

JÚLIA CRISTINA MAKSOUD BRAZUNA

**Estudos sobre leishmaniose visceral humana e  
canina no município de Campo Grande, MS,  
Brasil**

**CAMPO GRANDE  
2012**

JÚLIA CRISTINA MAKSOUZ BRAZUNA

**Estudos sobre leishmaniose visceral humana e canina no  
município de Campo Grande, MS, Brasil**

Tese apresentada como exigência para a obtenção do título de doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Lyrio de Oliveira

**Campo Grande  
2012**

*O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria  
se aprende é com a vida e com os humildes.*

*Cora Coralina*

*Aos meus pais  
William e Ítala*

*Que com as mãos sábias sempre me guiaram com sabedoria e frente às dificuldades da vida.*

*"Há certas pessoas que não morrem, ficam encantadas..."*

*João Guimarães Rosa*

*Aos meus amores:*

*Zeno e Júlio*

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, obrigada por tudo que me oferece nessa vida!

Agradeço ao meu PAI, por estar sempre ao meu lado!

Agradeço ao meu esposo ZENO e ao meu filho JÚLIO que são meu porto seguro, as pessoas mais importantes da minha vida. Obrigada por me apoiarem em minhas escolhas, estarem sempre ao meu lado e pelo amor incondicional. Amo vocês!

Ao Dr. Michael Robin Honer pelo apoio e orientações no início do curso;

A Dra. Ana Lúcia Lyrio de Oliveira pelo apoio e amizade na elaboração e conclusão e do trabalho;

Ao Prof. Dr. Valter Joost van Onselen pelos ensinamentos para o término das pesquisas;

Ao Greff Willians da Silva pela ajuda imprescindível;

A Ivana Gomes Ramos pela ajuda imprescindível;

Ao Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Junior pela ajuda imprescindível;

Ao Dr. Antonio Francisco de Souza Filho pela ajuda imprescindível;

A Dra. Ana Paula Antunes Nogueira pela ajuda imprescindível;

A Eliane Camargo de Lima, Patrícia de Souza Campos Fiorini e Vanessa Silva Barbuena pela amizade e compreensão nessa jornada;

Agradeço em especial aos amigos do CCZ: Iara, Vanessa, Marlene, Valeria, Elaine, Silvia, Cecy, Maria Aparecida, Elisabete, Marlene, Andréa, Juliana, Leila, Carmem, Alcides, Lucilene, Eliasze, Monteiro, Mariana, Gleyciane, Gilberto, Rose, Mauro, Elisa, Marcos Matias, Jairton, Julio, Roberval, Elaine Ibarra, Luana, Isis, Kelly Cristina, Paulo, Cibele, Keli, Suellen, Juliane, Ednaldo, Fran, Sara, pela ajuda imprescindível;

A todos os servidores do CCZ que participam das incontáveis e intermináveis ações de controle da Leishmaniose visceral;

A Profa. Dra. Inês Aparecida Tozetti, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da UFMS pelo apoio;

Aos professores e servidores do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da UFMS, pelas e colaborações nessa jornada;

Aos amigos da primeira turma do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, pelas dificuldades vencidas;

A todos os cães que participaram desse projeto.

*Porque na vida nada se consegue sozinho:*

*MUITO OBRIGADA!*

## *AGRADECIMENTOS ESPECIAIS*

*Aos Meus irmãos:*

*William, Liana, Márcia, Lilliam, Yone, Nábia e Maria Antonietta*

*Agradeço as minhas queridas amigas Tara Helena Domingos, Silvia Barbosa do Carmo e Elaine Araújo e Silva, por todas as horas.*

*Ao Prof. Dr. Valter Joost Van Onselen que acreditou no projeto e foi essencial para a conclusão.*

*A Prof. Dra Ana Lúcia Lyrio de Oliveira por acompanhar este trabalho, sempre otimista e confiante, contagiando a todos ao seu redor e, demonstrando ser, além de orientadora, uma amiga.*

*“ Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los. ”*

## RESUMO

No Brasil as leishmanioses caracterizam-se como enfermidades emergentes e reemergentes em franca expansão. Os objetivos deste estudo foram descrever o perfil epidemiológico dos pacientes notificados, verificar o efeito do uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em um programa de controle da Leishmaniose Visceral (LV) na redução da incidência canina e identificar relação da distribuição espacial dos casos caninos com os casos humanos de LV. O estudo foi realizado em Campo Grande, MS, utilizando-se informações de casos humanos de LV notificados e autóctones obtidas nas Fichas de Notificação do Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Os casos de LV canina e o registro do uso da coleira foram obtidos no Sistema de Informações de Controle da LV mantido pelo Centro de Controle de Zoonoses. Realizou-se um estudo de coorte acompanhando dois grupos de cães com mais de quatro meses de idade, sendo um que não recebeu a coleira e outro que recebeu a coleira a partir do início da avaliação em 2007 permanecendo encoleirado de forma ininterrupta até o término da avaliação em 2009. Foi avaliada por georreferencia uma área de aproximadamente 70.686m<sup>2</sup> com formato circular de raio igual a 150m em torno da residência de cada caso humano. A ocorrência da LV nos indivíduos do sexo masculino foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) do que nos do sexo feminino. Essa superioridade na frequência de notificações em homens associou-se à idade ( $p < 0,0001$ ), sendo mais intensa nos indivíduos com 40 anos ou mais. A incidência da leishmaniose nos animais que participaram do estudo de coorte foi de 33,72%, com menor ( $p < 0,0001$ ) incidência da doença no grupo de cães que usaram a coleira impregnada com deltametrina a 4%. Os cães que participaram desse estudo eram, em sua maioria, de pequeno ou médio porte, que tiveram uma incidência de leishmaniose significativamente ( $p < 0,05$ ) menor do que os de grande porte apenas no grupo de animais que usavam a coleira. Das 101 áreas avaliadas na área em torno do caso humano em duas delas no ano de 2008 e em cinco delas no ano de 2009 não se registrou nenhum cão positivo para LV. Em 2009 a presença do vetor *Lutzomyia longipalpis* ocorreu em todo Município. A correlação entre a ocorrência de casos humanos e a densidade de casos de LV canina nas diferentes regiões do Município foi alta e significativa. Também houve correlação significativa entre a ocorrência de casos humanos e a ocorrência média de LV canina, em torno da residência dos casos humanos nas diferentes regiões urbanas. Casos de LV em humanos e em cães ocorrem em todas as regiões urbanas Campo Grande. Embora não haja tendência de aumento nem de redução na incidência da doença à medida que a idade dos indivíduos aumenta, a superioridade na incidência em homens é maior em de pessoas com 40 anos ou mais. O uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em programas de controle da leishmaniose que incluem a eutanásia de cães soropositivos, borrifação residual com inseticidas, manejo ambiental e ações de educação e saúde para a população, reduz o risco da doença em cães. O risco de adquirir a doença é maior em cães de grande porte em relação aos cães de médio ou pequeno porte, quando utilizam a coleira impregnada com deltametrina a 4%. Casos de LV em humanos ocorrem em regiões de todos os níveis socioeconômicos no Município. A transmissão da LV em humanos pode ocorrer também em local distante de sua residência. A densidade de casos caninos de LV na região e em torno da residência são fatores de risco importantes para a ocorrência da doença em humanos.

Palavras-chave: reservatório canino, zoonose, fator de risco, coleira, deltametrina.

## ABSTRACT

Leishmaniasis in Brazil is characterized for being an emerging and reemerging disease in true expansion. This study aims to describe the epidemiological profile of notified patients, verify the effects of a control program of VL (Visceral Leishmaniasis) using a 4% deltamethrin-impregnated collar to reduce canine prevalence, and identify the relation of the spacial distribution of canine cases and human cases. The study was realized in Campo Grande, MS, using information of human cases of VL notified and autochthonous obtained from the Brazilian National Information System for Notifiable Diseases. Canine VL cases and the register of the use of the collar were obtained of the Canine Visceral Leishmaniasis Control, managed by the county's Center for Zoonosis Control. Registered dogs aged four months or more, received a 4% deltamethrin-impregnated collar every six months. A cohort study was applied taking two groups of animals, being that one did not received the collar and the other one received it since the beginning of evaluation in 2007 till the end of it in 2009. The information was georeferenced in the program Mapiinfo<sup>®</sup>. Was evaluated an area of about 70.686m<sup>2</sup> with a ray of 150m around each residence containing a human case. The occurrence of VL in male was significantly larger ( $p < 0,0001$ ) than in female. This superior frequency of notifications in male, was associated with age ( $p < 0,0001$ ), being more intense in individuals aged 40 years or more. Leishmaniasis incidence in animals that participated of cohort study was of 33,72%, being significantly associated ( $p < 0,0001$ ) between the VL diagnosis and the use of 4% deltamethrin-impregnated collar, with lower incidence in the group that used the collar. Most dogs that involved this study was small or medium and had significantly lower incidence ( $p < 0,05$ ) than bigger dogs, only in the group that used the collar. The 101 areas evaluated in human cases ray, two of them in 2008, and five of them in 2009, did not registered any canine VL case. The presence of the vector *Lutzomyia longipalpis* occurred in the entire county in 2009. The correlation between the occurrence of human cases and the density of canine VL in the different regions of the county was high and significant. It was also observed a significant correlation between human cases and the canine VL average around the residences containing human cases, in different urban regions. Human and canine VL cases as well as the vector occur in all urban regions of Campo Grande. Although does not exist tendency of increase or reduction in the incidence of the disease, as the age of the individuals increase, the superiority of incidence in male is higher in the group of people aged 40 or more. The use of 4% deltamethrin-impregnated collar in control programs of leishmaniasis that includes euthanasia in seropositive dogs, residual spraying with pesticide, environmental manager, and educative actions beside population, reduce the risk of the disease in dogs. The risk of acquire the disease is higher in large dogs, compared with medium and small dogs when using the 4% deltamethrin-impregnated collar. Human cases of VL occur in regions of all different socioeconomic levels in the county. The transmission of the disease in human can also occur in distant places of the residence. The density of canine VL cases in the region and around the residence is an important risk factor for the occurrence of the disease in human.

Keywords: canine reservoir, zoonosis, risk factor, collar, deltamethrin.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Histórico .....	15
2.2	Taxonomia e morfologia .....	16
2.3	Ciclo biológico .....	18
2.4	Genoma do parasito .....	19
2.5	Leishmanioses .....	20
2.5.1	Leishmaniose visceral canina.....	23
2.6	Resposta imunológica na leishmaniose visceral canina.....	25
2.7	Diagnóstico.....	31
2.7.1	Diagnóstico parasitológico.....	31
2.7.2	Diagnóstico sorológico .....	33
2.7.3	Diagnóstico molecular .....	36
2.8	Tratamento.....	38
2.9	Epidemiologia.....	42
2.10	Controle.....	45

3 OBJETIVOS .....	50
3.1 Objetivo geral.....	50
3.2 Objetivos específicos .....	50
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
5 RESULTADOS .....	52
5.1 Artigo 01: Profile and geographic distribution of reported cases of visceral leishmaniasis in the city of Campo Grande/MS/Brazil between 2002 and 2009 .....	53
5.2 Artigo 02: Efeito da coleira impregnada com deltametrina a 4% em programa de controle da leishmaniose visceral canina: um estudo de Coorte ....	60
5.3 Artigo 03: Relação espacial da leishmaniose visceral humana e canina no município de Campo Grande, MS, Brasil, 2009.....	74
6 DISCUSSÃO .....	88
7 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	93
REFERÊNCIAS .....	95
ANEXO A .....	114
ANEXO B .....	116

## 1 INTRODUÇÃO

O complexo das leishmanioses é causado por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que podem constituir uma zoonose ou antropozoonose dependendo dos tipos de hospedeiros presentes no ciclo biológico do parasito. Estão em expansão nos últimos 20 anos, com aumento do número de casos em todas as suas formas (ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004). Esses parasitos são transmitidos principalmente por fêmeas de insetos dípteros conhecidos como flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae), causando um espectro de manifestações clínicas em humanos, com apresentação das formas visceral, tegumentar e mucosa (GRIMALDI; TESH, 1993; DESJEUX, 2004).

Segundo Desjeux (2001) a ocorrência anual é estimada em 1- 2 milhões de casos, sendo 1- 1,5 milhões da forma tegumentar e 500.000 da forma visceral, estando 350 milhões de pessoas sob risco de contraírem esta infecção a cada ano. Estão distribuídas em 88 países, dos quais 72 são classificados como países em desenvolvimento, com 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrendo em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil e 90% dos casos de leishmaniose tegumentar ocorrendo no Afeganistão, Algéria, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (DESJEUX, 2004).

No Brasil as leishmanioses caracterizam-se como enfermidades emergentes e reemergentes em franca expansão, e segundo a Portaria Ministerial nº1943 (BRASIL, 2001), são agravos de notificação compulsória em todo o território nacional. As formas tegumentares foram notificadas em 27 unidades federadas brasileiras (BRASIL, 2007), e a notificação de casos autóctones de Leishmaniose Visceral nas regiões Nordeste, Norte, Centro-Oeste e Sudeste (BRASIL 2006), e mais recentemente na Região Sul (BRASIL, 2010). Sendo doenças metaxênicas, causadas por parasitos multihospedeiros, interagindo em complexas relações em diferentes ambientes, o conhecimento dos insetos vetores e dos hospedeiros mamíferos envolvidos nos ciclos

enzoóticos e zoonóticos é fundamental para compreender a epidemiologia das leishmanioses e estabelecer medidas de controle adequadas para cada região (ASHFORD, 2000; RANGEL; LAINSON, 2003).

A leishmaniose visceral (LV) tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominado pelas características de ambientes rurais e periurbanas 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, onde o vetor encontra condições ambientais favoráveis para a manutenção e desenvolvimento do seu ciclo de vida (BRASIL, 2006).

No Estado de Mato Grosso do Sul tem-se verificado um aumento do constante no registro do número de casos da doença, sendo registrada em 51,28% (40/78) dos municípios.

No Brasil as estratégias de controle, até então utilizadas, estavam centradas e dirigidas verticalmente para o controle do reservatório canino (inquérito sorológico canino e eutanásia em cães sororreagentes), para a aplicação de inseticidas, diagnóstico e tratamento adequado dos casos humanos registrados. Entretanto, essas medidas, muitas vezes realizadas de forma isolada, não apresentaram efetividade para redução da incidência da doença (BRASIL, 2006).

No município de Campo Grande, MS, o primeiro caso autóctone notificado de LV em humanos ocorreu em 2002 e, desde então vem ocorrendo de forma crescente. Na área urbana vêm sendo observadas inúmeras dificuldades para a implementação das medidas de controle recomendadas pelo Ministério da Saúde, tais como o inquérito sorológico canino para a eliminação de cães positivos e a borrifação das paredes internas e externas das casas.

As medidas de controle, mesmo quando bem empregadas, são lentas para reduzir a incidência canina, principalmente pela alta reposição desta população.

Outras estratégias visando o controle da doença referem-se a medidas alternativas de atuação sobre os flebotomíneos tais como: o uso de telas impregnadas de inseticida do grupo dos piretróides sintéticos em janelas e portas, o tratamento tópico de cães com inseticidas por meio de banho ou aplicação localizada, que mostraram-se inadequados enquanto medida de saúde pública.

Tendo em vista as dificuldades de controle da doença, o município de Campo Grande, a partir de 2007 iniciou o inquérito censitário sorológico canino, borrifação residual em áreas de transmissão intensa e moderada, e ações de manejo ambiental, sendo que essas medidas de controle ao serem implantadas foram realizadas de forma integrada, para que pudessem ser efetivas na redução dos casos da doença no homem e no cão. Em conjunto com essas ações implementou o uso do colar impregnado com deltametrina a 4% na população canina com exame sorológico negativo para LV, com a finalidade de auxiliar a redução do número de casos caninos e humanos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C., feitas pelos índios do Peru, que apresentam mutilações de lábios e narizes, características da espúndia, atualmente conhecida como leishmaniose cutânea-mucosa (LAISON; SHAW, 1998). Posteriormente, através de estudos de paleomedicina, foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas características da leishmaniose (SANTOS; COIMBRA, 1994).

Em 1901 William Leishman, identificou formas amastigotas em esfregaços de baço de um soldado britânico, morto pela “febre Dum-Dum”. Médicos indianos, na pequena cidade de Dum-Dum, na Índia, utilizavam o termo em sânscrito “kala-azar” para nomear uma doença severa e fatal que acreditavam ser causada por tripanossomas (FAUST; RUSSEL; JUNG, 1974). Porém, em 1903, Charles Donovan estudando o agente etiológico desta entidade mórbida o descreve como inédito. Mas foi Major Ross, com base nos achados anteriores, que relaciona o “kala-azar” ao novo parasito, nomeando-o como *Leishmania donovani*, criando dessa forma o gênero *Leishmania* (ROSS, 1903).

A leishmaniose visceral ou calazar foi descoberta em 1835 por Roeser na ilha grega de Hydra, onde era conhecida pelo nome de “ponos ou hapoplinakon”. Em 1869 na Índia, Clarke descreveu o que seria o “Kala-jwar” que significa febre negra ou “Kala-azar”, assim chamada devido ao discreto aumento de pigmentação da pele observada nos pacientes (MARZOCHI et al., 1981).

No ano de 1908, Nicolle e Comte observaram a presença do protozoário em cães na Tunísia, sugerindo o papel do cão como reservatório no ciclo biológico do parasito (NICOLLE, 1908).

O primeiro caso descrito no Brasil (MIGONE, 1913) foi de um imigrante italiano que vivera muitos anos em Santos-SP e após viajar para Mato Grosso (após 1979 foi denominado Mato Grosso do Sul), apresentou os primeiros sinais da doença, tendo sido diagnosticada a doença no Paraguai (ALENCAR, 1977), porém a sua passagem por diversas regiões não permitiu determinar onde o paciente adquiriu a infecção.

No Estado de Mato Grosso do Sul (MS) os primeiros relatos da doença foram a partir de 1980 em Corumbá e Ladário (REGO – JR, 1983). Na capital, Campo Grande, o primeiro caso autóctone canino foi registrado em 1998 (SILVA et al., 2000), e os primeiros casos humanos em 2002 (FURLAN, 2010).

O processo de endemização da doença com elevada incidência em Campo Grande (SILVA; ANDREOTTI; HONER, 2007) e Três Lagoas (OLIVEIRA et al., 2006) confirmam sua expansão e urbanização. O Estado é o oitavo do país com o maior registro de casos e apresenta letalidade média de 8,6%, sendo que a doença já foi registrada em 56 dos 78 de seus municípios (BRASIL, 2009a; MATO GROSSO DO SUL, 2010).

## **2.2 Taxonomia e morfologia**

A *Leishmania* é um protozoário pertencente ao Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Ordem Kinetoplastida, Subordem Trypanosomatina, Família Trypanosomatidae e Gênero *Leishmania* (CAMPILLO et al., 1999).

O parasita apresenta duas formas biológicas e necessita de dois hospedeiros diferentes (um inseto vetor e um vertebrado) para realizar o seu ciclo biológico. A forma promastigota, presente no inseto, é extracelular,

fusiforme, tem 5-20 µm de comprimento e 1-4 µm de largura e apresenta um flagelo que lhe confere mobilidade (ROZE, 2005). O gênero *Leishmania* divide-se em sub-gênero *Viannia* e *Leishmania*, com base nas diferenças existentes durante o desenvolvimento dos promastigotas no inseto vetor (BANETH, 2006). No hospedeiro vertebrado é observada a forma amastigota, de formato ovóide ou redondo, com 2,5-5 µm de comprimento e 1,5-2 µm de largura, desprovida de motilidade, apresentando apenas um flagelo rudimentar, que não é visível por microscopia óptica convencional. As formas amastigotas estão, geralmente, localizadas nas células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF), como macrófagos, monócitos, células de Langerhans, células de Kupffer e células apresentadoras de antígenos (ROZE, 2005; BANETH, 2006). No gênero *Leishmania* se descrevem dois subgêneros em função do lugar de reprodução no trato digestivo do vetor (LAINSON et al., 1979; 1987): subgênero *Leishmania* (SAF'JANOVA, 1982) com desenvolvimento suprapilárico dos flagelados e subgênero *Viannia* (LAINSON; SHAW, 1987) de multiplicação peripilórica.

Existem duas vertentes do pensamento taxonômico em relação às espécies *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, através de dados genéticos e enzimáticos, a primeira vertente do pensamento considera que representam a mesma espécie (MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000; LUKES et al., 2007;) e, por isso, devem ser utilizadas como sinônimas.

A segunda vertente considera que esses parasitos são espécies diferentes, e decidiram separá-los em duas subespécies, atribuindo os nomes *L. (L.) infantum infantum* e *L. (L.) infantum chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2005; 2006), estando esta nomenclatura correta (SHAW, 2006).

Esta separação de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* em duas subespécies é em parte aceitável, contudo, estas devem ser consideradas sinônimas até que uma nova classificação para o gênero *Leishmania* seja proposta (MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000; DANTAS-TORRES, 2006b; LUKES et al., 2007). Dessa forma, será adotado no presente

trabalho a nomenclatura *L. (L.) chagasi* como o agente causador da LV nas Américas.

### **2.3 Ciclo biológico**

Como a *Leishmania* possui parte de ciclo de vida no trato gastrointestinal do hospedeiro do invertebrado (muitas espécies do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo) e a outra parte no hospedeiro vertebrado, principalmente em macrófagos, na forma de amastigota ele é um parasita digenético.

Quando a fêmea do flebotomíneo se encontra infectada, inocula as formas promastigotas metacíclicas infectantes no hospedeiro vertebrado, as quais são fagocitadas por macrófagos, que tentam eliminá-lo por meio da cascata metabólica de derivados de oxigênio, incluindo o óxido nítrico além de hidrolases (Figura 1). As formas promastigotas diferenciam-se em formas amastigotas no interior das células do hospedeiro vertebrado e passam a se reproduzir, por divisão binária. Uma vez cheias de amastigotas as células se rompem, levando a disseminação do parasito por todo o organismo do hospedeiro (REY, 1991). O período de incubação varia entre 3 meses e 7 anos na espécie canina (SLAPPENDEL; FERRER, 1998).

A progressão da doença vai depender de vários fatores como: a capacidade das amastigotas de sobreviver às reações bioquímicas dos macrófagos, a virulência do protozoário e a eficácia da resposta imune.

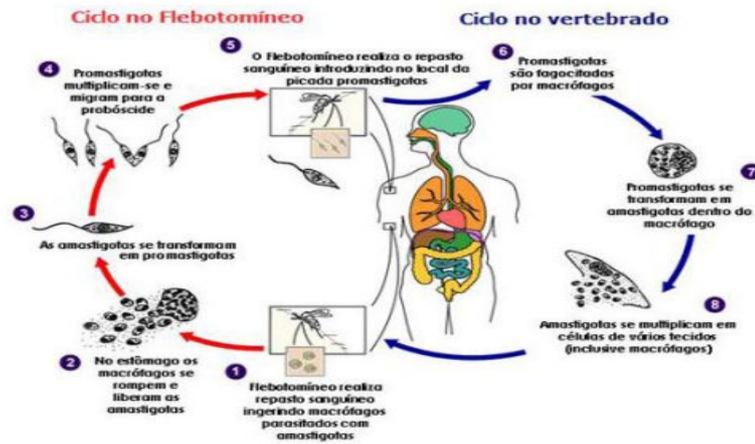


Figura 1 – Ciclo de vida de *Leishmania* (Adaptado de Centers for Diseases Control and Prevention).

Fonte: (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>).

## 2.4 Genoma do parasito

Os protozoários da ordem Kinetoplastida possuem seu DNA localizado em duas estruturas: no núcleo (DNA cromossômico) e na mitocôndria ou cinetoplasto (kDNA) (CHOCHOLOVÁ; JIRKU; LUKES, 2008). O kDNA está classificado em maxicírculos (15% do DNA de toda célula) presentes entre 20 a 50 cópias por célula, e minicírculos (35% do total de todo DNA da célula) com 10.000 cópias por célula (SIMPSON et al., 1980; SHAPIRO; ENGLUND, 1995) que se replicam independentemente.

Os maxicírculos possuem o tamanho de 20-35kb extremamente homogêneas entre os diferentes grupos que compõe a ordem Kinetoplastida. Os minicírculos são moléculas menores (0,5-1,5kb), que apresentam-se em grande quantidade e com sequências heterogêneas entre os grupos. O que favorece o seu uso para distinguir classes, gêneros ou espécies (FERNANDES et al., 1996; NOYES et al., 1998; BARKER, 2011). Cada minicírculo de *Leishmania* é composto de uma molécula de DNA circular com uma região conservada de aproximadamente 200pb contendo três blocos de sequências conservadas em todas as espécies de *Leishmania*. O restante da molécula,

aproximadamente 550-700pb, apresenta sequências altamente variáveis, contendo um grande número de nucleotídeos A e T. Portanto, nessa região, pode-se encontrar sequências específicas para os diferentes grupos de *Leishmania*.

As *Leishmanias* apresentam de 20 a 36 cromossomos de aproximadamente 150 kilobases para os minicromossomos e quatro megabases para os de maior tamanho (VAN DER PLOEG et al., 1984). As estruturas dos cromossomos de *Leishmania* são comparados as de outros protozoários, com uma região central de sequências conservadas com baixo número de cópias ou de cópia única (WINCKER et al., 1996). Tibayrenc e Ayala (1999) no trabalho sobre evolução genética do parasito sugerem que a recombinação genética entre *Leishmanias* seria possível, porém rara em condições naturais. Existem poucos relatos sobre o isolamento de cepas que foram caracterizadas como híbridos entre diferentes espécies de *Leishmania*. Estes híbridos ocorrem essencialmente entre espécies próximas, como *L. braziliensis* e *L. panamensis* ou *L. peruviana* (THOMAZ SOCCOL et al., 1993; BANULS et al., 1997; TORRICO et al., 1999).

## 2.5 Leishmanioses

Dentro do complexo das leishmanioses existe um espectro de manifestações clínicas em humanos como apresentada por Álvarez (2010):

- a) Leishmaniose cutânea localizada;
- b) Leishmaniose cutânea difusa;
- c) Leishmaniose cutânea disseminada;
- d) Leishmaniose mucocutânea;
- e) Leishmaniose cutânea recidivante;
- f) Leishmaniose visceral;
- g) Leishmaniose dérmica pós calazar;

Em particular a Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar é uma endemia de grande expansão geográfica, tanto no velho e quanto no novo mundo, de ocorrência em países das regiões tropicais, subtropicais e no Mediterrâneo (CHAPPUIS et al., 2007; BRASIL, 2009b; SRIVASTAVA et al., 2011). Em função de sua elevada incidência e alta mortalidade em indivíduos não tratados, em crianças desnutridas e em infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a LV foi considerada uma das seis doenças mais importantes do mundo causadas por protozoários (SINGH; PANDEY; SUNDAR, 2006; BRASIL, 2009b;).

A Leishmaniose Visceral afeta, anualmente, aproximadamente 500.000 pessoas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010) em 69 países em todos os continentes, causando cerca de 50 mil mortes por ano, sendo cinco países responsáveis por 90% dos casos: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (FAUCHER; PIARROUX, 2010).

No Brasil, a sua ocorrência estava distribuída em áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, embora, hoje, encontra-se em franca expansão para grandes centros, estando distribuída em 21 unidades da Federação, atingindo as cinco regiões brasileiras. Nos últimos dez anos, o país apresentou uma média anual de 3.379 casos e uma incidência de 1,9 casos por 100.000 habitantes, com uma letalidade média de 6,3% (BRASIL, 2009a). A LV é mais freqüente em crianças menores de 10 anos (BRASIL, 2009b), principalmente na faixa etária de um a quatro anos, e o sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (LUZ; AGUIAR-SANTOS, 2005; BRASIL, 2009b). Seu espectro clínico pode se apresentar desde a forma assintomática, até ser expresso por episódios febris associados à hepatoesplenomegalia grave, emagrecimento, anemia, micropoliadenia, podendo ocorrer manifestações intestinais e fenômenos hemorrágicos (BRASIL, 2009a).

Normalmente a evolução da doença é lenta, podendo levar os pacientes a complicações graves (GONTIJO; MELO, 2004), ao contrário do que ocorre no Estado de Mato Grosso do Sul onde os pacientes se apresentam com

expressiva esplenomegalia e pancitopenia, além da evolução em poucos dias (BRUSTOLONI, 2006).

Outro fator primordial para a transmissão da LV está relacionado à dispersão vetorial, entretanto há poucos relatos na literatura. Para a *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* nas Américas, há relatos na Colômbia onde a recaptura variou de 0 a 500 m (MORRISON et al. 1993). No Brasil, Dye et al. (1991) recuperaram em poucos dias espécimes de *Lu. longipalpis* a 20, 85, 200 e 700m de distância. Em 2010, Oliveira et al. (2010) descreveram um estudo de dispersão de *Lu. longipalpis* com auxílio de geotecnologia. Na ocasião foram georreferenciadas 20 residências em área periférica do município de Campo Grande, onde obtiveram como resultado o deslocamento de 0 a 156, 169 e 223m de distância.

*Lutzomyia longipalpis* além de ser o principal vetor da *L. (L.) chagasi*, está bem adaptado ao ambiente peridomiciliar, alimentando-se em uma grande variedade de hospedeiros, entre aves, o homem e outros animais silvestres e domésticos (OLIVEIRA, 2000). A transmissão da LV pode ocorrer de humano para humano ou de um reservatório animal, principalmente canídeo, para humanos através da picada de insetos vetores pertencentes ao gênero *Lutzomyia*. (GONTIJO; MELO, 2004). Outras vias potenciais de transmissão relatadas são: congênita, transfusional (ANTINORI et al., 2007; PAGLIANO et al., 2005) através de transplantes de órgãos (ANTINORI et al., 2008) e pelo compartilhamento de agulhas/seringas contaminadas. Esta última vem sendo a principal forma de transmissão de LV em países do Mediterrâneo (ALVAR et al., 2008; CRUZ et al., 2002).

Recentemente tem-se levantado a hipótese de que algumas pulgas (COLOMBO et al., 2011) e carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (DANTAS-TORRES, 2011) serem vetores de *Leishmania* para cães, porém ainda são necessários alguns estudos para comprovar a participação destes na epidemiologia da doença (COLOMBO et al., 2011; DANTAS-TORRES, 2011).

### **2.5.1 Leishmaniose visceral canina**

Desde 1908, quando relataram pela primeira vez na Tunísia a presença de formas amastigotas em cães domésticos (NICOLLE; COMTE, 1908) e no Brasil (DEANE; DEANE, 1954; 1955a; 1955b; 1962) ao detectarem elevado parasitismo cutâneo em cães e raposas do Ceará, os canídeos são considerados como importantes reservatórios no ciclo da LV.

Existe uma classificação para a doença no cão em formas clínicas por meio da estratificação de sinais clínicos amplamente empregada e reconhecida na literatura científica preconizada por Mancianti et al. (1988) que propuseram a classificação da LVC baseada em sinais clínicos abrangendo três grupos clínicos distintos, a saber: cães assintomáticos (CA), cães oligossintomáticos (CO) e cães sintomáticos (CS). A LVC pode envolver desde casos assintomáticos aparentemente saudáveis até uma a doença sistêmica e grave, que geralmente culmina em óbito. Apesar da grande diversidade de manifestações clínicas existem mais animais aparentemente saudáveis que aqueles que exibem a sintomatologia característica de estágios finais da doença. Um fato considerável é que a doença canina pode permanecer clinicamente inaparente por longos períodos (TESH, 1995; SILVA, 2008).

As manifestações clínicas da LV canina são variadas, inespecíficas e incluem a linfadenopatia generalizada; a perda de pêlos, ao redor dos olhos, do nariz, da boca e das orelhas; as lesões de pele, com ou sem descamações e às vezes úlceras; a perda de apetite ocasionando depressão e emagrecimento; a onicogribose dificultando a sua locomoção; a febre, a enterite, os distúrbios de coagulação, e as lesões renais, hepáticas e lesões oculares (FEITOSA et al. 2000).

Os achados laboratoriais evidenciam alterações hematológicas como a anemia, geralmente normocítica normocrômica, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, hiperproteinemia, trombocitopenia, leucopenia associada à linfopenia ou leucocitose (SLAPPENDEL; FERRER, 1998; NOLI, 1999).

Alterações dermatológicas são muito frequentes em animais portadores da LV e raramente ocorrem na ausência de outros sinais clínicos da doença (FERRER et al., 1988). No quadro dermatológico clássico estão presentes: dermatite esfoliativa com formação de caspas, hipotricose e alopecia não pruriginosa, dermatites ulcerativas, formação de pústulas e nódulos, ceratoconjuntivite, epistaxe, hiperkeratose e despigmentação do focinho e coxins, descamação e alopecia focais das pinas, focinho e região periocular, onicogribose (SOLANO-GALLEGO et al. 2004; ALBUQUERQUE et al., 2007; IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007). Ocasionalmente são observadas alterações locomotoras, hepáticas, respiratórias, cardíacas e/ou neurológicas (NOGUEIRA et al., 2009).

Em um estudo é descrito quatro casos clínicos de cães infectados por *Leishmania* spp. com alterações dermatológicas com envolvimento da mucosa de região peniana, lingual, nasal e prepucial, o parasito foi detectado em amostras de biópsia ou “imprints” desses tecidos. No entanto, em outros dois animais não foi possível observar a presença de *Leishmania* spp. ao exame citológico de linfonodo e/ou medula óssea (FONT et al. 1996).

Os animais assintomáticos representam um problema de saúde pública, pois a detecção da infecção é dificultada pela ausência de sintomas, o que impossibilita a adoção de medidas adequadas de controle (MACHADO; HOFFMAN; LAGONI, 2007). A intensidade do parasitismo aparentemente não está associada diretamente à gravidade do quadro clínico, podendo ser observados cães com sintomatologia leve com parasitismo intenso (FEITOSA et al., 2000; CAMARGO-NEVES et al., 2006).

O quadro de onicogribose associado à presença do parasito estimulando a matriz ungueal é comumente observado (NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000). No intestino é observada diarreia crônica e melena, devido às ulcerações na mucosa gástrica intestinal. Colite ulcerativa e erosiva também pode estar presente (FERRER, 1999). As inflamações do trato intestinal podem alcançar desde a mucosa até a muscular da submucosa (LUVIZOTTO, 2006a).

Os estudos concernentes às alterações neurológicas associadas com LV em humanos podem ter os cães como bons modelos. Os cães doentes podem apresentar, além dos sintomas clássicos de LV, alterações neurológicas tais como letargia, convulsões, mioclonias, nistagmo, tremores, paralisia de mandíbula, ptose labial, andar em círculos, tetraparesia e rigidez raquial e cervical. Os sintomas neurológicos na LV estão associados à inflamação meningeal crônica com infiltrado linfoplasmocitário (VIÑUELAS, 2001).

Altos níveis de anticorpos anti *Leishmania* são encontrados no líquido cérebro espinhal vindos, provavelmente, da circulação sangüínea através do rompimento da barreira hemato cerebral ocasionado pelas leishmanias (LIMA et al., 2003). A LV também pode manifestar lesões osteolíticas e osteo proliferativas de diáfises ósseas com sinais de atrofia muscular (BURRACO; ABATE; GUGLIELMINO, 1997; SOUZA et al., 2005).

## **2.6 Resposta imunológica na leishmaniose visceral canina**

A adesão, a internalização das promastigotas pelos macrófagos e participação de vários receptores desempenham papel fundamental nas interações de formas promastigotas de *Leishmania* com fagócitos mononucleares garantindo dessa forma o sucesso da infecção (BLACKWELL et al, 1985; MOSSER; ROSENTHAL, 1993; KANE; MOSSER, 2000). Esta interação se dá com a participação de moléculas da superfície do parasito (lipofosfoglicanos e gp63) ou opsoninas derivadas do hospedeiro (complemento, fibronectina ou imunoglobulinas) e múltiplos receptores nos macrófagos (receptores para o complemento - CR, receptores para fibronectina, receptor de fucose-manose e receptores para Fc de IgG). A resposta das células T pelo hospedeiro é o principal fator que influencia a evolução da infecção. Estudos sobre a resposta imunológica têm revelado que os linfócitos T e as citocinas produzidas por estas células determinam se a

infecção resultará em uma resposta imune protetora ou na evolução da patogenicidade (PINELLI, et al., 1999).

A imunidade protetora contra a leishmaniose é mediada por células T e associada à produção de IFN- $\gamma$  como foi demonstrado em cães (CABRAL, et al., 1992; PINELLI, et al., 1994), humanos e camundongos (LIEW; O'DONNELL, 1993). A depressão da imunidade celular em cães, assim como em humanos é manifestada por reação de hipersensibilidade tardia negativa na pele e ausência de resposta proliferativa in vitro (CARVALHO, et al., 1981; SACKS et al., 1987). A resposta celular em cães através do teste de hipersensibilidade tardia (DTH), utilizando diversos antígenos, mostrou resultados variados: Battistini; Herrer (1945) obtiveram positividade em alguns animais com infecção experimental. Marzochi; Barbosa Santos (1988) e Genaro et al. (1992) alcançaram resultados positivos utilizando antígenos diferentes em cães infectados por *Leishmania braziliensis*. Pinelli et al. (1994) e Cardoso (2007) demonstraram que em cães assintomáticos a reação intradérmica é positiva. No tecido cutâneo, as células de Langerhans são as principais responsáveis pela apresentação de antígenos às células T.

A LV em cães sintomáticos é caracterizada pela ausência de reação de hipersensibilidade tardia (DTH) (CARDOSO et al., 1998), diminuição de células T no sangue periférico (PINELLI, et al., 1994; DE LUNA, et al., 1999), e ausência de IFN- $\gamma$  e IL-2 no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) in vitro (PINELLI, et al., 1994; SANTOS-GOMES et al., 2002). Além disso, altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* são detectados em animais sintomáticos (ABRANCHES, et al., 1991a). Por outro lado, resistência a LVC foi inicialmente associada à ativação de células e produção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  (PINELLI, et al., 1994). O principal mecanismo envolvido na resposta imune protetora de cães infectados por *L. chagasi* é a ativação de macrófagos através de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e morte de amastigostas intracelulares pela via do óxido nítrico (PINELLI, et al., 2000). O envolvimento de IL-10 na LV ativa ainda é controverso. Estudos realizados utilizando sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue

periférico (PBMC) obtidos de cães sintomáticos e ensaios de ensaio imunoenzimático (ELISA) altos níveis de IL-10 foram detectados (PINELLI et al., 1999). Em contraste, concentrações baixas ou não detectáveis desta citocina foram encontradas no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de animais oligossintomáticos e assintomáticos, respectivamente (PINHEIRO et al., 2005). Resultados semelhantes foram obtidos com relação aos níveis de IL-4 no mesmo estudo. Com relação ao perfil de citocinas presentes na medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, Quinnell et al. (2001) relataram que a expressão de mRNA IL-10, IL-4 e IL-18 não foi elevada em cães infectados. Entretanto, alguns cães infectados tiveram expressão detectável de mRNA IL-4 correlacionada significativamente aos sinais clínicos mais severos. Além disso, não foi detectada expressão de mRNA IL-13 tanto em cães controle como infectados. IFN- $\gamma$  foi elevado em cães infectados e positivamente correlacionado com resposta humoral (IgG1), mas não com respostas linfoproliferativas a antígenos de *Leishmania*.

No trabalho de Quinnell et al. (2001), não se constatou o papel imunossupressor da IL-10 na LVC. Cães naturalmente infectados por *L. chagasi* foram comparados com controles não infectados. Verificou-se maior expressão de IFN- $\gamma$  nos cães infectados, sendo que, não foi observado aumento da expressão de IL-4, IL-18 e IL-10 nestes animais, em relação aos animais não infectados. Em estudo realizado por Santos-Gomes et al. (2002), com cães infectados experimentalmente com *L. chagasi* resultados semelhantes aos de Quinnell et al. (2001) foram verificados, não sendo possível estabelecer uma correlação entre a severidade da doença e a expressão de IL-10.

Chamizo et al. (2005) avaliaram de forma semi-quantitativa a expressão gênica de citocinas em células mononucleares do sangue periférico de cães assintomáticos infectados experimentalmente com *L. chagasi* comparados a cães controle não infectados. A expressão de TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-18 foram semelhantes nos dois grupos, somente a IL-4 foi detectada em níveis

inferiores no grupo de cães assintomáticos. Para esta semi-quantificação, foi realizada a técnica da transcriptase reversa-PCR com iniciadores específicos para cada citocina e os produtos foram corridos em gel de agarose corado com brometo de etídeo. A intensidade dos sinais obtidos foi analisada em programa de computador, permitindo uma quantificação relativa.

Recentemente Lage et al. (2007) estudaram o perfil de citocinas expressas no baço em cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes formas clínicas e graus de parasitismo. De forma interessante estes autores mostraram que 100% dos cães com alta carga parasitária apresentaram aumento da expressão de IL-10 quando comparados aos cães com baixo e médio parasitismo. O aumento do parasitismo foi correlacionado com a expressão de IL-10 na presença de IFN- $\gamma$ . Portanto, foi observado que a LV é marcada por uma produção balanceada de citocinas do tipo 1 (Th1) e 2 (Th2) com expressão de mRNA de IL-10 e IFN- $\gamma$  que estão relacionadas à intensidade parasitária e a progressão clínica.

Estudos avaliando a LV natural e/ou experimental relatam a ocorrência de ativação policlonal de linfócitos B com conseqüente elevação na produção de imunoglobulinas (ABRANCHES et al., 1991a; REIS et al., 2006a,b GIUNCHETTI et al., 2008). Embora não esteja bem definida na literatura a associação entre um padrão de resposta humoral anti-*Leishmania* associada à resistência ou susceptibilidade na LV (DAY, 2007), pesquisas relatam que em cães assintomáticos, menores títulos de anticorpos circulantes, com presença predominante de IgG1 associada a uma menor freqüência de intensidade parasitária em diversos tecidos (REIS et al., 2006a,b). Por outro lado, cães sintomáticos apresentaram elevada produção de imunoglobulinas tais como, IgG2, IgA, IgM e IgE (REIS et al., 2006a,b).

As características genéticas podem determinar diferentes respostas imunológicas na espécie canina, sendo que alguns animais ou raças têm uma resposta mais efetiva do que outros (FONT et al., 1996; FERRER, 1999). Em torno de 60-80% dos cães pertencentes à área endêmica podem ter contato com o parasito e não desenvolver sinais clínicos da doença (FERRER, 1999).

Os cães assintomáticos representam cerca de 20 a 40% da população soropositiva e aproximadamente 80% desenvolvem a doença (NOLI, 1999). Há duas subpopulações de células T auxiliares que expressam a molécula CD4+: os linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) e os linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2). As células Th1 secretam interleucina-2 (IL-2), interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF) que desencadeiam uma resposta imune celular protetora, conduzindo à resistência imunológica. Se interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) que desencadeiam a proliferação de linfócitos B e uma resposta imune humoral não protetora. Esta resposta causa a exacerbação da infecção, sendo demonstrada pela hipergamaglobulinemia e por altos títulos de anticorpos produzidos pelos cães infectados (ABRANCHES et al., 1991b; SLAPPENDEL; FERRER, 1998; PINELLI et al., 1999). A produção exagerada de anticorpos leva à formação de imunocomplexos circulantes podendo causar vasculite, uveíte, poliartrite e glomerulonefrite (SLAPPENDEL; FERRER, 1998).

Em trabalho realizado por Brachelente et al. (2005), foi pesquisada de forma quantitativa a expressão local de citocinas em biópsias parafinadas de pele de cães infectados com *L. infantum*. Para isso, foi realizada a técnica de PCR em tempo real utilizando como molde o cDNA produzido por RT-PCR a partir de RNA total extraído das biópsias de pele. Neste estudo, as biópsias dos cães infectados foram comparadas com material de cães normais e de cães apresentando flebite. Os cães infectados não foram classificados clinicamente, sendo possível, apenas, a diferenciação do perfil de citocinas na pele destes animais em relação aos dois grupos controle. No grupo de cães naturalmente infectados, a expressão de IL-4, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foi significativamente superior em relação aos grupos controles. Também se constatou que, cães com alta carga de amastigotas apresentaram níveis de expressão de IL-4 significativamente superiores aos demais cães em estudo. Outras citocinas não foram pesquisadas neste estudo.

Lage et al. (2007) avaliaram de forma semi-quantitativa o perfil de citocinas em células de baço de cães naturalmente infectados por *L.*

*chagasi*. Para isso, empregaram a técnica de RT-PCR, de forma semelhante à utilizada por Chamizo et al. (2005). Neste estudo, verificaram que não houve diferença significativa na expressão de IL-12, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Houve, no entanto, um acúmulo significativo de IL-10 em cães que apresentaram maior carga parasitária no baço, independente do grupo clínico a que pertenciam. Estes resultados sugeriram uma produção balanceada de citocinas Th1 e de citocinas regulatórias.

Lima et al. (2007) usaram a técnica de ELISA de captura, dosaram IL-6 e TNF- $\alpha$  no soro de cães sintomáticos com infecção natural por *L. chagasi* e cães controle não infectados. O fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) foi encontrado em níveis semelhantes nos cães dos dois grupos enquanto que a IL-6 foi encontrada em níveis estatisticamente superiores em cães com LV ativa.

Pela presença de IgG2 e IgE na forma clínica sintomática poderia indicar uma associação dessa forma clínica com a resposta imune do tipo 2 (Th2) (REIS et al., 2006b). Ao analisar o fenótipo de leucócitos do sangue periférico na LV, Reis et al. (2006c) demonstraram aumento de linfócitos T CD5+ e das subpopulações de linfócitos T (CD4+ e CD8+) em cães assintomáticos em relação aos cães sintomáticos. Além disto, estes autores mostram que ocorre queda de linfócitos B CD21+ nos animais sintomáticos quando comparados aos cães não infectados e assintomáticos. Ao reagrupar os mesmos animais, considerando a carga parasitária da medula óssea, foram observados resultados semelhantes, como aumento de linfócitos T CD5+ e das subpopulações de linfócitos T CD8+ nos grupos com baixo e médio parasitismo quando comparado ao grupo com alto parasitismo. Este último, por sua vez, apresentou queda na população de linfócitos B CD21+ e monócitos CD14+ em relação ao grupo com médio parasitismo.

## 2.7 Diagnóstico

O diagnóstico das leishmanioses pode ser feito com base em dados clínicos e epidemiológicos, sendo confirmado pela presença do parasito (MARFURT et al., 2003). Em cães o diagnóstico clínico da LV canina é dificultado devido à variedade de manifestações clínicas, aos achados clínicos serem semelhantes a outras enfermidades, e também devido maioria dos cães infectados não desenvolve sinais clínicos, isto torna o diagnóstico laboratorial necessário para a confirmação da suspeita (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007).

Pode-se classificar o diagnóstico da leishmaniose visceral em três categorias: métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (NOGUEIRA et al., 2009).

### 2. 7.1 Diagnóstico parasitológico

A detecção microscópica de *Leishmania* é considerada padrão ouro no diagnóstico da LV devido à sua alta especificidade, apesar da discordância entre autores (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007; SRIVASTAVA et al., 2011). Contudo, em muitos casos, especialmente em animais assintomáticos, nos quais poucas formas amastigotas estão presentes podem ocorrer resultados falsos negativos (FARIA, 2007). A pesquisa direta do parasito pode atingir 100% de especificidade, no entanto a sensibilidade é baixa, em torno de 60 e 80% (LUVIZOTTO, 2006b), sendo ainda menor em cães assintomáticos. A sensibilidade depende do grau de parasitemia, do tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina (BRASIL, 2006).

Esta técnica demonstra as formas amastigotas do parasito, geralmente observados dentro de células fagocíticas (FAUCHER; PIARROUX, 2010) em

esfregaços realizados a partir de punções de linfonodos, de medula óssea e do baço. Os esfregaços do baço possuem a melhor sensibilidade, variando entre 93,1 a 98,7%, já os de medula óssea e linfonodo têm menor sensibilidade com 52-85% e 52-58%, respectivamente (SRIVASTAVA et al., 2011).

É importante ressaltar que as punções são consideradas invasivas, possuindo contra-indicações, e exigem ambientes e profissionais habilitados para a coleta. Desta forma, esses procedimentos não são adequados para estudos epidemiológicos e, algumas vezes, também para diagnósticos individuais (SUNDAR; RAI, 2002; SILVA; STEWART; COSTA, 2005).

A cultura sofre as mesmas dificuldades da microscopia, por utilizar uma amostra obtida através de um procedimento invasivo, apresentar variações na sensibilidade e necessitar de um profissional experiente, além de ser uma técnica demorada de alto custo, e com possibilidade de contaminação microbiológica seu resultado está na dependência da carga parasitária e ainda há baixa adaptação do isolado ao meio. Isso torna a técnica pouco requisitada pelos clínicos, sendo utilizada apenas em trabalhos de pesquisa científica (SRIVASTAVA et al., 2011).

A técnica da cultura é usada quando se pretende obter um número de parasitos suficiente para identificação isoenzimática, antígeno para o diagnóstico imunológico, modelos de infecções experimentais, assim como para o “screening” de fármacos ou identificação molecular (MAIA; CAMPINO, 2008).

Quando se utiliza inoculação em hamsters como exemplo de prova parasitológica, ela não possui valor diagnóstico por requerer um tempo consideravelmente longo para que haja o desenvolvimento da sintomatologia e a confirmação diagnóstica (BRASIL, 2006).

### 2.7.2 Diagnóstico sorológico

A detecção de anticorpos anti-leishmania circulantes utilizando técnicas sorológicas constitui um instrumento importante no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (BRASIL, 2006).

Existem vários métodos sorológicos disponíveis para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no diagnóstico da LV canina, que são diferentes em sensibilidades e especificidades. Dentre eles tem-se: Imunofluorescência Indireta (IFI); o Ensaio imunoenzimático (ELISA) com diferentes modificações tais como Dot-ELISA; FML-ELISA; Fast-ELISA; BSM-ELISA; Slide-ELISA; fixação do complemento; hemaglutinação indireta; imunoeletroforese; Teste de Aglutinação Direta (DAT) e o teste Imunocromatográfico Rápido rK39 (rK39-ICT) (KARGIN KIRAL et al., 2004; PAVLI; MALTEZOU, 2010;). Os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis (IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006).

As técnicas de ELISA e IFI são técnicas que apresentam alta sensibilidade e especificidade, embora nem sempre um resultado positivo possa ser conclusivo de doença ativa, da mesma forma que cães infectados podem ser soronegativos (SILVA et al., 2006).

As técnicas que utilizam antígenos totais são limitadas em termos de especificidade, apresentando reações cruzadas não somente com outras espécies da família Trypanosomatidae, mas também com organismos filogeneticamente distantes (RACHAMIN et al., 1991; MELO, 2004). Enquanto alguns trabalhos apontam para a ocorrência de reação cruzada entre LV e babesiose canina ou doença de Chagas por meio da técnica de ELISA (ROSÁRIO et al., 2005), outros afirmam não existir reação cruzada com erliquiose e babesiose (LIMA et al., 2005; VERCAMMEN et al., 1997), toxoplasmose (LIMA et al., 2005) e doença de Chagas (VERCAMMEN et al., 1997).

O ELISA é um exame cuja sensibilidade e especificidade dependem do tipo de antígeno utilizado (bruto ou purificado). Apesar do grande número de antígenos já estudados, ainda não existe um antígeno padrão para esta técnica. Devido à necessidade de técnicos treinados e equipamentos, esta técnica não é aplicada para o diagnóstico de rotina em regiões endêmicas em humanos (SRIVASTAVA et al., 2011), sendo utilizada na rotina apenas para o diagnóstico da LV canina (BRASIL, 2006).

O ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. apresenta, dependendo do antígeno empregado, uma sensibilidade entre 95% e 99,5% e uma especificidade entre 97,1% a 100% (MANCIANTI et al., 1995; LAURENTI et al., 2005). Contudo, observa-se discordâncias entre alguns autores, os quais descrevem valores de sensibilidade e especificidade de 80 e 81%, respectivamente (ASHFORD et al., 1995) e outros que observaram valores de 100% para ambos os índices (VERCAMMEN et al., 1997). A sensibilidade e especificidade deste método dependem do tipo de antígeno empregado (espécie ou forma evolutiva do parasita) e de mudanças no protocolo experimental padrão (tempo de incubação ou tipo de microplacas utilizadas) (REINTHINGER et al., 2002).

A IFI tem sido a técnica sorológica mais utilizada no diagnóstico da LV canina, particularmente em inquéritos epidemiológicos (BRASIL, 2003), entretanto, possui a desvantagem de quando da análise de um grande número de amostras, o tempo dispendido pelo profissional para a leitura das lâminas é muito grande (RACHAMIN et al., 1991; GONTIJO; MELO, 2004). A IFI demonstra sensibilidade que varia entre 90 e 100% e especificidade entre 80 e 100% (ALVES; BEVILACQUA, 2004; METTLER et al., 2005, SRIVASTAVA et al., 2011), mas sua necessidade de condições laboratoriais apropriadas não permite o seu uso a campo. A especificidade desta prova é prejudicada pela ocorrência de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanosomatídeos, tais como o agente causador da doença de Chagas. Portanto, seus resultados não devem ser utilizados isoladamente como

indicadores de infecção leishmaniótica específica, particularmente em áreas onde há doença de Chagas (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Existem na literatura inúmeros relatos da ocorrência de reação sorológica cruzada na IFI entre os membros da família Trypanosomatidae, envolvendo, principalmente, os protozoários *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*, os quais possuem uma relação filogenética muito estreita. No entanto, a ocorrência de reação cruzada entre LV canina e outros agentes etiológicos por meio dos métodos sorológicos ainda é motivo de discordâncias na medicina veterinária. Um exemplo desse fato é, com relação à ocorrência de reação cruzada. Vercammen et al. (1997), utilizando amostras de soro de três cães infectados por *Babesia* sp. e de um cão infectado por *Ehrlichia* sp., não observaram resultados positivos quando da realização da IFI para LV. No Brasil, essa é a técnica disponibilizada e mais utilizada pelos laboratórios de referência no Sistema Únicos de Saúde (BRASIL, 2006).

O Teste de Aglutinação Direta (DAT) é uma técnica simples, sensível e altamente específica (SILVA; STEWART; COSTA, 2005). Apesar da alta sensibilidade e especificidade, estimadas em 94,8% e 85,9%, respectivamente, esta técnica possui desvantagens como o tempo de incubação relativamente longo, a necessidade de múltipla pipetagem, e o alto custo do antígeno (CHAPPUIS, 2006). Outra limitação da técnica é sua incapacidade de diferenciar entre uma infecção ativa e assintomática e a permanência de um resultado positivo após a cura (SRIVASTAVA et al., 2011).

O *Western blotting* ou *Immunoblotting* possui a capacidade de fornecer informações detalhadas sobre as respostas dos anticorpos a vários antígenos de *Leishmania* sp. Este teste é mais sensível que IFI e ELISA, embora seja caro, demorado e laborioso, sendo portanto, pouco utilizado no diagnóstico (SRIVASTAVA et al., 2011). A maior sensibilidade e especificidade do *Western blotting* se justifica pelos diferentes anticorpos produzidos em resposta a infecção poderem reconhecer as diferentes frações do complexo antigênico, separados eletroforicamente, permitindo o reconhecimento de forma específica e individual, gerando perfis de reconhecimento distintos,

capazes de confirmar e diferenciar a infecção por *Leishmania* de outros parasitos, além do monitoramento, do prognóstico do paciente e da detecção de reações cruzadas (SUNDAR; RAI, 2002; SINGH; SIVAKUMAR, 2003). Como exemplos de desvantagens dessa técnica estão a dificuldade de execução (pessoal treinado e equipamentos específicos), produção do antígeno utilizado e, assim como em outras técnicas sorológicas, a ausência de resposta (imunossupressão), pode denotar falsos negativos (SINGH; SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR; RAI, 2002).

A detecção de *Leishmania* por imunohistoquímica em tecidos, apresenta resultados promissores, com fácil identificação de amastigotas no interior de macrófagos de diversos órgãos, alta sensibilidade e especificidade, principalmente em locais com baixo parasitismo (LIVNI et al., 1983; TAFURI et al., 2004), mas por ter elevado custo, ser laboriosa e relativamente demorada é mais utilizada na pesquisa do que na rotina para diagnóstico.

### **2.7.3 Diagnóstico molecular**

Dentre os testes moleculares a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) se destaca devido sua elevada sensibilidade e especificidade e sua capacidade de identificar e amplificar especificamente sequências de DNA do parasito (NOGUEIRA et al., 2009). A detecção do DNA do parasito pode ser dar partir de vários materiais biológicos como sangue, medula óssea, cútis e líquido (FERRER, 1999; GONÇALVES et al., 2004).

Ashford et al. (1995) informaram, que a PCR apresenta maior sensibilidade que a sorologia e a cultura de parasitos para o diagnóstico da LV em cães, o que abre a perspectiva do uso desta técnica como principal método de diagnóstico na identificação de cães positivos para leishmaniose. Osman et al. (1997) concluíram que a técnica de PCR é mais sensível quando comparada ao exame parasitológico para a constatação da doença em

amostras de linfonodo e medula óssea, sendo também um método indicado para a confirmação de casos clínicos suspeitos. A sensibilidade pode atingir a 88% logo após a infecção e diminuir até 50% nos meses subsequentes (IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006).

Roura et al. (1999), avaliando 46 cães pelo exame citológico de medula óssea, obtiveram resultados negativos em 39% dos animais, e pela PCR do mesmo material, foi possível confirmar o diagnóstico da doença em 97,8% dos casos. No mesmo estudo, foi realizada a técnica de imunoperoxidase em biópsias cutâneas de cães que apresentaram quadro clínico dermatológico. Os fragmentos cutâneos foram colhidos nas regiões de cútis lesionada e o diagnóstico foi confirmado em 100% dos casos. Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, a técnica de PCR se torna muito adequada para procedimentos de diagnóstico. Estes fatores estão diretamente ligados ao conjunto de *primers* utilizados para a amplificação do DNA alvo, ao número de cópias do DNA alvo a ser amplificado, ao método de extração de DNA utilizado, ao tipo de material a ser analisado e ao protocolo de PCR (CORTES et al., 2004; SALAM et al., 2010).

Solano-Gallego et al. (2004) estudando a cútis clinicamente sem alterações, correspondente à região de plano nasal de cães sintomáticos e assintomáticos, pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR, observaram parasitos no tecido cutâneo de 70% dos cães sintomáticos, mas não observaram parasitos pela imunohistoquímica na cútis dos cães assintomáticos. Já a PCR mostrou positividade de 100% em todos os cães sintomáticos e assintomáticos.

Com o uso da PCR em tempo real pode-se aumentar a sensibilidade e a especificidade do teste, além da possibilidade de quantificar a carga parasitária e monitoramento da LV (MARY et al., 2006), sendo uma técnica alternativa quando o paciente apresenta suspeita clínica, e a microscopia e/ou a sorologia são negativas ou indeterminadas (ALAM et al., 2009).

A principal desvantagem das técnicas moleculares é a necessidade de equipamentos e técnicos treinados (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007). É

necessário padronizar reação nas condições ideais de concentração dos componentes da reação, pois não existe um protocolo padrão que possa ser usado para todas as amplificações. O número de ciclos, a concentração dos íons magnésio, da enzima e do DNA molde, assim como a temperatura de anelamento e a concentração dos *primers*, devem ser cuidadosamente ajustadas para cada tipo de reação que se proceda (BASTIEN; PROCOP; REISCHL, 2008).

Outro fator fundamental no preparo das reações é relacionado à fonte da qual o DNA será extraído. Deve-se considerar a introdução ou a presença de inibidores da DNA polimerase durante o processo de extração do DNA. Entre os inibidores estão substâncias como o grupo heme da hemoglobina, assim como os que geralmente são introduzidos no processo de coleta ou extração do material biológico como o fenol e o clorofórmio (que podem inibir a ação enzimática); a proteinase-K (pode degradar a DNA polimerase); o EDTA e a heparina (quelantes dos íons magnésio) (SAMBROOK et al., 1989).

Apesar dos inúmeros testes diagnósticos disponíveis a LV, continua representando um desafio, pois não existe um único método capaz de obter sensibilidade e especificidade ótima, de forma a permitir um diagnóstico preciso das diversas formas de apresentação da doença (SILVA et al., 2006).

## **2.8 Tratamento**

Há mais de 60 anos o tratamento humano vem sendo realizado principalmente, com antimoniais pentavalentes. O antimoniato de N-metil glucamina-Glucantime<sup>®</sup> e o estibogluconato de sódio-Pentostan<sup>®</sup> são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento (BANETH; SHAW, 2002).

No Brasil, o tratamento da doença humana é feito usando formulação disponível do antimoniato de N-metil glucamina, de distribuição exclusiva do Ministério da Saúde, em ampolas de 5ml com 405mg de Sb+5 (1 ml = 81 mg

de Sb+5), sendo recomendado para o tratamento da leishmaniose visceral a dose de 20mg de Sb+5/Kg/dia, por via endovenosa ou intramuscular profunda, por no mínimo vinte dias e no máximo quarenta dias. O tratamento deve ser limitado a duas ou três ampolas por dia com finalidade de cura, alcançando índices de cura de 95%.

No entanto, esses medicamentos, são tóxicos e nem sempre efetivos, sendo aplicados em esquemas prolongados. O mecanismo de ação dos antimoniais não está totalmente elucidado, mas, sabe-se que atuam nas formas amastigotas do parasito, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa dos ácidos graxos (LAMOTHE, 1999). Dados recentes indicam que a resistência aos antimoniais tem se tornado um problema na Índia e Sudão.

No Brasil, ainda não existe documentação da presença de cepas *de L. chagasi* resistentes in vitro aos antimoniais (BRASIL 2004). Entretanto, a atual perspectiva da quimioterapia da LV está mais promissora que há alguns anos atrás, com novas formulações de medicamentos sendo comercializadas. O desenvolvimento de anfotericina B encapsulada em lipossomas (AmBisome<sup>®</sup>) tem mostrado bons resultados, com cura de 90 a 95% dos casos de LV humana na Índia. O miltefosine, uma droga desenvolvida como agente antitumoral, mostrou 95% de cura efetiva no calazar indiano (PRASAD et al., 2004).

No Brasil, como tratamento alternativo aos antimoniais, vem sendo utilizado o desoxicolato sódico de anfotericina B e suas formulações lipossomais (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal), as pentamidinas (sulfato e mesilato) e os imunomoduladores (interferon gama e GM-CSF). Com exceção das duas primeiras drogas, as demais se encontram em fase de investigação. Todas elas só devem ser administradas em hospitais de referência (BRASIL, 2004).

Os cães domésticos com LV são tratados com os mesmos medicamentos utilizados na LV humana. Os antimoniais pentavalentes são os medicamentos mais largamente utilizados, na atualidade, também no tratamento LV canina. O tratamento de cães, no entanto, não é uma medida

recomendada pela saúde pública para o controle da LV. O uso rotineiro de drogas anti-*Leishmania* em cães, induz a remissão temporária dos sinais clínicos, mas não previne a ocorrência de recidivas, por não levar a cura parasitológica, podendo acarretar duas sérias consequências epidemiológicas: o desenvolvimento de cepas com resistência às drogas e a recorrência do risco de transmissão (BANETH; SHAW, 2002; MORENO; ALVAR, 2002).

As principais drogas utilizadas no tratamento da leishmaniose canina são os antimoniais pentavalentes, alopurinol, aminosidina e anfotericina B, usadas individualmente ou em combinação (IKEDA-GARACIA et al., 2006). Todavia, é importante lembrar que o Ministério da Saúde ainda recomenda a eutanásia dos cães soropositivos, sejam esses sintomáticos ou não (BRASIL, 2004). Além disso, o Glucantime® (Aventis Pharma) é um medicamento de uso exclusivo do Ministério da Saúde, que o distribui gratuitamente para o tratamento dos casos humanos de LV no Brasil. O uso do Glucantime® para o tratamento da leishmaniose canina está proibido (BRASIL, 2004).

Além dos antimoniais, o alopurinol (KOUTINAS et al., 2001), a anfotericina B e outros medicamentos como a aminosidina (VEXENAT et al., 1998), a pentamidina (RHALEM et al., 1999), as alkilfosfocolinas e alguns antifúngicos (BANETH; SHAW, 2002) têm sido testados no tratamento da LV canina. Nenhum deles, no entanto, mostrou-se capaz de promover a cura parasitológica dos animais, mostrando ação semelhante à dos antimoniais.

A questão envolvendo o tratamento canino é bastante controversa e pelo fato de que animais “curados” possam manter-se reservatórios do parasito, a eutanásia de todo os animais doentes e/ou portadores é indicada por lei, pois o Código Penal Brasileiro enquadra como crime contra a saúde pública, não adotar esta medida sanitária (PARISE 2006). Noli (1999) afirma que quando os cães são tratados, esta intervenção terapêutica não elimina completamente o parasito e as recaídas são frequentes.

Não há cura parasitológica nos cães e estes continuam a ser fonte de infecção para o vetor, contribuindo para a manutenção da LV. Outros fatores como: a baixa imunidade do cão frente às infecções pelas Leishmanias, as

diferenças do metabolismo hepático comparativamente entre cão e homem, a resposta relativa a condição clínica do animal a medicação, o alto custo do tratamento, a ocorrência de sérios efeitos colaterais e a aparente melhora do animal levando o proprietário a abandonar o tratamento, evidenciam as desvantagens de se preconizar o tratamento canino (THOMÉ, 1999).

Fica evidente que os esforços (VEXENAT et al., 1998; BANETH; SHAW, 2002; IKEDA-GARCIA; GARCIA et al., 2006), e os resultados obtidos na grande maioria das tentativas de tratamento da leishmaniose canina não são positivos. Se por um lado inúmeros avanços foram alcançados no que concerne à recuperação clínica do animal, por outro, a taxa de cura parasitológica ainda tem sido muito baixa, de aproximadamente 20% (ALVAR et al., 2004).

A Nota Técnica de 30/01/2004, a Organização Mundial da Saúde (OMS) proíbe o uso do Glucantime para tratamento canino. Embora haja ausência temporária dos sinais clínicos após tratamento, este não apresenta eficácia, não diminui a importância do cão como reservatório da doença, não previne as recidivas e não tem efeito limitante na infectividade dos flebotomíneos (BRASIL, 2004).

A Portaria Interministerial (Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) Nº 1.426, de 11 de julho de 2008, proíbe o tratamento da LV canina em cães infectados ou doentes, com produtos de uso humano ou produtos não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2008). Nos últimos anos, progressivamente, maiores doses de antimoniato têm sido recomendadas pela OMS e do Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA, devido ao aparecimento de resistência primária do parasito a esta droga no Sudão, Quênia e Índia (BRASIL, 2004). O aparecimento de cepas resistentes às drogas utilizadas se deve aos fatores acima descritos, como já aconteceu na medicina humana, quando no início da década de 50 a dosagem de antimoniato era de 9mg/kg/dia por 10 dias e eficácia de 80% contra

20mg/kg/dia por 20 a 30 dias para o mesmo percentual de eficiência de hoje (THOMÉ, 1999).

Considera-se que a dosagem utilizada para tratamento canino é aproximadamente dez vezes maior que a humana conduzindo a seleção de parasitas resistentes, além de ser feita indiscriminadamente, resultando em impacto negativo para o Programa Nacional de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral no Brasil que visa prioritariamente a proteção da saúde humana (BRASIL, 2006).

Além do mais a ampla diversidade de espécies e os diferentes níveis de virulência, em função da genética, são fatores que influenciam o tipo de resposta aos protocolos de tratamento, o que exige uma abordagem terapêutica específica. Por isso, tanto por razões clínicas quanto epidemiológicas é importante identificar as espécies de *Leishmania*.

## **2.9 Epidemiologia**

As transformações no ambiente provocadas pelo intenso processo migratório, em virtude de pressões econômicas e sociais, pelas distorções na distribuição de renda, pelo processo de urbanização crescente, pelo esvaziamento rural e pelas secas periódicas acarretam a expansão das áreas endêmicas e o aparecimento de novos focos de LV, facilitando ocorrência de epidemias (BRASIL, 2003). As condições sócio-econômicas, ambientais e hábitos de vida são fatores significativos na epidemiologia da LV em áreas endêmicas. Tais condições podem contribuir para que a LV seja perpetuada nas áreas rurais e periurbanas, acometendo aglomerados humanos com baixo nível sócio-econômico que vivem em condições precárias de moradia (CALDAS et al., 2001).

A epidemiologia da LV vem se alterando através do tempo. A urbanização da LV parece ter ocorrido devido à mudança de comportamento

do vetor, em consequência das modificações socioambientais, tais como o desmatamento e o processo migratório. O desmatamento reduziu a disponibilidade de animais que eram fonte de alimentação para o vetor, assim, o cão e o homem aparecem como as alternativas mais acessíveis (BARATA et al., 2005).

A infectividade dos cães difere de acordo com os diferentes níveis de sintomatologia, pois os cães sintomáticos são 4 vezes mais infecciosos que animais oligossintomáticos ou animais assintomáticos, no entanto, as baixas taxas de infectividade de cães que possuam qualquer uma das duas últimas formas clínicas de leishmaniose devem ser consideradas na epidemiologia da LV canina (MICHALSKY et al., 2007).

As doenças nos reservatórios animais podem apresentar uma forma enzoótica, e mesmo não causar danos a canídeos selvagens, ou atingir formas epizoóticas, que envolvem a disseminação rápida da doença entre uma população-reservatório não imune, o que frequentemente resulta em alta mortalidade (SILVEIRA et al., 1997). Os marsupiais (*Didelphis albiventris*) também são importantes reservatórios do ambiente silvestre e foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (BRASIL, 2003).

Dados epidemiológicos relatados ao final da década de 90 revelam a periurbanização e a urbanização da LV, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE) Camaçari (BA) e também nas epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRASIL, 2003).

Os estudos de fatores de riscos associados a dados epidemiológicos da população canina como faixa etária, sexo e raça não são numerosos (FRANÇA-SILVA et al., 2003).

No Brasil, inicialmente, Alencar; Cunha (1963) não observaram diferença de ocorrência da LV entre cães machos e fêmeas. Em Portugal, Abranches et al. (1991b) observaram a doença apenas em adultos jovens e animais idosos.

Já Feitosa et al. (2000), realizando estudo em Araçatuba (SP), observaram maior ocorrência em animais entre 1 e 3 anos de idade.

França-Silva et al. (2003) observaram prevalência semelhante em todas as idades de cães avaliados em Montes Claros (MG).

Segundo Moreira Jr. et al. (2003), o pêlo curto dos cães é considerado uma variável predisponente de infecção, bem como a presença de chiqueiros de porcos e galinheiro nos quintais e, por esta razão, a diminuição do contato dos cães com animais estabulados no ambiente peridoméstico durante a noite, quando os vetores são mais ativos, é recomendada como medida preventiva da infecção.

Recentemente em Cuiabá (MT), Almeida; Mendonça; Sousa. (2010) não detectaram diferença significativa entre as raças infectadas (sem raça definida e boxer) apesar da descrição de maior susceptibilidade da raça boxer (FRANÇA-SILVA et al., 2003). Apesar de todos os cães serem susceptíveis à infecção por *Leishmania*, tem se associado a maior frequência de casos aos cães de porte grande, pois estes têm a finalidade de guarda, habitando ambiente peridomiciliar e ficando assim mais expostos ao vetor (FEITOSA et al., 2000).

Iqbal et al. (2002) observaram que o risco de infecção é alto onde o vetor e o hospedeiro da infecção coabitam sob condições climáticas favoráveis. Sherlock (1996), comenta que a redução do uso de inseticida para controle do vetor da malária possibilitou a recuperação da densidade populacional do vetor da LV, e contribuiu para a sua dispersão.

Cães vivendo próximos a floresta estão expostos a um maior risco, assim como os que vivem em casas onde há presença de didelfídeos (CABRERA et al. 2003). Outro fator de risco adicional é o histórico de coinfeção com outras etiologias como por *Neospora caninum* (CRINGOLI et al., 2002).

## 2.10 Controle

Dentro do Programa de Controle da LV, preconizado pelo Ministério da Saúde, a vigilância epidemiológica é um dos seus componentes, cujos objetivos são reduzir as taxas de letalidade e o grau de morbidade da doença em humanos. Assim, as estratégias de controle estão centradas e dirigidas no diagnóstico e tratamento adequado dos casos humanos; controle do reservatório canino através de inquérito sorológico e eutanásia dos animais sororreagentes; bem como aplicação de inseticidas de ação residual para combate ao vetor (BRASIL, 2004).

No que se refere às atividades de educação em saúde é importante que o material informativo sobre LV a ser utilizado contenha mensagem clara e pedagógica. No Brasil o material educativo que vem sendo distribuído reduziu significativamente a complexidade da informação sobre a doença, contudo, segundo especialistas, ainda persiste a linguagem imprópria (demasiadamente técnica) e erros conceituais sobre o assunto (LUZ; SCHALL; RABÉLLO;2005).

O programa de controle da LV se baseia em três medidas prioritárias: o diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, aplicação de inseticida contra os flebotomíneos e inquérito sorológico e eliminação de cães soropositivos (BRASIL, 2004).

Essas medidas de controle permanecem as mesmas desde a década de 50 (DEANE, 1956) e atualmente não estão sendo capazes de reduzir a incidência de casos humanos a níveis aceitáveis (DESJEUX, 1991; COSTA; VIEIRA, 2001; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Ao contrário, o impacto da LV tem aumentado e a doença tem se tornado um grave problema de saúde pública na maioria dos Estados da Federação. Apesar da epidemiologia da doença ser conhecida no Brasil o controle ainda não foi satisfatoriamente alcançado (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Devido aos diversos fatores ecológicos, epidemiológicos, educacionais e socioeconômicos, o controle da doença em países em desenvolvimento da

América do Sul é muito mais complexo do que em países desenvolvidos, a exemplo da Espanha, onde os casos de LV registrados, estão frequentemente associados à co-infecções com o HIV (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

O plano de controle vetorial com medidas de saneamento ambiental, baseia-se na limpeza áreas urbanas públicas e habitacionais e evitando o estabelecimento de criadouros; controle químico utilizando aspersão com inseticida de ação residual para o inseto adulto, observando a metodologia específica para cada zona de vigilância; ações educativas voltadas à comunidade, considerando os diferentes aspectos socioculturais e níveis de compreensão do público a ser sensibilizado (BRASIL, 2006; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Devido ao impacto ambiental e ao risco do aparecimento de cepas vetoriais resistentes, o uso do inseticida tem sido bastante reduzido nos últimos anos. Quando o seu uso é inevitável, são necessárias precauções imprescindíveis como a capacitação de pessoal para a aplicação do mesmo, utilização de equipamentos de proteção individual apropriados e monitoramento dos níveis da enzima acetilcolinesterase nos trabalhadores, quando os inseticidas utilizados são os carbamatos e/ou os organofosforados (TAUIL, 2006).

A OMS recomenda a eutanásia dos cães portadores da infecção, apesar de ser muito criticada, por questões éticas, emocionais e econômicas. Além disso, estudos, realizados em países onde a eutanásia é adotada como medida de controle, mostram resultados pouco satisfatórios (ASHFORD et al., 1998; PALATINIK-DE-SOUSA et al., 2001). Essa medida leva a diminuição da transmissão da LV na área de cobertura com duração apenas de médio prazo, sendo que algum tempo após sua interrupção, a incidência e a prevalência da infecção voltam a atingir os antigos níveis (MORENO; ALVAR, 2002).

A eliminação de hospedeiros reservatórios, particularmente de cães soropositivos, tem sido largamente empregada no Brasil (LACERDA, 1994). Além de ser socialmente rejeitada (ALMEIDA et al., 2005), essa medida

apresenta um baixo impacto sobre a incidência da LV em humanos (ASHFORD et al., 1998; DIETZE et al., 1997; COURTENAY et al., 2002). Isso tem estimulado a busca de novas alternativas para o controle da doença.

Uma vacina (Leishmune®; Fort Dodge Saúde Animal) contra LV em cães foi recentemente registrada no Brasil (DANTAS-TORRES, 2006b). A vacina Leishmune® é uma vacina altamente purificada, que exige meios de cultura específicos e cuja produção é bastante complexa (BORJA – CABRERA et al., 2002), trata-se de uma vacina de subunidade, ou seja, é obtida de uma glicoproteína existente na membrana do protozoário (*Leishmania*) capaz de estimular a produção de anticorpos. A vacina é de uso exclusivo dos médicos veterinários e deve ser aplicada em cães soronegativos e assintomáticos a partir dos quatro meses de idade. Devem ser administradas três doses com intervalos de 21 dias entre elas. É recomendada a revacinação anual dos animais. (NOGUEIRA et al., 2005). Estudos apontam que essa vacina induz níveis de proteção satisfatórios (BORJA-CABRERA et al., 2002). A adoção desta forma de prevenção obriga o proprietário do animal vacinado a adotar outras medidas concomitantemente, como o uso de coleira repelente e telas de proteção no canil, durante o período da primovacinação. Para humanos, entretanto, apesar dos avanços nas pesquisas, atualmente não existe vacina comercialmente disponível (COLER; REED, 2005; SUKUMARAN; MADHUBALA, 2004).

Outra alternativa é o uso de coleiras impregnadas com inseticidas em cães tem reduzido o risco de infecção entre estes animais (DAVID et al., 2001; REITHINGER et al., 2004; RIBEIRO et al., 2005) e, indiretamente, para o homem, como verificado no Irã (GAVGANI et al., 2002).

No sul da Itália Maroli et al (2001), avaliaram a eficácia da coleira com deltametrina a 4%, sobre a incidência da LV canina. O encoleiramento ocorreu em duas temporadas consecutivas de transmissão, com 350 em 1998 e 354 caes em 1999 cães na cidade de San Sebastiano al Vesuvio (70% da população canina). O grupo controle de cães (371 cães e 264 cães em 1998 e 1999, respectivamente) era de quatro cidades da mesma área. Antes de cada

estação de transmissão, a soroprevalência da LVC nas cidades de intervenção e controle foi avaliada por amostragem e considerada semelhantes (cerca de 15% em 1998 e 10% em 1999, respectivamente). Após cada período de transmissão, os índices de incidência de soroconversões foram avaliados. O aumento nos índices de soroconversão registrados nos cães controle sugere um aumento na força de infecção da *Leishmania* no agente canino durante a estação de flebotomíneos de 1999, como apoiado pelo aumento concomitante de casos humanos nas cidades controle e em toda a região do estudo. Os resultados da pesquisa sugerem que o impacto do uso em massa da coleira impregnada com deltametrina a 4% em cães sobre a incidência de LV pode ser insignificante durante as estações de baixa transmissão, ou provavelmente em focos endêmicos fracos, mas pode ser muito forte quando a força de transmissão é alta.

Em 2002 Gavvani et al. (2002), realizaram um estudo no Irã, em área de foco de leishmaniose visceral zoonótica, onde buscou-se avaliar a proteção das crianças contra a infecção, utilizando-se a coleira impregnada com deltametrina a 4% nos cães das comunidades do estudo. Observou-se que a coleira não só protege os cães domésticos, mas também pode reduzir o risco de infecção em crianças.

No Brasil Reithinger et al (2004) realizaram um estudo em área endêmica de LV do estado de Minas Gerais, utilizando a coleira impregnada com deltametrina a 4% em 136 cães e um grupo controle de 97 cães sem proteção. Estes autores concluíram que o impacto epidemiológico é maior com a utilização da coleira do que a estratégia da eutanásia, entretanto este depende da cobertura do uso e das taxas de perdas da coleira.

Ferroglio; Poggi; Trisciuglio (2008) pesquisaram a eficácia da solução em spot-on de permetrina 65% (Exspot<sup>®</sup>, Schering-Plough) e coleira impregnada com deltametrina (Scalibor<sup>®</sup>, Intervet) na redução da infecção por *Leishmania*, em uma região endêmica (Liguria), na Itália. Dos 120 cães tratados com spot-on de permetrina e dos 119 cães tratados com a coleira apenas 2,5% soroconverteram após a estação de transmissão, enquanto que

nos cães do grupo controle a soroconversão foi de 15%. Conclui-se que os dois tratamentos são eficazes na redução do risco de adquirir infecção por Leishmania.

No Brasil, no município de Andradina (SP) com 55.161 habitantes e 15.600 cães, Camargo-Neves et al (2006) realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a eficácia de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% no controle da LV. Um estudo coorte em cães foi implementado entre outubro de 2002 e abril de 2004, encoleirando-se todos os cães soronegativos que viviam na cidade. Os cães soropositivos foram eutanasiados. Durante o período da intervenção foi verificada uma redução de prevalência canina de 10,8% em 2002 para 4,8% em 2004 acompanhado de uma redução em casos humanos (de 19 casos em 2002 para 02 casos em 2004). Estes resultados indicaram que o uso de coleiras é eficaz no controle da LV quando associadas a outras medidas. A redução observada nos indicadores ocorreu provavelmente devido à diminuição da força da infecção entre os cães, que resultou em menor chance do vetor infectar devido à barreira imposta pelo uso constante da coleira. Estes resultados apontaram para a utilização da coleira como mais um método a ser empregado no controle da LV. Ressalta-se que em saúde pública só faz sentido se aplicada de modo integral e, ao que parece, por tempo indeterminado. Deve ser um programa com o envolvimento de outros setores da sociedade, participação comunitária e individual, e deverá estar associado a um programa de controle de população animal.

As medidas de controle devem ser aplicadas levando-se em consideração a correlação espacial e todos os indicadores socioeconômicos e demográficos a fim de se concentrar as intervenções em áreas de alto risco para se obter o controle da doença em área urbana de modo eficaz (ALMEIDA; MEDRONHO; WERNECK, 2011), além disso, seria fundamental que o Ministério da Agricultura (MAPA) exigisse exames sorológicos negativos para permitir a entrada de animais de zona endêmica para zona indene, antes de autorizar guia de trânsito (THOMAZ-SOCCOL et al., 2009), dessa forma impedindo a dispersão da doença.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar a ocorrência e características da LV em humanos e cães no município de Campo Grande.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Descrever o perfil e a distribuição geográfica de casos notificados de leishmaniose visceral na área urbana do município de Campo Grande/MS/Brasil entre 2002 e 2009.
- Avaliar o efeito do uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em um programa de controle da leishmaniose visceral, na redução da incidência canina da doença.
- Demonstrar a associação da distribuição espacial dos casos caninos e humanos de leishmaniose visceral nas regiões do município de Campo Grande.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

##### **Local do Estudo:**

O estudo foi realizado no Município de Campo Grande, capital do Estado de Mato Grosso do Sul, que se localiza na região Centro-Oeste do Brasil, possui uma área territorial de 8.092,974km<sup>2</sup>, está localizado geograficamente na porção central de Mato Grosso do Sul, ocupando 2,26% da área total do Estado. A sede do município localiza-se nas imediações do divisor de águas das Bacias do Paraná e Paraguai, definida pelas coordenadas geográficas 20°26'34" latitude Sul e 54°38'47" longitude Oeste, e a sua altitude varia entre cotas 500 e 675 metros.

Possui 786.797 habitantes, com uma taxa de urbanização de 98,66% distribuídos em 35.302,82 ha. O Clima segundo a classificação de Koppen, situa-se na faixa de transição entre o sub-tipo (Cfa) mesotérmico úmido sem estiagem ou pequena estiagem e o sub-tipo (Aw) tropical úmido, com estação chuvosa no verão e seca no inverno. Campo Grande está dividido em sete grandes regiões urbanas: Anhanduizinho, Bandeira, Centro, Imbirussu, Lagoa, Prosa e Segredo, que ainda são subdivididos em setores denominados Novos Bairros (PMCG, 2008).

O estudo utilizou dados sobre os casos humanos de LV notificados e autóctones referentes ao ano de 2009 obtidos a partir das Fichas de Notificação do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), sob responsabilidade da Secretaria Municipal de Saúde Pública, Campo Grande, MS (SESAU), com acesso finalizado em setembro de 2010. As informações dos casos de LV em cães foram obtidas do Sistema de Informações de Controle da Leishmaniose (SCL) mantido pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Campo Grande, MS.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em 27/06/2008, sob registro nº1212.

As metodologias empregadas encontram-se descritas nos respectivos artigos científicos, os quais são apresentados a seguir.

## **5. RESULTADOS**

## **5.1 Artigo 01**

**“Profile and geographic distribution of reported cases of visceral leishmaniasis in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, from 2002 to 2009”**

**“Perfil e distribuição geográfica de casos notificados de leishmaniose visceral na cidade de Campo Grande/MS/Brasil entre 2002 e 2009”**

Publicado pela Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 45(5):601-606, Sep-Oct, 2012.

# Profile and geographic distribution of reported cases of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil, from 2002 to 2009

Júlia Cristna Maksoud Brazuna<sup>[1],[2]</sup>, Elaine Araujo e Silva<sup>[2]</sup>, Júlio Maksoud Brazuna<sup>[3]</sup>, Iara Helena Domingos<sup>[2]</sup>, Neuma Chaves<sup>[2]</sup>, Michael Robin Honer<sup>[4]</sup>, Valter Joost van Onselen<sup>[1]</sup> and Ana Lúcia Lyrio de Oliveira<sup>[1],[2]</sup>

[1]. Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. [2]. Centro de Controle de Zoonoses, Secretaria Municipal de Saúde Pública, Campo Grande, MS. [3]. Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, Campo Grande, MS. [4]. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS.

## ABSTRACT

**Introduction:** This study sought to describe the profile and geographic distribution of reported cases of visceral leishmaniasis (VL) in the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul (MS), Brazil, from 2002 to 2009. **Methods:** Human data were collected from the Brazilian National Information System for Notifiable Diseases. Canine cases and entomological data were obtained from the Information Service for Canine Visceral Leishmaniasis Control/Campo Grande, MS. **Results:** A total of 951 records from 2002 to 2009 were investigated. The number of reported cases of VL in males was significantly higher ( $p < 0.0001$ ) than that in females. The higher frequency observed among males was associated with age ( $p < 0.0001$ ), which increased in individuals aged 40 years and older. The overall fatality rate was 7.4%. Entomological surveys conducted in 2006, 2007, and 2009 showed the insect vector *Lutzomyia longipalpis* to be present in all urban regions of the county. **Conclusions:** VL cases in humans and dogs, as well as in vectors, occurs in all urban regions of Campo Grande. Despite not observing tendencies of increase or reduction in the incidence of the disease due to aging, the major incidence in men is higher in those aged 40 years or above.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis. Epidemiology. Risk factors.

## INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL), a potentially fatal parasitic zoonosis, is a frequently occurring disease in the Indian subcontinent, East Africa, and South America<sup>1</sup>. In Brazil, VL is caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). Fatal if untreated, VL has a wide clinical spectrum of signs and symptoms. These can be moderate to severe and are often characterized by fever, pallor, and hepatosplenomegaly, sometimes including diarrhea and/or nonproductive cough, features that are often shared with other infectious processes<sup>2</sup>, including human immunodeficiency virus (HIV), malaria, diarrhea caused by other etiologies, hepatitis, and other causes.

Visceral leishmaniasis is transmitted by infected female sandflies, particularly *Lutzomyia longipalpis*, dipterous insects of the family Psychodidae<sup>3</sup>. In a localized outbreak of the disease in the county of Corumbá, state of Mato Grosso do Sul (MS), *L. cruzi* was identified as the main vector species<sup>4</sup>.

Visceral leishmaniasis diagnosis has been largely based on microscopic examination of thin smears of bone marrow, although serological and molecular methods constitute less invasive alternatives currently in use.<sup>1</sup>

A number of factors facilitate VL transmission. Poor housing and sanitation, often resulting from fast, unplanned population growth, particularly in developing countries, provide a favorable environment for transmission of infectious and parasitic diseases<sup>5</sup>.

Mato Grosso do Sul, in southwestern Brazil, has recently undergone environmental changes such as the construction of a gas pipeline and the destruction of cerrado vegetation that may have played a role in the spread of vectors. In Campo Grande, the state capital, the laying down of avenues bordering water courses and the clearing of native vegetation to make way for low-income housing developments have had a major impact on the environment. The high ratio of *L. longipalpis* occurrence relative to other phlebotomine species in areas of human and canine leishmaniasis cases reflects the insect's role as a VL vector in the Brazil<sup>6</sup>. The disease gained endemic status with the first reported autochthonous cases in dogs in 1998 and humans in 2002.

This study sought to describe the profile and geographic distribution of reported cases of VL in Campo Grande, MS, Brazil between 2002 and 2009.

## METHODS

Campo Grande (26°34'S, 54°38'47"W) covers 8,118.4km<sup>2</sup> of the central portion of MS, accounting for 2.3% of the state's area. The urban area of Campo Grande is formally divided into 7 regions—Anhanduizinho, Bandeira, Centro, Imbirussu, Lagoa, Prosa, and Segredo<sup>8</sup>.

Retrospective data of human VL cases from January 2002 to December 2009 were collected from the records of the Brazilian National Information System for Notifiable Diseases (Sistema de Informação de Agravos de Notificação [SINAN]), managed by the Municipal Health Office of Campo Grande (Secretaria Municipal de Saúde Pública [SESAU]). Data collection ended in September 2010. The following variables were analyzed for all reported autochthonous cases: a) *personal data*: age, gender, county region of residence; b)

**Address to:** Dra. Júlia Cristna Maksoud Brazuna. CCZ/Secretaria Municipal de Saúde Pública. Av. Senador Filinto Muller 1601, 79074-460 Campo Grande, MS, Brasil.

**Phone:** 55 67 3313-5018; Fax 55 67 3314-9501

**e-mail:** maksoudbrazuna@gmail.com

**Received in** 29/09/2011

**Accepted in** 19/04/2012

**diagnostic method:** enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect fluorescent antibody test (IFAT), direct parasitological examination; c) **symptoms or clinical signs:** fever, splenomegaly, hepatomegaly, weakness, weight loss, and cough and/or diarrhea. Co-infection with human immunodeficiency virus; and d) **case outcome:** death or treatment.

Two factors related to transmission of VL to humans were assessed: a) **visceral leishmaniasis in dogs:** the number of occurrences in each urban region was obtained from the Information Service for Canine Visceral Leishmaniasis Control (SCL), managed by the county's Center for Zoonosis Control (Centro de Controle de Zoonoses [CCZ]). Data from the SCL's serosurvey records were limited to 2007-2009, given the inconsistency of records prior to this period. The laboratory methods for VL diagnosis in dogs included screening by ELISA and IFAT for confirmation of disease. The kits were provided by the Biomanguinhos laboratory (*Fundação Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Brazil); and b) **vector presence:** data regarding *L. longipalpis* presence were collected from entomological surveys conducted in 2006, 2007, and 2009. In all districts of each urban region, sandflies were collected using 2 traps per household (1 indoors, 1 outdoors). For 3 consecutive nights, the traps were installed at dusk and collected in the morning. Household selection took into account the presence of plants (trees and shrubs), accumulated organic matter, and domestic animals (dogs and chickens)-elements suggestive of vector presence.

Descriptive statistical analysis was performed, and frequencies were calculated for the variables. The statistical significance of the association between variables was determined using the chi-squared test, considering a type I error probability of 1% ( $\alpha = 0.01$ )<sup>9</sup>.

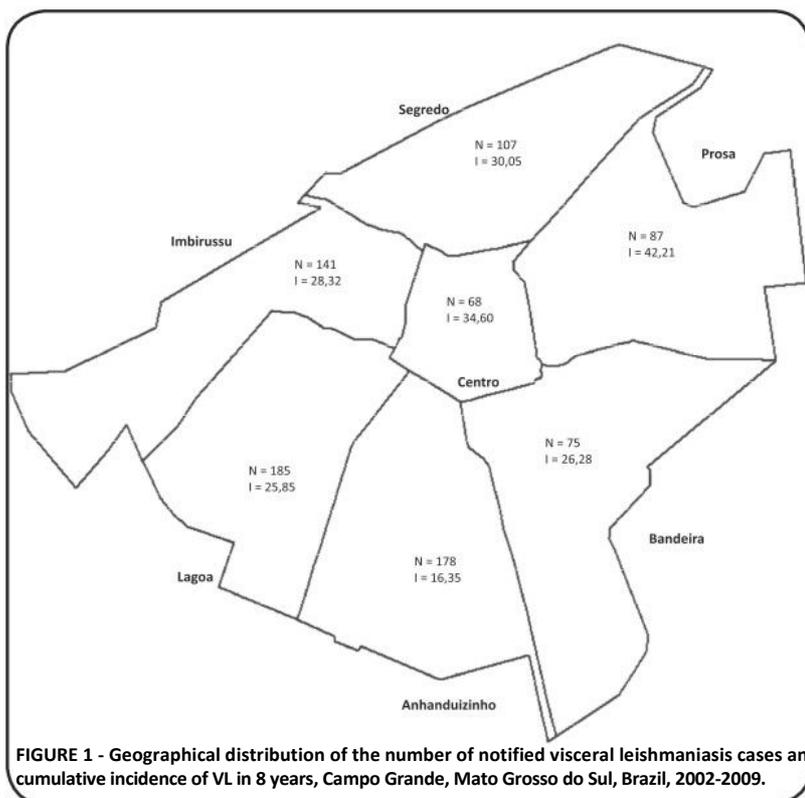


FIGURE 1 - Geographical distribution of the number of notified visceral leishmaniasis cases and cumulative incidence of VL in 8 years, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, 2002-2009.

VL: visceral leishmaniasis; I: rate per 10,000 inhabitants; N: number of cases.

## Ethical considerations

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (permit 1212, obtained on June 27, 2008).

## RESULTS

From January 1, 2002, to December 31, 2009, a total of 951 autochthonous cases of VL were reported in Campo Grande (98.9% or 941 cases in the urban area, 0.5% or 5 cases in the rural districts, and 0.5% or 5 cases without records for location).

The distribution of human cases by region is shown in **Figure 1**.

The records of VL cases at the SESAU began in 2002, peaking in 2006 during the period investigated (**Table 1**). Cases were diagnosed and reported in every month during the study period, with higher rates observed from September to March. September had the highest rate, which was 10.8% throughout the period of the study.

A significantly higher number of cases were reported in males ( $p < 0.0001$ ) than in females. The higher rates observed among males were associated with age ( $p < 0.0001$ ), which increased in individuals aged 40 years and older (**Table 2**).

Over a third of cases occurred in patients younger than 10 years of age. Slightly less than half of the patients were under 20 years of age (**Table 2**). Although the number of reported cases differed significantly ( $p < 0.0001$ ) between age groups, an increase or reduction in the proportion of individuals in extreme age ranges was not observed.

The overall fatality rate was 7.4% during the study period, where the referred rate for males is 8.9%, and for females is 4.5%, with higher values among patients aged 60 years and older (**Table 2**).

In most cases (730/951 or 76.8%), diagnosis was based on parasitological examination, with 79.5% of individuals testing (580/730) positive. IFAT was performed for 45.7% of cases (435/951), of which 85.8% (373/435) were positive. ELISA was performed only from 2002-2006, for 7.6% (72/951) of cases, of which 18.1% (13/72) were positive. In cases not subjected to laboratory testing, diagnosis was based on therapeutic response.

The signs and symptoms described in the 951 records included fever (95.3%), splenomegaly (83.6%), hepatomegaly (75.8%), weakness (74.1%), weight loss (72.2%), and cough and/or diarrhea (50.68%). Co-infection with human immunodeficiency virus occurred in 7.1% of cases.

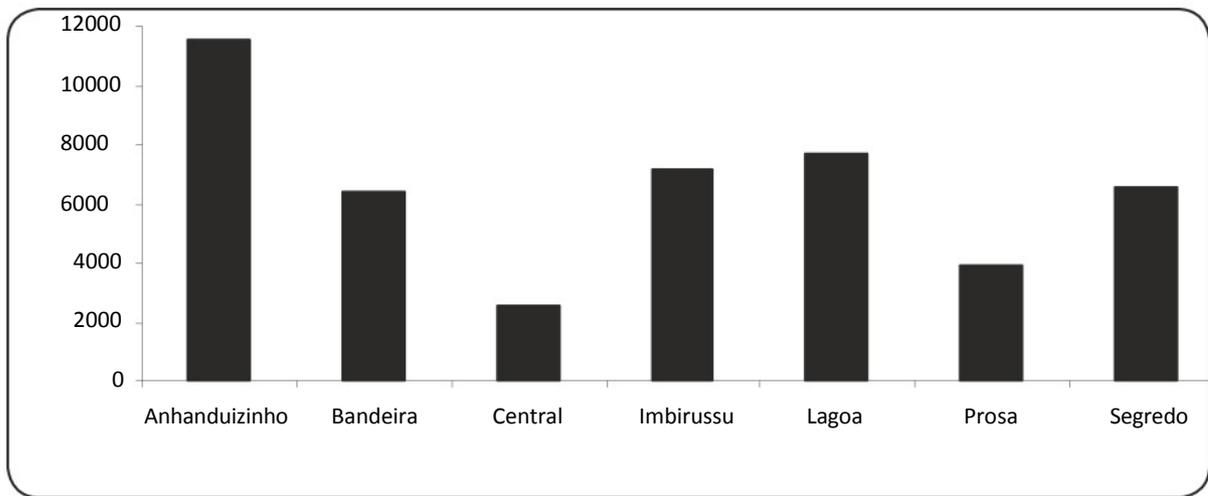
From 2007 to 2009, a total of 45,873 cases of American VL (AVL) were detected in 326,217 dogs across all urban regions of the city, 2 of which (Anhanduizinho and Lagoa) jointly accounted for 42% of canine cases (**Figure 1**).

The insect vector was found to have spread to all urban regions, as shown by capture of *L. longipalpis* specimens in all 3 entomological surveys conducted in 2006, 2007, and 2009 (**Table 3**).

**TABLE 1 - Reported autochthonous cases and incidence of visceral leishmaniasis, by urban region of residence in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, 2002-2009.**

Urban region	Year															
	2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009	
	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I
Anhanduizinho	8	5.0	36	22.1	44	26.5	43	24.8	47	26.6	39	23.1	39	22.2	22	12.4
Bandeira	1	1.0	5	4.9	9	8.6	10	9.2	14	12.6	19	18.4	14	13.0	3	2.8
Centro	2	2.5	15	18.6	14	17.1	6	7.0	11	12.5	8	10.9	5	6.5	7	9.0
Imbirussu	2	2.2	13	13.6	23	23.7	29	28.6	19	18.4	11	11.5	28	28.1	16	15.9
Lagoa	3	3.0	14	13.4	20	18.8	46	41.5	41	36.2	24	22.9	20	18.3	17	15.4
Prosa	1	1.6	5	8.0	6	9.5	9	13.6	16	23.7	23	34.3	14	20.1	13	18.5
Segredo	2	2.3	9	10.2	12	13.4	12	12.9	13	13.7	13	13.9	23	23.7	23	23.3
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>3.2</b>	<b>97</b>	<b>13.9</b>	<b>128</b>	<b>18.2</b>	<b>155</b>	<b>21.1</b>	<b>161</b>	<b>21.6</b>	<b>137</b>	<b>19.4</b>	<b>143</b>	<b>19.3</b>	<b>101</b>	<b>13.4</b>

N: number of cases; I: incidence rate per 100,000 inhabitants.



**FIGURE 2 - American visceral leishmaniasis cases in dogs, by urban region in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, 2007-2009.**

AVL: American visceral leishmaniasis.

**TABLE 2 - Number of cases, deaths, cumulative incidence and case fatality rates of visceral leishmaniasis, by age range and gender in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, from 2002-2009.**

Age range (years)	Gender											
	males				females				total			
	cases (incidence)		deaths (fatality)		cases (incidence)		deaths (fatality)		cases (incidence)		deaths (fatality)	
	N	I	N	%	N	I	N	%	N	I	N	%
< 1	45	94.0	6	13.3	30	65.7	0	0.0	75	80.2	6	8.0
1  --  4	98	51.9	1	1.0	97	53.4	1	1.0	195	52.6	2	1.0
5  --  9	60	22.3	1	1.7	40	15.3	0	0.0	100	18.9	1	1.0
10  --  19	41	7.2	1	2.4	43	7.6	0	0.0	84	7.4	1	1.2
20  --  39	147	15.3	7	4.8	72	6.9	3	4.2	219	11.0	10	4.6
40  --  59	145	26.1	17	11.7	35	5.6	4	11.4	180	15.2	21	1.7
≥ 60	79	38.8	22	27.8	17	6.7	7	41.2	96	21.1	29	30.2
Not informed	2		0		0		0		2		0	
<b>Total</b>	<b>617</b>	<b>25.2</b>	<b>55</b>	<b>8.9</b>	<b>334</b>	<b>12.8</b>	<b>15</b>	<b>4.5</b>	<b>951</b>	<b>18.8</b>	<b>70</b>	<b>7.4</b>

N: number; I: incidence rate per 100,000 inhabitants from 2002 to 2009; %: percentage.

TABLE 3 - Number of households investigated and sandflies captured, by urban region in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, 2006-2009.

Urban region	Households								
	investgated			harboring vectors			sandflies captured		
	2006	2007	2009	2006	2007	2009	2006	2007	2009
Anhanduizinho	45	84	70	20	44	34	278	1,300	646
Bandeira	33	66	55	18	23	13	215	610	1,369
Centro	39	78	65	13	21	15	125	677	299
Imbirussu	21	42	35	15	19	17	275	445	1,170
Lagoa	36	66	55	19	29	34	529	1,593	1,364
Prosa	33	66	55	13	20	14	98	874	745
Segredo	21	42	35	10	16	17	47	172	477
<b>Total</b>	<b>228</b>	<b>444</b>	<b>370</b>	<b>108</b>	<b>172</b>	<b>144</b>	<b>1,567</b>	<b>5,671</b>	<b>6,070</b>

## DISCUSSION

Drastic environmental changes caused by human activity have led some phlebotomine species to occupy urban habitats<sup>10</sup>. The literature reports the spread and urbanization of the VL vector, a process that has transformed several highly populated Brazilian centers into endemic areas for the disease. These centers include Santarém, Pará (PA), Corumbá, MS, Teresina, Piauí (PI), Natal, Rio Grande do Norte (RN), São Luis, Maranhão (MA), Fortaleza, Ceará (CE), Camaçari, Bahia (BA), and Belo Horizonte, Minas Gerais (MG)<sup>11-16</sup>.

With cases of VL occurring in all urban regions of Campo Grande since 2002, the disease can be considered endemic in the city. Anhanduizinho and Lagoa, the city's southwestern urban regions, have higher population densities and larger expanses of vegetation, favorable factors for the breeding of sandflies in addition to higher concentrations of dogs, the principal urban reservoirs of *L. chagasi*<sup>17</sup>. Higher concentrations of the vector in both regions have been reported for the 2003-2005 period<sup>6</sup>. In the present investigation, larger numbers of seropositive dogs and greater proportions of households harboring sandflies were found in both regions, placing its residents at increased risk of contracting VL.

Although sandflies can be found virtually year round, entomological surveys have revealed higher vector densities during the months with higher temperatures and higher rainfall rates<sup>18,19</sup>. Vector density varies from region to region, depending on environmental factors and control measures.

The risk of transmission is highest from December to April, the wet period associated with an increased sandfly population<sup>6,20</sup>. Weather data for Campo Grande from 2002-2009 are typical of a tropical climate, with temperatures and rainfall rates favorable for the development of the VL vector<sup>8</sup>. Variation in incubation time, time elapsed from onset of symptoms to diagnosis, and records with incomplete or missing information regarding the estimated date of infection are some factors that, in conjunction, preclude deeper analysis of the monthly distribution of reported cases. Moreover, the month in which a case is reported does not necessarily correspond to the month of infection.

As a response to the increasing incidence of AVL, public health agents intervened in the regions with the most cases (Anhanduizinho, Lagoa, and Imbirussu) by using chemical control of vector insects, eliminating animal reservoirs, and implementing environmental

management following the Health Ministry recommendations<sup>2</sup>. These initiatives could have contributed to stabilizing or quickly reducing the number of cases reported from 2007-2009 in the cited areas.

Higher VL incidence in males, also observed in other studies<sup>21-23</sup>, may be indicative of higher exposure to risk-associated environments (while not ruling out the possibility of differences between genders in defense mechanisms against VL). This fact lends support to the hypothesis that infection is not limited to the household setting, as males and females are similarly distributed across urban regions.

Studies conducted in Três Lagoas, MS<sup>21</sup>, Brasília, Federal District<sup>24</sup>, and Várzea Grande, Mato Grosso<sup>25</sup> reported a higher incidence of AVL in patents younger than 5 years, a feature possibly related to increased susceptibility to infection at an early age, when long-term immunity is developing<sup>21,24-26</sup>. This finding, also mirrored by the present study, is indicative of a transition from an epidemic to an endemic pattern of transmission.

Direct examination for parasites was also the method most often employed to confirm diagnosis in cases occurring in Recife, Pernambuco<sup>27</sup> and Três Lagoas, MS.<sup>21</sup> Reasons for the limited use of ELISA for human diagnosis include difficulties in standardization and constraints in sensitivity, specificity, availability, and cost<sup>27</sup>.

The symptoms exhibited by patents in the present investigation have also been reported in other studies conducted in Brazil<sup>21,28-30</sup>.

VL is the clinical form of leishmaniasis most associated with HIV-infected individuals. VL versus HIV co-infection, currently viewed as an emerging disease in several regions of the world, is spreading to Brazil<sup>31-33</sup>.

Death rates higher than those observed in the present study have been found in Natal, RN (9%)<sup>34</sup> and in the City of São Paulo (9.3%)<sup>30</sup>. Early diagnosis and treatment are required if morbidity and mortality from VL are to be reduced, as early-treated patients are clinically cured in 98% of cases,<sup>34</sup> while the fatality rate is near 95% in untreated cases<sup>35</sup>.

There is no tendency toward either increase or reduction in VL incidence as the age of individuals increase. VL occurred predominantly in males in all age ranges.

The higher incidence of leishmaniasis in men is elevated in the group aged 40 years or above. Fever, splenomegaly, hepatomegaly, weakness, and weight loss are frequent clinical signs in VL patients.

Leishmaniasis cases in human and dogs as well as in vectors (sandflies, *Lutzomyia longipalpis*) occur in all urban regions of Campo Grande City.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

## ABSTRACT in portuguese

### Perfil e distribuição geográfica de casos notificados de leishmaniose visceral na Cidade de Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, entre 2002 e 2009

**Introdução:** O objetivo deste trabalho foi descrever o perfil e a distribuição geográfica de casos notificados de leishmaniose visceral, na Cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS), Brasil, entre os anos de 2002 e 2009. **Métodos:** Os dados de casos humanos foram obtidos a partir da Ficha de Notificação do Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Os casos caninos e dados entomológicos foram obtidos do Sistema de Controle de Leishmaniose/Campo Grande, MS. **Resultados:** Foram notificados 951 casos de leishmaniose visceral entre 2002 e 2009. A ocorrência destes nos indivíduos do sexo masculino foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) do que nos do sexo feminino. Essa superioridade na frequência de notificações em homens associou-se à idade ( $p < 0,0001$ ), sendo mais intensa nos indivíduos com idade igual ou superior a 40 anos. O coeficiente de letalidade foi de 7,4%. O levantamento entomológico feito em 2006, 2007 e 2009 demonstrou dispersão do vetor em todas as regiões urbanas do município com captura de *L. longipalpis* nos três anos. **Conclusões:** Casos de LV em humanos e em cães assim como o vetor ocorrem em todas as regiões urbanas Campo Grande. Embora não haja tendência de aumento, nem de redução na incidência da doença à medida que a idade dos indivíduos aumenta, a superioridade na incidência em homens é maior no grupo de pessoas com idade igual ou superior a 40 anos.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose visceral. Epidemiologia. Fatores de risco.

## REFERENCES

- Mondal S, Bhattacharya P, Ali N. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Rev Ant Infect Ther* 2010; 8:919-944.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
- Gontjo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004; 7:338-349.
- Santos SO, Arias JR, Ribeiro AA, Hoffman MP, Freitas RA, Malacco MAE. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of american visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1998; 12:315-317.
- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95:239-243.
- Silva EA, Andreot R, Honer MR. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:420-425.
- Prefeitura Municipal de Campo Grande. Coordenadoria de Vigilância em Saúde. Serviço de Vigilância Epidemiológica. SINAN. Relatórios SESAU-2002. Campo Grande: Secretaria Municipal de Saúde; 2005.
- Prefeitura Municipal de Campo Grande. Perfil Sócio-Econômico de Campo Grande. Campo Grande: Instituto Municipal de Planejamento Urbano; 2008.
- Sampaio IBM. Estatística aplicada à experimentação animal. 3<sup>rd</sup> ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte; 2007.
- Rangel EF. Transmission of american cutaneous leishmaniasis in peridomestic foci in Rio de Janeiro State and other similar situation comparing with the classic epidemiology in Amazon Brazil. *Proceedings from a research seminar Tdr Sarec, Stenungsund, Sweden. Vol. 2; p. 103-110; 1995.*
- Marzochi MCA, Sabroza PC, Toledo LM, Marzochi KBF, Tramontano NC, Rangel Filho FB. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro -Brasil. *Cad Saude Publica* 1985; 1:5-17.
- Genaro O, Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL, et al. Ocorrência de calazar em área urbana da Grande Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop* 1990; 23:121.
- Costa CHN, Pereira HF, Araújo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Rev Saude Publica* 1990; 24:361-372.
- Tesh RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52:287-292.
- Castro AG. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 1996.
- Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91:671-683.
- Alencar JE. Leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Assoc Med Bras* 1958; 4:222-236.
- Resende MC, Camargo MCV, Vieira JRM, Nobi RCA, Porto MN, Oliveira CL, et al. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39:51-55.
- Almeida PS, Minzão ER, Minzão LD, Silva SR, Ferreira AD, Faccenda O, et al. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:723-727.
- Silva EA, Andreot R, Dias ES, Barros JC, Brazuna JCM. Detecton of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Exp Parasitol* 2008; 119:343-348.
- Oliveira ALL, Paniago AMM, Dorval MEC, Leal CR, Sanches M, Cunha RV, et al. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39:446-450.
- Glória MRB. Leishmaniose visceral: situação epidemiológica e distribuição espacial, município de Palmas, Tocantins. [Masters Dissertaton]. [Rio de Janeiro]: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca; 2006. 98 p.
- Carranza-Tamayo CO, Carvalho MSL, Bredt A, Bofill MIR, Rodrigues RMB, Silva AD, et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:396-399.
- Missawa NA, Borba JF. Leishmaniose visceral no município de Várzea Grande, Estado de Mato Grosso, no período de 1998 a 2007. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42:496-502.
- Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 1986; 154:639-649.
- Queiroz MJA, Alves JGB, Correia JB. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. *J. Pediatr (Rio J.)* 2004; 80:141-146.
- Alencar JE, Aragão T. Leishmaniose visceral no Ceará. Sintomas observados em 174 casos. Diagnóstico clínico. Paper presented at: XII Congresso Brasileiro de Higiene. Belém, PA, Brazil; 1955.
- Pedrosa CMS, Rocha EMM. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37:300-304.
- Pastorino AC, Jacob CMA, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MMS. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *J Pediatr* 2002; 78:120-127.
- Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna E. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica* 2008; 24: 2941-2947.

31. Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97:3-15.
32. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Leishmania*-HIV. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
33. Jeronimo SMB, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop med Hyg* 1994; 88:386-388.
34. Fernández-Guerreiro ML, Aguado JM, Buzon L, Barros C, Montalban C, Martín T, et al. Visceral leishmaniasis in immunocompromised hosts. *Am J Trop Med* 1987; 83:1098-1102.
35. Costa JML, Viana GMC, Saldanha ACR, Nascimento MDSB, Alvim AC, Buratni MN, et al. Leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. *Cad Saude Publica* 1995; 11:321-324.

## **5.2 Artigo 02**

**Efeito da coleira impregnada com deltametrina a 4% em programa de controle da leishmaniose visceral canina: um estudo de Coorte.**

## **Efeito da coleira impregnada com deltametrina a 4% em programa de controle da leishmaniose visceral canina: um estudo de Coorte**

Júlia Cristina Maksoud Brazuna<sup>1,2</sup>, Júlio Maksoud Brazuna<sup>3</sup>, Iara Helena Domingos<sup>2</sup>, Ana Paula Antunes Nogueira<sup>2</sup>, Michael Robin Honer<sup>4</sup>, Valter Joost Van Onselen<sup>1</sup>, Ana Lúcia Lyrio de Oliveira<sup>1</sup>

1. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil;
  2. Secretaria Municipal de Saúde Pública de Campo Grande, MS, Brasil;
  3. Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP), Campo Grande, MS, Brasil;
  4. Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande, MS, Brasil;
- Correspondência:** Júlia Cristina Maksoud Brazuna. Secretaria Municipal de Saúde Pública; Centro de Controle de Zoonoses; Avenida Senador Filinto Müller, 1601; Campo Grande, MS 79074-460, Brasil;  
Tel. +55-67-3313-5018; fax +55-67-3314-9501. E-mail: maksoudbrazuna@gmail.com

### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em programa de controle da leishmaniose visceral, na incidência canina da doença. O trabalho foi conduzido no município de Campo Grande, MS, Brasil. Um estudo de coorte foi realizado de junho de 2007 a junho de 2009 acompanhando dois grupos, sendo um que não recebeu a coleira com 315 cães e outro com 14.149 cães que recebeu a coleira. As coleiras foram usadas pelos animais de forma ininterrupta e trocadas a cada seis meses. A incidência da leishmaniose nos animais que participaram do estudo foi de 33,72%, havendo associação significativa ( $p < 0,0001$ ) entre o diagnóstico da leishmaniose visceral e o uso da coleira impregnada com deltametrina a 4%, com menor incidência da doença no grupo de cães que usaram a coleira. A intensidade da ação protetora da coleira pode ser avaliada pelo Risco Relativo, que foi igual a 2,56. Esta razão de incidências representa a forte associação que ocorreu entre o uso da coleira e a ocorrência de leishmaniose. A redução na incidência da leishmaniose com o uso da coleira pode ser medida pelo Risco Atribuível, que foi de 0,51, o que significa uma queda em mais de 50 pontos percentuais na incidência da doença com o uso da coleira impregnada com deltametrina a 4%. No grupo de cães que usaram a coleira ininterruptamente o *odds* foi de 1:2,07, indicando que a chance de um animal usando a coleira apresentar a doença é de aproximadamente um contra dois de não apresentar. Esta chance, quando os animais não usam a coleira é aproximadamente dez vezes maior. Os cães que participaram do estudo eram, em sua maioria, de pequeno ou médio porte, que tiveram uma incidência de leishmaniose significativamente ( $p < 0,05$ ) menor do que os de grande porte apenas no grupo de animais que usavam a coleira. Conclui-se que o uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em programas de controle da

leishmaniose que incluem a eutanásia de cães soropositivos, borrifação residual com inseticidas, manejo ambiental e ações de educação e saúde para a população, reduz o risco da doença em cães.

Palavras chave: colar, inseticida, reservatório canino.

## **Introdução**

A leishmaniose visceral (LV) ainda é uma das doenças mais negligenciadas no mundo, afetando com maior frequência a população mais pobre, principalmente nos países ainda em desenvolvimento. Nos últimos 10 anos grandes avanços científicos foram alcançados no diagnóstico, tratamento e prevenção da leishmaniose e os preços de vários medicamentos essenciais foram reduzidos. Muito embora estas novas tecnologias tenham facilitado a implementação sustentável de programas de controle da doença, programas nacionais e regionais de controle em andamento ainda são raros, de modo que a mortalidade e a morbidade em todo o mundo apresentam-se como uma preocupante e crescente tendência (WHO, 2010).

A distribuição geográfica das leishmanioses tem sofrido alterações nos últimos anos, pois vários casos estão sendo descritos em áreas que não eram endêmicas. A urbanização e alterações do meio ambiente são fatores que devem estar relacionados com a expansão desta doença. A interação entre as mudanças ambientais urbanas e a presença de flebotomíneos vetores são pré-requisitos fundamentais para a compreensão da epidemiologia e adoção de medidas preventivas e estratégias de controle (WHO, 2002).

Nas áreas peri-urbanas e urbanas o cão é o principal reservatório do parasita e sua introdução em novo ambiente pode ser responsável pela origem de novos focos (Marzochi et al., 1994).

As estratégias de controle da LV estão centradas no diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos, monitoramento e eutanásia de cães sororreagentes, redução da população de flebotomíneos por meio de controle químico, medidas preventivas e atividades de educação em saúde. Destaca-se que estas medidas devem ser realizadas de forma integrada para que possam ser realmente efetivas (Brasil, 2006).

A leishmaniose visceral canina possui uma importância epidemiológica cada vez maior em parte do Mediterrâneo e na América Latina, sendo o cão o principal reservatório da doença nessas regiões, infectando flebótomos que contaminam seres humanos. A contaminação de pessoas com co-morbidades, principalmente as portadoras do vírus HIV (Human Immunodeficiency Virus), agrava o caso e aumenta a morbidade e a letalidade em humanos. Na existência da leishmaniose visceral zoonótica estas considerações fornecem justificativas adicionais à eutanásia dos animais enfermos (WHO, 2010).

Uma nova alternativa de controle da LV utilizando coleiras para cães, impregnadas com o inseticida deltametrina a 4% já foi testada em diversos países. No Irã, Gavvani et al. (2002) conduzindo um estudo em 18 vilas obtiveram como resultado a redução do risco de infecção por LV em crianças e a redução da incidência de leishmaniose em cães. No trabalho de Aoun et al. (2008), realizado na Tunísia, os 42 cães que utilizaram a coleira impregnada com deltametrina a 4% não adquiriram a doença após serem expostos ao risco da transmissão, enquanto 15,8% dos 38 cães que não usaram a coleira se tornaram positivos.

No Brasil, o estudo conduzido por Camargo-Neves et al. (2004) no município de Andradina, SP, envolveu 15.600 cães e o uso da coleira impregnada com deltametrina a 4%. Os autores observaram redução na prevalência canina de leishmaniose de 10,8% em 2002 para 4,8% em 2004 e uma redução dos casos humanos de 19 casos em 2002 para apenas dois casos em 2004.

O controle da LV em áreas urbanas tem sido um desafio para os órgãos públicos de saúde, tendo em vista as dificuldades operacionais das ações necessárias, apontando para a necessidade de maiores investimentos na área técnico-científico visando o aprimoramento das medidas de vigilância e controle da leishmaniose visceral.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em um programa de controle da leishmaniose visceral, na redução da incidência canina da doença.

## Metodologia

O trabalho foi conduzido no município de Campo Grande, que possui uma área territorial de 8.118,4km<sup>2</sup> e está localizado geograficamente na porção central do estado de Mato Grosso do Sul (MS) / Brasil - latitude Sul 20°26'34" e latitude Oeste 54°38'47". O Município ocupa 2,27% da área total do Estado e a área urbana é dividida em sete regiões: Anhanduizinho, Bandeira, Centro, Imbirussu, Lagoa, Prosa e Segredo. O clima é mesotérmico a tropical úmido (classificação de Koppen), com estação chuvosa no verão e seca no inverno. No período de 2007 a 2009 a temperatura anual média foi de 26,7°C e a média anual de precipitação pluviométrica foi de 1.611,42mm (PMCG, 2008).

A estimativa da população humana para o município de Campo Grande em 2007 é de 724.524 habitantes (IBGE, 2008), com incidência de leishmaniose visceral igual a 1,94 por 10.000 habitantes no mesmo ano (Brazuna, JCM: dados não publicados). A população canina em 2006 totalizou 129.528 cães (PMCG, 2006) e, no ano de 2007 a prevalência da leishmaniose canina foi de 15,96% (Brazuna, JCM: dados não publicados).

Um estudo de coorte foi realizado acompanhando de junho de 2007 a junho de 2009 dois grupos de animais com mais de quatro meses de idade que inicialmente apresentavam diagnóstico negativo para leishmaniose visceral, sendo um que não recebeu a coleira com 315 cães e outro com 14.149 cães que recebeu a coleira.

As coleiras impregnadas com deltametrina a 4% foram usadas pelos animais de forma ininterrupta e trocadas a cada seis meses, sendo colocadas em junho e dezembro de 2007 e 2008. Estas coleiras, fabricadas de polivinil clorido (PVC) impregnado com 40mg/g de deltametrina, pesavam 25g e mediam 65cm. O tamanho das coleiras foi ajustado no momento da sua colocação nos cães.

No momento da colocação da primeira, da terceira e seis meses após a da quarta coleira, foram colhidas amostras de sangue de todos os cães por meio de punção venosa (jugular ou braquial) com agulha 25x7mm e seringa de 5ml. O sangue obtido foi transferido em seguida para tubos de ensaio e

colocado em isopor com gelo reciclável a 6 a 8°C, para encaminhamento ao laboratório de zoonoses do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) no prazo máximo de seis horas, quando passaram a ser conservados sob refrigeração a 2 a 8°C.

Após um prazo máximo de oito dias de armazenamento foi realizado o exame sorológico para leishmaniose pelo método de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) e, nas amostras com resultados positivos realizou-se também o exame pelo método de IFI (Imunofluorescência indireta). Para estes exames utilizaram-se kits padronizados do laboratório Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/Brasil. Os cães foram considerados positivos para leishmaniose apenas quando apresentavam resultados positivos nos dois métodos.

Durante o período do estudo foi executado no Município um programa de controle da leishmaniose visceral com ações de conscientização da população sobre os fatores de risco da doença, ações de borrifação residual com inseticidas em áreas de transmissão intensa ou moderada, segundo classificação do Ministério da Saúde (Brasil, 2006), distribuição semestral de coleiras impregnadas com deltametrina a 4%, eutanásia de cães positivos quando autorizado pelos proprietários e intensificação no serviço de limpeza de terrenos com predisposição para criação do vetor da doença.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou ao teste exato de Fischer (Zar, 2009) para verificar a ocorrência de associação entre variáveis. Para as conclusões considerou-se o nível de 1% de significância ( $\alpha=0,01$ ). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em 27/06/2008, sob registro nº 1.212.

## **Resultados**

Observa-se na Tabela 1 que a proporção de cães que não receberam as coleiras foi pequena em todo o município, não chegando a 4% dos cães que as receberam nas diferentes regiões urbanas do Município. A incidência da

leishmaniose nos animais que participaram do estudo foi de  $I=(4.614+263)/(14.149+315)=33,72\%$ , havendo associação significativa ( $p<0,0001$ ) entre o diagnóstico da leishmaniose visceral e o uso da coleira impregnada com deltametrina a 4%, com menor incidência da doença no grupo de cães que usaram a coleira em todas as regiões urbanas de Campo Grande. A intensidade da ação protetora da coleira pode ser avaliada pelo Risco Relativo, que no Município todo foi igual a  $RR=0,8349/0,3261=2,5603$ . Esta razão de incidências representa a forte associação que ocorreu entre o uso da coleira e a ocorrência de leishmaniose, de modo que a incidência foi maior que o dobro entre os indivíduos sem a coleira quando comparados com os que usaram a coleira.

A redução na incidência da leishmaniose com o uso da coleira pode ser medida pelo Risco Atribuível, que foi de  $RA=0,8349-0,3261=0,5088$ , o que significa uma queda em mais de 50 pontos percentuais na incidência da doença com o uso da coleira impregnada com deltametrina a 4%.

No grupo de cães que usaram a coleira ininterruptamente o *odds* foi de  $O_{com}=0,3261:0,6739=1:2,0665$ , indicando que a chance de um animal usando a coleira apresentar a doença é de aproximadamente um contra dois de não apresentar. Já no grupo de cães que não usaram a coleira o *odds* foi de  $O_{sem}=0,8349:0,1651=1:0,1977$ , indicando que a chance de um animal sem coleira apresentar a doença é de aproximadamente dez contra dois de não apresentar. A razão destas chances (*odds ratio*), igual a  $OR=O_{sem}/O_{com}=10,4504$ , também representa a força da associação entre o diagnóstico e o uso da coleira, informando que a chance de ocorrer a doença é aproximadamente dez vezes maior nos animais que não usam coleira do que nos que a usam.

TABELA 1 - Número e percentual de cães com e sem coleira segundo o resultado do exame sorológico para leishmaniose, por região urbana do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul/Brasil

REGIÃO	COLEIRA	DIAGNÓSTICO				TOTAL (Nº)
		NEGATIVO		POSITIVO		
		Nº	%	Nº	%	
Anhanduizinho	com	2.378	70,94	974	29,06	3.352
	sem	6	9,84	55	90,16	61
Bandeira	com	1.636	67,94	772	32,06	2.408
	sem	8	27,59	21	72,41	29
Centro	com	549	62,60	328	37,40	877
	sem	4	16,67	20	83,33	24
Imbirussu	com	1.438	63,40	830	36,60	2.268
	sem	10	16,39	51	83,61	61
Lagoa	com	1.461	72,26	561	27,74	2.022
	sem	4	13,33	26	86,67	30
Prosa	com	793	64,11	444	35,89	1.237
	sem	5	13,51	32	86,49	37
Segredo	com	1.280	64,48	705	35,52	1.985
	sem	15	20,55	58	79,45	73
CAMPO GRANDE	com	9.535	67,39	4.614	32,61	14.149
	sem	52	16,51	263	83,49	315

De acordo com os dados da Tabela 2 os cães que participaram do estudo eram, em sua maioria, de pequeno ou médio porte. Com exceção da região urbana do Centro e do Prosa, a incidência de leishmaniose foi significativamente ( $p < 0,01$ ) menor entre os animais de pequeno ou médio porte comparado com os de grande porte, quando os cães usavam a coleira. Esta diferença na frequência da doença entre os animais de grande porte e de pequeno ou médio porte foi menor quando não estavam utilizando a coleira, o que acarretou em falta de significância ( $p > 0,01$ ) em todas as regiões urbanas. A pequena superioridade do risco dos animais de grande porte adquirirem a doença em relação ao dos de pequeno e médio porte é avaliada pelo Risco Relativo que, em todo o Município foi, no grupo de cães que usaram a coleira, igual a  $RR_{com} = 0,4028/0,3039 = 1,3254$  e no grupo de cães que não usaram a coleira igual a  $RR_{sem} = 0,9186/0,8035 = 1,1432$ .

TABELA 2 - Número total de cães e seu percentual positivo no exame sorológico para leishmaniose segundo o uso da coleira e o porte, por região urbana do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul/Brasil

REGIÃO	COLEIRA	PORTE				valor-p*
		GRANDE		PEQUENO E MÉDIO		
		Nº TOTAL	% POSITIVO	Nº TOTAL	% POSITIVO	
Anhanduizinho	Com	740	34,73	2.612	27,45	<0,0001
	Sem	18	100,00	43	86,05	0,1098
Bandeira	Com	515	41,17	1.893	29,58	<0,0001
	Sem	11	81,82	18	66,67	0,3852
Centro	Com	214	43,93	663	35,29	0,0233
	Sem	7	100,00	17	76,47	0,2240
Imbirussu	Com	506	45,45	1.762	34,05	<0,0001
	Sem	14	92,86	47	80,85	0,2690
Lagoa	Com	433	36,03	1.589	25,49	<0,0001
	Sem	9	88,89	21	85,71	0,6550
Prosa	Com	321	39,56	916	34,61	0,1111
	Sem	6	100,00	31	83,87	0,3900
Segredo	Com	441	45,58	1.544	32,64	<0,0001
	Sem	21	85,71	52	76,92	0,3090
<b>CAMPO GRANDE</b>	<b>Com</b>	<b>3.170</b>	<b>40,28</b>	<b>10.979</b>	<b>30,39</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	<b>Sem</b>	<b>86</b>	<b>91,86</b>	<b>229</b>	<b>80,35</b>	<b>0,0142</b>

\* Probabilidade de se obter um valor igual ou maior à estatística (qui quadrado para o grupo com o uso da coleira e exato de Fisher para o grupo sem o uso da coleira) encontrada na hipótese de não haver associação entre o porte e o resultado do exame sorológico para leishmaniose.

## Discussão

Estudos de campo com coleiras impregnadas com deltametrina a 4% conduzidos em outros países empregando menor número de animais, como o de Maroli et al. (2001) na Itália com 1339 cães e o de Gavvani et al. (2002) no Irã com 957 cães, apresentam reduções na prevalência canina de leishmaniose. Esses estudos, porém, tiveram uma abordagem diferente da proposta neste trabalho uma vez que compararam áreas com e sem intervenção. O ambiente e, principalmente o clima da região onde se realiza o estudo epidemiológico deve ser considerado quando se compara os efeitos de programas de controle da leishmaniose. Em muitos países existe uma estação do vetor ou período de transmissão, o que não ocorre no município de Campo

Grande, onde a procriação dos flebotomíneos vetores ocorre durante o ano todo.

A menor incidência da LV nos animais que usaram ininterruptamente a coleira em relação à dos que não usaram a coleira é um indicativo da eficiência de proteção da coleira impregnada com 4% de deltametrina na prevenção de novos casos da doença em cães.

A menor soroconversão com a utilização da coleira impregnada com deltametrina a 4% observada neste estudo em Campo Grande está de acordo os relatos de Camargo-Neves et al. (2004) que, no município de Andradina, estado de São Paulo/Brasil, obtiveram redução na prevalência canina da leishmaniose de 10,8% para 4,8% após o período de dois anos da implementação de ações de controle da doença que incluía o uso da coleira.

Resultados favoráveis ao uso da coleira também foram relatados por Maroli et al. (2001) e Ferroglio et al. (2008) que, em trabalhos com duração de dois anos na Itália verificaram respectivamente que apenas 3,5 e 2,5% dos cães negativos com coleira ficaram positivos após a estação do vetor, enquanto no grupo controle sem coleira, respectivamente 25,8 e 15,0% dos cães inicialmente negativos se tornaram positivos para leishmaniose após a temporada de transmissão.

A maior incidência de leishmaniose em cães de grande porte indica que o risco de adquirir a doença é menor em animais de pequeno ou médio porte, o que se deve possivelmente ao fato dos animais maiores permanecerem mais tempo na área externa das residências e, conseqüentemente, mais expostos ao vetor. Embora este risco seja menor nas duas categorias de tamanho quando os cães utilizam a coleira impregnada com 4% de deltametrina, o efeito da coleira na redução é maior nos cães de pequeno e médio porte, o que sugerem o desenvolvimento de estudos futuros, principalmente com cães de porte grande, envolvendo o tamanho da coleira, a concentração do inseticida e o tempo necessário para que o animal adquira a proteção contra o vetor.

A probabilidade de cães com coleira de grande porte e de pequeno ou médio porte adquirirem a LV foi igual apenas nas regiões urbanas do Centro e do Prosa, que coincidem com as regiões que possuem maior taxa de

alfabetização e rendimento médio mensal do município (PMCG, 2008). Como Borges et al. (2008) relatam que o nível de conhecimento da população sugere melhores condições de cuidados com seus cães, pode se supor que nestas duas regiões urbanas, devido às melhores condições sociais e econômicas, os proprietários de cães de grande porte oferecem melhores condições, com melhor qualidade alimentar e sanitária, de forma semelhante às oferecidas pelos proprietários de cães de médio e pequeno porte. Neste sentido, não há desvantagem dos cães de grande porte nestas duas regiões urbanas, pois a desnutrição é considerada fator de risco para o desenvolvimento da doença (Badaró et al., 1986).

## **Conclusões**

O uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% nos cães em programas de controle da leishmaniose que incluem a eutanásia de cães soropositivos, borrifação residual com inseticidas, manejo ambiental e ações de educação e saúde para a população, reduz a incidência da doença em cães.

## Referências

1. AOUN, K.; CHOUIHI, E.; BOUFADEN, I.; MAHMOUD, R.; BOURATBINE, A.; BEDOUI, K. Efficacy of Deltamethrine-impregnated collars Scalibor in the prevention of canine leishmaniasis in the area of Tunis. **Archives de L'Institut Pasteur de Tunis**, Tunis, v.85, n.1-4, p.63-68, 2008.
2. BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LORENÇO, R.; CERF, B.J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON Jr., W.D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v.154, n.4, p.639-649, 1986.
3. BORGES, B. K. A.; SILVA, J. A.; HADDAD, J. P. A.; MOREIRA, E. C.; MAGALHÃES, D. F.; RIBEIRO, L. M. P.; FIÚZA, V. O. P. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24, n.4, p.777-784, 2008.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: 2006. 120p
5. CAMARGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; PAULIQUÉVIS-JR C. Utilização de coleiras impregnadas com deltametrina para o controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo. Resultados Preliminares. **Boletim Epidemiológico Paulista**. São Paulo, v.12, p.7-13, 2004.

6. FERROGLIO, E.; POGGI, M.; TRISCIUOGLIO, A. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. **Zoonoses and Public Health**, Berlim, v.55, n.3, p.145-8, 2008.
7. GAVGANI, A. S.; HODJATI, M. H.; MOHITE, H.; DAVIES, C. R.; Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. **The lancet**, London, v.360, n.9330, p.374-379, 2002.
8. IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Contagem da população 2007**: agregado por Setores Censitários. Rio de Janeiro, 2008.
9. MAROLI, M. et al. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by mass use of deltamethrin impregnated dog collars in southern Italy. **Med. and Vet. Ent.**, v.15, p.358 - 363, 2001.
10. MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Today**, Cambridge, v.10, n.1, p.37-40, 1994.
11. Prefeitura Municipal de Campo Grande. Instituto Municipal de Planejamento Urbano. **Perfil Sócio-Econômico de Campo Grande**. Campo Grande, MS, 2008, 258p.
12. Prefeitura Municipal de Campo Grande. Secretaria Municipal de Saúde. Diretoria de vigilância em saúde. Coordenadoria de Controle de

Zoonoses. Serviço de Controle da raiva e outras zoonoses. **Relatório Anual**. Campo Grande, MS, 2006.

13. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, 2010, Geneve. **Control of the leishmaniasis**. Geneve: WHO - World Health Organization. 2010.

14. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Urbanisation: facteur de risqué croissant pour la leishmaniose. **Weekly epidemiological record**, Geneve v.77, n.44, p.365-372, 2002.

15. ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 5<sup>a</sup>ed. New Jersey: Prentice Hall, 2009. 944p.

### **5.3 Artigo 03**

**Relação da distribuição espacial da leishmaniose visceral canina com os casos humanos no município de Campo Grande, MS, Brasil, 2009**

## **Relação da distribuição espacial da leishmaniose visceral canina com os casos humanos no município de Campo Grande, MS, Brasil, 2009**

Relation between spatial distribution of canine visceral leishmaniasis and human cases in Campo Grande, MS, Brazil, 2009.

Júlia Cristina Maksoud Brazuna<sup>1,2</sup>, Júlio Maksoud Brazuna<sup>3</sup>, Elaine Araujo e Silva<sup>2</sup>, Iara Helena Domingos<sup>2</sup>, Ana Paula Antunes Nogueira<sup>2</sup>, Valter Joost van Onselen<sup>1</sup>, Ana Lúcia Lyrio de Oliveira<sup>1,2</sup>

1. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil;

2. Secretaria Municipal de Saúde Pública de Campo Grande, MS, Brasil;

3. Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP), Campo Grande, MS, Brasil;

**Correspondência:** Júlia Cristina Maksoud Brazuna. Secretaria Municipal de Saúde Pública; Centro de Controle de Zoonoses; Avenida Senador Filinto Müller, 1601; Campo Grande, MS 79074-460, Brasil;

Tel. +55-67-3313-5018; fax +55-67-3314-9501. E-mail: maksoudbrazuna@gmail.com

### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi identificar a relação da distribuição espacial dos casos caninos com os casos humanos de leishmaniose visceral (LV) em Campo Grande, MS. O estudo retrospectivo utilizou dados sobre os 101 casos humanos de LV notificados e autóctones no ano de 2009. As informações sobre os casos de LV em cães nos anos de 2008 e 2009 foram obtidas do Sistema de Informações de Controle da Leishmaniose mantido pelo Centro de Controle de Zoonoses. As informações foram georreferenciadas com o objetivo de localizar geograficamente os casos humanos e caninos de leishmaniose. Uma área de aproximadamente 70.686m<sup>2</sup> com formato circular de raio igual a 150m em torno da residência de cada caso humano foi delimitada. Das 101 áreas avaliadas, apenas em sete delas não se registrou nenhum cão positivo para LV. Na região Central ocorreu em média o menor número de casos caninos em torno da residência do caso humano. Foi observada correlação positiva dos casos humanos de LV com a densidade de cães soropositivos nas regiões urbanas ( $r=0,7441$  com  $p=0,0551$ ) e com o número médio de cães soropositivos em torno da residência dos casos humanos ( $r=0,7753$  com  $p=0,0405$ ). Conclui-se que os casos de LV em humanos ocorrem em regiões de todos os níveis socioeconômicos e, a densidade de cães soropositivos na

região e em torno da residência são fatores de risco importantes para a ocorrência da doença em humanos.

Palavras chave: reservatório canino, zoonose, fator de risco, georeferenciamento.

## **Abstract**

The aim of this study was to identify the relationship of the spatial distribution of canine cases with human cases of visceral leishmaniasis (VL) in Campo Grande, MS. It was studied 101 cases of diagnosed and autochthonous human VL notified in 2009. The data on VL cases in dogs in 2008 and 2009 were obtained from the Information Systems Control Leishmaniasis maintained by the Center for Zoonosis Control. The information was georeferenced in order to geolocate cases of human and canine leishmaniasis. An area of about 70.686m<sup>2</sup> and of 150m around the residence of each human case has been delimited. Only seven of 101 areas evaluated did not register any dog positive for VL. The lowest average number of canine cases around the residence of the human case occurred in the central area. Positive correlation was observed between human cases of VL and density of seropositive dogs in urban areas ( $r=0.7441$ ,  $p=0.0551$ ) and the average number of seropositive dogs around the residence of human cases ( $r=0.7753$   $p=0.0405$ ). It is concluded that VL cases in humans occur in regions of all socioeconomic levels, and the density of seropositive dogs in the area and around the home are important risk factors for the occurrence of the disease in humans.

Keywords: canine reservoir, zoonosis, risk factor, georeferencing.

## **Introdução**

Há dois tipos de Leishmaniose visceral (LV), as quais diferem em suas características de transmissão: LV zoonótica, transmitida do animal para o vetor e para o humano e LV antroponótica, transmitida de humano a humano pelo vetor. No primeiro, humanos são ocasionalmente hospedeiros e animais,

principalmente canídeos, são reservatórios do parasito. A transmissão de LV antroponótica é encontrada em áreas de transmissão de *Leishmania (Leishmania) donovani* (Índia) e de LV zoonótica em áreas de transmissão de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*<sup>1</sup>.

Vários canídeos selvagens<sup>2,3,4</sup> e roedores sinantrópicos<sup>5</sup> podem servir de reservatórios para *L. (L.) chagasi*. Já os reservatórios domésticos são representados por cães<sup>6</sup>. O cão é considerado a principal fonte de infecção de LV para o homem em ambiente peridoméstico e doméstico no Brasil e os canídeos silvestres tem sido incriminados como reservatórios em ambiente silvestre<sup>7</sup>. Em estudo no município de Araçatuba, São Paulo<sup>8</sup>, concluíram que a eutanásia do reservatório canino, associada a outras medidas de controle da LV, está relacionada com a diminuição da incidência da doença no homem.

O cão vem sendo apontado como reservatório da doença e, como hospedeiro doméstico, é, provavelmente, o mais importante reservatório natural relacionado com casos humanos. Esse hospedeiro apresenta variações no quadro clínico da doença, passando de animais aparentemente sadios a oligossintomáticos podendo chegar a estágios graves da doença, com intenso parasitismo cutâneo<sup>2,9</sup>. Assim, o cão representa uma fonte de infecção para o vetor, sendo um importante elo na transmissão da doença para o homem<sup>10</sup>.

A principal espécie de flebotomíneo transmissora de LV nas Américas é a *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912), apresentando distribuição abrangente e coincidente com os focos da doença, hábito alimentar eclético, inclusive antropofílico. Já se comprovou a infecção nesta espécie em exemplares natural e experimentalmente infectados<sup>11</sup>. Em foco no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul<sup>12</sup>, a *Lutzomyia cruzi* foi identificada como a principal espécie vetora.

Outro fator primordial para a transmissão da LV está relacionado à dispersão vetorial, entretanto há poucos relatos na literatura. Para a *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* nas Américas, há relatos na Colômbia<sup>13</sup> onde a recaptura variou de 0 a 500 m. No Brasil<sup>14</sup>, recuperaram em poucos dias espécimes de *L. longipalpis* a 20, 85, 200 e 700 m de distância. Em Campo

Grande, MS, foi realizado um estudo de dispersão de *L. longipalpis* com auxílio de geotecnologia, onde se obteve deslocamentos de 0 a 223 m de distância<sup>15</sup>.

O município de Campo Grande, capital do estado de Mato Grosso do Sul, vem sofrendo nos últimos 13 anos com casos de LV canina e há nove anos com casos de LV na população humana. O objetivo deste estudo foi identificar relação da distribuição espacial dos casos caninos com os casos humanos de LV na área urbana do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

## **Metodologia**

O estudo foi realizado com dados do município de Campo Grande, que possui uma área territorial de 8.118,4km<sup>2</sup> e está localizado geograficamente na porção central do estado de Mato Grosso do Sul (MS) / Brasil - latitude Sul 20°26'34" e latitude Oeste 54°38'47". O Município ocupa 2,27% da área total do Estado e a zona urbana é dividida em sete regiões: Anhanduizinho, Bandeira, Centro, Imbirussu, Lagoa, Prosa e Segredo. O clima é mesotérmico a tropical úmido (classificação de Koppen), com estação chuvosa no verão e seca no inverno. A temperatura média no ano de 2009 foi de 24,35°C e a precipitação pluviométrica acumulada foi de 1.967,30 mm<sup>16</sup>.

A estimativa da população humana para o município de Campo Grande em 2009 é de 755.680 habitantes<sup>17</sup>, com incidência de leishmaniose visceral (LV) igual a 1,34 por 10.000 habitantes<sup>18</sup>. A população canina em 2009 totalizou 182.334 cães, com prevalência da leishmaniose igual a 12,78% (Brazuna, JCM: dados não publicados).

Este estudo retrospectivo utilizou dados sobre todos os casos humanos de LV notificados e autóctones referentes ao ano de 2009 obtidos a partir das Fichas de Notificação do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), sob responsabilidade da Secretaria Municipal de Saúde Pública, Campo Grande, MS (SESAU), com acesso finalizado em setembro de 2010. As informações sobre os casos de LV em cães nos anos de 2008 e 2009 foram obtidas do Sistema de Informações de Controle da Leishmaniose (SCL)

mantido pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Campo Grande, MS.

As informações foram georreferenciadas pelo programa Mapiinfo® com o objetivo de localizar geograficamente os casos humanos e caninos de leishmaniose nas regiões urbanas do Município. Uma área de aproximadamente 70.686 m<sup>2</sup> com formato circular de raio igual a 150 m em torno da residência de cada caso humano foi delimitada. O comprimento do raio do círculo foi definido em função da distância do vôo do vetor da LV.

Um levantamento entomológico foi realizado com a finalidade de verificar a presença do vetor *Lutzomyia longipalpis*. A coleta de flebótomos foi realizada em todos os bairros de todas as regiões urbanas do município, utilizando-se duas armadilhas em cada residência, uma no intradomicílio e outra no peridomicílio. As armadilhas foram instaladas no entardecer e retiradas no período matutino seguinte durante três noites consecutivas. Os domicílios selecionados foram aqueles sugestivos para a presença do vetor, onde ocorria a presença de plantas (árvores, arbustos), acúmulo de matéria orgânica e animais domésticos (cães e/ou galinhas).

As informações foram submetidas à análise estatística descritiva. A significância estatística da associação entre variáveis foi determinada aplicando-se o teste t para o coeficiente de correlação de Pearson (r)<sup>19</sup>. Para as conclusões considerou-se o nível de 5% de significância ( $\alpha=0,05$ ). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em 27/06/2008, sob registro nº1212.

## **Resultados**

Todos os 101 casos humanos autóctones de leishmaniose visceral (LV) registrados no período de 1º de janeiro a 31 de dezembro de 2009 pela Secretaria Municipal de Saúde Pública de Campo Grande, MS (SESAU), possuíam residência na área urbana do Município. Conforme se observa na Tabela 1, as regiões urbanas de maior ocorrência foram as do Segredo e Anhanduizinho.

TABELA 1 - Número de casos humanos, valores mínimos, máximos e as médias com respectivos erros padrão de cães soropositivos em torno do caso humano\*, distribuídos por região urbana do município de Campo Grande/MS/Brasil, 2008 a 2009

Região Urbana	Casos humanos 2009	Casos caninos*							
		2008				2009			
		Média ± Ep	Min	Máx	Média± Ep	Min	Máx		
Anhanduizinho	22	8,64 ± 0,81	3	16	8,73 ± 1,04	2	20		
Bandeira	3	7,00 ± 0,82	5	8	3,33 ± 1,96	0	8		
Centro	7	4,57 ± 0,90	1	7	0,86 ± 0,37	0	3		
Imbirussu	16	14,25 ± 1,54	4	27	14,13 ± 1,44	5	25		
Lagoa	17	5,00 ± 0,72	1	13	8,59 ± 1,24	1	21		
Prosa	13	7,15 ± 1,38	0	17	9,62 ± 1,33	1	17		
Segredo	23	15,22 ± 1,88	0	36	13,48 ± 2,11	0	39		
<b>Campo Grande</b>	<b>101</b>	<b>9,89 ± 0,70</b>	<b>0</b>	<b>36</b>	<b>10,05 ± 0,74</b>	<b>0</b>	<b>39</b>		

(\*) área de aproximadamente 70.686m<sup>2</sup> com formato circular de raio igual a 150m em torno da residência do caso humano.

Nas áreas em torno da residência de cada caso humano em 2009, delimitadas por um raio de 150 m, havia registro de 5.487 cães examinados em 2008 e de 5.515 cães examinados em 2009, dos quais, respectivamente, 999 (18,21%) e 1.015 (18,40%) foram diagnosticados como positivos para LV. Estas proporções de cães soropositivos na área de maior risco, isto é, na área ao redor da residência dos casos humanos, são maiores do que as prevalências da doença em 2008 (Anhanduizinho: 12,59%; Bandeira: 13,49%; Centro: 18,41%; Imbirussu: 17,74%; Lagoa: 12,16%; Prosa: 13,29%; Segredo: 14,56%; Campo Grande: 14,08%) e em 2009 (Anhanduizinho: 11,70%; Bandeira: 10,43%; Centro: 11,05%; Imbirussu: 15,95%; Lagoa: 13,73%; Prosa: 13,94%; Segredo: 12,91%; Campo Grande: 12,78%).

Não houve correlação significativa entre a ocorrência de casos humanos em 2009 e as prevalências da LV canina em 2008 e em 2009 nas diferentes regiões urbanas de Campo Grande, com coeficientes iguais a  $r_{2008} = -0,2771$  ( $p=0,5474$ ) e  $r_{2009} = 0,4525$  ( $p=0,3079$ ).

Das 101 áreas avaliadas, apenas em duas delas no ano de 2008 e em cinco delas no ano de 2009 não se registrou nenhum cão positivo para LV. Para apenas um caso humano de 2009, residente na região urbana do Segredo, não se registrou nenhum caso canino de LV nos anos de 2008 e 2009.

A região Central, embora não tenha sido a região urbana de menor ocorrência de casos humanos de LV, foi a região em que ocorreu em média o

menor número de cães soropositivos em torno da residência do caso humano (Tabela 1).

A correlação entre os casos caninos registrados (média do número de cães soropositivos nas áreas de maior risco em torno da residência dos casos humanos das diferentes regiões urbanas) em 2008 e em 2009 (Tabela 1) não foi muito elevada e igual a  $r=0,65$  ( $p<0,0001$ ).

Com exceção da região urbana do Centro, a densidade de casos de LV canina na área em torno da residência dos casos humanos foi maior do que a densidade em toda região urbana, chegando a ser mais do que o dobro nas regiões do Prosa e do Imbirussu (Anhanduizinho: 1,23 e 0,86; Bandeira: 0,47 e 0,46; Centro: 0,12 e 0,65; Imbirussu: 2,00 e 0,66; Lagoa: 1,21 e 0,78; Prosa: 1,36 e 0,45; Segredo: 1,91 e 0,76; Campo Grande: 1,42 e 0,66 cães soropositivos por hectare, respectivamente na área em torno da residência dos casos humanos e na área total da região urbana, no ano de 2009).

A correlação entre a ocorrência de casos humanos de LV em 2009 e a densidade de cães soropositivos em 2009 nas diferentes regiões do Município foi positiva e significativa ( $r_{2009}=0,7634$  com  $p=0,0458$ ), o que indica que regiões urbanas com maior concentração de cães infectados apresentam maior ocorrência de casos humanos de LV (Figura 1). Não se observou associação entre a ocorrência de casos humanos em 2009 e a densidade de casos de LV canina em 2008 nas diferentes regiões urbanas ( $r_{2008}=0,0749$  com  $p=0,8732$ ).

Também houve correlação significativa entre a ocorrência de casos humanos em 2009 e a ocorrência média em 2009 de LV canina na área de maior risco em torno da residência dos casos humanos nas diferentes regiões urbanas ( $r_{2009}=0,7753$  com  $p=0,0405$ ), indicando que regiões urbanas com maior concentração de cães infectados próximos do caso humano apresentam maior ocorrência de pessoas com LV (Figura 1).

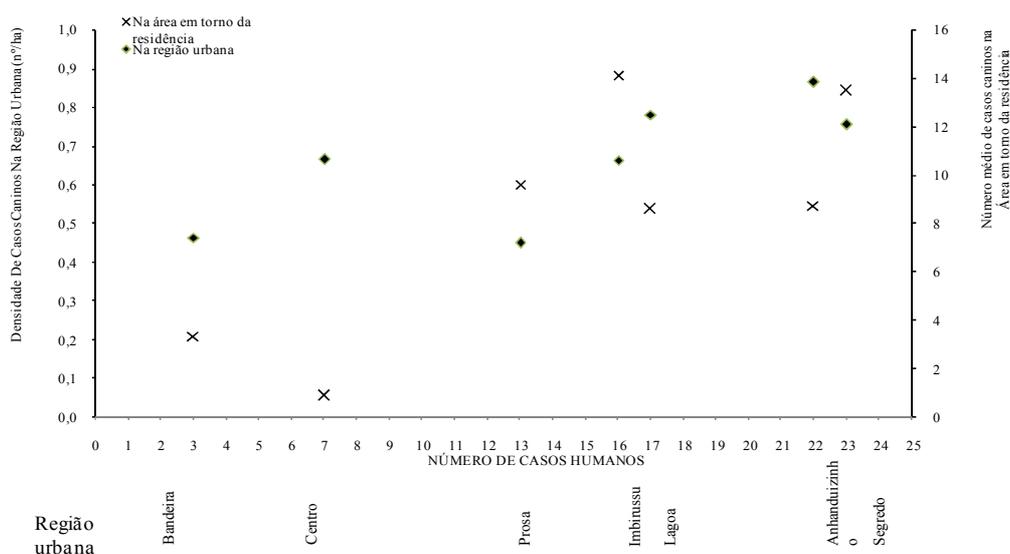


FIGURA 1 - Dispersão dos casos humanos de LV, em relação aos casos caninos na região urbana e na área em torno de suas residências\*, Campo Grande/MS/Brasil, 2009

(\*) área de aproximadamente 70.686m<sup>2</sup> com formato circular de raio igual a 150m em torno da residência do caso humano.

Não se observou associação entre a ocorrência de casos humanos em 2009 e a ocorrência média em 2008 de LV canina em torno da residência dos casos humanos nas diferentes regiões urbanas ( $r_{2008}=0,5653$  com  $p=0,1859$ ).

A presença do vetor *Lutzomyia longipalpis* foi constatada, no ano de 2009, em todas as regiões urbanas do Município (Tabela 2).

TABELA 2 - Número de residências com instalação de armadilha para captura de flebótomos e percentual com a presença do vetor por região urbana do município de Campo Grande/MS/Brasil, 2009

Região Urbana	Nº coletado	% com vetor
<b>Anhanduizinho</b>	70	48,57
<b>Bandeira</b>	55	23,64
<b>Centro</b>	65	23,08
<b>Imbirussu</b>	35	48,57
<b>Lagoa</b>	55	61,82
<b>Prosa</b>	55	25,45
<b>Segredo</b>	35	48,57
<b>Campo Grande</b>	370	38,92

## Discussão

As regiões urbanas em que se observou maior ocorrência de casos humanos de leishmaniose visceral (LV) foram as duas que possuem as menores taxas de alfabetização e rendimento mensal médio do Município<sup>16</sup>, muito embora a doença também ocorreu em indivíduos que residem nas regiões com maior índice de alfabetização e maior renda, como na região Central. As condições socioeconômicas e indicadores demográficos estão espacialmente correlacionados com a incidência da LV<sup>20</sup>.

A elevada ocorrência de casos humanos na região urbana Prosa e Imbirussu – que não estão entre as regiões com os mais baixos índices de alfabetização e renda média – o elevado número de casos caninos na área de maior risco, isto é, na área ao redor da residência, principalmente no Imbirussu e a presença do vetor em todas as regiões do Município sugerem que o nível socioeconômico não parece ser importante fator de risco para a doença em Campo Grande.

Não há justificativa neste estudo para se considerar maiores prevalências de LV canina em certas regiões urbanas de Campo Grande como fator de maior risco da doença para humanos, já que não se obteve associação entre a ocorrência de casos humanos e a prevalência da LV canina. Em estudo no município de Araçatuba, São Paulo, foi relatado a correlação entre a ocorrência de infecção humana e prevalência canina<sup>21</sup>, a elevada prevalência de cães com LV não aumenta o risco de crianças contraírem a doença em áreas rurais do estado do Ceará<sup>22</sup>. Por outro lado, a densidade de casos de LV canina nas diferentes regiões de Campo Grande pode ser considerada um fator de risco importante para a doença em humanos, já que esta, em 2009, esteve diretamente associada à ocorrência de casos humanos. Estes fatos sugerem que, para a ocorrência de casos humanos, a proximidade de cães portadores é mais importante do que a proporção destes na população canina. A ocorrência de casos humanos em diversas regiões de Campo Grande quando poucos cães afetados foram identificados na área de maior risco, reforça esta hipótese e indica que a abordagem do estudo não deve se restringir a aspectos

quantitativos, mas deve considerar também a simples presença ou ausência do animal infectado.

A elevada densidade de cães doentes na área em torno da residência dos casos humanos, sendo inclusive maior do que a densidade em cada região urbana do Município, acrescida da baixa frequência de casos humanos sem cães soropositivos para LV na área de maior risco ao redor da residência, são dois fatores que apóiam a hipótese do cão doméstico ser reservatório da doença em Campo Grande, contribuindo para indicar esta espécie como importante elo na transmissão da doença para o homem<sup>10</sup>.

A associação encontrada entre a ocorrência de casos humanos em 2009 e a densidade de cães soropositivos, tanto nas regiões como um todo quanto nas áreas em torno da residência, apenas em 2009 e não em 2008, sugere que, se o indivíduo foi contaminado devido à presença do cão doente ao redor de sua residência, a probabilidade de ter adquirido leishmaniose em 2009 é maior do que o contágio ter ocorrido em 2008.

No Rio de Janeiro<sup>23</sup> o foco de leishmaniose visceral foi associado com a presença de *Lutzomyia longipalpis* e com a infecção canina. A ocorrência de casos humanos em Campo Grande sem cães infectados ao redor de suas residências sugere que estes indivíduos podem ter contraído a doença em local distante de suas moradias. Desta forma, ações eficientes, mas localizadas de controle da leishmaniose não eliminam a possibilidade dos indivíduos domiciliados naquele local contraírem a LV.

## **Conclusões**

Casos de leishmaniose visceral em humanos ocorrem em regiões de todos os níveis socioeconômicos no município de Campo Grande, MS.

A densidade de cães soropositivos para leishmaniose na região e em torno da residência é fator de risco importante para a ocorrência da doença em humanos.

## Referências

1. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(11):873-82.
2. Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *Hospital.* 1955; 47:75-87.
3. Deane LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Serviço Social de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, 1956; 162p.
4. Silva ES, Pirmez C, Gontijo CMF, Fernandes O, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. *Vet Rec* 2000; 147: 421-2.
5. Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol.* 2005; 129(3-4):219-27.
6. França-Silva JC, Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, Costa CA, Mayrink W, et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2003; 111(2-3):161-73.
7. Lainson R, Ishikawa EA, Silveira FT. American visceral leishmaniasis: wild animal hosts. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96(6):630-1.
8. Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Gonçalves Filho J, Perri SH. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol.* 2010; 170(1-2):131-3.
9. Costa CH, Pereira HF, Pereira FC, Tavares JP, Araújo MV, Gonçalves MJ. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93(5):464.
10. Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 1995;17(9):451-8.

11. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100(8):811-27.
12. Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol*. 1998; 12(3):315-7.
13. Morrison AC, Ferro C, Morales A, Tesh RB, Wilson ML. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol*. 1993; 30(2):427-35.
14. Dye C, Davies CR, Lainson R. Communication among phlebotomine sandflies - a field-study of domesticated *Lutzomyia-longipalpis* populations in amazonian brazil. *Animal Behaviour*. 1991; 42:183-92.
15. Oliveira EF, Silva EA, Paranhos Filho AC, Fernandes CE, Ribeiro AA, Gamarra RM, Brazil RP, Oliveira AG. Estudo da dispersão de *Lutzomyia longipalpis* em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. In *Anais do IV Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais*, Recife, 2010.
16. Prefeitura Municipal de Campo Grande. Perfil Sócio-Econômico de Campo Grande. Instituto Municipal de Planejamento Urbano, Campo Grande, MS, 2010, 244p.
17. IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Contagem da população 2009: agregado por Setores Censitários. Rio de Janeiro, 2010.
18. Brazuna JCM, Silva EA, Brazuna JM, Domingos IH, Chaves N, Honer MR, van Onselen VJ, & Oliveira ALL. Profile and geographic distribution of reported cases of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil, from 2002 to 2009. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 45, n. 5, out. 2012
19. ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. 5ªed. New Jersey: Prentice Hall, 2009. 944p.

20. Almeida AS, Medronho RA, Werneck GL. Identification of risk areas for visceral leishmaniasis in Teresina, Piaui State, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84(5):681-7.
21. Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF, Cruz OG. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cad. Saúde Pública* [online]. 2001, vol.17, n.5 [citado 2013-02-06], pp. 1263-1267 .
22. Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Sousa AQ, Lima JWO, Pearson RD. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Northeast Brazil, *J Infect Dis.* (1992) 166(5): 1124-1132 doi:10.1093/infdis/166.5.1124.
23. Marzochi MCA, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza MA, Souza PPM, Toledo L, et al. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. *Cad. Saúde Pública* [serial on the Internet]. 1985 Dec.

## 6. DISCUSSÃO

Drásticas alterações ambientais causadas pela ação humana vêm modificando o habitat de algumas espécies de flebotomíneos, propiciando sua urbanização (RANGEL, 1995). Diversos autores relatam a expansão e o processo de urbanização do vetor da LV, transformando muitos centros brasileiros de elevada concentração populacional em áreas endêmicas da doença, tais como: Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e Belo Horizonte (MG) (MARZOCHI et al., 1985; GENARO et al., 1990; COSTA; PEREIRA; ARAUJO, 1990; TESH, 1995; CASTRO, 1996; SHERLOCK, 1996).

Com a ocorrência de casos de LV em todas as regiões urbanas de Campo Grande desde 2002, a doença é considerada endêmica na cidade. Anhanduizinho e Lagoa, regiões urbanas localizadas ao sudoeste da cidade, apresentam densidade demográfica mais alta e maiores extensões de áreas verdes, resultando em condições mais favoráveis ao desenvolvimento dos flebotomíneos e maior concentração de cães, o principal reservatório urbano da *L. chagasi* (ALENCAR, 1958). Maior concentração de flebotomíneos nestas regiões foi relatada em estudo realizado no período de 2003 a 2005 (SILVA, ANDREOTTI, HONER, 2007).

A presença do flebotomíneo ocorre praticamente durante o ano todo, porém pesquisas entomológicas indicam maior densidade vetorial nos meses de maior temperatura e com índices pluviométricos elevados (RESENDE et al., 2006; ALMEIDA et al., 2010).

A época de maior risco de transmissão é a compreendida entre os meses de dezembro a abril que corresponde ao período chuvoso e aumento populacional de flebotomíneos (SILVA, ANDREOTTI, HONER, 2007; SILVA et al, 2008). As informações climáticas para Campo Grande no período de 2002 a 2009 indicam que o município possui um clima tipo tropical, com temperatura e precipitação pluviométrica favorável para o desenvolvimento do vetor da LV.

A maior incidência da doença em indivíduos do sexo masculino, que também tem sido observada por outros autores (OLIVEIRA et al., 2006; COSTA; PEREIRA; ARAUJO, 1990; GLORIA, 2006), indica a maior exposição do homem às áreas de risco, apesar de estarem sendo desenvolvidos diversos estudos buscando evidências de diferenças nos sistemas orgânicos de defesa contra a LV entre os dois sexos. Este fato reforça a hipótese de que os indivíduos não adquirem a enfermidade somente nos locais de suas residências, considerando distribuição semelhante da população de homens e de mulheres nas diferentes regiões urbanas.

Leishmaniose visceral é a forma clínica das leishmanioses que está mais associada aos portadores de HIV. A co-infecção LV vs HIV tem sido considerada como doença emergente em várias regiões do mundo e, no Brasil encontra-se em expansão pelo interior de todo país (MAIA-ELKHOURY et al., 2008; DESJEUX; ALVAR, 2003; BRASIL, 2004). Para reduzir a morbimortalidade da LV é necessário diagnosticá-la e tratá-la mais precocemente, pois quando tratado precocemente os pacientes evoluem para a cura clínica em 98% dos casos (FERNÁNDEZ-GUERREIRO et al., 1987). Além disso, sabe-se que o índice de letalidade está próximo a 95% nos casos não tratados (COSTA et al., 1995).

No estudo de coorte o elevado percentual de soroconversão nos cães sem coleira impregnada com deltametrina a 4% e inicialmente negativos durante os anos de 2007 a 2009 observado neste estudo, indica o alto risco de transmissão da leishmaniose visceral (LV) no município de Campo Grande.

A menor incidência da LV nos animais negativos que usaram ininterruptamente a coleira em relação à dos que não usaram a coleira é um indicativo da eficiência de proteção da coleira impregnada com 4% de deltametrina na prevenção de novos casos da doença em cães.

A menor soroconversão com a utilização da coleira impregnada com deltametrina a 4% observada neste estudo em Campo Grande está de acordo os relatos de Camargo-Neves et al. (2004) que, no município de Andradina, estado de São Paulo/Brasil, obtiveram redução na prevalência canina da

leishmaniose de 10,8% para 4,8% após o período de dois anos da implementação de ações de controle da doença que incluía o uso da coleira.

A maior incidência de leishmaniose em cães de grande porte indica que o risco de adquirir a doença é menor em animais de pequeno ou médio porte, o que se deve possivelmente ao fato dos animais maiores permanecerem mais tempo na área externa das residências e, conseqüentemente, mais expostos ao vetor. Embora este risco seja menor nas duas categorias de tamanho quando os cães utilizam a coleira impregnada com 4% de deltametrina, o efeito da coleira na redução é maior nos cães de pequeno e médio porte, o que sugere o desenvolvimento de estudos futuros, principalmente com cães de porte grande, envolvendo o tamanho da coleira, a concentração do inseticida e o tempo necessário para que o animal adquira a proteção contra o vetor.

Almeida et al. (2011) relatam que as condições socioeconômicas e indicadores demográficos estão espacialmente correlacionados com a incidência da LV. Muito embora as regiões urbanas em que se observou maior ocorrência de casos humanos de leishmaniose visceral (LV) no presente estudo foram as duas que possuem as menores taxas de alfabetização e rendimento mensal médio do Município (PMCG, 2008), a doença também ocorre em indivíduos que residem nas regiões com maior índice de alfabetização e maior renda, como na região Central.

Em relação a análise realizada em torno da residência de cada caso humano, a elevada densidade de cães doentes nessa área foi inclusive maior do que a densidade em cada região urbana do Município, sem cães soropositivos para LV na área de maior risco ao redor da residência, são dois fatores que apóiam a hipótese do cão doméstico ser reservatório da doença em Campo Grande, contribuindo para indicar esta espécie como importante elo na transmissão da doença para o homem, conforme já foi relatado por Deplazes et al. (1995).

A associação encontrada entre a ocorrência de casos humanos em 2009 e a ocorrência média de LV canina apenas em 2009 e não em 2008, sugere que, se o indivíduo foi contaminado devido à presença do cão doente ao redor

de sua residência, a probabilidade de ter adquirido leishmaniose em 2009 é maior do que a transmissão ter ocorrido em 2008.

Marzochi et al. (1985) associaram o foco de leishmaniose visceral do Rio de Janeiro com a presença de *Lutzomyia longipalpis* e com a infecção canina. A ocorrência de casos humanos em Campo Grande sem cães doentes ao redor de suas residências sugere que estes indivíduos podem ter contraído a doença em local distante de suas moradias. Desta forma, ações eficientes, mas localizadas de controle da leishmaniose não eliminam a possibilidade dos indivíduos domiciliados naquele local contraírem a LV.

Camargo-Neves et al. (2001) em um estudo no município de Araçatuba, estado de São Paulo, encontraram correlação entre a ocorrência de infecção humana e prevalência canina. Já Evans et al. (2001) também cita que a elevada prevalência de cães com LV não aumenta o risco de crianças contraírem a doença em áreas rurais do estado do Ceará. Nesse estudo em Campo Grande, não há justificativa para se considerar maiores prevalências de LV canina como fator de maior risco da doença para humanos, já que não se obteve associação entre a ocorrência de casos humanos e a prevalência da LV canina. Por outro lado, a densidade de casos de LV canina nas diferentes regiões de Campo Grande pode ser considerada um fator de risco importante para a doença em humanos, já que esta, em 2009, esteve diretamente associada à ocorrência de casos humanos. Estes fatos sugerem que, para a ocorrência de casos humanos, a proximidade de cães portadores é mais importante do que a proporção destes na população canina. A ocorrência de casos humanos em diversas regiões de Campo Grande quando poucos cães portadores foram identificados na área de maior risco, reforça esta hipótese e indica que a abordagem do estudo não deve se restringir a aspectos quantitativos, mas deve considerar também a simples presença ou ausência do animal doente.

O controle da LVA em áreas urbanas tem sido um desafio para os órgãos públicos de saúde, tendo em vista as dificuldades operacionais das ações necessárias, apontando para a necessidade de maiores investimentos

na área técnico-científica visando o aprimoramento das medidas de vigilância e controle da leishmaniose visceral.

## 7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O resgate de dados de LV em humanos desde o registro dos primeiros casos permitiu um melhor conhecimento da série histórica da doença no município.

O aumento dos casos humanos e a expansão da doença por toda área urbana, demonstram a disseminação da LV, conforme a dispersão do vetor. As regiões urbanas Anhanduizinho, Lagoa e Imbirussu, são as que possuem maior ocorrência de casos humanos que coincidem com as áreas de residência dos cães soropositivos.

A dispersão do vetor em todas as regiões aliada a presença do cão soropositivo e de seres humanos completa o ciclo zoonótico da doença na área urbana do município.

Os programas de controle da leishmaniose que incluem o uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para cães aliadas à eutanásia de cães soropositivos, borrifação residual com inseticidas, manejo ambiental e ações de educação e saúde para a população, reduzem a prevalência canina da doença.

Casos de LV em humanos ocorrem em regiões de todos os níveis socioeconômicos no município de Campo Grande, MS.

A transmissão da LV em humanos pode ocorrer também em local distante de sua residência.

A densidade de casos caninos de LV na região e em torno da residência são fatores de risco importantes para a ocorrência da doença em humanos.

As medidas de controle da leishmaniose visceral requerem uma boa estruturação dos serviços de saúde, uma vez que as ações devem ser implantadas em tempo hábil e com controle de todas as atividades implantadas.

Os setores da saúde que atuam nessas ações devem possuir um laboratório de diagnóstico de LVC, que possam processar as amostras coletadas de forma rápida, com qualidade e segurança.

A análise epidemiológica da LVA em suas áreas de ocorrência é uma importante ferramenta que orienta os gestores a determinarem medidas mais efetivas de controle a fim de reduzir a morbimortalidade da doença. Os resultados devem ser avaliados por todos os profissionais que atuam no programa de controle da leishmaniose, trazendo como consequência ações de vigilâncias ambiental, entomológica, de casos humanos e caninos. Estas ações devem ser integradas e direcionadas para a redução dos riscos de transmissão e para fornecer condições de diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos.

No programa de controle da LV para que as ações se tornem mais efetivas para o controle da doença em nosso país, cabe as autoridades políticas das diferentes esferas, Municipal, Estadual e Federal, o desenvolvimento de políticas públicas de educação e saúde, no sentido de incluí-los como prioridades de governo.

## REFERENCIAS

- ABRANCHES, P. et al. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.13, p.537-550, 1991a.
- ABRANCHES, P. et al. Canine leishmaniasis pathological and ecological factors influence transmission of infection. **Journal of Parasitology**, v.77, p.557-561, 1991b.
- ALAM, M. Z. et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. **Tropical Medicine International Health**, Oxford, v. 14, p. 499–503, 2009.
- ALBUQUERQUE, A. L. et al. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clinica Veterinária**, v. 71, n. 1, p. 78-80, 2007.
- ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, v. 17/18, p. 129-148, 1977.
- ALENCAR, J. E.; CUNHA, R. V. Inquéritos sobre calazar canino no Ceará – Novos resultados. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, Uberlândia, v.36, n.1, p.391-404, 1963.
- ALENCAR, J.E. Expansão do Calazar no Brasil. **Ceará méd.** v. 5,n.1-2, p.86-102, 1983.
- ALENCAR, J.E. Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 4, n. 3, p. 222-236, agosto, 1958.
- ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A.J.; SOUSA, V. R. F. S. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**,v. 40, n. 7, p. 1610-1615, 2010.
- ALMEIDA, M. A. et al. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology, Amsterdam**, v. 106, n. 1-2, p. 151-158, June 2005.
- ALMEIDA, P.S. et al. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 6, dez. 2010 .
- ALMEIDA. A. S.; MEDRONHO, R. A.; WERNECK, G. L. Identification of Risk Areas for Visceral Leishmaniasis in Teresina, Piaui State, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 84, n. 5, p. 681 – 687, 2011.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis : clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Annals of Tropical Medicina and Parasitology**, 88, 371-378, 1994.
- ALVAR, J. et al. Canine Leishmaniasis. **Adv Parasitol**, v.57, p.1-88, 2004.

- ALVAR, J. et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 21, p.334–359, 2008.
- ALVAREZ, A. M. M. Leishmaniasis: Aspectos de interés sobre un parasitismo exótico para Cuba. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**, v. 48, n. 1, p. 78-92, Abr. 2010.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 1993-1997, Jan./feb., 2004.
- ANTINORI, S. et al. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIVinfected and HIV uninfected patients: a single-center, 8-year experience in italy and review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 44, p. 1602–1610, 2007.
- ANTINORI, S. et al. Leishmaniasis among organ transplant recipients. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 8, p. 191–199, 2008.
- ASHFORD, D. A. et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 53, n. 3, p. 251-255, Sept. 1995.
- ASHFORD, D. A. et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 1, p. 53-57, July 1998.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 30, n. 12/13, p. 1269-1281, Nov. 2000.
- AZEVEDO, M.A. A. et al. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréo, Estado do Mato Grosso, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.17, n. 3, p.123-127 2008.
- BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia: Elsevier Inc., 2006. p. 685-695.
- BANETH, G.; SHAW, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p.315-324, 2002.
- BANULS A.L. et al. Evidence for hybridization by multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis/guyanensis* in Ecuador. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, p.408-411, 1997.
- BANULS, A.L; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and

Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, v. 64, p.1-109, Mai. 2007.

BARATA, I. R. et al. The infectivity of dogs infected with *Leishmania chagasi* for *Lutzomyia longipalpis* is not related to clinical status or the humoral response of the animals. **In: Third World Congress on Leishmaniasis (Abstract Book)**, Palermo-Terrasini, Sicily, Italy; 2005, p.110.

BARKER, D.C. Kinetoplast minicircle sequence database. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/parasites/kDNA/Source.htm>. Acesso em: Mai 2011.

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

BATISTINI, G.; HERRER, A.. Intradermorreacción en Leishmaniasis tegumentaria en el Perú. **Bol. Fac. Med. Humana**, Lima, v. 4, p. 101-116, 1945.

BLACKWELL, J. M. Receptors and recognition mechanisms of *Leishmania* species. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v.79, n.5, p.606-612. 1985.

BORJA-CABRERA, G. P. et al. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). **Vaccine**, Kidlington, v. 20, n. 27/28, p. 3277-3284, Sept. 2002.

BRACHELENTE, C. et al. Cutaneous Leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. **Vet Pathol**, v.42, p.166-175, 2005.

BRAGA, M. D. M, et al. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 31, n. 5, out. 1998 .

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria Interministerial nº 1426, de 11 de julho de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Leishmania*-HIV. Brasília; 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: 2003. 120p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação da Leishmaniose Visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina. Brasília, 26 de Julho de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: 2006. 120 p

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. Brasília, 2007. 180 p

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim eletrônico epidemiológico - Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse à Saúde Pública. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009a. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/svs>>. Acesso em: 16 mai 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. II Fórum de discussão sobre o tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009 Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii\\_forum\\_tratamento\\_relatorio\\_final\\_07\\_10\\_2009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii_forum_tratamento_relatorio_final_07_10_2009.pdf)>. Acesso em: 17 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2001. Portaria No 1943/01, de 18 de outubro de 2001. Brasília, **Diário Oficial**, nº 204, 24 out.

BRUSTOLONI, Y. M. **Leishmaniose visceral em crianças no estado de mato grosso do sul, brasil: contribuição ao diagnóstico e ao tratamento.** 2006. 31 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Convênio Rede Centro-Oeste UnB / UFG / UFMS Campo Grande 2006.

BURRACO, P.; ABATE, O.; GUGLIELMINO, E. Osteomyelitis and Arthrosynovitis Associated with *Leishmania donovani* Infection in a Dog. **Journal of Small Animal Practice**, v 38, p 29-30, 1997.

CABRAL, M.; O'GRADY, J. E.; ALEXANDER, J. Demonstration of Leishmania specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite Immunol.**, v.14, p.531- 539, 1992.

CABRERA, M. A. et al, Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of Risk Factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 25, n.2, p. 79-83, 2003.

CALDAS, A. J. M. et al. Infecção por *Leishmania chagasi* em Crianças de uma Área Endêmica de Leishmaniose Visceral Americana na Ilha de São Luiz – MA, Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 445-451, 2001.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. et al. **Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo.** Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo – Superintendência de Controle de Endemias e Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2006.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. et al. Utilização de coleiras impregnadas com deltametrina para o controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo. Resultados Preliminares. **Boletim Epidemiológico Paulista.** São Paulo, v. 12, p. 7-13, 2004.

- CAMPILLO, M. C. et al. **Parasitología Veterinaria**. 1ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 1999. pp.651-665.
- CARDOSO, L. Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 117, p. 35-41, 2007.
- CARDOSO, L. et al. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine Leishmania-specific cellular immunity. **Vet Parasitol**, v. 79, p. 213-220, 1998.
- CARVALHO, E. M.; TEIXEIRA, R. S.; JOHNSON, W. D. Cell-mediated immunity in American Visceral Leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. **Infect. Immun.**, v. 33, p. 498-500, 1981.
- CASTRO, A.G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar)**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 86 p, 1996.
- CERF, B.J. et al. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**. v.156, n. 6, p.1030-1033, 1987.
- CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v.103, p.67-75, 2005.
- CHAPPUIS, F. Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. **Trop Med Int Health**, v. 11, n. 1, p. 31-40 2006.
- CHAPPUIS, F. et al. Visceral Leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 7-16, Nov. 2007.
- CHOCHOLOVA, E.; JIRKU, M.; LUKES, J. A diagnostic assay based on variable intergenic region distinguishes between *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*. **Folia Parasitologica**, v. 55, n. 1, p. 75-78, Mar 2008.
- COLER, R. N.; REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 244-249, May 2005.
- COLOMBO, F. A. et al. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, Berlin, p. 1-8, Jan. 2011.
- CORTES, S. et al. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 98, p. 12-17, Jan. 2004.
- COSTA, C. H. N. et al. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de saúde pública**, São Paulo, v.24, n.5, p. 361-372, out. 1990.
- COSTA, C. H.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n.2, p. 223-228, mar./abr. 2001.

- COSTA JML. et al. Leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. **Cad Saúde Pública** 1995; 11:321-324
- COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, n. 9, p. 1314-1320, Nov. 2002.
- CRINGOLI, G. et al. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 307-313, 2002.
- CRUZ, I. et al. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. **Lancet**, London, v. 359, p. 1124–1125, 2002.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 54-60, 2006a.
- DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the laws of nomenclature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 117-118, 2006b.
- DANTAS-TORRES, F. Leishmune vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 141, n. 1/2, p. 1-8, Oct. 2006c.
- DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of Leishmania parasites. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 27, p. 155-159, 2011.
- DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting the paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, May/June 2006.
- DAVID, J. R. et al. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 839-847, Aug. 2001.
- DAY, M. J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. **Vet Parasitol.**, v. 147, p. 2-8, 2007.
- DE LUNA, R. et al. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol**, v.70, p.95-103, 1999.
- DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará**. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956. 162 p.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 45, p.419-421, 1954.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 1, p. 61-76, 1955a.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 4, p.108-212, 1962.

DEANE, L. M.; DEANE, M.P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 47, p. 75-87, 1955b.

DESJEUX, P. **Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory**. Geneva: World Health Organization, 1991. 47 p.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 305-318, Sept. 2004.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, n. 3, p. 239-243, May/June 2001.

DESJEUX, P; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**v. 97, n. 1,p. 3-15, 2003.

DIETZE, R. et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 25, n. 5, p. 1240-1242, Nov. 1997.

DYE, C.; DAVIES, C. R.; LAINSON, R. Communication among phlebotomine sandflies: a field study of domesticated *Lutzomyia longipalpis* populations in Amazonian Brazil. **Animal Behaviour**, St. Louis, v. 42, n. 2, p. 183-192, Aug. 1991.

FARIA, M. B. **Leishmaniose Visceral Canina: Revisão Bibliográfica**. 2007. Rio de Janeiro: UCB. Dissertação (Especialização em clínica cirúrgica e médica. 45p. 2007.

FAUCHER, B.; PIARROUX, R. Actualités sur les leishmanioses viscérales. **Revue de medecine interne**, Paris, v. p. 1-8, 2010.

FAUST, E. C.; RUSSEL, P. F.; JUNG, R. C. **Parasitologia Clínica**. ed. México: Salvat, 1974.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba São Paulo, Brasil. **Clínica Veterinária**, Ano 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERNANDES, O. et al. An oligonucleotide probe from kDNA Minirepeats is specific for *Leishmania* (Viannia). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 3, p. 279-284, 1996.

- FERNÁNDEZ-GUERREIRO, ML. et al. Visceral leishmaniasis in immunocompromised hosts. **American Journal of Tropical Medicine** 1987; 83:1098-1102.
- FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, Spain. Canine Leishmaniasis: an update. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet, 1999. p.6.
- FERRER, L. M. et al. Skinlesions in canine Leishmaniasis. **J. Small Anim. Pract.**, v.29, n.6, p.381-388, 1988.
- FERROGLIO, E.; POGGI, M.; TRISCIUOGLIO, A. Evaluation of a 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. **Zoonosis and Public Health**, v. 55, p. 145-148, 2008.
- FONT, A. et al. Canine mucosal leishmaniasis. **Journal of the American Hospital Association**, v. 32, p. 131-137, 1996.
- FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.111, n.6, p.161-173, 2003.
- FURLAN, M. B. G. Epidemia de leishmaniose visceral no Município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 19, n. 1, mar. 2010 . Acesso em: 04 mai. 2011.
- GAVGANI, A. S. et al. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. **Lancet**, London, v. 360, n. 9330, p. 374-379, Aug. 2002.
- GENARO, O. et al . Montenegro skin tests in dogs experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 1, Mar. 1992 .
- GENARO, O. et al. Ocorrência de calazar em área urbana da Grande Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.23, p. 121, 1990.
- GIUNCHETTI, R.C. et al. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node incanine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.121, p.23-33, 2008
- GLÓRIA, M.R.B. **Leishmaniose visceral: situação epidemiológica e distribuição espacial, município de Palmas**, Tocantins. Dissertação: Apresentada a Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca para obtenção do grau de Mestre. Rio de Janeiro; maio 2006.
- GONÇALVES, M.E. et al. Detecção de DNA de *Leishmania* sp. em líquido de cães procedentes de área endêmica para leishmaniose visceral canina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13, SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETISIOSES, 1, 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto, 2004. p.239.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI-JUNIOR, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the new world: Current conceptions and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, New York, v. 6, p. 230-250, 1993.

IKEDA-GARCIA, F. A. et al. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 3-4, p. 254-259, 2006.

IKEDA-GARCIA, F. A., MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, v. 12, n. 71, p. 34-42, 2007.

IKEDA-GARCIA, F. A.; FEITOSA, M. M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, v.11, n.62, p.32-38, 2006.

IQBAL J, et al. Imported visceral leishmaniasis: Diagnostic Dilemmas and comparative analysis of three assays. **Journal of Clinical Microbiology**.v. 40, p. 475-479, 2002.

KANE, M. M.; MOSSER, D.M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Curr.Opin.Hematol.**, v. 7, n. 1, p. 26-31. 2000.

KARGIN KIRAL, F. et al. Some Haematological, Biochemical and Electrophoretic Findings in Dogs with Visceral Leishmaniasis. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 155, n. 4, p. 226, 2004.

KILLICK-KENDRICK, R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmania* and their phlebotomine vectors. **Bulletin of the Exotic Pathology Society**, Paris, v. 78, p. 747-755, 1985.

KOUTINAS, A. F. et al. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.98, n.4, p.247-261, Jul. 2001.

LACERDA, M. M. The Brazilian Leishmaniasis Control Program. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 489-495, July/Sept. 1994

LAGE, R. S. et al Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, v.115, p.135-145, 2007.

LAINSON, R. et al. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania(Leishmania) chagasi*. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v. 81, n. 3, p. 517, 1987.

LAINSON, R. et al. Leishmaniasis in Brazil; XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará state. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v. 73, n. 2, p. 239-242, 1979.

- LAINSON, R., SHAW, J.J. New World Leishmaniasis: The neotropical leishmania species. **In:** Cox Feg, Kreier JP, Wakelin D. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology, London, v. 5, p. 241-266, 1998.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the laws of nomenclature: Reply. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 108, 2006.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 811-827, 2005.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographic distribution. **In:** PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.), The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press, 1987. v. 1, p.1-120.
- LAMOTHE, J. Treatment of canine leishmaniasis from A (Amphotericin B) to Z (Zyloric). **In:** Canine Leishmaniasis: An update, 1, 1999, Barcelona. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis forum. Sumène, ed., agosto 1999, p.60-64.
- LAURENTI, M.D. et al. Evaluation of Kalazar Detect TM Rapid Test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **In:** Third World Congress on Leishmaniosis, PalermoTerrasini, 2005, Sicily, Italy. p.160. 2005.
- LIEW, F.Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. **Advances in Parasitology**. v. 32, p. 161-259, 1993.
- LIMA, V. M. F. et al. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, n.4, p.485-489, 2003.
- LIMA, V.M.F. et al. IL-6 e TNF- $\alpha$  production during active canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v.115, p.189-193, 2007.
- LIMA, V.M.F. et al. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p.215-218, 2005.
- LIVNI, N. et al. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared histological sections. **Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 401, n. 2, p.147-151, 1983.
- LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 9735-9380, 2007.
- LUVIZOTTO, M. C. R. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Manual Técnico Leishmaniose Visceral Canina**. Fort Dodge. p. 28-29, 2006b.
- LUVIZOTTO, M.C.R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. **In:** 10 FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA,

2006, Jaboticabal. **Anais do Fórum de Leishmaniose Visceral Canina** 2006a. p.15422.

LUZ, C.I.S.; AGUIAR-SANTOS, A. M. Leishmaniose Visceral: perfil clínico-ambulatorial e epidemiológico de crianças internadas em um hospital público, em Recife. **Arquivos Brasileiros de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 19-28, 2005.

LUZ, Z. M. P.; SCHALL, V.; RABÊLLO, A. Evaluation of a pamphlet of visceral leishmaniasis as a tool for providing disease information to healthcare professionals and laypersons. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 2, p. 606-621, 2005.

MACHADO, J. G.; HOFFMANN, J. L.; LAGONI H. Imunopatologia da Leishmaniose Visceral Canina. **Clínica Veterinária**, v. 12, n. 71, p. 50-58, 2007.

MAIA, C., CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-287. Dec. 2008.

MAIA-ELKHOURY, A.N.S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, Dec. 2008.

MANCIANTI, F. et al. A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 59, p. 13-21, 1995.

MANCIANTI, F. et al. Studies on canine Leishmaniasis control. 1- Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 82, n. 566-567, 1988

MARFURT, J. et al. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 46, p.115 -124. Jun. 2003.

MAROLI, M. et al. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by mass use of deltamethrin impregnated dog collars in southern Italy. **Med. and Vet. Ent.**, v.15, p. 358 - 363, 2001.

MARY, C. et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 75, p. 858–863, 2006.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v.41, p. 61-84, 1981.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro - Brasil. **Cadernos de saúde pública**. Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 5-17, jan./mar. 1985.

MARZOCHI, M. C. A.; BARBOSA-SANTOS, E. G. O.. Evaluation of a skin test on the canine mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, Sept. 1988 .

MATO GROSSO DO SUL (Estado). Secretaria de Estado de Saúde. Número Absolutos de Casos de Leishmaniose Visceral, Mato Grosso do Sul, 1999-2010, SINAN, 2010. Disponível em: <[http://www.sgi.ms.gov.br/pantaneiro/sites/saude/index.php?templat=list&voltar=home&id\\_comp=634](http://www.sgi.ms.gov.br/pantaneiro/sites/saude/index.php?templat=list&voltar=home&id_comp=634)>. Acesso em: 23 jun. 2010.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, p. 188-189, 2000.

MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: desafio e perspectivas. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, Ouro Preto, 2004. p. 41-45.

MENZ, I. Leishmune – Desenvolvimento e Resultados Atuais (dez 2005). **Anais do 1 Fórum sobre Leishmaniose Visceral Canina. Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal(SP), 2006

METTLER, M. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515–5519, Nov. 2005.

MICHALSKY, E. M. et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 67-76, 2007.

MIGONE, L. E. Un caso de Kalazar en Assunción (Paraguay). **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 6, p. 118-120, 1913.

MIRACELLY, K. Vacinação contra leishmune custa R\$ 250. **folhadaregiao.com**, Araçatuba, 2004. Disponível em: <[www.folhadaregiao.com.br/noticia?45577](http://www.folhadaregiao.com.br/noticia?45577)>. Acesso em: Mai de 2011.

MOREIRA JR., E.D. et al. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.69, n.4, p.393-397, 2003.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol**, v.18, n.9, p.399-405, 2002.

MORRISON, A. C. et al. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 30, n. 2, p. 427-35. Mar. 1993.

MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A.. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Semin Cell Biol**, v.4, n.5, p.315-22, Oct 1993.

- NICOLLE, C. J. 'Sur trois cas d' infection splénique infantile à corps de Leishman observés en Tunisie'. **Archives de L'Institut Pasteur de Tunis**, Tunis, n. 3, p. 1-26, 1908.
- NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine canine du Kala-azar. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v. 1, p. 299-301, 1908
- NOGUEIRA, F. S. et al. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of Leishmania parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, Kidlington, v. 23, n. 40, p. 4805-4810, Sept. 2005.
- NOGUEIRA, J. L. et al. A importância da Leishmaniose visceral canina para a saúde pública: Uma zoonose reemergente. **Revista Científica eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 13, 2009.
- NOLI, C. Canine leishmaniasis. **Waltham Focus**. v.9, n.2, pp.16-24, 1999.
- NOYES, H. A. et al. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying Leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 36, p.2877-81, 1998.
- NUNES, C. M. et al. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 131-133, 2010.
- OLIVEIRA, A. G. **Estudo de Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000**. Tese de Mestrado, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2000.
- OLIVEIRA, A. G. et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 869-874, 2006.
- OLIVEIRA, A.L.L. et al. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.39, p. 446-450, 2006.
- OLIVEIRA, E. F. et al. Estudo da dispersão de *Lutzomyia longipalpis* em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 2010 In: IV Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais- Entomol: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães CPqAM/Fiocruz. 2010.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis magnitude of the problem. 2010 Disponível em: [http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/print.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/print.html). Acesso em: mai. 2011.
- OSMAN, O. F. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2454-2457, Oct. 1997.

- PAGLIANO, P. et al. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 55, p. 229–233, 2005.
- PALATNIK-DE-SOUZA, C.B. et al, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.65, p.510-517, 2001.
- PARISE, S. C. Leishmaniose ou calazar. **Vida de Cão**, 2006. Disponível em: < [www.vidadecao.com.br/cao/leishma.htm](http://www.vidadecao.com.br/cao/leishma.htm)> Acesso em: Mai. 2011
- PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 14, p. 1032-1039, 2010.
- PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62, n.1, p.229-235, 1994.
- PINELLI, E. et al. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p.181-89, 2000.
- PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.M.G.; RUITENBERG, E.J. Cellular immune response in canine leishmaniasis. **Proc. Int.. Can. Leish. Forum**, Barcelona, v.1, p.60-64, 1999.
- PINHEIRO, P.H.C. et al. Recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* implicated in human and dog T-cell responses. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 3787–3789, 2005.
- PMCG-Prefeitura Municipal de Campo Grande. Instituto Municipal de Planejamento Urbano. **Perfil Sócio-Econômico de Campo Grande**. Campo Grande, MS, 2008, 244p.
- PMCG-Prefeitura Municipal de Campo Grande. Instituto Municipal de Planejamento Urbano. **Perfil Sócio-Econômico de Campo Grande**. Campo Grande, MS, 2010, 258p. Disponível em: [http://www.campogrande.ms.gov.br/egov/3rdparty/pageflip/index.php?id\\_pag=1&id\\_sec=65](http://www.campogrande.ms.gov.br/egov/3rdparty/pageflip/index.php?id_pag=1&id_sec=65) Acesso em setembro de 2010.
- PRASAD, R. et al. Miltefosine: An oral drug for visceral leishmaniasis. **Indian J Pediatr**, v.71, n.2, p.143-4, 2004.
- QUINNELL. R.J. et al. Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.183, p.1421-1424, 2001.
- RACHAMIM, N. et al. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. **Ann Trop Med Parasitol**. v. 85, p. 503–508, 1991.
- RANGEL, E. F. A transmissão da leishmaniose tegumentar americana no peridomicílio, no Rio de Janeiro Estado e outras situações semelhantes em relação à epidemiologia clássica na região amazônica. **In: Proceedings de um Seminário de Pesquisa em Doenças Tropicais, Sociedade e Meio Ambiente**. v.

2. Genebra: Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais / SAREC; p. 103-10, 1995.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. *In*: Rangel, E. F. & R. Lainson. (org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 291-310, 2003.

REGO – JR, F. A. Ocorrência de casos de leishmaniose em cães no município de Corumbá-MS. *In*: **Anais do VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia**, São Paulo p.2, 1983.

REIS, A. B. et al. Systemic and Compartmentalized Immune Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, Mar. 2009.

REIS, A.B. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 112, n. 3-4, p.102-16, Apr 2006b.

REIS, A.B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res Vet Sci**, v.81, p.68-75, 2006a.

REIS, A.B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clin. Exp. Immunol.**, v.146, p.303-311 2006c.

REITHINGER, R. et al. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal for Parasitology**, New York, v. 34, n. 1, p. 55-62, Jan. 2004.

REITHINGER, R. et al. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, July 2002.

RESENDE, M. C. et al. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 1, Feb. 2006.

REY, L. **Parasitas e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África**. 2a edição. Ed. Guanabara Koogan S.A., 1991, 731p.

RHALEM, A. et al. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.71, p.69-76, 1999.

RIBEIRO, M. Leishmoniose. **Manual Técnico de Leishmoniose Visceral Canina**, p 13-23 e 28-29, 2005.

RIBEIRO, V. L. et al. Evaluation of the potential transmission of visceral leishmaniasis in a canine shelter. **Revue de Medecine Veterinaire**, Toulouse, v. 56, n. 1, p. 20-22, Jan. 2005.

RIOUX, J. A. et al. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for new classification. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, Paris, v. 65, p. 111–125, 1990.

ROSÁRIO, E.Y. et al Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.

ROSS, E. Notes on the bodies recently described by leishmann and Donovan. **Britanic Medicine Journal**, v. 2,p. 1261 – 1262, 1903

ROURA, X., SÁNCHEZ, A., FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. **Veterinary Record**, v.144, p.262-4, 1999.

ROZE, M. Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. **The European Journal of companion Animal Practice**, v.15, n. 1, p. 39-52, 2005.

SACKS, D.L.; LOUIS, J. A.; WIRTH, D. F. Leishmaniasis. In: Warren, K. S. Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infection. 3rd ed. Boston: Blackwell Scientific Publication. P 237 – 268.

SAF'JANOVA, V. M. Classification of the genus *Leishmania*. **Protozoology**, Union Society of Protozoologists, p. 219-220, 1982.

SALAM, M. A. et al. PCR for diagnosis and assessment of cure in kala-azar patients in Bangladesh . **Acta tropica**, Basel, v. 113, p. 52-55, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH,E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning, a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, R. V.; COIMBRA, J. R. C. E. A. **Saúde e Povos Indígenas**. Rio de Janeiro: 1994, Ed. FIOCRUZ; 1994.

SANTOS-GOMES, G.M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.88, p.21-30, 2002.

SARAIVA, E. M. et al. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. **Vaccine**, Kidlington, v. 24, n. 13, p. 2423-2431, Mar. 2006.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu. Rev. Microbiol.** 49: 117-143, 1995.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 577-579, 2006.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.

- SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; HONER, M. R. Behavior of *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of American visceral leishmaniasis, in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, p. 420-425, 2007.
- SILVA, E. S. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 6, p. 637-643, 2006.
- SILVA, E. S. et al. Primeiro relato de leishmaniose visceral canina em área urbana do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. In: **Resumos do XXXVI Congresso Brasileiro de Medicina Tropical**, São Luís, MA p. 318, 2000.
- SILVA, E.A. et al. Detection of Leishmania DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 343-348, 2008.
- SILVA, M. B. B.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. N. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 72, p. 811–814, 2005.
- SILVA, M. V. M. Leishmaniose Visceral Canina. In: X Semana da Biologia e V Encontro Norte-mineiro de Biólogos, Unimontes, 2008, Montes Claros. **Anais da X Semana da Biologia e V Encontro Norte-mineiro de Biólogos**, Unimontes, 2008.
- SILVEIRA, F.T. et.al. **Leishmaniose Visceral Americana. Doenças Infecciosas e Parasitárias Enfoque Amazônico**. Belém. Ed.: CEJUP: UFPA. IEC, p. 632-642. 1997.
- SIMPSON, L.; SIMPSON, A. M.; KIDANE, G.; LIVINGSTON, L.; SPITHILL, T. W. The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. **The American journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 29, S. 5, p. 1053-1063, Sep.1980.
- SINGH, R. K.; PANDEY, H. P.; SUNDAR, S. Visceral Leishmaniasis (kala-azar): Challenges ahead. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 123, p. 331-344, Mar. 2006.
- SINGH, S; SIVAKUMAR, R. Recent Advances in the Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n.1, p. 55-60, Jan-Mar. 2003.
- SLAPPENDEL, R.J. & FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. (Ed.) *Infectious diseases of the dog and cat*. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998, p.450-458.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected Dogs. **J. Comp. Pathol.**, v.130, p.7-12, 2004.
- SOUZA, A.I. et al. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 514-554, 2005.

- SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 105, p. 1-6, 2011.
- SUKUMARAN, B.; MADHUBALA, R. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 667-679, Sept. 2004.
- SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, p. 951-958, 2002.
- TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17– 23, Sep. 2004.
- TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 275- (2006)
- TESH, R. Controlo f zoonotic visceral leishmaniasis. Is it time to chang strategies? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore v. 52, N. 3, p. 287-292, 1995.
- THOMAZ-SOCCOL, V. A new focus of cutaneous leishmaniasis in the central area of the State of Paraná, south of Brazil. **Acta Trop.**, v. 111, p. 308-315, 2009.
- THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Phylogenetic taxonomy of the New World *Leishmania*. **Annals de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 68, n. 2, p.104-106, 1993.
- THOMÉ, S.M.G. Cuidado com as leishmanioses. **Revista Cães & Gatos**. p. 85. 1999
- TIBAYRENC, M.; AYALA F.J. Evolutionary genetics of Trypanosoma and Leishmania. **Microbes and Infection**, v.1, p.465-72, 1999.
- TORRICO, M. C. et al. In vitro promastigote fitness of putative *Leishmania (Viannia) braziliensis/Leishmania (Viannia) peruviana* hybrids. **Acta Tropica**. v. 15, n. 1, p. 99-110, Jan 1999.
- VAN DER PLOEG, L. H. et al. Chromosomes of kinetoplastida. **The EMBO journal**, v. 3, n. 3, p. 3109-3115, 1984.
- VERCAMMEN, F. et al. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. **Veterinary Record**, v.141, n.13, p.328-330, 1997.
- VEXENAT, J. A. et al. Clinical recovery and limited cure in canine visceral leishmaniasis treated with aminosidine (paromomycin). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 58, n. 4, p. 448-453, Apr. 1998.
- VIEIRA, J. B. F.; COELHO, G. E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 85-92, 1998.
- VIÑUELAS, J. G. A. Menigial leishmaniasis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 23-27,2001.

WINCKER P. et al. The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, v. 124, n. 9, p.1688-1694, 1996.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 2<sup>a</sup>ed. New Jersey: Prentice Hall, 1984. 718p.

ANEXO A – Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa/CEP/UFMS



**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
**Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS**



## *Carta de Aprovação*

*A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1212 da Pesquisadora Julia Cristina Maksoud Brazuna intitulado "Efeito do uso do colar impregnado com deltametrina a 4% na população canina, na redução de casos humanos de Leishmaniose Visceral Americana do Município de Campo Grande, MS", foi revisado por este comitê e aprovado em reunião ordinária no dia 26 de junho de 2008, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.*

*Prof. Odair Pimentel Martins*

*Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS*

*Campo Grande, 27 de junho de 2008.*

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>  
[bioetica@propp.ufms.br](mailto:bioetica@propp.ufms.br)  
fone 0XX67 345-7187

ANEXO B - Ficha de Investigação epidemiológica: leishmaniose visceral/SINAN



**PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPO GRANDE**  
Secretaria Municipal de Saúde Pública  
CNPJ 03.501.509/0001-06

**LEISHMANIOSE  
VISCERAL**

Dados Gerais	1 Tipo de Notificação 2 - Individual	2 Data da Notificação
	3 Município de Notificação	Código (IBGE)
	4 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)	Código

Dados do Caso	5 Agravo LEISHMANIOSE VISCERAL	Código (CID10) B 5 5 0	6 Data dos Primeiros Sintomas	
	7 Nome do Paciente	8 Data de Nascimento		
	9 (ou) Idade D - dias M - meses A - anos	10 Sexo M - Masculino F - Feminino 1 - Ignorado	11 Raça/Cor 1 - Branca 2 - Preta 3 - Amarela 4 - Parda 5 - Indígena 9 - Ignorado	12 Escolaridade (em anos de estudo concluídos) 1 - Nenhuma 2 - De 1 a 3 3 - De 4 a 7 4 - De 8 a 11 5 - De 12 e mais 6 - Não se aplica 9 - Ignorado
	13 Número do Cartão SUS	14 Nome da Mãe		

Dados de Residência	15 Logradouro (rua, avenida)	Código	16 Número
	17 Complemento (apto., Casa, ...)	18 Ponto de Referência	19 UF
	20 Município de Residência	Código (IBGE)	Distrito
	21 Bairro	Código (IBGE)	22 CEP
	23 (DDD) Telefone	24 Zona 1 - Urbana 2 - Rural 3 - Urbana/Rural 9 - Ignorado	25 País (se residente fora do Brasil)

**Dados Complementares do Caso**

Antecedentes Epidemiológicos	26 Data da Investigação	27 Ocupação / Ramo de Atividade Econômica
	28 Caso Novo 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado	29 Município Endêmico 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado

Dados Clínicos	30 Manifestações Clínicas (sinais e sintomas) 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado	<input type="checkbox"/> Febre	<input type="checkbox"/> Emagrecimento	<input type="checkbox"/> Aumento do Baço
		<input type="checkbox"/> Fraqueza	<input type="checkbox"/> Tosse e/ou diarreia	<input type="checkbox"/> Aumento do Fígado
	31 Infecções Intercorrentes 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado	<input type="checkbox"/> HIV	<input type="checkbox"/> Tuberculose	<input type="checkbox"/> Outras

Dados Labor.	32 Diagnóstico Parasitológico 1 - Positivo 2 - Negativo 3 - Não Realizado 9 - Ignorado	33 Diagnóstico Imunológico 1 - Positivo 2 - Negativo 3 - Não Realizado 9 - Ignorado	<input type="checkbox"/> IFI	<input type="checkbox"/> ELISA	<input type="checkbox"/> Outro
--------------	-------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------	--------------------------------	--------------------------------

Tratamento	34 Droga Inicial Administrada 1 - Antimonial Pentavalente 2 - Anfotericina 3 - Pentamidina 4 - Outras 5 - Não Utilizada 9 - Ignorada	35 Administração das Doses 1 - Supervisionada 2 - Não Supervisionada 3 - Não se Aplica 9 - Ignorado
------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	36 Duração do Tratamento com Antimonial Pentavalente 1 - < 20 Dias 2 - 20 Dias 3 - 21 a 40 Dias 4 - > 40 Dias 5 - Não se Aplica 9 - Ignorado	37 Outra Droga Utilizada, na Falência do Tratamento Inicial 1 - Antimonial Pentavalente 2 - Anfotericina 3 - Pentamidina 4 - Outras 5 - Não Utilizada 9 - Ignorada
--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

