaniose visceral é o principal método de diagnóstico disponível para a decisão de eliminar cães, é necessário que se considere a possibilidade de maior precisão. Embora o antígeno Hsp83 não tenha adicionado muito em

especificidade, foi claramente mais sensível que o antígeno bruto quando consideradas as duas áreas de abrangência do estudo.

O conhecimento gerado por meio de estudos longitudinais também é necessário à fundamentação da tomada de decisão por parte dos serviços de vigilância e controle da LV em um dado município.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE FILHO, JD; VALENTE, BV; ANDRADE, WA; Brazil, RP; FALCÃO, AL 2001 – Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Díptera: Psychodidae) – Ver. Soc. Bras. De Méd. Tropical. Vol.34, no.4. Uberaba, jul/ago.

ANGEL, SO; REQUENA, JM; SOTO, M; DOMINGO C; Alonso C 1996 – During Canine Leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa Heat Shock Protein Family elicits a strong Humoral Response – Acta Tropica 62 (1996) 45-56.

BEVILACQUA, PD; ALVES, W.A 2004. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, 1993-1997. Cad. Saude Pública, Rio de Janeiro, 20(1):259-265, jan-fev.

BEVILAQUA PD; ALVES, WA 2004– Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

BOULAERT M., EL SAFI S., MOUSA H., GITHURE J., MBATI P., GURUBACHARYA V *et al* . Multicenter evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. Trop Med Int Health 1999; 4: 31-7.

BRANDÃO FSP; TORRES, DF 2006; Visceral Leishmaniasis in Brazil: Revisiting Paradigms of Epidemiology and control Ver. Inst.Medicina Tropical –São Paulo 48(3):151-156, May-June.

BRASIL, Ministério da Saúde 2006 – Manual de vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral – Secretaria de Vigilância em Saúde - Dept. de vig. E epidemiologia- 3ª imp. Brasília – DF.

BRASIL, Ministério da Saúde 2008 – Nota Técnica No 02/08 DEVEP/SVS/MS – Leishmaniose Visceral Canina –Legislação Vigente para ações de controle do reservatório doméstico na leishmaniose visceral.

CABRERA, MAA, 1999- Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas,1937): estudo de possíveis variáveis preditoras. chagasi (Cunha e Chagas,1937) no ecótopo peridoméstico em Barra da Guaratiba. Rio de Janeiro –RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras. (Mestrado) fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública;84 p.

CELESTE BJ; ANGEL, S.O; CASTRO, LGM; GIDLUND, M; GOTO, H 2004 – Leishmania infantum heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis – Brazilian Journal of Medical and Biological Research , 37.

COSTA, CHN; TAPETY, MM; WERNECK, GL 2007 – controle da Leishmaniose visceral em Meio Urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial Ver. Soc. Brás. Med. Tropical 40(4): 415-419,jul-ago.

DEANE, L.M, 1956. Leishmaniose Visceral no Brasil.Estudo sobre Reservatórios e Transmissores no Estado do Ceará.Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária.

DESJEUX, P. 2004 - Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol.Infect.Dis.27,305-318.

DUJARDIN, J.C. 2006 –Risk Factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? Trends Parasitol (Trends in Parasitology) Vol.22.Ed.1,p:4-6,jan. PubMed – indexed for Medline:site:www.pubmed.com.br, acessado em 23/06/08.

GARCEZ, L.M., CARDOSO, J.F., PATRICK, A.F., ANADEIVA, P.C., CELESTE, B., GOTO, H, WINTER, L.F., SHAW, J.J, QUINNELL, R.J., COURTENAY, O. 2007. An Evaluation of the serological and molecular diagnostic methods used for determining the prevalence and control of canine visceral leishmaniasis in Brazil. Veterinary Parasitology, Michigan - USA- July

GONTIJO, CMF; MELO,CM 2004; Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas.Rev.Bras.Epidemiologia. Vol.07, No 3.

HIDASI FILHO,J 2002 Aspectos Bio – Eco - Epidemiológicos da leishmaniose Tegumentar na Região Central do Estado de Goiás, Brasil. Dissertação (Mestrado), UFGO-IPT.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) 2004 - Malha municipal digital do Brasil - disponível em: [www.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/temas.php?nomemun=Palmas&codmun=172100](http://www.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/temas.php?nomemun=Palmas&codmun=172100) – Acessado em 10/06/2008

LAINSON, R., DYE, C., SHAW, J.J., MACDONALD, D., COURTENAY, O., SOUZA, A A., SILVEIRA, F.T., 1990. Amazonian Visceral Leishmaniasis: distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz &Neiva) in relation to the fox *Cerdocion thous* and efficiency of this reservoir host as a source of infection. Memórias do Inst Oswaldo Cruz 85, 135-137.

LAINSON, R; RANGEL, E 2005 – *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review.Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 100(8): 811-827. December .

LAINSON, R; SHAW, J.J; RYAN,L; RIBEIRO, R.S.M; SILVEIRA,FT 1985 – Leishmaniasis in Brazil,XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz&Neiva,1912) as the vector.

MELO,NM 2004 – Leishmaniose Visceral no Brasil –In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino americano de Rickettsioses, Ouro Preto, MG.

NASCIMENTO, M. D. S. B., SOUZA, E. C., SILVA, L. M., LEAL, P. C., CANTANHEDE, K. L., BEZERRA, G. F. B., VIANA, G. M. C. 2005..Prevalência de Infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermoreação de

Montenegro em Área Endêmica do Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Vol.21.No 6. Rio de Janeiro, Nov - dez.

OLIVEIRA, S.S., ARAÚJO, T. M. 2003. Avaliação das Ações de Controle da Leishmaniose Visceral (calazar) em uma Área Endêmica do estado da Bahia, Brasil (1995-2000). *Cad. Saúde Pública*.Rio de Janeiro, 19(6):1681-1690, Nov - dez.

PALATINICK, S. C. B., SANTOS, W. R.; FRANÇA SILVA, J. C., COSTA, R. T., BARBOSA, R.A, PALATINICK, M.; MAY RINK, W., GENARO, O. 2001. Impact of Canine Controls in the Epidemiology of Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Am J Tropical Med Hyg.* 65.510-517.

PALATINIK, C.B; BATISTA, L. M.; CABRERA, B; GULNARA, P 2004 – Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. *An. Acad. Bras. Ciência. Set.* Vol.76, No 3, p.538-593. ISSN 0001-3765.

QUINNELL, J. R., COURTENAY, O., SHAW, M.A., DAY, M.J., GARCEZ, L.M., DYE, C., KAYE, M. P. 2001. *The Journal of Infectious Diseases.* 183;1421-4- Concise Communication.

QUINNELL, R.J., COURTENAY, O., GARCEZ, L.M., DYE, C. 1996. The epidemiology of Canine Leishmaniasis: Transmission rates estimated from a Cohort Study in Amazonian Brazil. *Parasitology* (1997).115.143-156.

REITHINGER, R; DUJARDIN, JC 2007 – Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: current Status and Future Applications – *Journal of Clinical Microbiology*, jan.p.21-25.

RICO ERRAZQUIM, A. I., (ano) “Propiedades Inmunostimuladoras de las proteínas de Choque Térmico Hsp70 y Hsp83 de *L.infantum*. Universidade Autónoma de Madrid. Calificación.

SANTOS, L. Laboratório Ambiental, Unioeste -305p.29.-Pr

SANTOS, P. G. N., 2003. Leishmaniose-Revisão Revisão e Abordagem sobre a Doença no município de Palmas-TO. Monografia-Universidade de Brasília (UnB)-DF.

SANTOS, S.O, Arias, J., RIBEIRO, A. A., De PAIVA, M. H., DE FREITAS, R. A., MALACCO, M. A., 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medical and Veterinary*.

Secretaria Estadual de Saúde SESAU/SINAN 2008 –Setor de Vigilância Epidemiológica - Relatório de dados sobre Leishmaniose Visceral ( Dados não publicados).Palmas –TO.

Secretaria Municipal de Saúde SESAU/SINAN 2006 – Centro de Controle e Zoonoses. Relatório de dados sobre Leishmaniose Visceral ( Dados não publicados).Palmas –TO.

Secretaria Municipal de Saúde SESAU/SINAN 2008 – Centro de Controle e Zoonoses. Relatório de dados sobre Leishmaniose Visceral ( Dados não publicados).Palmas –TO.

SHAW JJ. 2007 – The Leishmaniasis – survival and expansion in a changing world.a mini review. Memo Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol.102(5):541-547, august.

SHAW,J.J. 2006 – Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis – Mem.Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol.101(5)

SILVA, C. R. C. 2007. Implementação de um programa de Avaliação Externa da Qualidade em Sorologia para Leishmaniose Visceral Canina. Inst Oswaldo Cruz –Biologia Celular e Molecular (Mestrado)- Rio de Janeiro, 74f.

SILVA, L.A.G.G., Biomas Presentes no estado do Tocantins – Consultoria Legislativa – Nota Técnica –Consultor Legislativo da Área VI. Site:

SOUZA, M. B., MARZOCHI, M. C. A., CARVALHO, R. W., RIBEIRO, P. C., PONTES, C.S, CAETANO, J. M., MEIRA, A. M. 2003. Ausência da *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no município do Rio de Janeiro. Cad.Saúde Pública, Rio de Janeiro, 19(6):1881-1885, Nov - dez.

Textos de Epidemiologia p/ Vigilância ambiental em Saúde – 2002 MS.Fundação Nacional de Saúde.Julho.

World Health Organization –WHO 2003 –Leishmaniasis/HIV co-infecções, Annals of Tropical Medicine & Parasitology, October, Vol.97, suplem. No 1. Site: [www.who.leishmaniasis.en/acessado](http://www.who.leishmaniasis.en/acessado) em 20/06/08.



**Posição taxonômica do Agente Etiológico da Leishmaniose Visceral *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas,1937 segundo descrição do Ministério da Saúde ( 2006).**

Reino: Protista (Haekel, 1886)  
Sub-reino: Protozoa ( Goldfuss, 1817)  
Filo: Sarcomastigophora ( Honiberg & Balamuth,1963)  
Sub-filo: Mastigophora ( Diesing, 1866)  
Classe: Zoomastigophorea ( Calkins, 1909)  
Ordem: Kinetoplastida (Vickkerman,1976)  
Sub-ordem: Trypanossomatina ( Kent,1880)  
Família: Tripanossomatidae ( Grobben, 1905)  
Gênero: *Leishmania* (Ross,1903)  
Sub-gênero: *Leishmania* ( Saf'yanova, 1982)  
Espécie: *chagasi* ( Cunha & Chagas, 1937).

Atualmente existem divergências entre alguns autores sobre o nome do agente etiológico da leishmaniose visceral; enquanto uns pesquisadores com base em estudos isoenzimáticos consideram a *Leshmania (Leishmania) chagasi* como *Leishmania (Leishmania) infantum*, outros, pelas diferenças bioquímicas preferem manter o nome *chagasi*.

Shaw 2006, refere a *Leishmania (L) chagasi* como *Leishmania (L) infantun chagasi*.

# 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](#)