



Editorial

A Escola de Veterinária e o Conselho Regional de Medicina Veterinária, com satisfação, novamente disponibilizam para a comunidade de leitores o segundo número do Cadernos Técnicos, de 2012.

Com este número, tanto a Escola quanto o Conselho mantêm consolidada a parceria e seu compromisso com a comunidade veterinária de Minas Gerais.

O número 2, tratando do tema leishmaniose, mostra a inserção da Escola e do Conselho na análise crítica, discussão aprofundada e busca de soluções contemporâneas, validadas pela pesquisa, para equacionar problemas trazidos por essa zoonose, que atinge Minas Gerais e outras regiões do país.

Portanto, parabéns à comunidade de leitores que utilizam o Cadernos Técnicos para sua educação continuada, uma experiência que transcende os anos de graduação e pós-graduação.

Ainda, a Escola de Veterinária tem a satisfação de divulgar a celebração dos seus 80 anos, incluindo uma página com sua história de consistência e compromisso com o ensino, com o profissional e com a sociedade.

Prof. Antonio de Pinho Marques Junior
Editor-Chefe do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)

Prof. José Aurélio Garcia Bergmann
Diretor da Escola de Veterinária da UFMG

Prof. Marcos Bryan Heinemann
Editor do Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia

Prof. Nivaldo da Silva
CRMV-MG nº 0747 – Presidente do CRMV-MG

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Veterinária

Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia
- FEPMVZ Editora

Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais - CRMV-MG

Correspondência:

FEPMVZ Editora

Caixa postal 5671

30123-970- Belo Horizonte - MG

Telefone: (31) 3409-2042

E-mail: journal@vet.ufmg.br





Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais - CRMV-MG

Presidente:

Prof. Nivaldo da Silva

E-mail:

crvmg@crvmg.org.br

CADERNOS TÉCNICOS DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Edição da FEPMVZ Editora em convênio com o CRMV-MG
Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e
Zootecnia - FEPMVZ

Editor da FEPMVZ Editora:

Prof. Antônio de Pinho Marques Junior

Editor do Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia:

Prof. Marcos Bryan Heinemann

Editora convidada para edição 65:

Danielle Ferreira de Magalhães Soares

Revisora autônoma:

Giovanna Spotorno Moreira

Tiragem desta edição:

9.100 exemplares

Layout e editoração:

Soluções Criativas em Comunicação Ltda.

Fotos da capa:

Fabiana Lara, Luiz Felipe e www.bigstockphoto.com

Impressão:

Imprensa Universitária

**Permite-se a reprodução total ou parcial,
sem consulta prévia, desde que seja citada a fonte.**

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia. (Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG)

N.1- 1986 - Belo Horizonte, Centro de Extensão da Escola de Veterinária da UFMG, 1986-1998.

N.24-28 1998-1999 - Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, FEP MVZ Editora, 1998-1999

v. ilustr. 23cm

N.29- 1999- Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, FEP MVZ Editora, 1999-Periodicidade irregular.

1. Medicina Veterinária - Periódicos. 2. Produção Animal - Periódicos. 3. Produtos de Origem Animal, Tecnologia e Inspeção - Periódicos. 4. Extensão Rural - Periódicos.

I. FEP MVZ Editora, ed.



Linha do Tempo da Escola de Veterinária

80 anos de história



1926
Aprovado projeto e instalação do curso de veterinária naquela Escola, pelo Decreto nº 7.323, de 26 de Agosto. Inauguração da Escola Superior de Agricultura e Veterinária do Estado de Minas Gerais, sob a sigla ESAV.



1948
Criação da Universidade Rural do Estado de Minas Gerais (UREMCG), reunindo a Escola Superior de Agricultura, de Viçosa, com a Escola Superior de Veterinária, de Belo Horizonte.

1954
Com o intuito de difundir a prática do esporte e promover a confraternização entre estudantes, professores e funcionários, é criada a Associação Atlética Acadêmica da Escola.



1961
Federalização da Escola Superior de Veterinária e sua incorporação à então Universidade de Minas Gerais, posteriormente UFMG.

1963
Aquisição da Fazenda Experimental, com 243 hectares, no município de Igarapé.

1920
Criada a Escola Superior de Agricultura do Estado de Minas Gerais, pela Lei nº 761, de 6 de setembro, fixando-se na cidade de Viçosa para sua instalação.

1932
Instalação do curso superior de veterinária, a 1º de março.

1935
Graduação da primeira turma de médicos veterinários, com 4 diplomados.

1942
Desmembramento do curso de veterinária da ESAV e sua transferência para Belo Horizonte, com o nome de Escola Superior de Veterinária, subordinada ao Departamento de Ensino Técnico da Secretaria de Agricultura, Comércio e Trabalho do Estado de Minas Gerais e instalada na Gameleira. A Escola passa a funcionar na Gameleira, onde atualmente funciona o Parque de Exposições e a Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

1943
Criação do Centro de Estudos de Veterinária, pelos 16 professores e 41 alunos de então; Graduação da primeira turma em Belo Horizonte, com 13 diplomados. Lançamento do primeiro número da revista técnico-científica "Arquivos da Escola Superior de Veterinária do Estado de Minas Gerais", hoje "Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia".

1953
Criação do Jornal "Benzeno", do Diretório Acadêmico, para publicação das atividades, ideias e debates que envolviam os estudantes.

1960
Mudança da Escola Superior de Veterinária para a região da Nova Gameleira, onde hoje atualmente funciona o campus 2 do CEFET-MG.



1968
Instalação do curso de pós-graduação em Medicina Veterinária.

1973
Criação da Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia (FEPMVZ); Construção da escultura "O Boi", que mais tarde viria se tornar o símbolo da Escola.



1986
Publicação da 500ª tese de mestrado

1988
Inauguração do Auditório principal da Escola.



1989
Instalação do curso de doutorado em Ciência Animal.

1993
Agregação da Fazenda Modelo de Pedro Leopoldo.

2003
Criação do Laboratório de Análise da Qualidade do Leite.



2009
Ingresso da primeira turma de graduação em Aquacultura.

2012
O curso de especialização em residência em Medicina Veterinária passa a se chamar "Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária", com financiamento via Ministério da Educação e bolsas do mesmo valor dos programas de residência médica; Comemoração dos 80 anos da Escola de Veterinária da UFMG.

1965
Criação do Centro de Extensão, pioneiro na UFMG.

1969
Instalação do curso de pós-graduação em Zootecnia.

1974
Mudança para os atuais instalações, no campus da Pampulha da UFMG.



1985
Início da realização das Aulas Práticas Integradas de Campo (APIC), que viria a ser oficializada enquanto atividade de ensino dois anos depois



1998
Criação do curso de especialização em Residência Médico-Veterinária.

2005
Criação do Laboratório de Calorimetria e Metabolismo Animal, pioneiro na América Latina;

2006
Criação do Laboratório de Aquacultura.

2008
Aprovação da criação do curso de graduação em Aquacultura, através de recursos do Plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI).

2011
Comemoração dos 250 anos de ensino de Medicina Veterinária no mundo, e 100 anos no Brasil. Na Escola foram realizadas diversas atividades memorativas.







Prefácio

Danielle Ferreira de Magalhães Soares

Médica Veterinária, Professora de Epidemiologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose grave de transmissão vetorial e de grande importância em saúde pública. Atualmente, encontra-se presente nas cinco regiões brasileiras, e os casos em humanos e caninos têm aumentado de forma significativa em áreas urbanas brasileiras. Em Belo Horizonte, nos últimos anos, ocorreram aproximadamente 100 casos anuais com alta letalidade, em média 13,5%, variando de 6,3% no ano de 1996 a 23,6% em 2009.

O Programa de Controle da Leishmaniose Visceral tem como objetivo a redução das taxas de letalidade e do grau de morbidade, assim como a diminuição dos níveis de transmissão da doença. As estratégias propostas são: diagnóstico e tratamento precoces dos casos humanos, identificação e eliminação de reservatórios domésticos, sendo o cão o principal em área urbana, controle vetorial e educação em saúde. As medidas de controle usualmente empregadas não têm apresentado, em muitas regiões do país, efetividade suficiente para redução da incidência e da letalidade da doença, sendo esta considerada atualmente o principal problema da LV.

Um maior conhecimento científico sobre o papel específico de cada elemento da cadeia de transmissão (agente etiológico, inseto transmissor, homem e reservatórios silvestres e domésticos) representa um dos maiores desafios para o aprimoramento das estratégias de controle.

O papel do cão no cenário atual, a descoberta de novos reservatórios e vetores, as dificulda-





des nos diagnósticos canino e humano, a recusa dos proprietários de animais em atender às solicitações do serviço público, a proibição do tratamento canino, as comorbidades em humanos, responsáveis pela alta letalidade da doença, as perspectivas das vacinas anti-leishmaniose visceral, o difícil controle vetorial, entre outros fatores, tornam o combate à LV um grande desafio para o setor público e o privado.

Nesse cenário, a educação permanente dos médicos veterinários é imprescindível, uma vez que é papel desse profissional zelar pela saúde e pelo bem-estar tanto da população humana quanto da animal, promovendo o repasse de saberes voltados à guarda responsável de animais, ao cuidado com seus ambientes domésticos, ao uso racional de medicamentos e produtos voltados à prevenção dos cães, ao comércio de animais, às questões relativas ao bem-estar animal e ao controle de vetores e outros reservatórios da LV.

Esta edição do Caderno Técnico visa englobar, de forma multidisciplinar, aspectos epidemiológicos, entomológicos, clínicos e educacionais, gerando um campo para a discussão, o aprendizado e a problematização da situação da LV, com ênfase na discussão de novas estratégias, mais viáveis e efetivas, para serem empregadas no Programa de Vigilância e Controle.

Espera-se, dessa forma, alcançar maior inserção da comunidade no controle da LV com melhor reestruturação do programa de controle da doença, o que pode refletir na redução dos casos de LV entre os homens e os animais.





Sumário

Leishmanioses do Novo Mundo.....9

Revisão dos aspectos sobre a urbanização das leishmanioses e a importância da identificação de reservatórios de Leishmania sp. para o estabelecimento de medidas eficientes de controle.

Aspectos entomológicos das leishmanioses28

Revisão sobre a biologia e ecologia dos flebotomíneos, principais espécies vetoras das leishmanioses.

Vetores mecânicos da leishmaniose visceral canina.....36

O artigo aborda outros mecanismos de transmissão envolvidos na epidemiologia da leishmaniose visceral canina, além da transmissão natural pela picada de fêmeas de flebotomíneos da espécie Lutzomyia longipalpis.

Vigilância e controle da leishmaniose visceral no contexto urbano.....44

Revisão sobre a situação da leishmaniose no mundo e no Brasil e sobre medidas propostas para seu controle.

Clínica, diagnóstico e tratamento da LVC74

Revisão sobre os avanços, limitações e perspectivas relacionados aos aspectos clínicos, de diagnóstico e do tratamento da LVC.

Leishmaniose visceral felina104

Revisão sobre os principais aspectos epidemiológicos, sinais clínicos, diagnóstico e tratamento da infecção de gatos domésticos por L. Infantum.

Uma revisão sobre a vacinação canina e a vacina de FML115

Revisão sobre características imunológicas, de registro e comercialização das vacinas contra leishmaniose visceral canina.

Desenvolvimento de vacinas contra a LVC119

O artigo aborda as formulações vacinais contendo o antígeno A2. Imunogenicidade e eficácia de proteção em camundongos e cães e, Testes pré-clínicos em primatas não humanos

Educação em saúde e guarda responsável.....126

Revisão sobre a Aquisição de conhecimento, Avaliação de material informativo disponível, Medidas de intervenção para leishmaniose visceral e A guarda responsável de animais como auxílio ao programa de controle da doença







Leishmanioses do Novo Mundo

Estudo de hospedeiros não humanos e sua importância para a compreensão da ecoepidemiologia da doença

Eduardo de Castro Ferreira^{1,2}, Lutiana Amaral de Melo^{1,3}, Célia Maria Ferreira Gontijo¹

¹Fundação Oswaldo Cruz - Belo Horizonte, MG

²Universidade Federal de Ouro Preto - Ouro Preto, MG

³Fundação Ezequiel Dias - Belo Horizonte, MG

E-mail: ecferreira9@yahoo.com.br

1. Introdução

Os parasitos do gênero *Leishmania* são organismos unicelulares, digenéticos, pertencentes ao sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae¹. Esse gênero constitui um grupo de espécies morfologicamente muito similares, biologicamente distintas, com características genéticas, bioquímicas e imunológicas diferencia-

das. O gênero *Leishmania* apresenta em seu ciclo biológico formas amastigotas, com flagelo interno e cinetoplasto visível em forma de bastão. Essas vivem e multiplicam-se no interior de células do sistema monocítico fagocitário (SMF) dos hospedeiros vertebrados², que são mamíferos de diferentes ordens, entre elas roedores, marsupiais, edentados, carnívoros e primatas.^{3,4,5}

A transmissão do parasito entre os



hospedeiros vertebrados ocorre pela picada de fêmeas de insetos pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae.⁶ Ao picarem um animal parasitado, esses insetos podem, juntamente com o sangue, sugar formas amastigotas, que, no interior de seu tubo digestório, transformam-se em promastigotas e multiplicam.² No trato alimentar do inseto vetor, são encontradas as formas promastigotas e paramastigotas com flagelos longos.^{2,7} As formas primeiras também são cultivadas em meios axênicos⁸, como o LIT (Liver Infusion Tryptose) e o NNN (Novy Mc Nel e Nicolle).

Atualmente são conhecidas cerca de trinta espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos, agrupadas e classificadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*.⁹

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças parasitárias, amplamente distribuídas em países tropicais e subtropicais, em ciclos zoonóticos e antroponóticos, variando em gravidade, desde formas cutâneas com autocura, lesões únicas na pele a severas mutilações na mucosa, ou infecções nas vísceras.^{9,10}

Quanto maior a diversidade de ve-

A transmissão do parasito ocorre pela picada de fêmeas de insetos pertencentes à ordem Díptera.

tores e reservatórios, maior o número de táxons que pode ser encontrado no mesmo foco. A epidemiologia das leishmanioses somente pode ser com-

preendida mediante conhecimento de todos os elos que compõem seu ciclo de transmissão, como reservatórios e vetores envolvidos e suas relações ecológicas.^{11,12}

Diante da necessidade crescente de elucidar as fontes de infecção em diferentes áreas endêmicas para as leishmanioses, o presente trabalho tem como objetivo levantar algumas questões relacionadas ao estudo de hospedeiros de *Leishmania* spp., bem como a importância desses hospedeiros e das diferentes técnicas de diagnóstico empregadas no seu estudo para a elucidação da ecoepidemiologia da doença.

2. Revisão de literatura

2.1. Urbanização das leishmanioses e dificuldades de controle

As leishmanioses vêm ocorrendo de forma endêmico-epidêmica, apresentando diferentes padrões de transmissão, relacionados não somen-

te à penetração do homem em focos silvestres, mas frequentemente em áre-

A epidemiologia das leishmanioses somente pode ser compreendida mediante conhecimento de todos os elos que compõem seu ciclo de transmissão.





as de expansão de fronteiras agrícolas. Tem-se evidenciado a presença da doença em áreas de colonização antiga, demonstrando uma possível adaptação dos vetores e reservatórios a ambientes modificados. Trata-se de um importante problema de saúde pública pela sua magnitude, transcendência e pouca vulnerabilidade às medidas de controle.¹³

É amplamente aceito que as leishmanioses são doenças dinâmicas, sendo as circunstâncias da transmissão continuamente alteradas em relação aos fatores ambientais e do comportamento humano. Modificações no *habitat* dos hospedeiros naturais e dos vetores, migrações humanas decorrentes de conflitos, ou condições socio-econômicas precárias têm contribuído para a mudança no panorama epidemiológico das leishmanioses.¹⁴ A transmissão da leishmaniose visceral (LV) vem sendo descrita em vários municípios, de todas as regiões do Brasil. A doença tem apresentado mudanças relevantes no padrão de transmissão, inicialmente predominante em ambientes rurais e periurbanos e, mais recente-

Trata-se de um importante problema de saúde pública pela sua magnitude, transcendência e pouca vulnerabilidade às medidas de controle.

As circunstâncias da transmissão continuamente alteradas em relação aos fatores ambientais e do comportamento humano.

A transmissão da leishmaniose visceral (LV) vem sendo descrita em vários municípios, de todas as regiões do Brasil, sendo os cães considerados importantes reservatórios.

mente, em centros urbanos, como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros. Atualmente,

no Brasil, a LV está registrada em 21 das 27 Unidades da Federação, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone.¹⁵ Nesse contexto, os cães são considerados importantes reservatórios e talvez os responsáveis por essa mudança no perfil epidemiológico da LV¹⁶, uma vez que os casos caninos precedem os humanos, e também devido à grande discrepância entre o número de cães infectados e o de casos humanos notificados.^{17,18}

Belo Horizonte é uma região que vem apresentando casos humanos tanto de LV quanto de leishmaniose tegumentar (LT) há mais de 10 anos,

bem como a presença de flebotomíneos vetores, o que demonstra a ocorrência de transmissão ativa da infecção.^{19,20} Assim como em Belo Horizonte, o ciclo peri - urbano de transmissão de LT tem sido observado em outros centros urbanos, como na periferia da cidade de Manaus, no Amazonas.²¹





Com o desaparecimento das florestas primárias, roedores infectados e com hábitos sinantrópicos, os quais invadem com maior frequência as casas, podem servir como fonte de infecção para flebotomíneos bem adaptados ao ambiente modificado como *Lu. whitmani* e *Lu. intermedia*.²² A ação antrópica ao meio ambiente apresenta-se como fator importante para a aquisição da infecção, sendo identificada como um dos fatores de risco para o estabelecimento da transmissão.²³

Em focos ativos de LT, foi observada a ocorrência da doença em ambos os sexos, com vários indivíduos da mesma família, incluindo mulheres e crianças.²² Essas observações, associadas à coleta de um grande número de flebotomíneos vetores antropofílicos no peri domicílio ou mesmo no intradomicílio, são indicativas de que a transmissão possa ter ocorrido no ambiente peri domiciliar.^{20,24}

A complexidade na luta contra as infecções leishmanióticas explica-se pela grande diversidade de agentes etiológicos, pelo grande número de espécies de flebotomíneos que podem ser vetores, e por mais de uma centena de espécies de animais que podem ser reservatórios.²⁵ Para cada área de trans-

A complexidade na luta contra as infecções leishmanióticas explica-se pela grande diversidade de agentes etiológicos, pelo grande número de espécies de flebotomíneos que podem ser vetores, e por mais de uma centena de espécies de animais que podem ser reservatórios.

missão, são necessários estudos epidemiológicos para investigar a(s) espécie(s) de *Leishmania* circulante(s), bem como os vetores e reservatórios presentes, a fim de que se possam propor medidas de controle mais específicas e eficientes.

A escassez de recursos e a atual falta de infraestrutura dos serviços de saúde, especialmente no que concerne ao diagnóstico da infecção por *L. (L.) infantum* tanto na população canina quanto na humana, tornam as atuais medidas de controle pouco eficientes. Este quadro favorece a perpetuação do ciclo vicioso entre pobreza e doença em muitos estados brasileiros, nos quais a LV permanece como mais uma doença negligenciada.²⁶

2.2. Hospedeiro / reservatório - definição de conceitos

Para entender a relação entre o parasito e seus hospedeiros é preciso ter em mente que estes coadaptam-se de maneira a conviverem em certa harmonia. Quanto menor for a morbidade causada pelo parasito ao hospedeiro, e quanto mais constante for a incidência da infecção em dada população, mais antiga e equilibrada deve ser a relação entre eles.^{27,28}





Existem várias discussões sobre os conceitos acerca de hospedeiros e reservatórios.^{11,27, 29,30} O termo hospedeiro é bem generalista, diz respeito a uma espécie que abriga ocasionalmente um parasito oportunista que pode ou não comprometer sua sobrevivência.²⁸ Já o termo reservatório, para ser corretamente empregado em relação às zoonoses que acometem humanos, necessita que o hospedeiro preencha os seguintes critérios: (a) presente superposição espaço/tempo com os vetores; (b) sobreviva o suficiente para garantir a transmissão; (c) apresente uma prevalência de infecção de pelo menos 20%; (d) mantenha o parasito na pele ou no sangue em quantidade suficiente para infectar facilmente o vetor; e (e) apresente a mesma espécie de parasito encontrada no homem.³¹

Também deve se considerar que as circunstâncias da transmissão das leishmanioses são continuamente alteradas em relação aos fatores ambientais e do comportamento humano.¹⁴ O ambiente em que hospedeiros e parasitos interagem pode afetar substancialmente a força e a especificidade da seleção, o que possibilitaria a uma dada espécie ter maior ou menor importância como mantenedora do ciclo de transmissão, dependendo do ambiente em que esteja presente, não havendo espécies reservatório, mas, espécies servindo como

Para entender a relação entre o parasito e seus hospedeiros é preciso ter em mente que estes coadaptam-se de maneira a conviverem em certa harmonia.

reservatório em determinadas condições.³²

São reconhecidos dois principais tipos de hospedeiros vertebrados para o caso da leishmaniose zoonótica americana: 1. hospedeiro primário (reservatório), que se refere ao

vertebrado que alberga o parasito no ambiente silvestre, e que seria responsável pela manutenção da infecção sem a necessidade da coexistência de um outro hospedeiro; 2. hospedeiro secundário, que, diferentemente do primário, é um animal infectado, porém, incapaz de manter um ciclo enzoótico indefinidamente.¹¹

2.3. O cão e as leishmanioses em ambiente urbano

Os cães têm sido implicados como importantes reservatórios da LV desde a descoberta da leishmaniose visceral canina (LVC) em um inquérito canino realizado na Tunísia. De 145 cães examinados pelo método parasitológico utilizando material coletado por meio de punção na medula óssea, três animais mostraram-se positivos, ficando assim registrado o primeiro foco de calazar canino no mundo.³³

As primeiras observações feitas no Brasil sobre a LVC foram realizadas em 1937, por Chagas, na região Norte³⁴. No entanto, a doença só foi caracterizada em 1956 quando estudada por Deane,





em área endêmica do Ceará.³⁵ A LVC, assim como a doença humana, está bastante disseminada no país, e algumas localidades endêmicas revelam altas taxas de prevalência de LVC com presença abundante do vetor.^{15,36}

A infecção canina é considerada importante por várias razões, dentre as quais se destacam: o convívio do cão em estreita aproximação com o homem; o fato de servir de fonte de repasto para o vetor, atraindo-o para perto do homem; sua alta densidade populacional aliada à susceptibilidade que apresenta à *L. (L.) infantum*; além do grande número de cães assintomáticos com intenso parasitismo cutâneo.³⁷ O calazar canino é de início insidioso³⁸, com acentuado emagrecimento. O sinal mais frequente é geralmente apresentado na superfície cutânea, com grandes áreas de alopecia, eritema e descamação.³⁹ Entretanto, algumas vezes, os cães infectados apresentam aspecto aparentemente normal, mas com alto grau de parasitismo de pele e das vísceras.⁴⁰ O período de evolução da doença no cão pode ser bastante longo, poden-

A infecção canina é considerada importante por várias razões, dentre as quais se destacam: o convívio do cão em estreita aproximação com o homem; o fato de servir de fonte de repasto para o vetor, atraindo-o para perto do homem; sua alta densidade populacional aliada à susceptibilidade que apresenta à L. (L.) infantum; além do grande número de cães assintomáticos com intenso parasitismo cutâneo.

Áreas com maior incidência do calazar humano sobrepuseram-se àquelas que apresentaram a doença canina.

do chegar a mais de um ano. O animal torna-se apático, com pouca mobilidade, o que provoca um aumento acentuado das unhas.³⁹ Uma característica importante é a permanência da doença clinicamente inaparente por longos períodos.

Em diferentes estudos realizados em Belo Horizonte, foi observado que áreas com maior incidência do calazar humano sobrepuseram-se àquelas que apresentaram a doença canina.^{17, 18,41}

Embora os cães assintomáticos sejam considerados por alguns autores com pouca ou nenhuma importância epidemiológica, há estudos que demonstraram que as taxas de infecção dos vetores não estão correlacionadas com a condição clínica dos animais^{42,43,44}, o que ainda deve ser mais investigado, pois em estudo da infecção em *Lu. longipalpis* alimentadas em cães infectados com *L. (L.) infantum*, foi observada diferença entre as taxas de infecção quando o xenodiagnóstico foi realizado em animais assintomáticos (5,4%) em relação aos sintomáticos (28,35%).⁴⁵





Apesar de ser uma zoonose originalmente silvestre, a LT causada pela *L. (V.) braziliensis* tem sido descrita por diversos autores como ocorrendo em ambientes domésticos, tendo sido aventada a possibilidade de que animais domésticos e peridomésticos, e em especial o cão, seriam importantes fontes de infecção locais.^{46,47,48} A LT em cães pode apresentar-se como uma doença crônica com manifestações semelhantes às da doença humana. Esses animais geralmente apresentam lesões únicas, localizadas principalmente nas orelhas e nas patas, com parasitismo escasso.⁴⁸

Entretanto, o papel do cão na epidemiologia da LT é ainda uma questão controversa. Em algumas áreas endêmicas de ocorrência da *L. (V.) braziliensis*, existem evidências de transmissão domiciliar e de que cães infectados estariam associados a casos humanos, sugerindo o papel do cão como reservatório.⁴⁹ Em certas áreas do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, e em área rural do Espírito Santo, a LT é considerada uma zoonose mantida por cães domésticos.^{46,50,51} Falquetto e colaboradores sugerem que o cão é um importante mantenedor do ciclo no peri-domicílio, com base no fato de que a infecção humana foi mais frequente na presença de cães infectados com *L. (V.) braziliensis*.⁵²

Alguns autores con-

O papel do cão na epidemiologia da LT é ainda uma questão controversa.

sideram o cão apenas um hospedeiro acidental.^{53,54} Outros avaliam o papel do cão como um elo entre a doença dos animais silvestres e o homem.^{48,55}

Em estudo epidemiológico da LT na região do Vale do Ribeira, Paraná, não foram observados fatores que associassem o cão à transmissão para humanos.¹³

Vários questionamentos ainda permanecem quanto ao papel do cão como reservatório do parasito causador da LT, uma vez que as evidências que existem para suportar tal hipótese são somente circunstanciais.⁵⁶

2.4. Roedores e marsupiais, hospedeiros não humanos, possíveis reservatórios das leishmanioses

Os ciclos de transmissão das leishmanioses dependem dos movimentos de seus reservatórios, e a identificação desses hospedeiros é de fundamental importância para o controle efetivo da transmissão.¹¹ Vários animais domésticos já foram encontrados infectados por *Leishmania*, tais como equinos⁵⁷, suínos⁵⁸ e felinos.^{59,60} A busca pelos reservatórios silvestres naturais das leishmanioses tegumentar e visceral vem sendo um dos mais atraentes objetivos de pesquisado-

Vários animais domésticos já foram encontrados infectados por Leishmania, tais como equinos, suínos e felinos.





res em todo o mundo desde as primeiras décadas do século XX, com ênfase nos roedores, a partir do momento em que algumas espécies deles foram incriminadas como reservatórios de *Leishmania*.⁶¹

No Brasil, a participação de roedores na epidemiologia das leishmanioses já foi descrita por vários autores. Em 1970, em Mato Grosso, foi detectada pela primeira vez a infecção por *L. braziliensis* nos roedores do gênero *Oryzomys*.⁵³

Anos mais tarde, os mesmos autores trabalharam na região de Monte Dourado, norte do Pará, procurando determinar o(s) reservatório(s)

silvestre(s) para os agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar, e encontraram o roedor *Proechimys guyanensis* frequentemente parasitado 15/57 (26%) por *L. (L.) amazonensis*⁶². Outros hospedeiros de *L. (L.) amazonensis* são pequenos roedores silvestres, como *Oryzomys* sp.⁶³ e *Akodon* spp.⁶⁴

O alto índice de infecção do gênero *Oryzomys* (18/36 ou 50%) no Mato Grosso, bem como nas florestas de Utinga, também levava a crer tratar-se de um importante hospedeiro do(s) agente(s) causal(ais) da leishmaniose tegumentar, em virtude da distância de milhares de quilômetros entre os dois locais.⁵³ Além disso, o aspecto das lesões, geralmente do meio para a base da cauda e por vezes abarrotada de parasitos, faz desse roedor uma excelente fonte de infecção para o vetor.^{53,61,63}

A importância dos roedores como prováveis reservatórios da LT.

Parasitos do gênero *Leishmania* foram isolados a partir de roedores das espécies *Akodon arviculoides* e *Oryzomys nigripes* de área endêmica para LT em São Paulo, em 1972⁶⁵, sendo aventada a possibilidade de, o gênero *Oryzomys*, ser importante reservatório do parasito neste estado, à semelhança do que foi observado para *O. concolor* no Mato Grosso.⁵³ Um ano mais tarde e na mesma região, os autores isolaram o mesmo

parasito, *L. (V.) braziliensis*, a partir de *O. capito laticeps*.

Na Venezuela, este parasito também foi isolado de *Rattus rattus* (rato

preto) e *Sigmodon hispidus* (rato do algodão), o que enfatiza a importância dos roedores como prováveis reservatórios da LT.⁶⁶

Em Amaraji, em Pernambuco, *L. (V.) braziliensis* foi isolada de *Bolomys lasiurus* (atualmente *Necomys lasiurus*) e *Rattus rattus*.⁶⁷ O DNA de *L. (L.) chagasi* (syn *L. L. infantum*) foi detectado por PCR em amostra coletada do roedor silvestre *Nectomys squamipes* (rato da água), capturado em São Vicente Ferrer, Zona da Mata norte de Pernambuco.⁶⁸

Em levantamento da fauna de roedores sinantrópicos e silvestres no município de Araçuaí, Minas Gerais, 18 espécimes de um total de 62 roedores capturados estavam infectados por espécies dos complexos *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. donovani*. Parasitos des-





ses três complexos de *Leishmania* foram identificados em espécimes de *Thrichomys apereoides*, *Cerradomys subflavus* e *Rattus rattus*, o que indica que a última espécie possa participar do ciclo zoonótico doméstico das LV e LT em área urbana, devido aos seus hábitos sinantrópicos.⁶⁹

Em Belo Horizonte, de um total de 60 roedores capturados, 30% foram considerados infectados por espécie pertencente ao complexo *L. braziliensis*, sendo utilizada a PCR dirigida ao kDNA, seguida de hibridização.⁷⁰ Nesse mesmo município, de 62 roedores, foram identificados 24 *Mus musculus*, 19 *Rattus rattus*, nove *R. norvegicus*, cinco *Necromys lasiurus* e cinco *Cerradomys subflavus*. Quarenta e dois animais (67,7%) apresentaram resultados positivos para *Leishmania* nested PCR em pelo menos um tecido: destes 42, havia quatro animais (9,5%) infectados por *L. infantum*, 24 (57,1%) por *L. braziliensis* e três (7,2%) com infecção mista por *L. infantum* e *L. braziliensis*. O autor chama a atenção para o fato de que os animais que apresentaram infecção mista (*Mus musculus* e *R. rattus*) são comumente encontrados em áreas urbanas, em estreita relação com o domicílio, principalmen-

Os marsupiais, que são animais sinantrópicos, podem também ser apontados como reservatórios de Leishmania.

te habitações em que há condições mais precárias de higiene e maior desorganização ambiental.⁷¹

Em estudo realizado na reserva indígena Xakriabá, localizada no município de São João

das Missões, norte de Minas Gerais, 97 pequenos mamíferos foram capturados, dos quais 24 apresentaram resultados positivos na PCR. Após a identificação dos parasitos envolvidos na infecção, pela RFLP PCR, foi observado o encontro de roedores e marsupiais infectados por *L. braziliensis*, roedores infec-

tados por *L. infantum*, além da infecção por *L. guyanensis* tanto em roedores como em marsupiais, indicando a coexistência dos ciclos de transmissão destas três espécies de *Leishmania* na região.⁷²

Em algumas áreas, os marsupiais, que são animais sinantrópicos, podem também ser apontados como reservatórios de *Leishmania*. Espécies de marsupiais já foram encontradas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, como o *Didelphis* pela *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*^{31,73,74} e espécies de gambás infectadas por *L. (L.) amazonensis*.⁷⁵

Em Belo Horizonte/MG, de um total de 34 marsupiais do gênero *Didelphis* capturados, a taxa de infecção detectada

Os animais que apresentaram infecção mista (Mus musculus e R. rattus) são comumente encontrados em áreas urbanas, em estreita relação com o domicílio;





por PCR foi de 23,5%, e o agente etiológico envolvido foi caracterizado como pertencente ao complexo *L. (V.) braziliensis*.⁷⁰

Estes animais costumam ser encontrados com facilidade em florestas alteradas pela ação antrópica. São vistos com frequência nos quintais das residências situadas nas bordas das matas, visitando galinheiros e latas de lixo em busca de alimento. Apresentam hábitos crepusculares e noturnos. Escondem-se em ocos de árvores onde passam o dia dormindo. Apesar de nômades, seu território fica em torno de 2,5 km⁷⁶. Estudos colocam estes animais na lista de preferências alimentares tanto pela *Lu. longipalpis*, no Brasil⁷³, quanto pela *Lu. evansi* na Colômbia.⁷⁷

Gambás infectados, assim como os cães, podem apresentar duas formas da doença: uma subclínica, com apenas discretas alterações inflamatórias no fígado, baço e linfonodos, perceptíveis somente pela histopatologia, e outra forma grave, em que são encontrados macrófagos repletos de parasitos na pele e nos órgãos linfoides, necrose esplênica bem como esteatose hepática.⁷⁸ Portanto, em virtude de sua íntima associação com moradias humanas e o reduzido território, tornando possível o compartilha-

Vários pesquisadores apontam o gambá como um forte candidato a reservatório, pela sua proximidade com cães e moradias humanas.

mento dos vetores e parasitos com o homem e o cão⁷⁷, vários pesquisadores apontam o gambá como um forte candidato a reservatório^{79,80} Servindo de fonte para o repasto sanguíneo de diferentes espécies de

flebotomíneos, ele seria o elo perfeito entre os ciclos silvestre e periurbano.⁸¹ As espécies de *Didelphis* infectadas podem desempenhar um importante papel na epidemiologia das leishmanioses nos centros urbanos, além da manutenção do parasito na enzootia silvestre, o que faz com que sejam as espécies mais pesquisadas.⁷¹

Apenas quando for obtido um melhor entendimento da diversidade genética das espécies de *Leishmania* e dos reservatórios envolvidos no ciclo enzootico de cada uma delas, será possível avaliar qual o método(ou métodos) de controle mais eficaz.¹²

2.5. Técnicas de diagnóstico aplicadas em estudos de hospedeiros não humanos, possíveis reservatórios de *Leishmania* spp.

O diagnóstico parasitológico é o método de certeza, por meio da demonstração direta do parasito, e continua sendo o

O diagnóstico parasitológico é o método de certeza, sendo o padrão ouro no diagnóstico das leishmanioses





padrão ouro no diagnóstico das leishmanioses devido à sua alta especificidade. Isso é normalmente realizado pelo exame microscópico de esfregaços ou cortes histológicos de biópsia da lesão (LT), dos linfonodos, da medula óssea e do aspirado de baço (LV) em lâminas coradas pelo Giemsa; pelo isolamento em meios de cultura; ou pela inoculação em hamsters.^{40,82,83,84,85}

O isolamento do parasito em cultura em combinação com a eletroforese de enzimas *multilocus* permite a identificação da espécie do parasito. No entanto, tal procedimento exige uma riqueza de conhecimentos técnicos e é demorado, devido à necessidade de se obter uma massa grande de parasitos.⁸⁶ A sensibilidade do exame direto em lâmina e do isolamento em meio de cultura tende a ser baixa e pode ser altamente variável, dependendo do número e da dispersão de parasitos em amostras de biópsia, do processo de amostragem e, acima de tudo, da capacidade técnica do pessoal.^{83,87}

Diversas abordagens sorológicas são comumente usadas no diagnóstico da LV, em particular os testes de aglutinação direta com base em antígenos liofilizados e comercialmente disponíveis (DAT), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (IFI).⁸⁸

Métodos sorológicos podem ser úteis, porém apresentam problemas, como as reações cruzadas e a diferenciação entre infecção atual e passada.

Métodos sorológicos podem ser úteis, porém apresentam problemas, como as reações cruzadas e a diferenciação entre infecção atual e passada, não sendo acurados em casos de imunodeficiência.^{88,89,90,91,92}

Diante das limitações apresentadas pelos métodos de diagnóstico convencionais, existe a necessidade de se desenvolver uma ferramenta que seja capaz de promover um diagnóstico acurado. Assim, há cerca de 10 anos, os métodos moleculares vêm sendo aprimorados para identificação de grupos e espécies de *Leishmania* em variadas amostras clínicas, isolados de cultura, bem como *pool* de flebotomíneos.^{93,94}

Apesar da sucessiva avaliação de diferentes métodos moleculares para o diagnóstico da leishmaniose, técnicas baseadas na PCR atualmente constituem a principal abordagem de diagnóstico molecular de pesquisadores e profissionais de saúde. Vários formatos diferentes de PCR estão disponíveis, como, por exemplo, a PCR convencional ou a nested PCR, em que fragmentos amplificados pela PCR são resolvidos por eletroforese em gel e, eventualmente após clivagem com enzimas de restrição ou PCR-RFLP, visualizados após coloração com brometo de etídio^{94,95,96,97,98,99}; ou ainda, abordagens de alta tecnologia, como métodos em que os produtos de PCR são analisados durante a





sua amplificação (o chamado real-time PCR), após coloração com fluorogênicos. Neste caso, os ensaios são realizados dentro de um sistema fechado, diminuindo o risco de contaminação por fragmentos presentes no ambiente do laboratório. As aplicações são rápidas e de alto rendimento, mas o equipamento é relativamente caro, e os custos permanecem elevados.¹⁰⁰

Em termos de aplicações práticas, destacam-se três princípios básicos e/ou questões biológicas, que podem ser respondidos por métodos baseados nos ácidos nucleicos: (a) detecção do parasito, altamente sensível e específica, necessária em diagnóstico diferencial; (b) identificação da espécie de *Leishmania* por uma série de ensaios baseados na PCR; e (c) quantificação da carga parasitária presente nos tecidos do hospedeiro.¹⁰¹

Em estudos recentes, o sequenciamento de fragmentos de DNA obtidos pela amplificação de diferentes genes-alvo tem sido realizado e utilizado junto ao alinhamento das sequências obtidas, como uma forma de identificar a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção no Velho e no Novo Mundo.^{71,102,103,104,105}

A PCR em tem-

Métodos moleculares são rápidas e de alto rendimento, mas o equipamento é relativamente caro, e os custos permanecem elevados.

po real (qPCR) mostrou-se mais sensível que a imunistoquímica na quantificação do parasitismo tecidual, permitindo a diferenciação da intensidade do mesmo entre cães apresentando formas polares da leish-

maniose visceral canina, embora estas duas técnicas tenham apresentado correlação positiva em todos os órgãos, com exceção do fígado.¹⁰⁶

Além da alta sensibilidade da técnica de q-PCR, diferentes autores relatam a possibilidade de identificação da espécie de *Leishmania*, tanto no Velho como no Novo Mundo.^{71,107,108,109,110} Isto faz da q-PCR uma ferramenta ideal para ser usada em estudos de epidemiologia molecular de *Leishmania*, uma vez que, com uma única técnica seria possível detectar, identificar e quantificar a carga de parasitos presente na infecção, em diferentes tecidos, de diferentes hospedeiros, com alta sensibilidade, especificidade e menor risco de contaminação.⁷¹

3. Considerações finais

A detecção de DNA de Leishmania em uma espécie animal em particular é uma forte evidência, mas não é o suficiente para definir tal espécie de hospedeiro como reservatório da infecção.

A detecção de DNA de *Leishmania* em uma espécie animal em particular é uma forte evidência, mas não é o suficiente para





definir tal espécie de hospedeiro como reservatório da infecção. A confirmação do papel de determinadas espécies como reservatórios de *Leishmania* sp. depende de outros aspectos, entre eles: o encontro da espécie de flebotomíneo vetor naturalmente infectado na mesma região em que foi coletado o suposto reservatório; a sobrevivência do hospedeiro por tempo suficiente para garantir a transmissão da infecção; a prevalência da infecção elevada entre os hospedeiros (acima de 20%); a manutenção do parasitismo no sangue periférico ou em lesões na pele em quantidade suficiente para infectar o vetor; e a presença da mesma espécie de *Leishmania* no reservatório e em humanos.³¹

A identificação de reservatórios primários da infecção por *Leishmania* é crucial para o desenvolvimento e a avaliação de medidas de controle da transmissão. Antigamente, para realizar a caracterização da espécie de *Leishmania* envolvida, era necessário o isolamento do parasito, o que nem sempre é possível, especialmente quando a espécie em questão é *L. (V.) braziliensis*. Atualmente, esta caracterização das espécies de *Leishmania* pode ser mais facilmente realizada por meio de métodos baseados na PCR, que pode ser executada a partir de diferentes amostras biológicas coletadas.^{71, 94,96,102,104,105,107,108,109,110}

Mais estudos longitudinais sobre a ecologia de pequenos mamíferos são necessários, assim como a realização

de ensaios experimentais para avaliar a infecciosidade de espécies encontradas naturalmente infectadas, para espécies de flebotomíneos que são vetores comprovados de *Leishmania* spp. Tais investigações visam comprovar o papel desses hospedeiros como prováveis reservatórios. Então, uma vez comprovada a capacidade de o animal servir como fonte de infecção, é preciso estudar o comportamento ecológico do mesmo em relação à população de flebotomíneos e à população humana na área de estudo. Elucidados esses pontos, faz-se necessário definir o papel desse animal no ciclo de transmissão do parasito na área estudada.¹¹¹

4. Referências bibliográficas

1. Ross R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan (2) Further notes on leishman's bodies. *Br Med J* 1903; 2, 1261-1401.
2. Chang KP, Fong D, Bray RS. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. In: K.P.Chang & R.S.Bray eds *Leishmaniasis, Elsevier London* 1985; 1-30.
3. Lainson R and Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In *Biology of the Kinetoplastida* (Lumsden, W.H.R. and Evans, D.A., eds): *Academic Press* 1979, pp. 1-116.
4. Shaw JJ and Lainson R. Ecology and epidemiology: New World. In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine: Biology and Epidemiology* (Peters, W. and Killick-Kendrick, R., eds): *Academic Press* 1987, pp. 291-351.
5. Shaw JJ. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In *World*





- Class Parasites: *Leishmania* (Farrel, J., ed.): *Academic Press* 2003, pp. 11–31.
6. Martins AV, Williams P, Falcão AL. American Sandflies (Diptera): Psychodidae, Phlebotominae. Rio de Janeiro: *Academia Brasileira de Ciências* 1978; 195p.
 7. Walters LL. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly host. *J Euk Microbiol* 1993; 40, 196-206.
 8. Evans DA. *Leishmania*. In: Taylor, A.E.R. & Baker, J.R. (Eds.). *Vitro Methods for Parasite Cultivation*. London: *Academic Press* 1987; P. 52-75.
 9. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R (Eds) *The leishmaniasis in biology and medicine: Academic Press*, London 1987, Vol.1, P.1-120.
 10. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1269-1281.
 11. Shaw JJ. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83: 486-490.
 12. Shaw JJ. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(5): 541-547.
 13. Dunaiski M. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na região do vale do ribeira – paraná: cães reservatórios ou hospedeiros acidentais? [Dissertação de Mestrado] Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2006.
 14. Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control (Invited review). *Int J Parasitol* 2005; 35:1169-1180.
 15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: *Editora do Ministério da Saúde*, 2006. 120 p.
 16. Marzochi MCA, Marzochi KBF, Carvalho RW. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitol Today* 1994; 10(1): 34-37.
 17. Oliveira CL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil, 1994-1997. *Cad Saúde Pública* 2001; 17(5): 1231-1239.
 18. Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2001; 1: 53, 1-8.
 19. Souza CM, Pessanha JE, Barata RA, Monteiro EM, Costa DC, Dias ES. Study on Phlebotomine Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99 (8): 795-803.
 20. Passos VMA, Falcão AL, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, Barbosa-Santos EGO, Guerra HL. Epidemiological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88 (1): 103-110.
 21. Barrett TV, Senra MS. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. *Parasitol Today* 1989; 5: 255-257.
 22. Gontijo CMF, da Silva, ES, de Fuccio MB, de Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES, Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop* 2002; 81: 143-150.
 23. Vanzeli AC, Kanamura HY. Estudo de Fatores Socioambientais associados à ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no município de Ubatuba, SP, Brasil. *Rev Panam Infectol* 2007; 9(3): 20-25
 24. Oliveira CGC, Lacerda HG, Martins DRM, Barbosa JDA, Monteiro GR, Queiroz JW, Sousa JMA, Ximenes MFFM, Jerônimo SMB. Changing epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Trop* 2004; 90: 155-162.
 25. Organización Mundial de La Salud. Lucha con-





- tra las leishmaniosis. Serie de Reports Técnicos, 193. Ginebra, 1990; pp. 29-32.
26. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting the paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2006; 48 (3): 151-156.
27. Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* 1996; 14: 523-532.
28. Avila-Pires, F.D. Ecologia das Zoonoses. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. *Guanabara Koogan*; 2005 Vol. 1. Cap 5. P. 53-63.
29. Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson K. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (12): 1468-1473.
30. Chaves LF, Hernandez MJ, Dobson AP, Pascual M. Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. *Trends in Parasitol* 2007; 23(7), 311-316.
31. Silva ES, Gontijo CMF, Melo MN. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends in Parasitol* 2005; 21(12), 550-552.
32. Wolinska J, King KC. Environment can alter selection in host-parasite interactions. *Trends in Parasitol* 2009; 25(5): 236-244.
33. Nicolle C, Comte D. Origine Canine Du Kalazar. *Bull Soc Pathol Exot* 1908 ; 1, 299-301.
34. Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane L, Deane G, Guimarães FN, Von Paumgarten MJ, As B. Leishmaniose visceral americana (Relatório dos trabalhos pela Comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1938; 33: 89-229.
35. Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceará [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro (RJ): Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro ; 1956.
36. Vieira JBF, Coelho GE. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Méd Trop* 1998; 31, 85-92.
37. Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Fouchaux C, Delure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1997; 11: 105-111.
38. Laveran A, Havet J. Contribution a l'étude de la leishmaniose viscérale naturelle du chien. *Bull Soc Path Exot Filiales* 1917; 10, 386-392.
39. Alencar JE. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil [Tese de Livre Docência]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará; 1959.
40. Deane LM, Deane MP. 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* 1955; 48 (1): 79-97.
41. Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, Pessanha JE, Dias ES. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis in Belo Horizonte municipality, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(1): 31-38.
42. Dye D. Leishmaniasis epidemiology: The theory carches Up. *Parasitology* 1992; 104: 7-18.
43. Molina R, Amela C, Nieto J, San Andres M, Gonzales F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Med Hyg* 1994; 88, 491-493.
44. Guarga JL, Lucientes J, Peribáñez MA, Molina R, Garcia MJ, Castillo JA. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Trop* 2000; 77, 203-207.
45. Michalsky EM, Rocha MF, Lima ACVM, França-Silva JC, Pires MQ, Pacheco RS, Santos SL, Barata RA, Romanha A J, Fortes Dias CL, DIAS ES. Infectivity of seropositive dogs, showing





- different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary Parasitology* 2007, v. 147, p. 67-76.
46. Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi FG, Sessa PA, Carias VRD, Jesus, AC, Alencar JTA. Participação do Cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; 81: 155-163.
 47. Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmanioses in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 1994; 10: 359-375.
 48. Pirmez C, Coutinho S, Marzochi MCA, Grimaldi PG. Canine american cutaneous leishmaniasis a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Trop Hyg* 1988; 38: 52-58.
 49. Cunha JCL, Lima JWO, Pompeu MML. Transmissão domiciliar de leishmaniose tegumentar e associação entre leishmaniose humana e canina, durante uma epidemia na Serra de Baturité, no estado do Ceará, Brasil. *Rev Bras Epidemiol* 2006; 9(4): 425-35
 50. Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, Da Costa CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 1979; 73(2):123-37.
 51. Sessa PA, Falqueto A, Varejão JBM. Tentativa de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana por meio do tratamento de cães doentes. *Cad Saúde Pública* 1994; 10: 157-163.
 52. Falqueto A, Sessa PA, Varejão JBM, Barros GC, Momen H, Grimaldi Jr G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86(4): 499-500.
 53. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso state, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1970 ; 64 (5): 654-667.
 54. Le Pont F, Mollinedo S, Mouchet J, Desjeux P. Leishmaniose en Bolivie. IV – Le chien dans les cycles des leishmanioses on Bolivie. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989 ; 84: 391-392.
 55. Coutinho SG, Nunes MP, Morzochi, MCA. A survey for american cutaneous leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where human diseases occur. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1985; 80: 17-22.
 56. Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(4): 530-541.
 57. Rolão N, Martins MJ, João A, Campino L. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite* 2005; 12: 183-186.
 58. Brazil RP, Nascimento MDSB, Macau RP. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de Leishmaniose Tegumentar na Ilha de São Luís, Maranhão. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82: 145.
 59. Pennisi MG. Case report of leishmaniasis in four cats. *Vet Res Commun* 2004; 28 Suppl 1:363-6.
 60. Souza AI. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 128(1-2): 41-5.
 61. Nery-Guimarães F, Damasceno R, Azevedo M. Leishmaniose tegumentar – zoonose de roedores silvestres na Amazônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1968; 66 (2): 151-168.
 62. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World: taxonomia problems. *Br Med Bull* 1972 ; 28: 44-48.
 63. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis – incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968; 62 (3): 385-395.





64. Telleria J, Bosseno MF, Tarifa T, Buitrago R, Martinez E, Torrez M, Le Pont F, Brenière SF. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a sub-andean focus of Bolívia identified by kDNA-polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(1): 5-6.
65. Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira AO. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Púb S Paulo* 1972; 6: 255-261.
66. De Lima H, De Guglielmo Z, Rodríguez A, Convit J, Rodriguez N. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara state, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(2): 169-174.
67. Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97, 291-296.
68. Carvalho MR Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana na zona da mata norte de Pernambuco [Dissertação de Mestrado]. Recife (PE). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ; 2005.
69. 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: 219-227.
70. Melo LA. Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte, MG [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte (MG). Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ; 2008.
71. Ferreira EC. Estudo dos hospedeiros de Leishmania em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte (MG). Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ; 2010.
72. Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, Silva SR, Júnior AJM, Neto RGT, Madeira FM, Carvalho MB, Paglia AP, Melo MN, Gontijo CMF. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011; 105 (10) : 579-585.
73. Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr G. Natural infections of the *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79 (4): 511.
74. Schallig HDFH, Silva ES, Van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7(3): 387-393.
75. Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species. In: FEG Cox, JP Kreier, D Wakelin (eds), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed., 1998; Vol. 5 *Parasitology*, Arnold, London, p. 242-266.
76. Nowak RM, Paradiso JL. Walker's Mammals of the World. Marsupialia. Volume I Fifth edition. Baltimore and London: *The Johns Hopkins University Press* 1991; 10 - 113.
77. Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Gonçalves A, Vélez ID. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colômbia. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 84: 676-677.
78. Travi BL, Osório Y, Guarín N, Cadena H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol* 1998; 88: 73-75.
79. Arias JR, Naiff RD, Miles MA, Souza AA. The opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis* guyanensis in the Amazon Basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75 (4): 537-5.





80. Arias JR, Naiff RD. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, central Amazon of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1981; 76 (3): 279-286.
81. Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM, Jansen AM. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003; 45: 79-83.
82. Brener Z. Calazar canino em Minas Gerais [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 1957.
83. Marsden PD, Jones TC. Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. In Chang KP & Bray RS, editors. *Leishmaniasis*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers; 1985. P. 183-198.
84. Mohammed AR, Wright EP, Abdel Rahman AM, Kolk A, Laarman JJ, Pondman KW. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80: 271-274.
85. Genaro O, Mayrink W, Michalick MSM, Dias M, Costa CA, Melo MN. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83: 43.
86. Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994. 50: 296-311.
87. Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulálio C, Lopes U, Fernandes O, Degraeve W, Barker-Jr RH, Badaró R, David JR. Comparison of the polymerase and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53(3): 251-255.
88. Ferreira EC, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schallig H, Gontijo CM. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 2007; 146 (3-4): 235-241.
89. Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Quilici M. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 746-749.
90. Wilson SM. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: Fields applications and practicalities. *Ann Trop Med Parasitol* 1995; 89 (1): 95-100.
91. Hu XS, Yang WT, Lu HG, Yan HP, Cheng JP, Ma Y, Jin BQ, Zhang T. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. *J Parasitol* 2000; 86, n. 04, p. 822-826.
92. Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol* 2003; 113: 99-113.
93. Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFE, Secundino NFC, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* ssp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2002; 44: 255-259.
94. Schoönan G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe C. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47: 349-358.
95. Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S, Alvar J. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in co-infected patients with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 (1): 185-189.
96. Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Vianinia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonen-*





- sis causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2004; 90: 31-37.
97. Singh S, Dey A, Sivakumar R. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5:251-265.
98. De Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol* 2006; 140 (3-4), 231-238.
99. Simon S, Veron V, Carme B. *Leishmania* spp. Identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66(2)175-80.
100. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill 3rd FR, Smith TF. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1):165-256.
101. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (1): 21-25.
102. Parvizi P, Ready PD. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three *Leishmania* species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 2008; 13 (9): 1159-1171.
103. Parvizi P, Moradi G, Akbari G, Farahmand M, Ready PD, Piazak N, Assmar M, Amirkhani A. PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Parasitol Res* 2008; 103:1273-1278.
104. Medeiros AR, Silva Jr WA, Roselino AM. DNA sequencing confirms the involvement of *Leishmania (L.) amazonensis* in american tegumentary leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. *Clinics* 2008; 64:451-6.
105. Marcelino AP, Ferreira EC, Avedanha JS, Costa CF, Chiarelli D, Almeida G, Moreira EC, Leite RC, Reis JKP, Gontijo CMF. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 2011; 183: 54-58.
106. Alves CF. Determinação do Perfil de Citocinas e Quantificação da Carga Parasitária em Cães Naturalmente Infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) Com e Sem Expressão Clínica da Leishmaniose Visceral [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.
107. Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1666-1669.
108. Schulz A, Mellenthin K, Schonian G, Fleischer B, Drosten C. Detection, Differentiation and Quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence Resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1529-1535.
109. Monbrison F, Mihoubi I, Picot S. Real-time PCR assay for the identification of cutaneous *Leishmania* parasite species in Constantine region of Algeria. *Acta Trop* 2007; 102: 79-83.
110. Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BAS, Moreira OC, Brazil RP, Britto C. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. *Parasites & Vectors* 2012; 5:15.
111. Brandão-Filho SP, Dantas-Torres F, Tolezano JE, Shaw JJ. Hospedeiros reservatórios de *Leishmania* spp. associados à leishmaniose tegumentar americana, com especial ênfase no Brasil. In: Barral A, Costa JML. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas*, 2011. Cap 7 P. 65-74.





Aspectos entomológicos das leishmanioses

Fabiana de Oliveira Lara e Silva
Fundação Oswaldo Cruz - Belo Horizonte, MG
E-mail: flara@cpqrr.fiocruz.br

Transmissão das leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas causadas por protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* Ross, 1903. Este é dividido em dois subgêneros de acordo com o desenvolvimento no intestino do vetor: *Leishmania* e *Viannia*.¹ O ciclo de vida do parasito é digenético (heteroxênico), alternando-se entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, os flebotomíneos. A doença pode apresentar diversas formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da susceptibilidade do hospedeiro.² As duas formas clínicas básicas em que as leishmanioses humanas podem se apresentar são: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV).

Nas últimas décadas, têm ocorrido mudanças no padrão de transmissão da

LT. Inicialmente considerada uma zoonose de animais silvestres, só acometia o homem que ocasionalmente adentrava as florestas. Hoje, a doença já ocorre em zonas rurais, matas remanescentes modificadas e regiões periurbanas, onde a adaptação dos reservatórios silvestres e dos flebotomíneos é evidente, propiciando a formação do ciclo do parasito nesses ambientes.³

A LV tem aumentado significativamente sua importância no contexto de saúde pública, sobretudo devido às modificações no ambiente e à emergência de focos da doença em áreas urbanas.^{4,5} A crescente urbanização, associada à alteração no ambiente natural e à presença do vetor competente, tem favorecido o aumento da incidência de LV humana no Brasil.^{6,7}

A transmissão da doença se dá quando as fêmeas dos flebotomíneos se alimentam em um hospedeiro infectado, ingerindo macrófagos contendo as





formas amastigotas, que sofrem divisão binária no seu intestino, transformando-se em promastigotas. Estas formas se dividem por divisão binária longitudinal, passando por mudanças morfológicas e fisiológicas, e se diferenciam, por fim, em formas longas, que apresentam longo flagelo e alta motilidade, e não mais se dividem, promastigotas metacíclicas, as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado.^{8,9,10} Durante o repasto sanguíneo, os flebotomíneos injetam na pele do hospedeiro, juntamente com a saliva, as formas promastigotas do parasito. As células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) do hospedeiro endocitam estas formas, que se transformam em amastigotas e começam a se multiplicar no interior do fagolisossomo, infectando novas células do SMF quando a célula hospedeira original se rompe, ocorrendo à liberação destas formas. Estas serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo, então, a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea.

A transmissão da doença se dá quando as fêmeas dos flebotomíneos se alimentam em um hospedeiro infectado.

Biologia e ecologia dos flebotomíneos

Os flebotomíneos são dípteros pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, sendo os gêneros *Phlebotomus* (Rondani & Berté, 1840) e

Lutzomyia (França, 1924) responsáveis pela transmissão das leishmanioses no Velho Mundo e no Novo Mundo, respectivamente. O gênero *Lutzomyia* é subdividido em 15 subgêneros, 15 grupos e apresenta mais de 400 espécies.¹¹ É conhecido popularmente por mosquito-palha, biringui, cangalhinha, asinha branca, tatuquira, entre outros.¹² A importância dos flebotomíneos para

o homem e para os animais deve-se a seu papel como vetores naturais de alguns agentes etiológicos, como protozoários do gênero *Leishmania* e outros tripanossomatídeos, bactérias do gênero *Bartonella* e vários arbovírus.¹³

São insetos de pequeno porte (2 a 3mm), possuindo como característica o corpo com intensa pilosidade, hábitos de voo crepusculares e abrigam-se em locais úmidos e sombrios. Durante o pouso, mantêm suas asas em posição vertical característica. Os olhos são proeminentes, arredondados e bem separados, e as antenas são longas, formadas por 16 segmentos. Tanto os machos quanto as fêmeas necessitam de carboidratos para garantir suas funções vitais, como voo, acasalamento e postura. Apenas as fêmeas são hematófagas e, portanto, possuem importância epidemiológica.¹⁴

São holometábolos, com ciclo vital composto de fase de ovo, fase larval (compreende 4 estádios), fase de pupa





e adulto. Após a cópula, as fêmeas colocam seus ovos sobre um substrato úmido no solo e com presença de matéria orgânica, para garantir a alimentação das larvas. Os ovos eclodem geralmente de sete a 10 dias após a postura. As larvas dos flebotomíneos são bastante ativas, alimentam-se vorazmente e se deslocam com rapidez para buscar alimento, provável causa de dispersão na natureza.¹³ Seu desenvolvimento dura, em média, de 20 a 30 dias. Após esse período, as larvas de quarto estágio transformam-se em pupas, que são mais resistentes às variações de umidade do que os ovos e as larvas, normalmente permanecem imóveis e fixas ao substrato e não se alimentam. O período pupal, em condições favoráveis, tem duração, em média, de uma a duas semanas. O desenvolvimento do ovo ao inseto adulto compreende um período de aproximadamente 30 a 40 dias, de acordo com a temperatura.

Embora se conheçam os hábitos alimentares das formas imaturas, pouco se sabe sobre os criadouros naturais das larvas de flebotomíneos no Novo Mundo. O conhecimento específico desses sítios de criação pode facilitar o controle destes vetores.¹⁵ Os flebotomíneos utilizam como abrigos

As fêmeas colocam seus ovos sobre um substrato úmido no solo e com presença de matéria orgânica, para garantir a alimentação das larvas.

O desenvolvimento do ovo ao inseto adulto compreende um período de 30 a 40 dias.

uma grande diversidade de locais, como espaços existentes entre folhas caídas e o solo, tocas de animais, gretas nos troncos das árvores.¹⁴

A proximidade do homem às áreas de florestas e a criação de animais domésticos são atrativos para uma grande quantidade de espécies de flebotomíneos, que se deslocam para o peridomicílio. Ao serem atraídos, eles se estabelecem nessas áreas, e a presença desses pode contribuir para a manutenção do ciclo de transmissão e torná-los o elo entre animais domésticos e o homem.¹⁶ Ao final da década de 80, verificou-se a adaptação deste vetor aos ambientes urbanos,

em periferias de grandes centros, principalmente na região Sudeste, podendo ser encontrados no peridomicílio, em galinheiro, chiqueiro, canil, paiol, entre outros ambientes, e também no intradomicílio.

Espécies vetoras das leishmanioses

Muitas espécies têm sido incriminadas na transmissão da LT, em associação com *leishmanias* dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, porém somente algumas têm sido consideradas importantes vetores, com base nos seguintes critérios: grau de antropofilia, infecção





natural por *Leishmania* e distribuição espacial coincidente com a da doença.¹⁷

A transmissão do agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) envolve diferentes espécies de flebotômíneos em associações estreitas com parasitos e reservatórios, compondo os elos de diversos ciclos de transmissão que ocorrem em todo o Brasil. Os principais flebotômíneos transmissores da LTA no Brasil são *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* Lutz & Neiva, 1912; *L. migonei* França, 1920; *L. (N.) whitmani* Antunes & Coutinho, 1939; *L. (Pintomyia) fischeri* Pinto, 1926; *L. (Pintomyia) pessoai* Coutinho & Barreto, 1940; *L. (N.) umbratilis* Ward & Fraiha, 1977; *L. (Psychodopygus) wellcomei* Fraiha, Shaw & Lainson, 1971; *L. (Trichophoromyia) ubiquitalis* Mangabeira, 1942; *L. (Psychodopygus) complexa* Mangabeira 1941; *L. (Psychodopygus) ayrozai* Barreto & Coutinho, 1940; *L. (Psychodopygus) paraensis* Costa Lima, 1941; *L. (N.) flaviscutellata* Mangabeira, 1942.

No ciclo de transmissão da *Leishmania infantum* (sin = *L. chagasi*), agente etiológico da LV no Novo Mundo, a transmissão ocorre, principalmente, por meio da picada de fêmeas de flebotômíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912. Trabalhos têm demonstrado a possibilidade de *Lutzomyia evansi*¹⁸ agir como vetor na Colômbia, e o encontro de fêmeas de *L. cruzi* Mangabeira, 1938, infectadas em área endêmica para LV em Corumbá, Mato Grosso

do Sul, aponta para a possibilidade de essa espécie ser a transmissora da doença nessa área.¹⁹ Outras espécies podem abrigar, mesmo que experimentalmente, a *L. chagasi*, mas sem efeito sobre a transmissão da doença, pois acredita-se na existência de certa especificidade do vetor para as *leishmanias*.^{20,21}

Alguns autores levantam a hipótese da transmissão entre a população canina por meio de ectoparasitos, sugerindo a capacidade vetorial de pulgas e carrapatos.^{22,23,24} Outros autores sugerem que a transmissão possa ocorrer por meio de mordeduras, cópula ou transmissão vertical entre os cães, porém não existem evidências sobre a importância epidemiológica desses mecanismos de transmissão.^{25,26}

***Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)**

Nas Américas, a espécie *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal transmissora do agente etiológico causador da LV e cumpre todos os critérios estabelecidos para ser considerada um vetor competente, chamando a atenção para os essenciais, como antropofilia, distribuição espacial coincidente com os casos humanos da doença e encontro de exemplares naturalmente infectados por *L. chagasi*.²⁷ No Brasil, esta espécie ocorre nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste.¹⁴

Observações realizadas na região amazônica do Brasil²⁸ apontaram que a espécie *L. longipalpis* é essencialmente





silvestre e pode ser capturada em florestas remotas, distante das habitações humanas. No entanto, a maior parte dos estudos iniciais sobre a LV no Brasil foi realizada nos estados pouco arborizados do país, como consequência do desmatamento, e com isso houve a tendência de se pensar na LV como sendo uma doença que circulava somente entre o cão e esta espécie de flebotomíneo, em um ambiente essencialmente doméstico.

A *L. longipalpis* gradualmente foi colonizando o ambiente rural e, no final da década de 80, começou a invadir o ambiente urbano, instalando-se principalmente na periferia das cidades, onde passou a ser capturada no intradomicílio e no peridomicílio. Alguns aspectos comportamentais desta espécie têm papel fundamental no contexto da urbanização da LV, sobretudo devido aos seus hábitos ecléticos de alimentação e fácil adaptação ao ambiente doméstico.²⁷

As fêmeas de *L. longipalpis* invadem com rapidez as habitações, no domicílio e no peridomicílio, alimentam-se de sangue do homem, de cão, de galinha, de equídeos, suínos e caprinos.^{29,30} Observa-se que as fêmeas de *L. longipalpis* se concentram principalmente em galinheiros, o que tem considerável importância epidemiológica, já que esse ambiente não é borrifado comumente, e esta continua sendo uma importante medida de controle da LV.²⁸

Estudos realizados em áreas endêmicas para LV no estado de Minas Gerais mostraram que a espécie *L. longi-*

palpis é a mais abundante onde algumas características, como a baixa condição socioeconômica, o ambiente propício para a reprodução do flebotomíneo, com acúmulo de matéria orgânica e presença de animais domésticos, foram fatores determinantes para o encontro de alta densidade desta espécie. A maior parte destes exemplares foi encontrada no peridomicílio, mas é importante salientar a presença de considerável densidade no interior das casas, o que ilustra o caráter endofílico desta espécie, podendo a transmissão da LV ocorrer no ambiente intradomiciliar.^{31,32,33,34}

A detecção de fêmeas de *L. longipalpis* naturalmente infectadas em áreas endêmicas de LV tem grande importância no papel desempenhado por esta espécie na transmissão da doença nessas áreas.³⁵ A soma dos fatores acima mencionados com os diversos estudos demonstrando a infecção desta espécie por *L. chagasi* aumenta as evidências da participação desta no ciclo epidemiológico da LV.

Considerações finais

Sendo considerada uma doença multifatorial, as leishmanioses sofrem influência de um grande número de variáveis que determinam as formas clínicas observadas, como características do parasito, resposta individual, distribuição geográfica, hábitos socioculturais, ocupacionais e de moradia da população, hospedeiros e reservatórios envolvidos, entre outros. Nesse contexto, é





primordial para a compreensão da epidemiologia das leishmanioses o estudo da ecologia dos flebotomíneos, sendo este baseado na identificação minuciosa da fauna flebotomínica nas áreas onde a doença ocorre. Além disso, o conhecimento da fauna de flebotomíneos presente em uma região é importante para se determinar as principais espécies vetoras e até mesmo esclarecer questionamentos sobre espécies secundárias que possam participar na transmissão das leishmanioses. Estudos envolvendo a fauna flebotomínica e outros aspec-



Figura 1 – Fêmea de flebotomíneo adulto, ingurgitada

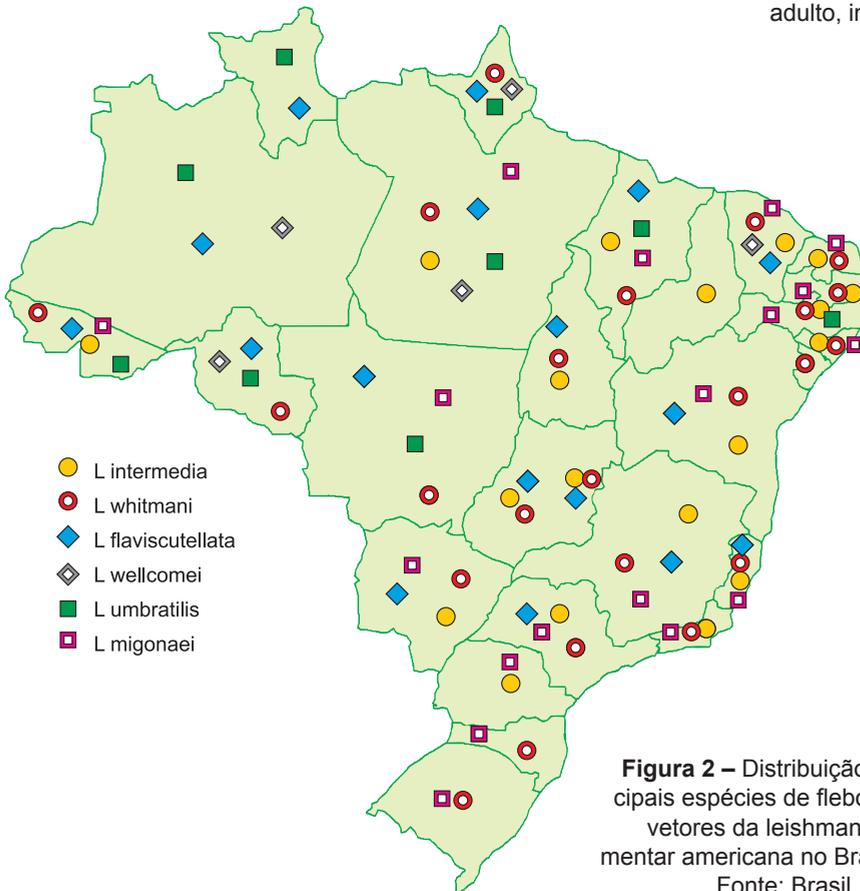


Figura 2 – Distribuição das principais espécies de flebotomíneos vetores da leishmaniose tegumentar americana no Brasil, 2005. Fonte: Brasil, MS 2007.





tos, como variação sazonal, diversidade genética, seus hábitos alimentares e a detecção de infecção natural, são fundamentais e auxiliam na compreensão da biologia, na determinação da diversidade e competência vetorial de uma espécie, e na possível importância epidemiológica dos flebotômíneos na transmissão da leishmaniose.

Referências

1. Lainson R, Ready PD, Shaw JJ. Leishmania in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian "uta", as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. Proc. Royal Soc. of London Series B. Biological Science. 1979; 206 (1164): 307-318.
2. Saravia NGL, Valderrama M, Labrada AF, Holguín C, Navas G, Palma A, et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in new World leishmaniasis. J. Infect. Dis. 1989; 159: 725-735.
3. Lima AP, Minelli L, Teodoro U, Comunello E. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoreamento orbital remoto orbital, no Estado do Paraná, Brasil. An. Bras. Dermatol. 2002; 77(7): 681- 692.
4. Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001; 96 (3): 285- 291.
5. Travi BL, Adler GH, Lozano M, Cadena H, Montoya-Lerma J. Impact of Habitat Degradation on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of Tropical Dry Forests in Northern Colombia. J. Med. Entomol. 2002; 39 (3): 451-456.
6. Luz ZMP et al. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília. 2001; 34 (3): 249-254,
7. Silva, ES et al. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2001; 96 (3): 285-291
8. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int. J. Parasitol. 2000; 30: 1269- 81.
9. Choi CM & Lerner EA. Leishmaniasis as an Emerging Infection. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 2001; 6: 175-182.
10. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int. J. Parasitol. 2007; 37(10): 1097-106.
11. Young DG & Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem. of the American Entomol. Inst. 1994; 54: 1-881.
12. Frões HP. Leishmaniose visceral no Brasil e especialmente na Bahia. Brasil Médico. 1935; 4: 109-112.
13. Sherlock IA. A importância dos flebotômíneos. In: Rangel EF & Lainson R., editores. Flebotômíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 2003. P. 15- 21.
14. Brazil RP & Brazil BG. Biologia de flebotômíneos neotropicais. In: Rangel EF & Lainson R, editores. Flebotômíneos do Brasil. 20 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. P. 257-274.
15. Feliciangeli, M. D. Natural breeding places of Phlebotomine sandflies. Medical and Veterinary Entomology, Oxford. 2004; 18: 7061-1067.
16. Missawa NA, Lorosa ES, Dias ES. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2008; 41(4): 365-368.
17. Rangel EF & Lainson R. Ecologia das Leishmanioses: transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana In: Rangel EF & LAINSON R, editores. Flebotômíneos do Brasil. 20 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2003; P. 291-309.
18. Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jamarillo C, Llano R, Velez ID. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Colombia. J. Med. Entomol. 1996; 33: 278-285.





19. Santos SO, Arias JR, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.* 1998; 12(3): 315-317.
20. Sherlock IA. Há especificidade dos flebotômíneos para as leishmânias? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1997; 30: 151-155.
21. Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis: The neotropical leishmania species. In: Cox Feg, Kreier JP, Wakelin D. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology.* 1998; 5: 241-266.
22. Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A., et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* . 2005; 128: 149-155.
23. Coutinho MTZ, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet. Parasitol.* 2007; 147: 320-325.
24. Paz GF, Ribeiro MFB, Michalsky EM, Lima ACVMR, França-Silva JC, Barata RA, ET al. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 2010; 106: 523- 528.
25. Santos RL, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TMA, Paixão TA, et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplantally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet. Parasitol.* 2009; 165(3-4): 327-31.
26. Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 2009; 160(1-2): 55-9.
27. Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad. Saúde Pública.* 2008; 24(12): 2948- 2952.
28. Rangel EF & Lainson R. Ecologia das Leishmanioses: *Lutzomyia longipalpis* e a Eco -Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil. In: Rangel EF & LAINSON R, editores. *Flebotomíneos do Brasil.* 20 ed. Rio de Janeiro: Editora Fliocruz; 2003; P. 311-336.
29. Sherlock IA, Guitton N. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia. III- Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.* 1969; 21: 541-548.
30. Passos-Dias FO, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodiade, Phlebotominae). *Cad. Saúde Pública.* 2003, 19: 1373-1380.
31. Souza CM, Pessanha JE, Barata RA, Monteiro EM, Costa DC, Dias ES. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004; 99(8): 795-803.
32. Barata RA, França-Silva JC, Costa RT, Fortes-Dias CL, Silva JC, Paula EV, et al. Phlebotomine Sand Flies in Porteirinha, na Area of American Visceral Leishmaniasis Transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004; 99: 481-487.
33. França-Silva JC, Barata RA, Costa RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GLL, Vieira EP, Prata A, Mayrink W, Nascimento E, Fortes-Dias CL, Silva JC, Dias ES. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.* 2005; 131: 213-220.
34. Monteiro EM, França-Silva JC, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2005; 38: 147-152.
35. Monteiro EM, Guedes KS, Lara-Silva FOL, França-Silva JC, Fortes Dias CL, Barata RA, Dias ES. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011; 44(1): 58-62.





Vetores mecânicos da *leishmaniose* visceral canina



Gustavo Fontes Paz

Rhipicephalus sanguineus e *Ctenocephalides felis felis*

Gustavo Fontes Paz

Fundação Oswaldo Cruz - Belo Horizonte, MG

E-mail: gustavopaz@cpqrr.fiocruz.br

1. Introdução

Embora a transmissão natural de *Leishmania infantum* (sin = *L. chagasi*) ocorra principalmente pela picada de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, outros mecanis-

mos de transmissão provavelmente estejam envolvidos na epidemiologia da leishmaniose visceral canina (LVC). Esse fato se justifica devido à baixa taxa de infecção natural por *L. chagasi* no vetor biológico, não excedendo, em sua

36

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº 65 - maio de 2012





maioria, 0,5%¹, assim como em razão da alta prevalência de cães infectados, encontrados principalmente no Brasil.^{2,3,4} Além disso, em algumas áreas endêmicas, *L. longipalpis* não é encontrada.⁵

Outra espécie de flebotomíneo que vem sendo incriminada como vetor em Corumbá, Mato Grosso do Sul, é *Lutzomyia cruzi*.⁶ Porém, devido a uma enorme semelhança morfológica, *L. longipalpis* e *L. cruzi* estão agrupadas no complexo longipalpis, sendo as fêmeas indistinguíveis nas duas espécies, cuja identificação taxonômica específica se torna possível por meio de pequenas diferenças morfológicas entre os machos.⁷

Fêmeas de outras espécies de flebotomíneos também foram encontradas infectadas por *L. chagasi* (com taxas de infecção não excedendo, em sua maioria, 1%), como *Lutzomyia almerioi*, na Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul⁸, *Lutzomyia neivai* e *Lutzomyia sallesi*, em Lassance, Minas Gerais.⁹ Até o momento, essas espécies ainda não são consideradas vetoras de *Leishmania* spp.

Uma das hipóteses a ser considerada seria a participação do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e da pulga *Ctenocephalides felis felis* como vetores mecânicos de *L.*

chagasi para a população canina, fazendo com que a incidência dessa infecção se mantenha alta e crescente nas áreas endêmicas, independentemente da presença e da densidade de *L. longipalpis*.

2. Outros vetores na transmissão da LVC

2.1 *Rhipicephalus sanguineus* (latreille, 1806)

São conhecidas mais de 825 espécies de carrapatos no mundo, divididas em três famílias: Ixodidae (625 espécies), Argasidae (195 espécies) e Nuttalliellidae (uma espécie). O carrapato vermelho do cão, *R. sanguineus*, é provavelmente a espécie mais distribuída em todo o mundo, sendo adaptada nas Américas do Norte, Central e do Sul, nas regiões Leste e Oeste da Índia, China, Austrália, Micronésia, Sudeste da Europa, Madagascar e África.¹⁰

Originária do continente africano, onde existem aproximadamente 20 espécies do gênero *Rhipicephalus*, a espécie *R. sanguineus* está distribuída em todo território nacional e acredita-se que tenha sido introduzida no Brasil por volta do século XVI, com a entrada dos coloniza-

dores. A espécie *R. sanguineus* está distribuída em todo território nacional e acredita-se que tenha sido introduzida no Brasil por volta do século XVI, com a entrada dos coloniza-

Participação do carrapato Rhipicephalus sanguineus e da pulga Ctenocephalides felis felis como vetores mecânicos de L. chagasi.

R. sanguineus é um carrapato trioxeno, necessitando de três hospedeiros para completar o ciclo biológico





dores europeus e seus animais.¹¹ *R. sanguineus* é um carrapato trioxeno, necessitando de três hospedeiros para completar o ciclo biológico, que envolve os seguintes estádios: ovo, larva, ninfa e adultos macho e fêmea. Dentro do ciclo de vida dos carrapatos, o estágio de fêmea ingurgitada é o de maior importância no crescimento da população, pois é o único que poderá dar origem a mais de um indivíduo; ou seja, enquanto uma fêmea poderá dar origem a milhares de larvas, uma larva ou uma ninfa poderá dar origem a apenas uma ninfa ou um adulto, respectivamente. Assim, pode-se inferir que, no ambiente onde ocorre um maior desprendimento de fêmeas ingurgitadas do hospedeiro, será encontrada a maior parte das formas de vida livre do carrapato, especialmente as fases de fêmeas em postura, ovos e larvas não alimentadas.¹² Desse modo, as medidas de controle devem ser direcionadas para o ambiente onde o cão vive, principalmente onde ele dorme, tendo em vista que 95% da população de carrapatos está na fase não parasitária e a maioria se desprende dos cães durante a noite.¹³

Esse carrapato é um dos principais parasitos de cães, sendo encontrado em alta prevalência em animais dessa espécie, que vivem em ambiente urbano. Com frequência, torna-se uma importante praga urbana, que começa a requerer atenção dos organismos de

38

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº 65 - maio de 2012

R. sanguineus é vetor da bactéria Ehrlichia canis e dos protozoários Babesia canis.

saúde pública, sendo, ainda, motivo de constante preocupação entre os profissionais veterinários em seus locais de atendimento. O parasitismo humano por *R. sanguineus*,

embora não seja muito comum, tem sido relatado em vários países do mundo, inclusive no Brasil e na América do Norte.^{14,15,16}

R. sanguineus é considerado um dos carrapatos de maior importância médico-veterinária do mundo. Além dos danos diretos que ele causa pelo parasitismo em si, o qual não muito raramente pode levar cães à condição de exangue, é também vetor da bactéria *Ehrlichia canis* e dos protozoários *Babesia canis* (= *B. vogeli*), *B. gibsoni* e *Hepatozoon canis*. Além disso, está envolvido na transmissão de riquetsias para humanos no Velho Mundo (especialmente *Rickettsia conorii*).

Em um trabalho francês, foi demonstrada a capacidade de *R. sanguineus* ser infectado experimentalmente, e manter *Leishmania* sp. na transmissão transestadial, assim como transmitir a infecção por inóculo de macerado para o roedor *Citellus citellus*. Contudo, o autor não descreveu de forma detalhada a metodologia utilizada, para uma melhor interpretação de seus resultados.¹⁷

Alguns pesquisadores do Mediterrâneo apresentaram argumentos a favor da transmissão de *Leishmania* sp. por *R. sanguineus*.¹⁸ O mesmo autor salientou que flagelados de gênero próximo





a *Leishmania* poderiam não apenas ser mantidos, como também se desenvolverem no tubo digestivo de ixodídeos.

No Brasil, apesar do pequeno número de *R. sanguineus* coletado (6 fêmeas, 11 machos e 22 ninfas), foi demonstrada uma taxa de infecção natural de 15,4%, detectada pela técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase), em cães soropositivos para *Leishmania* sp. A infectividade de *Leishmania* sp. encontrada nos carrapatos foi comprovada por meio de inoculação experimental de macerados de carrapatos positivos em hamsters (*Mesocricetus auratus*) pela via oral e peritoneal, atingindo taxas de infectividade da ordem dos 58,8% pela técnica de esfregaço em fígado e baço.¹⁹ Esse trabalho demonstrou, pela primeira vez, a transmissão mecânica experimental de *Leishmania* sp. pela ingestão de carrapatos infectados.

A técnica da PCR tem sido muito utilizada em pesquisa e diagnóstico na parasitologia veterinária, porém muitas vezes os resultados obtidos são interpretados equivocadamente. Devido à sua alta sensibilidade, pode-se detectar, aproximadamente, 1ng de DNA-alvo na amostra examinada ou até menos. Assim, essa pequena quantidade pode representar poucos parasitas, um único parasita e/ou até mesmo fragmentos deste agente.²⁰

Até o momento, foi encontrado

A infestação por R. sanguineus em cães de área urbana é um fator de risco para a leishmaniose visceral canina.

apenas kDNA de *Leishmania* sp. em diferentes estádios de *R. sanguineus* alimentados em cães com leishmaniose visceral, incluindo os estádios de pós-muda, sugerindo a manutenção e a trans-

missão transestadial de *Leishmania* sp. em *R. sanguineus*. No entanto, nenhuma forma do parasito foi encontrada nos estádios pesquisados.²¹

A infestação por *R. sanguineus* em cães de área urbana é um fator de risco para a leishmaniose visceral canina. Os cães infestados têm 53% mais chance de adquirirem a infecção em comparação aos cães sem infestação.²²

2.2. *Ctenocephalides felis felis* (bouché, 1835)

As pulgas, independentemente de sua espécie, são insetos com metamorfose completa, sendo seu ciclo biológico dividido em quatro fases diferenciadas: ovo, larva, casulo pupal e adulto. O ciclo biológico dos pulicídeos tem início quando os ovos são depositados entre os pelos dos hospedeiros. Após a oviposição, estes caem ao solo, tendendo a acumular-se em grandes quantidades nos locais habitualmente mais frequentados pelos hospedeiros. As larvas eclodem no intervalo entre um e 10 dias, de acordo com as condições ambientais de temperatura e umidade relativa, sendo o tempo médio de desenvolvimento





larval de cinco a 11 dias, passando por três estádios, separados entre si por duas mudas de cutícula. No final do seu desenvolvimento, o terceiro estádio larval deixa de se alimentar e esvazia seu trato digestivo, iniciando a produção de tênues fios de seda viscosos, para a formação do casulo pupal, que irá aderir-se a qualquer sujidade ambiental, como grãos de areia ou outro tipo de resíduo. A emergência das pulgas adultas ocorre cerca de cinco a nove dias após o início da pupação, podendo chegar a um tempo longo como 140 dias. As pulgas emergentes apresentam fototropismo positivo e geotropismo negativo, além de serem atraídas por vibrações, correntes de ar, gás carbônico, ruídos, odores e outros estímulos químicos. Logo após a emergência, as pulgas iniciam o repasto sanguíneo, e a oviposição ocorre num tempo máximo de 36 a 48 horas do primeiro repasto.²³

É incontestável que a espécie *C. felis felis* está muito mais disseminada entre os cães de área urbana do que sua congênera, *Ctenocephalides canis*.²³ Em Minas Gerais, foi verificado que de 4.499 pulgas capturadas de 282 cães provenientes de 11 municípios, a *C. canis* foi identificada em somente 0,76% das pulgas e estava presente em 3,19% dos cães.²⁴

C. felis felis também tem sido alvo de pesquisas devido à sua provável partici-

pação na epidemiologia da LVC.^{25,26}

Em um estudo, foram coletados 207 exemplares de pulgas (todos identificados como da espécie *C. felis felis*), provenientes de 59 cães soropositivos para *Leishmania* sp. Após dissecação de todo o material, em quatro pulgas (1,9%) foram identificadas formas promastigotas de tripanossomatídeos. Em 144 exemplares foi realizada a PCR, sendo 43 amostras (29,9%) positivas para *Leishmania* sp. Em outra amostra

de 409 pulgas, coletada de nove cães soropositivos, realizou-se macegado desses exemplares, sendo, posteriormente, inoculado pelas vias oral e peritoneal em 36 hamsters. Destes animais, seis morreram antes do término do experimento (seis meses pós-inóculo),

16 animais (53,3%) tiveram sorologia e PCR positivas para *Leishmania* sp., porém em nenhum foram encontradas formas amastigotas do parasito.²⁵

Em outro estudo mais recente, realizado em Araçatuba, São Paulo, 22 exemplares de *C. felis felis*, coletados de 22 cães soropositivos para LVC (sendo um exemplar por cão), foram submetidos ao exame da PCR e inoculados no peritônio de 22 hamsters. Os resultados demonstraram que 59% das pulgas apresentaram PCR positiva e 18% dos roedores foram positivos nos testes de

É incontestável que a espécie C. felis felis está muito mais disseminada entre os cães de área urbana do que sua congênera, Ctenocephalides canis.





ensaio imunoenzimático (ELISA) e PCR.²⁶

Outro dado importante é que as pulgas apresentam alta taxa de infecção natural por outros tripanossomatídeos, como *Leptomonas*, *Herptomonas* e *Criethidia*.²³ Desse modo, a infecção por *Leishmania* nessa espécie parece ser provável, mantendo a hipótese de sua capacidade vetorial na transmissão mecânica da LVC.

A infestação por *C. felis felis* em cães de área urbana também é um fator de risco para a leishmaniose visceral canina. Os cães infestados têm 300% mais chance de adquirir a infecção, em comparação aos cães sem infestação.²²

3. Considerações finais

É importante salientar que, para ser considerado um vetor biológico da leishmaniose visceral canina, o artrópode deve: (1) alimentar-se no reservatório animal; (2) suportar o desenvolvimento do parasito depois que o bolo sanguíneo infectado tiver sido digerido e expulso; (3) possuir parasitos indistinguíveis daqueles isolados de pacientes; e (4) ser capaz de transmitir o parasito por meio da picada.²⁷ A última característica faz com que tanto o carrapato

quanto a pulga dificilmente possam ser incriminados como vetores biológicos da leishmaniose visceral canina. Contudo, de acordo com os estudos realizados até o momento, *R. sanguineus* e *C. felis felis* podem estar atuando como vetores mecânicos dessa doença.

A infecção por Leishmania nessa espécie parece ser provável, mantendo a hipótese de sua capacidade vetorial na transmissão mecânica da LVC.

A infestação por C. felis felis em cães de área urbana também é um fator de risco para a leishmaniose visceral canina.

Para que a transmissão mecânica de *Leishmania* sp. pelo carrapato tenha importância epidemiológica, seriam necessários vários estádios infectados de *R. sanguineus*, presentes no ambiente, para que os cães pudessem ingeri-los e se contaminarem. Para isso, o protozoário teria que sobreviver ao processo de digestão do carrapato, multiplicar-se nessas condições e ser transmi-

tido para os outros estádios dentro do ciclo biológico.

A hipótese defendida neste artigo seria a possibilidade de os cães se infectarem por *Leishmania* sp. ao ingerirem carrapatos ingurgitados, principalmente teleóginas recém- desprendidas de animais infectados, ou então pela ingestão de machos na lambedura, devido a um maior trânsito desse estágio entre os animais. A importância epidemiológica dessa hipótese estaria restrita às áreas endêmicas para LVC com alta densidade e trânsito animal, como em vilas, favelas e canis, em associação às altas ta-





xas de infestação pelo carrapato.

Com relação à pulga, a hipótese também defendida aqui estaria relacionada à ingestão pelos cães de pulgas, ou fezes de pulgas, contaminadas com *Leishmania* sp. As pulgas infectadas poderiam ser ingeridas pelos cães ao passarem de um cão infectado para um sadio, durante lambedura ou amamentação de filhotes.

Um dado também importante, do ponto de vista prático, são os frequentes relatos dos agentes de controle de endemias e da população de áreas endêmicas da intensa infestação por pulgas e carrapatos nos cães, principalmente nos que são submetidos à eutanásia nos Centros de Controle de Zoonoses (CCZs), devido à detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. nesses animais.

Estes estudos indicam que *R. sanguineus* e *C. felis felis* (Bouché, 1835) podem estar atuando na natureza como vetores mecânicos de *Leishmania* sp., contribuindo para a manutenção da doença na população canina. Entretanto, são necessárias mais pesquisas para rejeitar ou não essa hipótese.

4. Referências

1. MONTOYA-LERMA, J.; CADENA, H.; OVIEDO, M. et al. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. Longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Trop.*, v.85, p.19-29, 2003.
2. FRANÇA-SILVA, J.C.; BARATA, R.A.; COSTA, R.T. et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.10, p.213-220, 2005.
3. MICHALSKY, E.M.; ROCHA, M.F.; DA ROCHA-LIMA, A.C. et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.*, v.147, p.67-76, 2007.
4. NUNES, C.M.; LIMA, V.M.; PAULA, H.B. et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.23, p.6:19, 2008.
5. ROMERO, G.A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v.4, p.e584, 2010
6. SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.*, v.12, p.315-317, 1998.
7. MARTINS, A.V.; FALCÃO, A.L.; DA-SILVA, J.E. et al. Nota sobre *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Mangabeira, 1938), com a descrição da fêmea (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.79, p.439-442, 1984.
8. SAVANI, E.S.M.; NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B. et al. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.24, p.160-18, 2009.
9. SARAIVA, L.; CARVALHO, G.M.L.; GONTIJO, C.M.F. et al. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J. Med. Entomol.*, v.46, p.1159-1163, 2009.
10. SOULSBY, E.J.L. Biology of Parasites. Emphasis on Veterinary Parasitosis. Academic Press. New York and London., p. 72-77, 1966.
11. LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapato





- em Cães no Brasil. *Clin. Vet.*, v.30, p.24-32, 2001.
12. PAZ, G.F.; LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C. Drop off rhythm of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) of artificially infested dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.17, p.139-44, 2008.
 13. PAZ, G.F.; LEITE, R.C. OLIVEIRA, P.R. Control of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) in the kennel of the UFMG Veterinary School, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.17, p 41-44, 2008.
 14. GOTHE, R.; WEGEROT, S.; WALDEN, R. et al. Epidemiology of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs in Germany. *Kieinti-erpraxis*; v.34, p.309- 320, 1989.
 15. DANTAS-TORRES, F.; DE BRITO, M.E.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.31, p.54-60, 2006.
 16. GUGLIELMONE, A.A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D.M. et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South América. *Exp. Appl. Acarol.*, v.40, p.83-100, 2006.
 17. BLANC, G.; Caminopetros, J. La trasmission du Kala - Azar méditerranéen par une tique: *Rhipicephalus sanguineus*. *C. R. Acad. Sci.*, v.191, p.1162 - 4, 1930.
 18. SHERLOCK, I.A.; MIRANDA, J.C.; SADI-GURSKY, M. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.79: p.5-11, 1984.
 19. COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v.128, p.149-55, 2005.
 20. PRICHARD, R. Application of molecular biology in veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.*, v.31, p.155-175, 1997.
 21. PAZ, G.F.; RIBEIRO, M.F.; MICHALSKY, E.M. et al. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.*, v.106, p.523-8, 2010.
 22. PAZ, G.F.; RIBEIRO, M.F.; MAGALHÃES, D.F. et al. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. *Prev. Vet. Med.*, v.97, p.131-3, 2010.
 23. LINARDI, P.M.; GUIMARÃES, L.R. Siphonápteros do Brasil. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
 24. LINARDI, P.M.; NAGEM, R. L. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. *Rev. Bras. Biologia*, v.33, p.529 - 38, 1973.
 25. COUTINHO, M.T.Z.; LINARDI, P.M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet. Parasitol.*, v.147: p.320-5, 2007.
 26. FERREIRA, M.G.P.A.; FATTORI, K.R.; SOUZA, F. et al. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet. Parasitol.*, v.165: p.150-154, 2009.
 27. KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.*, v.4, p.1-24, 1990.





Vigilância e controle da leishmaniose visceral no contexto urbano

Maria Helena Franco Morais^{1,2}, Vanessa Oliveira Pires Fiúza¹, Valdelaine Etelvina Miranda de Araújo^{1,2}, Mariângela Carneiro²

¹Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura de Belo Horizonte, MG

²Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

E-mail: mhfmorais@yahoo.com.br

Introdução

As leishmanioses são caracterizadas por sua diversidade e complexidade. Doenças metaxênicas, são causadas por mais de vinte espécies de protozoários do gênero *Leishmania* spp., parasitas in-

tracelulares obrigatórios e transmitidos aos hospedeiros e reservatórios, entre eles o homem, por aproximadamente 30 espécies de flebotomíneos. Ocorre de forma endêmica em grande área dos trópicos, regiões subtropicais e na





bacia do Mediterrâneo, e é composta por quatro principais síndromes clínicas: leishmaniose visceral (LV), geralmente fatal quando não tratada; leishmaniose mucosa (LM), uma forma que pode levar à mutilação de mucosas nasais e bucais; leishmaniose cutânea difusa (LCD), doença de longa duração, que pode ocorrer devido a sistemas imunitários deficientes; e a leishmaniose cutânea (LC), que pode ser incapacitante quando as lesões são múltiplas¹.

O gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania*, engloba várias espécies, entre as quais duas que levam à ocorrência da forma visceral da doença: *Leishmania (Leishmania) infantum*, zoonose que ocorre na Europa, no norte da África e na América Latina, e *Leishmania (Leishmania) donovani*, antroponose endêmica no leste da África e na Índia.¹

O número total de novos casos humanos de LV, no mundo, é estimado em cerca de 500.000, com 50.000 óbitos a cada ano. Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal, Sudão e Etiópia representam aproximadamente 90% dos casos estimados da doença.² Governos da Índia, do Nepal e de Bangladesh, onde ocorrem 67% do número de casos mundiais, propuseram a

Leishmaniose visceral: pode ser fatal quando não tratada; leishmaniose mucosa: mutilação de mucosas nasais e bucais; leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose cutânea: incapacitantes quando as lesões são múltiplas.

implantação de programa para reduzir a incidência anual da doença para um caso por 10.000 habitantes e, com isto, eliminar sua ocorrência até o ano de 2015.³

Na Europa, a situação da LV tem-se tornado uma séria questão, com aumento do número de casos clínicos, assim como de infecção

assintomática em humanos. Estima-se que, para cada caso de leishmaniose visceral humana (LVH), possa haver de três a 10 infecções subclínicas. Bancos de sangue em regiões endêmicas no sul da França, na Grécia e na Espanha detectaram 3,4%, 15% e 22,1% de sororreatividade, respectivamente. Em regiões endêmicas da Espanha são encontrados até 34% de positividade canina.⁴

No Brasil, a LV é causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi* (= *L. infantum*), uma zoonose transmitida principalmente por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*. O cão é considerado o principal reservatório urbano do parasita, desempenhando um papel importante

na transmissão e na epidemiologia da doença.⁵

A complexidade epidemiológica, somada ao processo de urbanização da LV no Brasil, que ocorre desde a década de 1980, tornou a vigilância

No Brasil, a LV é causada pela Leishmania chagasi transmitida por Lutzomyia longipalpis.





e o controle um desafio. Diante disso, evidências científicas podem ajudar no planejamento, no monitoramento, na avaliação e na atualização necessária ao programa de controle. A presente revisão apresenta estudos úteis nesse contexto.

Situação epidemiológica da leishmaniose visceral e medidas de controle desenvolvidas

A incidência anual média da LVH no Brasil, no período de 1990 a 2009, foi de aproximadamente 1,8/100.000 habitantes.⁶ Entre 1994 e 2005, a letalidade média anual foi de 5,5%, com incremento de 117% no ano de 2005 (6,9%) em relação a 1994 (3,2%).⁷ A alta letalidade é o principal problema da LV, e atualmente sua ocorrência tem sido vinculada à presença de comorbidades.^{8;9}

Inicialmente, a LV foi caracterizada como endêmica em áreas rurais, principalmente nos estados do Nordeste do Brasil. De 1980 a 2009, o Brasil registrou 71.119 casos novos da doença, com uma média anual de 2.452 casos. Desde a década de 1980, um número crescente de LVH tem sido relatado em grandes metrópoles brasileiras, com 94% dos casos registrados na região Nordeste, sendo esse percentual reduzido para 89% nos anos 90. Na década de 2000, com o avanço da

De 1980 a 2009, o Brasil registrou 71.119 casos novos da doença, com uma média anual de 2.452 casos

urbanização da doença, as regiões Norte e Sudeste apresentaram 37% dos casos, e a região Centro-Oeste 7%. No ano de 2009, foi confirmado o primeiro caso autóctone na região Sul, no estado do Rio Grande do Sul.¹⁰

Grandes cidades brasileiras, como São Luís (MA), Teresina (PI), Natal (RN), Aracaju (SE), Fortaleza (CE), Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Montes Claros e Sabará (MG), apresentaram casos autóctones já na década de 1980. No início dos anos 90, municípios como Belo Horizonte (MG), Feira de Santana (BA), Várzea Grande (MT), Araçatuba (SP), Aquidauana (MS) tornaram-se focos de leishmaniose visceral em áreas urbanas e, desde 2000, novas epidemias urbanas foram notificadas nos municípios de Palmas (TO), Três Lagoas e Campo Grande (MS), Caxias, Timon, Codó e Imperatriz (MA), Bauru (SP), Paracatu (MG), Cametá (PA) e outros.⁷

Ambientes com baixo nível socioeconômico e estrutura básica precária, muito comum em áreas rurais, são propícios para a ocorrência de LV. Os processos migratórios facilitaram a expansão da doença. Atualmente esse processo é continuado devido ao esvaziamento rural, à contínua movimentação populacional aliada ao crescimento desordenado das cidades, às intensas transformações ambientais e às altas





densidades demográficas.⁵

Essas questões remetem à heterogeneidade da transmissão no meio urbano. Os vários cenários de transmissão oriundos das diferenças intraurbanas apresentam maior ou menor semelhança com o padrão rural, formando um verdadeiro mosaico de realidades sociocultural-ambientais, que incidem na dinâmica da doença. Tais fatores favorecem o contato entre seres humanos, vetores e outros animais, porém não parecem ser suficientes para afirmar que exista um padrão epidemiológico urbano de transmissão, em oposição ao que ocorre no meio rural.¹¹

No Brasil, zona urbana é definida por lei municipal, e existe grande variabilidade de critérios utilizados para tais classificações entre os municípios.¹² Relacionadas a essas definições, o termo *urbano* refere-se às cidades e seu entorno, *urbanidade* ao estudo de condições de saúde relevantes para as áreas urbanas em dado momento, e *urbanização* ao complexo processo pelo qual as cidades crescem (ou diminuem), modificam-se e influenciam a saúde de sua população.¹³

Nesse contexto, estudos comparativos intraurbanos, que focalizam a distribuição espacial de grupos de indivíduos vivendo em uma mesma vizinhança, permitem avaliar associações entre características da unidade espacial em estudo, com eventos em

saúde, principalmente para delineamentos ecológicos e transversais.¹³ No caso de doenças com longa cadeia causal e de grande relação com o ambiente, como a LV, a proposição de medidas de intervenção deve levar em consideração as diferenças intraurbanas existentes.

Estudos que avaliam as ações de controle da LV têm sido realizados, no entanto os resultados são conflitantes. O início das atividades de controle no Brasil remonta ao ano de 1953, no estado do Ceará.¹⁴ Naquele momento foi proposto o controle sobre a tríade: tratamento de casos humanos; controle do reservatório canino e do vetor.¹⁵

Na década de 60, Magalhães *et al.*¹⁶ conduziram estudo de intervenção na região do Vale do Rio Doce, em Minas Gerais. Os resultados mostraram impacto prolongado na redução de LVH e da infecção canina. Esse estudo foi realizado sobre as mesmas bases de controle, porém em contexto diferente do atual.

Estudos avaliaram o papel do reservatório canino na epidemiologia da doença. Dietze *et al.*¹⁷, em ensaio controlado, investigaram o papel de cães soropositivos na

infecção humana por LV. Não encontraram diferenças significativas entre a incidência de soroconversão de humanos nas áreas de intervenção comparadas à área-controle ao final de 12 meses de estudo, apesar da retirada dos cães soropositivos.

O início das atividades de controle no Brasil remonta ao ano de 1953, no estado do Ceará.





Ashford *et al.*¹⁸ avaliaram o efeito da remoção de cães infectados por *Leishmania sp.* sobre a soroconversão canina e a incidência de leishmaniose visceral em crianças. Observou-se redução significativa da incidência de sororreatividade canina, assim como da incidência de doença em crianças com menos de 15 anos de idade. Entretanto, os autores questionam se os resultados obtidos relacionaram-se à efetividade do controle em cães.

Várias questões têm sido descritas como limitantes na obtenção de melhores resultados no controle do reservatório. O intervalo de tempo entre a realização da coleta e a eutanásia do cão reagente é apontado como um dos fatores que interferem na efetividade do programa. A retirada otimizada de cães, sete dias após a coleta, em grupo de cães examinados com a técnica de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), reduziu em 27% a sororreatividade canina após seis meses.

No grupo-controle, os cães foram examinados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e recolhidos com intervalo médio de 80 dias. Esse grupo apresentou redução de 7% na soroprevalência. Os autores salientam que, além do menor prazo de recolhimento, a maior sensibilidade do ELISA também contribuiu para obtenção desses resultados, e a utilização da RIFI nos inquéritos sorológicos caninos

pode ter interferido na efetividade dessa estratégia, devido à permanência de cães infectados no ambiente.¹⁹

O estudo da movimentação de cães em Jequié, Bahia, mostrou a importância desse reservatório no surgimento de novos focos da doença, bem como a dificuldade das ações de controle. Os autores também chamam a atenção para a ocorrência de áreas com concentrações de cães positivos, porém sem casos humanos. Novas áreas com casos de LVH podem surgir, se medidas não forem implementadas.²⁰

Avaliando as estratégias propostas pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), Camargo-Neves²¹ identificou o controle de reservatórios como sendo a de melhor custo-benefício.

A migração de cães para áreas sob intervenção, funcionando como reposição de animais recolhidos, chegou a 50% da população canina em estudo, sendo que, destes, 15% já se encontravam infectados ao serem introduzidos na população.²² Estudo realizado em Araçatuba, São Paulo, identificou reposição canina de 39% dos cães recolhidos, no período de agosto de 2002 a julho de 2004.²³

Oliveira e Araújo²⁴ avaliaram as ações de controle de LV desenvolvidas rotineiramente em Feira de Santana, Bahia, no período de 1995 a 2000. Encontraram relação significativa inversa

A retirada otimizada de cães, sete dias após a coleta reduziu em 27% a sororreatividade canina após seis meses.





entre número de ciclos de borriiação de imóveis para controle vetorial e incidência de casos humanos.

Nos anos de 1995 e 1996, foi realizado um estudo comunitário randomizado de intervenção em Teresina, Piauí com o objetivo de avaliar a efetividade das intervenções conjuntas sobre o controle vetorial e de reservatórios. Foram realizados quatro tipos de intervenções em áreas distintas. Os resultados mostraram que a eliminação do reservatório canino, associada à borriiação intradomiciliar, reduziu a incidência de infecção em humanos, em comparação com área onde somente ocorreu borriiação intradomiciliar. Por outro lado, a borriiação intradomiciliar, associada à borriiação de anexos, com ou sem eliminação de cães infectados, não esteve significativamente associada à redução da infecção humana.²⁵

Souza et al.²⁶ realizaram ensaio comunitário para avaliação da efetividade das estratégias de prevenção e controle da LVH no município de Feira de Santana (BA). Duas áreas receberam ações de controle diferenciadas: uma com controle vetorial químico e outra com controle vetorial e do reservatório. A terceira foi selecionada como área-controle. A densidade de incidência da infecção foi de 2,5, 1,9 e 2,7 casos/100 crianças, respectivamente, nas três áreas. Apesar de

o resultado desse estudo indicar redução em torno de 30% na incidência de infecção nas áreas sob intervenção, essa diminuição não foi significativa.

Ao descreverem a epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, cuja capital, Teresina, foi o primeiro grande município com ocorrência de epidemia no Brasil, Costa *et al.*²⁷ identificaram entre os municípios com menores coeficientes de incidência de LVH daquele estado aqueles em que os imóveis receberam tratamento focal ou preventivo com DDT.

Dye²⁸ modelou o efeito de diferentes estratégias na transmissão da leishmaniose e mostrou que o controle vetorial químico foi mais efetivo do que o controle dos reservatórios na redução da incidência e da prevalência tanto da LV humana quanto da canina.

No entanto, merecem destaque as condições e os produtos químicos utilizados nesses estudos, que são completamente diferentes do contexto mais recente da leishmaniose visceral. Segundo o PCLV, para maior efetividade do controle vetorial, é necessária a realização de alterações ambientais que dificultem o estabelecimento do vetor na área, o que depende não só da intervenção do poder público como também de mudanças de comportamento da população. Esta última é uma medida da qual

Para maior efetividade do controle vetorial, é necessária a realização de alterações ambientais que dificultem o estabelecimento do vetor na área.





se esperam resultados a médio e longo prazo.⁵

Alternativas para o controle químico tradicional têm sido estudadas. No nível do controle individual, com repercussões no coletivo, existem as coleiras impregnadas com produtos químicos de ação repelente e inseticida. Estudo realizado no Ceará confirmou o efeito repelente e sobre a densidade de vetores do uso de coleiras impregnadas com deltametrina em cães.²⁹ Gavvani *et al.*³⁰ obtiveram resultados satisfatórios com uso de coleiras impregnadas com deltametrina em cães, reduzindo em 46% a taxa de infecção canina no primeiro ano, quando comparada com os cães sem uso da coleira, além de reduzir em 43% o risco de infecção em crianças.

Estudo recente realizado no Brasil mostrou que o impacto do uso de coleiras impregnadas pode ser maior do que o obtido pela estratégia de eutanásia, dependendo da cobertura obtida com o uso da coleira, bem como das perdas ocorridas na manutenção delas. Em áreas com baixos percentuais de sororreatividade canina, porém, o impacto de ambas as intervenções foi similar. Com o aumento da taxa de transmissão, espera-se melhor resultado do uso da coleira sobre a estratégia da eutanásia.³¹ Esses resultados coincidem com o obtido por Maroli *et al.*³² no sul da Itália, onde até 86,0% de proteção contra a infecção canina foi observada com

Técnicas de ELISA e RIFI são utilizadas para triagem e confirmação dos resultados.

o uso da coleira, em período no qual a transmissão da doença se mostrou mais intensa.

Alternativa de controle individual para os cães seria o uso de produtos *spot-on*, à base de permetrina (65%). Resultados de estudo em área endêmica de LV mostraram redução da incidência de infecção no grupo-tratado.³³

Courtenay *et al.*³⁴ testaram no Brasil o uso de cortinados impregnados com deltametrina como uma barreira física, em comparação com cortinados não tratados. Os resultados iniciais apontam melhor efetividade do efeito de barreira e de mortalidade de flebotomíneos. Essa estratégia tem sido utilizada em outros países, com resultados promissores.^{35; 36}

2.1. Diagnóstico canino

Os testes diagnósticos utilizados em inquéritos sorológicos também são descritos como fator que interfere no controle da transmissão da LV. Nos inquéritos caninos, as técnicas de ELISA (ensaio imunoenzimático) e RIFI (imunofluorescência indireta) são utilizadas, respectivamente, para triagem e confirmação dos resultados, segundo orientação do PCLV.⁵ Vários estudos têm buscado avaliar a acurácia dos testes utilizados.

Dye *et al.*³⁷ avaliaram o desempenho da RIFI na detecção de infecção por *L. infantum* em cães naturalmente infectados, propondo contrapor os





resultados de sensibilidade e especificidade aos encontrados em testes realizados com soros caracterizados. No acompanhamento da coorte, observaram variação nos valores de sensibilidade e especificidade da técnica, dependendo do momento da infecção. A sensibilidade máxima, porém, foi sempre inferior a 80%. Salientam que a utilização desse teste em inquéritos sorológicos caninos pode subestimar a prevalência de cães infectados assim como a dimensão do problema existente e dos desafios para o controle.

Rosário *et al.*³⁸ não encontraram diferenças significativas no desempenho das técnicas RIFI e ELISA ao avaliarem o uso dos dois testes em cães. Da mesma forma, os resultados obtidos na comparação entre testes de ELISA com antígenos brutos de *L. chagasi* e *L. amazonensis* e recombinantes rK39 e rK26 foram semelhantes, tanto em testes realizados com soro quanto em eluatos obtidos de coleta em papel-filtro.

Lira *et al.*³⁹ também avaliaram as técnicas diagnósticas utilizadas em inquéritos caninos, com o uso dos antígenos fornecidos por Bio-Manguinhos⁵ (Fiocruz, Brasil). O desempenho da RIFI foi similar ao do ELISA. Entretanto, com a utilização dos testes em série, a sensibilidade encontrada foi de 48%, e a especificidade de 100%. Os autores indicam a utilização desses testes em paralelo para obtenção de maior sensibilidade.

A comparação da técnica de RIFI com o teste de aglutinação direta

(DAT), em animais suspeitos de LV, demonstrou sensibilidade de 100% para os dois testes. A especificidade do DAT foi maior (91,0%), se comparada à encontrada para RIFI, de 74,0%.⁴⁰

Coura-Vital⁴¹*et al.* compar a prevalência de sororreatividade em cães a partir de resultados obtidos por meio da técnica de ELISA, utilizada na rotina do serviço para triagem de cães negativos, com reação em cadeia pela polimerase associada à restrição enzimática (PCR-RFLP). O estudo, desenvolvido na Regional Noroeste de Belo Horizonte entre os anos de 2008 e 2010, demonstrou diferença de 15,9% na detecção da infecção, ao comparar os resultados obtidos na PCR-PFLP com resultados do ELISA. Ao final desse estudo, aos 30 meses, somente 16% dos cães pertencentes à coorte não se infectaram, segundo resultados da PCR-RFLP.

Apesar dos vários estudos realizados para avaliação das técnicas diagnósticas, mantêm-se as questões acerca de quais técnicas podem representar melhores estratégias de uso e custo-efetividade para aplicação em inquéritos caninos.^{42;}

⁴³

Considerando a baixa sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos testes atualmente utilizados, principalmente com o *kit* de RIFI e as frequentes interrupções no fornecimento deles, o Ministério da Saúde orientou realização de estudo transversal, multicêntrico, randomizado e duplo-cego com o objetivo de validar os testes diagnósticos





sorológicos da LVC produzidos pelo laboratório de Bio-Manguinhos (Fiocruz, Brasil), gerando resultados que possam assegurar tomadas de decisão em saúde pública. Foram testados aproximadamente 1.400 soros de cães de área urbana com transmissão intensa e percentual de positividade canina maior que 10%. Foram comparados os resultados dos testes com ELISA *major like*, RIFI *major like* (1:40) e teste rápido imunocromatográfico (DPP), tendo exames parasitológicos como padrão ouro. Os resultados obtidos mostraram maior sensibilidade (87,88 IC95% 79,78-93,58) e especificidade (88,03 IC95% 86,68-90,21) do DPP e ELISA ao se comparar com ELISA e RIFI (sensibilidade de 86,00 IC95% 77,63-92,13 e especificidade de 85,71 IC95% 83,67-87,59) também utilizados em série. Foi igualmente melhor a reprodutibilidade apresentada pelo DPP (0,778 IC95% 0,745-0,812) e pelo ELISA (0,819 IC95% 0,851-0,884) em comparação à RIFI (0,459 IC95% 0,418-0,499). A partir dos resultados acima, foi orientada a substituição do método atual por utilização de DPP como teste de triagem usando sangue total, plasma ou soro sanguíneo, bem como a realização do ELISA como confirmatória, utilizando soro sanguíneo para os exames realizados em cães.⁴⁴

52

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº 65 - maio de 2012

2.2. Infecção humana

Como somente parte das pessoas infectadas desenvolve a doença^{45;46;47}, o conhecimento da situação de infecções subclínicas também é importante para avaliação da transmissão e dos fatores de risco ligados a ela. Além disso, a infecção humana é um quesito a ser considerado na proposição e avaliação de medidas de controle. Porém, a dificuldade de se diagnosticar esse tipo de infecção ocorre em função das técnicas disponíveis e dos baixos níveis de anticorpos no sangue.^{48; 49}

Badaró *et al.*⁴⁵ identificaram, em área endêmica para LV no Brasil, maior chance de se infectar por LV relacionada ao aumento da idade de crianças até 15 anos. O adoecimento, por sua vez, foi mais prevalente em crianças desnutridas e menores de cinco anos de idade (68%).

Inquérito sorológico realizado no Ceará, não encontrou risco diferenciado de infecção segundo a idade entre crianças de até 12 anos, mas o desenvolvimento da doença foi mais incidente em crianças de até quatro anos, com hematócrito abaixo de 33%, e que residem nas regiões de maior altitude, onde também ocorreu maior taxa de infecção. Das 710 crianças examinadas na avaliação da linha de base, 6,8% apresentaram





resultados reativos. A incidência anual acumulada foi de 4,6%, e a ocorrência de casos de LVH em familiares aumentou em três vezes o risco de infecção por LV.⁴⁶

Em localidade próxima a Salvador, capital da Bahia, inquérito sorológico humano não identificou diferença significativa na frequência de infecção por *L. chagasi* entre familiares (45%) e vizinhos (27%) dos casos.⁵⁰

Inquérito sorológico realizado entre 1987 e 1989, em área rural endêmica no interior do estado do Ceará, identificou incidência anual de 5% em crianças de até 11 anos. Crianças oriundas de residências com ocorrência anterior de casos de LVH apresentaram maior risco

de infecção (três vezes). A LVH ocorreu em 12% das crianças sororreativas, nos primeiros quatro anos do experimento. No estudo de seguimento, realizado em 1994, foram obtidas informações a respeito das crianças sororreativas, não havendo posterior desenvolvimento de leishmaniose clínica nessas crianças.⁵¹

No Maranhão, estudo sobre fatores de risco para infecção identificou os seguintes elementos: ocorrência de LVH em familiares, idade das crianças entre dois e cinco anos e local de moradia. Nesse estudo, porém, alguns resultados variaram conforme o teste utilizado (intradermorreação de Montenegro-IDR ou ELISA). Variáveis como presença

de flebotomos, cães e/ou galinhas na residência ou na vizinhança significaram proteção ou risco, conforme o teste diagnóstico considerado. A prevalência inicial foi de 13,5%, e a final, após um ano de acompanhamento, de 34,4%. A incidência da infecção foi de 28%.⁵²

Em inquéritos sorológicos realizados no Irã, 22% dos cães examinados foram sororreativos, média de infecção maior do que a encontrada em crianças assintomáticas (7%). A sororreatividade em crianças foi significativamente

maior nas vilas com maior número de cães, assim como naquelas com maior relação de cães/habitante. Ser proprietário de cães também foi considerado fator de risco para infecção

Há maior chance de se infectar por LV relacionada ao aumento da idade de crianças até 15 anos.

infantil.⁵³

Na cidade de Natal (RN), foi conduzido estudo com 216 famílias e 1106 indivíduos, identificados a partir de casos de LVH. Os resultados mostraram diferentes padrões de infecção, que variaram desde casos clínicos da doença (12%) a ocorrência de infecção assintomática com autorresolução (35%) e de infecção assintomática recente (1,9%). A ocorrência da doença nesse município tem sido relacionada ao crescimento de bairros da periferia da cidade, com tendência de diminuição em áreas onde ocorrem melhorias advindas do desenvolvimento urbano.⁵⁴

Os fatores de risco para infecção hu-





mana por *L. infantum*, encontrados em estudo transversal de base populacional no município de Sabará, Minas Gerais, variaram de acordo com os marcadores de infecção utilizados. As taxas de prevalência da infecção variaram entre 2,4 e 5,6%, dependendo do teste diagnóstico utilizado.⁵⁵ Na avaliação de fatores de risco, um modelo incluiu todos os participantes reativos na hibridização com sonda para o complexo *L. donovani*, enquanto outro incluiu, além destes, aqueles reativos em pelo menos um teste sorológico. A avaliação conjunta dos dois modelos identificou como fator de risco: presença de lixo não removido pela coleta pública, lixo não enterrado ou depositado fora de casa, relato familiar de conhecimento sobre o vetor, presença de áreas de erosão no bairro, tempo de permanência fora de casa entre 18 e 22 horas e ser proprietário de aves.⁵⁶ Os resultados desse estudo se assemelham aos achados de Caldas *et al.*⁵²

Avaliação da prevalência de infecção assintomática, por meio das técnicas de ELISA, com antígeno bruto e rk39, além da intradermoreação de Montenegro, foi realizada em 1520 crianças menores de 15 anos, no Maranhão. Os resultados mostraram prevalências similares para os dois antígenos utilizados na técnica

54

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº 65 - maio de 2012

de ELISA, sendo de 19,4% para rk39 e de 19,7% para antígeno bruto.⁵⁷

Inquéritos realizados no Irã demonstraram a presença de infecção subclínica por meio de sorologia e também PCR. Entre os que se apresentaram infectados, 18% residiam junto com pessoas que apresentaram LV clínica em momento anterior ao inquérito. O acompanhamento, durante 18 meses, de participantes que apresentaram PCR positiva não identificou desenvolvimento clínico de doença.⁵⁸

fator de risco: presença de lixo não removido pela coleta pública, lixo não enterrado ou depositado fora de casa, relato familiar de conhecimento sobre o vetor, presença de áreas de erosão no bairro, tempo de permanência fora de casa entre 18 e 22 horas e ser proprietário de aves.

Estudo conduzido na Região Metropolitana de Belo Horizonte avaliou 138 parentes e vizinhos de casos clínicos diagnosticados. As positivities na primeira avaliação, nas técnicas ELISA-*L. chagasi*, ELISA-rK39 e PCR, foram 9,4%, 5,1%, 18,1%, respectivamente. Após 12 meses de seguimento, somente 2,9% daqueles previamente positivos na PCR permaneceram

infectados, e 14,2% entre os negativos se tornaram infectados. Durante o seguimento, nenhum participante apresentou manifestação clínica de LV.⁵⁹ Ausência de adoecimento foi também observada em uma coorte de indivíduos infectados por *L. infantum* avaliados em três momentos, durante sete anos de acompanhamento.⁶⁰





Com o objetivo de avaliar técnicas utilizadas para diagnóstico da infecção assintomática por *L. infantum*, Romero *et al.*⁶¹ avaliaram os seguintes testes: ELISA com antígeno de promastigotas (ELISAp); ELISA com antígeno rk39 recombinante (ELISA rK39); ELISA com antígeno rk26 (ELISArk26); teste de imunofluorescência indireta com antígeno de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (RIFI) e teste imunocromatográfico com antígeno rK39 (TRALd). O melhor desempenho para diagnóstico de casos clínicos foi obtido pelas técnicas de RIFI e TRALd. Maior sensibilidade (69%) e especificidade (100%) foram obtidas com ELISA utilizando-se antígenos recombinantes. Os autores concluem que, devido às diferenças na positividade dos testes utilizados, juntamente com a baixa concordância entre os resultados, não é possível selecionar o melhor teste para o diagnóstico de infecção por *L. infantum*.

Recente estudo realizado no município de Raposa (Maranhão) identificou infecção por *L. infantum* em 18,9% dos indivíduos examinados, 47,8% dos cães e 1,56% da espécie vetora *L. longipalpis* capturada, o que ocorreu com maior frequência no peridomicílio (74,5%).⁶² Esse resultado é similar ao encontrado em área urbana de Belo Horizonte, onde inquérito sorológico identificou 17,1% de infecção em crianças de até sete anos.

Nesse estudo, após um ano do inquérito inicial, 68,0% das crianças com resultados sorológicos reativos foram reexaminadas. A positividade entre elas caiu para 8,7%, e nenhuma apresentou sintomas compatíveis com leishmaniose.⁶³

A avaliação da infecção humana tem sido frequentemente estudada. Como pode ser observado nos estudos acima, ela é importante na avaliação da real transmissão da LV. Entretanto, a baixa acurácia dos testes sorológicos e as dificuldades de implementação de técnicas moleculares para realização de inquéritos epidemiológicos podem comprometer resultados de estudos de avaliação, ao se subestimar a prevalência de infecção subclínica.⁶⁴

Por outro lado, investigações conduzidas em Bangladesh, Nepal e Sudão sugeriram que a sorologia é adequada para identificar infecção por *L. donovani* em estudos de campo, por apresentar alta sensibilidade e especificidade, e moderada concordância.^{65; 66; 67}

Além disso, considerando-se os elevados percentuais de infecção assintomática identificados entre seres humanos, é questionada a possibilidade de casos de LVH, pessoas com infecção subclínica ou, ainda, com infecção assintomática, funcionarem como fonte de infecção para o vetor.^{58;68} Experimentalmente, a infectividade para vetores, a partir de pessoas doentes, demonstrou infecção de 0,7% dos flebótomos utilizados, os quais se infectaram a partir de 11 dos 44 casos de LVH. Os indivíduos





assintomáticos não funcionaram como fonte de infecção.⁶⁹

2.3. Programa de controle da leishmaniose visceral (PCLV) proposto pelo ministério da saúde

O PCLV foi revisto em 2003 e tem como objetivo a redução das taxas de letalidade e do grau de morbidade, assim como a diminuição dos níveis de transmissão da doença. As estratégias propostas são: diagnóstico e tratamento precoces dos casos humanos, identificação e eliminação de reservatórios domésticos, controle vetorial, educação em saúde e manejo ambiental.⁵

Entre os componentes do PCLV, a vigilância epidemiológica tem por objetivo a redução das taxas de letalidade e do grau de morbidade, por meio do diagnóstico rápido e do tratamento precoce dos casos, assim como a redução dos riscos de transmissão da doença mediante o controle do reservatório, do vetor e das situações de risco. Desta forma, busca melhor definição das áreas silenciosas, de transmissão ou de risco e propõe ações de vigilância e/ou controle distintas para cada situação, além de medidas preventivas. As áreas com transmissão são estratificadas segundo critérios epidemiológicos, em

É questionado o fato de pessoas com infecção subclínica ou com infecção assintomática funcionarem como fonte de infecção para o vetor.

que cada município recebe uma pontuação de acordo com a média de ocorrência da LVH, nos últimos três anos. Os municípios com média de casos menor que 2,4 estão classificados como municípios de transmissão esporádica; aqueles com a média de casos entre 2,4 e 4,4 estão classificados como de transmissão moderada; e com média de casos > 4,4 estão classificados como de transmissão intensa. O último estrato é dividido entre municípios de transmissão intensa baixa ($\geq 4,4$ e < 17), intensa média (≥ 17 e $< 55,7$) e intensa alta ($\geq 55,7$).⁵

A estratificação epidemiológica das áreas serve de orientação para as diferentes medidas a serem implantadas. As ações voltadas para o diagnóstico precoce e o tratamento da LVH, assim como medidas educativas e de manejo ambiental, devem ser priorizadas em todas as situações.

O PCLV prevê ainda ações de vigilância, monitoramento e controle do reservatório canino. O monitoramento consiste em inquéritos sorológicos censitários (ISCC) e inquéritos amostrais. O ISCC está indicado para zonas urbanas de municípios silenciosos ou receptivos, com população canina menor que 500 cães; em setores urbanos de municípios classificados como de transmissão moderada ou intensa; ou ainda em se-





tores com prevalência canina maior ou igual a 2%. Segundo o PCLV, setores são conjuntos de quadras estratificadas para a implantação do Programa Nacional de Controle da Dengue (PCND), com aproximadamente 1.000 imóveis cada. Esse tipo de inquérito objetiva realizar o controle do reservatório e também avaliar a prevalência de infecção canina. Os inquéritos devem ser realizados anualmente, por no mínimo três anos, independentemente da confirmação de novos casos de LVH, a fim de se reduzir a transmissão na área. Além dos inquéritos, a eutanásia e o destino dos cadáveres também são previstos.⁵

O tratamento canino passou, a partir de 2008, a ser proibido no Brasil, por meio da Portaria Interministerial (IM) nº 1.426. Em 2009, o II Fórum de discussão sobre o tratamento da leishmaniose visceral canina realizado em Brasília, Distrito Federal, concluiu que o tratamento canino representa risco para a saúde pública com quatro consequências previstas: 1) contribuir para a disseminação de uma enfermidade que resulta na morte de, em média, 6,7% dos seres humanos acometidos no Brasil, podendo chegar a 17%, índice que pode aumentar ainda mais em indivíduos imunodeprimidos; 2) manter cães como reservatórios do parasito, o que representa risco para as populações humana e canina; 3) desenvolver a resistência de

O tratamento canino passou, a partir de 2008, a ser proibido no Brasil, por meio da Portaria Interministerial (IM) nº 1.426.

parasitos às poucas medicações disponíveis para o tratamento da leishmaniose visceral humana; 4) dificultar a implementação das medidas de saúde pública reforçando a resistência da população à eutanásia de animais que continuarão como fonte de infecção para o vetor. A recomendação do fórum foi manter a proibição do tratamento da LVC pelos Ministérios da Saúde e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, conforme a Portaria IM nº 1.426 (2008) que regulamentou o Decreto nº 51.838 (1963).⁷⁰

Outro componente do programa de controle é a vigilância entomológica, que tem por objetivo levantar informações quantitativas e qualitativas sobre os flebotômios

transmissores da LV. São recomendados levantamentos e investigações entomológicas e monitoramento das diferentes situações existentes. O controle vetorial químico dependerá das características epidemiológicas e entomológicas de cada localidade. Ele é recomendado em áreas com ocorrência do primeiro caso autóctone de LVH, após a investigação entomológica, e em áreas com transmissão moderada e intensa, de acordo com a curva de sazonalidade do vetor. O primeiro ciclo de borrifação deve ser feito ao final do período chuvoso, e o segundo três a quatro meses após o primeiro.⁵





Estrutura do programa de controle da LV no município de belo horizonte

Em 1992, os primeiros casos de leishmaniose canina foram diagnosticados no município de Sabará, situado na Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH). A maioria dos cães era proveniente do bairro Alvorada, vizinho da capital mineira.⁷¹ Em dezembro daquele mesmo ano, os primeiros cães infectados, oriundos dos Distritos Sanitários Nordeste e Leste, foram notificados ao Serviço de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte. Em 1993, foi firmada uma parceria entre a Secretaria Municipal de Saúde (SMSA) e a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), para realização de pesquisa de reservatórios positivos.⁷² A partir de 1994, ano em que foi confirmado o caso índice de LVH em Belo Horizonte, a SMSA assumiu as atividades de vigilância e controle da doença. Durante a série cronológica de ocorrência da LV em Belo Horizonte, foram realizados investimentos na estruturação do programa de controle.⁷³

Em 2004, foi publicado o Manual do PCLV pelo Ministério da Saúde.⁷⁴ O município de Belo Horizonte, com a finalidade de adequar-se às orientações do PCLV, realizou a estratificação epidemiológica referenciando as áreas de abrangência (AA) dos Centros de Saúde. Contudo, foi considerada

a incidência acumulada de casos humanos e não a média dos últimos três anos, conforme orientação do programa. Os estratos foram constituídos a partir dos seguintes percentis de incidência acumulada de LVH nas áreas de abrangência: $\leq 0,1$; 0,1 a 0,6; 0,7 a 0,9; e $> 0,9$, classificados, respectivamente, como de baixa transmissão, média, alta e muito alta transmissão. As áreas sem casos no período foram denominadas sem transmissão. Orientam-se ações de controle para as áreas com média a muito alta transmissão, associando-se o conhecimento sobre a sororreatividade canina e a situação socioambiental, para priorização das áreas a serem trabalhadas.⁷⁵

A estrutura laboratorial do município também foi ampliada para atender à necessidade do programa. Em 2001, o Laboratório de Zoonoses da SMSA (LZOON) tinha capacidade instalada para processamento de 96.000 amostras/ano, a qual foi ampliada para 156.000 amostras no ano seguinte. Em 2006, o LZOON teve tanto sua estrutura física quanto operacional reformadas, chegando à capacidade de produção de 216.000 amostras/ano.⁷³

No mesmo ano, foi implantado no Sistema de Informação de Controle de Zoonoses (SCZOO) o componente leishmaniose, subcomponente Inquérito Canino, possibilitando melhorias no acompanhamento e na avaliação das atividades de controle desenvolvidas.⁷⁶



Leishmaniose visceral humana (LVH)

A distribuição temporal de casos, óbitos e letalidade por LVH em Belo Horizonte, no período 1994-2011, é apresentada na FIG. 1.⁷⁷ A partir dos primeiros casos autóctones da doença relatados no Distrito Leste da cidade, na fronteira com o município de Sabará, iniciou-se o processo de urbanização e expansão da LV no município. No mesmo ano, 29 casos foram diagnosticados nos Distritos Leste e Nordeste da cidade.⁷² Após esse período, a doença se espalhou para áreas vizinhas, com aumento do número de casos notificados.

Entre 1994 e 2010, a incidência média em BH foi de 3,8/100.000 habitantes. Variou de 1,2/100.000 em 1998 a 7,2/100.000 em 2008. Na década de

2000, o aumento do número de casos coincidiu com a dispersão da doença para distritos sanitários até então pouco acometidos. A partir de 2008, observa-se uma inversão na curva, com redução de casos seguidamente nos anos 2009 a 2011 (FIG. 2).

A incidência média de LVH no município foi superior à média nacional (1,9%), entre 1994 e 2010. No Brasil, também houve inversão da tendência da curva a partir de 2008 (FIG. 3). Nos dois locais, observaram-se redução de casos em áreas priorizadas para o controle e surgimento de casos em áreas de transmissão esporádica ou sem transmissão. Isso pode ter sido um reflexo das medidas de controle implementadas a partir de 2004, segundo orientações do novo PCLV (Brasil 2003).

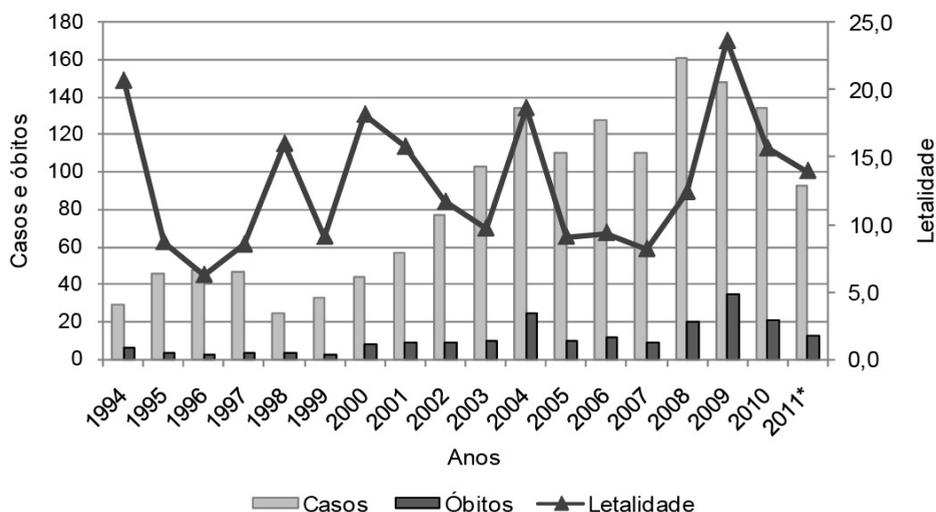


Figura 1 - Série temporal de casos, óbitos e letalidade de LVH no município de Belo Horizonte, 1994 a 2011.

Fonte: PBH/SMSA/GVSI/GEEPI/SINAN

*dados parciais atualizados em 13/03/12

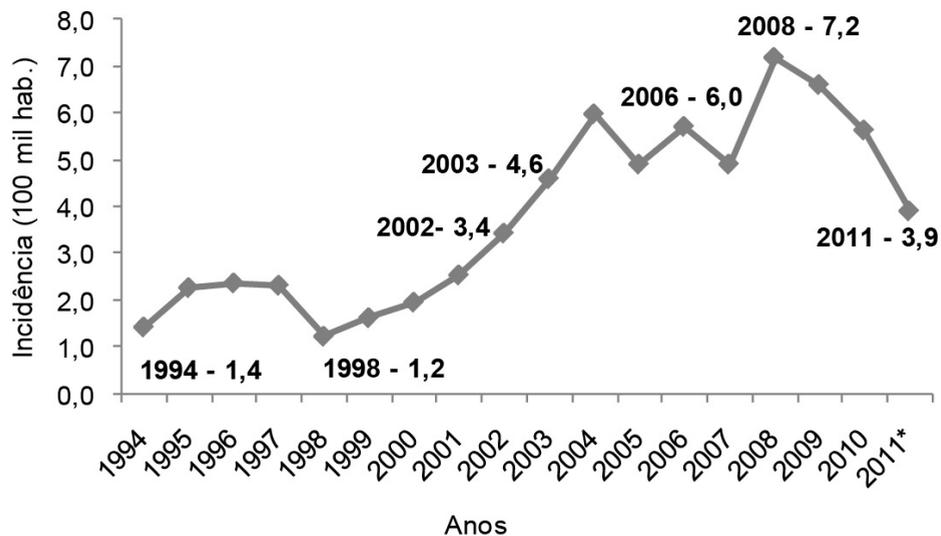


Figura 2 - Incidência de LVH (100.000 hab.) no município de Belo Horizonte, 1994 a 2011.

Fonte: PBH/SMSA/GVSI/GEEPI/SINAN

*dados parciais atualizados em 13/03/12

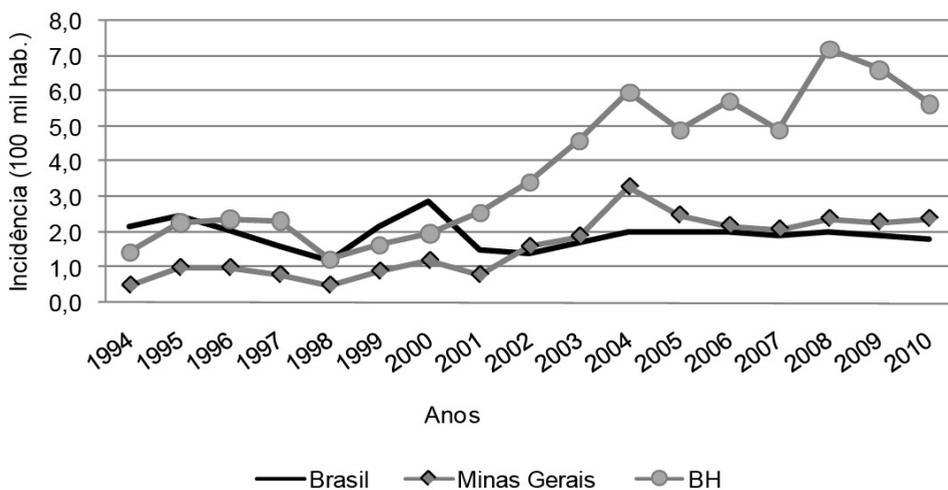


Figura 3 - Incidência de LVH (100.000 hab.) no Brasil, Minas Gerais e Belo Horizonte, 1994-2010.

Fonte: MS/SVS/SINAN - atualizado em 15/03/12, PBH/SMSA/GVSI/GEEPI/ SINAN





De 1994 a 1999, houve expansão da ocorrência da doença na região metropolitana de BH. O número de municípios que relataram casos de LVH no período aumentou de seis para 15, entre os 36 então existentes.⁷⁸

A letalidade média por LVH em BH foi de 13,5%, variando de 6,3% (1996) a 23,6% (2009). Em 2004, foi superior à registrada em 1994 (20,7%), uma década antes, quando ocorreram os primeiros casos de LVH no município (FIG. 1).

A análise de casos de LV ocorridos na capital, de 2008 a agosto de 2011, mostrou que 71,0% ocorreram no sexo masculino. A incidência foi mais elevada (37,5 casos por 100.000 hab.) entre crianças e adolescentes até 19 anos, e em maiores de 60 anos (35,4 por 100.000 hab.). Nesta faixa etária, ocorreu a maior letalidade (35,4%), sendo a menor (3,4%) entre os menores de 20 anos. Foram identificados 19 óbitos (22,6%) por LV com co-infecção por HIV, sendo 15 do sexo masculino. Entre os nove óbitos da faixa etária de 20 a 39 anos, cinco (55,5%) apresentaram coinfeção com HIV, três (33,3%) eram etilistas, e sete (77,8%) apresentaram uma e/ou outra dessas comorbidades. Tais associações estiveram presentes em 31,0%, 36,0%, 52,0% e 67% do total de óbitos, respectiva-

A avaliação de casos autóctones de LVH identificou a faixa etária de menores de cinco anos como a mais atingida, e o sexo masculino como o mais acometido a partir dos 10 anos de idade.

mente, de 2008 a 2011.⁹

A avaliação do perfil clínico-epidemiológico dos casos autóctones de LVH, ocorridos no período de 2002 a 2009, identificou a faixa etária de menores de cinco anos como a mais atingida, e o sexo masculino como o mais acometido a partir dos 10 anos de idade. Febre e esplenomegalia foram observadas em 87,3% dos indivíduos no momento da notificação. A maior chance de óbito ocorreu em pessoas que apresentaram pelo menos uma das seguintes características: 60 anos ou mais, fraqueza, presença de outro quadro infeccioso, fenômenos hemorrágicos, icterícia e coinfeção Leishmania-HIV.⁸

Foram publicados estudos sobre análise espacial da leishmaniose visceral em Belo Horizonte.

Um deles analisou a associação entre os casos incidentes de leishmaniose visceral humana e cães sororreativos nos nove Distritos Sanitários, entre 1994 e 1997. Os resultados mostraram correlação entre casos humanos e caninos.⁷⁹ Esse estudo refere-se ao período inicial de ocorrência da doença em Belo Horizonte, após o qual a leishmaniose visceral espalhou-se rapidamente pelo município.

Souza⁸⁰ et al. estudaram a distribuição de flebotomíneos relacionada à ocorrência de LVH (64 casos), cães so-





rorreativos (4.673) e informações sobre a biogeografia dos Distritos Sanitários, entre abril de 2001 e março de 2003. Encontraram áreas de concentração de sororreatividade canina nos seguintes Distritos: Leste, Nordeste, Noroeste, Oeste e Venda Nova, sendo 84,2% dos casos de leishmaniose humana relacionados à presença de cães sororreativos. Quanto às variáveis biogeográficas, somente a altitude mostrou associação com LV, estando 67,5% dos casos humanos e 71,9% dos cães sororreativos localizados entre 780 e 880m acima do nível do mar, locais onde também foram encontrados flebotomíneos.

A distribuição de agravos à saúde no ambiente urbano de Belo Horizonte, entre estes dengue e leishmaniose visceral, foi avaliada por Caiaffa *et al.*⁸¹ Descreveram altos índices de doenças vetoriais em regiões desfavorecidas socioeconomicamente e baixos índices em regiões mais favorecidas, sendo que os dois eventos raramente coexistem em uma mesma região.

Estudo de caso-controle investigou fatores de risco para LV em áreas urbanas e suburbanas da RMBH. Os casos (109 indivíduos com diagnóstico de LV) foram notificados de julho de 1999 a dezembro de 2000, em municípios da região metropolitana. Dois tipos de controle, vizinhança (106) e hospitalar (60), foram utilizados. O ambiente ex-

terno e a presença de animais no peridomicílio foram significativamente associados à maior chance de infecção por leishmaniose visceral.⁸²

Outro estudo de caso-controle realizado na capital analisou 82 casos de LVH ocorridos em 2004. Os 164 controles eram vizinhos dos casos. Observou-se, pela análise univariada, que os proprietários de cães apresentaram maior risco de contrair LV. Também foi verificada associação positiva entre a manutenção do cão no intradomicílio e a ocorrência de LV em humanos.⁸³

Análise espaço-temporal, do período de 2002 a 2009, descreveu estimativas de incidência de LVH mais elevadas nos Distritos Sanitários Norte, Nordeste e Venda Nova, nos dois primeiros anos. A partir de 2004, observou-se intensa expansão da doença em todos os Distritos Sanitários, mantendo, porém, diferença de incidência entre eles.⁸⁴

3.2. Reservatório canino

Ao assumir as atividades de controle da leishmaniose em Belo Horizonte, no ano de 1993, a SMSA/PBH realizou inquéritos sorológicos caninos a partir de dois casos humanos notificados nos Distritos Leste e Nordeste. A autoctonia deles não foi confirmada. Foram examinados 2.436

Altos índices de doenças vetoriais em regiões desfavorecidas socioeconomicamente e baixos índices em regiões mais favorecidas





cães; destes, 5,5% foram positivos.⁷²

Com a confirmação do primeiro caso autóctone, no ano de 1994, foram iniciadas as atividades de controle, segundo orientações do programa vigente. As medidas foram priorizadas nas áreas de confirmação dos casos humanos, com objetivo de controlar a doença. Para avaliar a situação no restante do município, foi realizado inquérito amostral nos nove Distritos, com positividade geral de 0,7%. As atividades de controle foram mantidas ao longo dos anos, com expansão das áreas de intervenção.^{79; 85}

Em 2004, já ocorriam atividades de controle em todos os Distritos, com incremento de pessoal e da capacidade laboratorial. A metodologia de controle foi adequada às orientações do novo manual do PCLV. Foram estratificadas as áreas de abrangência dos Centros de Saúde com base na incidência acumulada de LVH, priorizando aquelas com média, alta e muito alta transmissão. Nelas, foi realizado inquérito canino censitário anual, seguido de controle vetorial químico.⁷³ A partir de 2007, alguns Distritos passaram a utilizar o Índice de Vulnerabilidade à Saúde (IVS)⁸⁶, que é uma avaliação preexistente de risco à saúde, como mais um indicador na definição de áreas para inquérito censitário canino e controle vetorial químico.⁸⁷ Essa estratégia foi validada posteriormente

Inquérito amostral foi realizado no ano de 2005, identificando 4% de sororreatividade geral.

pelo estudo de Araújo⁸⁴ (2011).

Novo inquérito amostral foi realizado no ano de 2005, identificando 4% de sororreatividade geral. Ao longo do período analisado, o percentual de sororreatividade em cães foi variável (FIG. 4). Essa análise incluiu diferentes categorias de coleta, como inquéritos censitários, amostrais e solicitações recebidas dos proprietários dos animais. Tal fato faz com que o dado não reflita a real soroprevalência dos cães do município.

No período de 2006 a 2011 (FIG. 5), pode-se observar tendência de redução da soroprevalência canina. Esta é um indicador tanto da redução de transmissão da LV nos Distritos Sanitários (DS) como de dispersão dela no município, uma vez que, em 2011, a soroprevalência foi inferior a 4,0% em todos os DS, com exceção do DS Nordeste, onde foi de 4,2%.

Resultados “indeterminados e monitorar” obtidos a partir dos exames caninos são questões que merecem ser discutidas para o controle do reservatório urbano. Esses resultados, em BH, representaram, em média, 2,5% e 6%, respectivamente, das coletas realizadas a cada ano, no período de 2008 a 2011. Observou-se que, em média, 80,7% dos exames com resultados iniciais “indeterminados” tornaram-se reativos na segunda coleta, após 45 dias de intervalo da primeira.⁷⁶ Os resultados “monitorar”, referentes aos resultados





discordantes entre ELISA e RIFI, somente são contabilizados em Belo Horizonte, município que realiza tal registro desde 2008. O percentual observado

desses resultados é mais elevado do que o de resultados indeterminados. Em uma amostra de 30 cães “monitorar” submetidos à nova coleta de sangue,

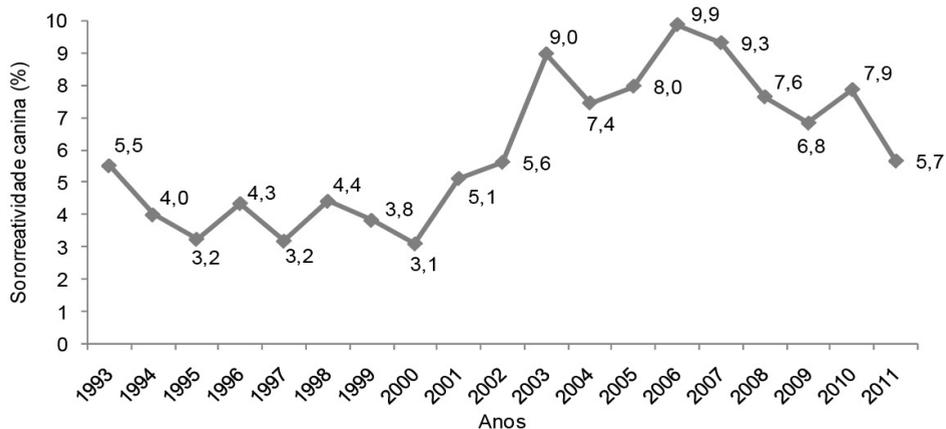


Figura 4 - Percentual geral de cães sororreativos, Belo Horizonte, 1994 a 2011.
Fonte: PBH/SMSA/GVSI/GECOZ/SCZOO

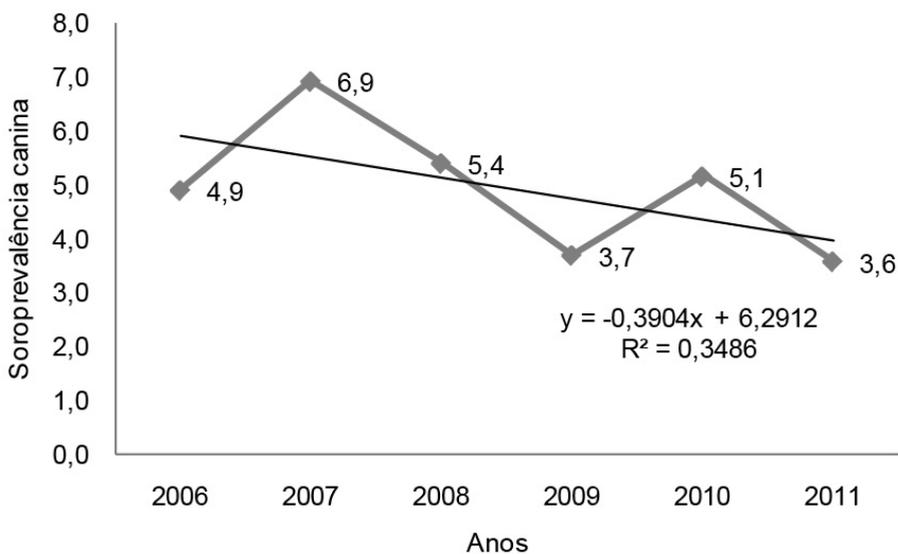


Figura 5 - Soroprevalência canina no município de Belo Horizonte, 2006 a 2011.
Fonte: PBH/SMSA/GVSI/GECOZ/SCZOO





cerca de 75 dias após o exame inicial, 50,0% deles apresentaram sorologia reativa, e 33,0% resultados “indeterminados”. Esse fato repercute na mensuração dos efeitos do programa de controle, uma vez que a identificação de somente “parte” dos cães sororreativos ou infectados é apontada como uma das causas da falta de efetividade dessa ação.^{37; 41; 88}

O acesso aos animais sororreativos para recolhimento e eutanásia é outra questão relevante. Em média, 87% dos cães sororreativos identificados pela SMSA, em Belo Horizonte, foram eutanasiados no período de 2006 a 2011. Foi adicionado a esse dado o número de cães “mortos” (média de 7%), segundo informação dos proprietários. A população canina coberta com exames sorológicos tem variado ao longo dos anos, e a maior cobertura ocorreu em 2010, quando 60,0% dos cães foram submetidos a inquéritos censitários.

Como fatores associados à infecção canina precoce por *L. infantum* (PCR-RFLP positiva), identificada em Belo Horizonte, estão as condições socioeconômicas do proprietário, o conhecimento dele sobre o vetor, o comportamento do cão quanto ao acesso à rua, bem como os cuidados dispensados ao animal.⁴¹ Esses resultados são válidos por permitirem melhor compreensão da transmissão da LV urbana e refletirem a importância de questões, como posse responsável e

condições de vida, na transmissão da infecção em cães.

3.3. Controle vetorial

Estudos entomológicos realizados no município em diferentes períodos e áreas demonstram a dispersão do vetor. Levantamento entomológico realizado em três áreas distintas do município, entre outubro de 1997 e setembro de 1999, capturou 397 flebotomíneos. Destes, 69%, 30% e 1% dos exemplares eram dos Distritos Leste, Nordeste e Barreiro, respectivamente.⁸⁹ Já no intervalo de abril de 2001 a março de 2003, um novo levantamento foi realizado em BH, com captura de 3.971 exemplares de flebotomíneos. A presença desses dípteros foi predominante nos Distritos Sanitários Leste, Nordeste, Noroeste, Oeste, Pampulha e Venda Nova. *L. longipalpis* foi encontrado com maior frequência no peridomicílio, enquanto nas áreas verdes *L. whitmani* foi a espécie mais capturada. O estudo demonstrou associação entre áreas com altitude entre 780 e 880m e a presença de flebotomos, casos humanos e cães sororreativos.⁸⁰

Mais recentemente, no período de julho de 2006 a junho de 2007, foi realizado inquérito entomológico na Regional Nordeste de Belo Horizonte. Foram capturados 245 espécimes, 21 destes foram identificados como *L. longipalpis*, espécie que apresentou a maior taxa de infecção por *L. infantum* (19%) entre as demais capturadas.⁹⁰





Com vistas ao controle vetorial, a aspersão de inseticida tem sido realizada no município ao longo dos anos. Até 2003, realizavam-se anualmente um inquérito canino e um ciclo de borrifação censitários nas áreas mais acometidas. As áreas de vigilância eram trabalhadas com raios em torno de casos humanos. A partir de 2004, o controle vetorial passou a ser direcionado com base no planejamento das atividades, de acordo com a priorização de áreas.⁷³ Há, entretanto, dificuldades na implementação dessa atividade. No período de 2008 a 2011, a média de pendência (imóveis fechados e recusas) dessa atividade foi de 28,9%. Além disso, o percentual de imóveis com borrifação total (intra e peridomicílio) foi de, no máximo, 45,0% dos imóveis trabalhados no período de 2008 a 2010. Maior cobertura domiciliar com borrifação total é desejável, a fim de se evitar o contato do vetor com indivíduos, que permanecem, em sua maioria, no interior das residências, no período de maior atividade dos flebotômíneos.

Santana Filho⁹¹ encontrou diferença significativa em 26% dos casos de LVH, em quatro áreas de abrangência da Regional Noroeste de BH. Ele comparou o perfil de recusas de borrifação nos quarteirões contidos em uma área de 200 metros ao redor de um caso de LVH, com o perfil dos quarteirões fora dessa área. O maior número de casos coincidiu com áreas onde ocorreu maior recusa da população em receber o serviço de controle químico.

3.4. Educação e manejo ambiental

A educação sanitária e o manejo ambiental são fundamentais para a mudança do padrão de ocorrência de LV, principalmente no contexto atual da urbanização da doença.⁵ No entanto, é uma atividade que necessita de intervenções diferenciadas, visando a mudanças de comportamentos, das quais, se efetivamente implantadas, esperam-se resultados tanto a médio quanto a longo prazo.

O controle ambiental, quando bem estabelecido, poderia levar a mudanças que impactariam na morbimortalidade da doença de forma mais efetiva, ao transformar ambientes propícios para manutenção e proliferação do vetor em ambientes inóspitos para ele, além de mais saudáveis para a população.²¹ A disseminação da informação sobre a leishmaniose visceral por escolares pode contribuir para as ações de prevenção da doença, segundo estudo realizado em Caeté, MG, levando, inclusive, a melhorias no manejo ambiental dos peridomicílios.⁹²

Borges *et al.*⁹³ avaliaram o nível de conhecimento e de atitudes preventivas em relação à leishmaniose visceral em Belo Horizonte, no ano de 2006. Cinquenta por cento dos humanos acometidos desconheciam a enfermidade quando adoeceram, e apenas 1,2% conhecia o vetor. Saber algo sobre leishmaniose visceral minimizou o risco de





adoecer em 2,24 vezes. Quanto às atitudes de proteção, o risco de se contrair leishmaniose visceral diminuiu em 1,94 vez dentre as pessoas que mantinham limpos os domicílios ou que levavam o cão ao veterinário, resultado que coincide com o de Coura-Vital *et al.*⁴¹

O trabalho diário dos agentes de combate a endemias (ACE) em BH visa a orientação dos proprietários sobre a doença e formas de prevenção. O manejo dos cães e a coleta sanguínea, assim como a atividade educativa exercida pelo ACE, foram avaliados em uma área de abrangência do Distrito Sanitário Noroeste de Belo Horizonte. A técnica de contenção foi considerada boa por 98% dos proprietários. O repasse de informações sobre posse responsável e sobre a leishmaniose necessita ser implementado durante a rotina de trabalho dos agentes, visando melhorar a conscientização da população quanto à importância de sua participação no controle da leishmaniose visceral.⁹⁴

Outro estudo avaliou o conhecimento de professoras dos três primeiros anos do ensino fundamental sobre leishmaniose, também na Regional Noroeste de BH. Observou-se que grande parte do conhecimento existente é referente às vivências pessoais e que as mestras creditam muito da responsabilidade do controle da doença ao serviço público. Também avaliam serem seus

alunos importantes multiplicadores de informação sobre leishmaniose e outras zoonoses.⁹⁵

Considerações finais

Os resultados atuais demonstram redução de casos humanos de LV nas áreas trabalhadas com maior intensidade. Apesar do curto período de observação e da necessidade de estudos sobre a efetividade da intervenção, a situação atual pode ser um reflexo da mudança

A educação sanitária e o manejo ambiental são fundamentais para a mudança do padrão de ocorrência de LV

de estratégia, que direciona ações de controle para áreas de maior risco, mas também uma demonstração da necessidade de se implementar e manter ações de vigilância, nas áreas de menor risco. A

vigilância também se faz importante para o trabalho em áreas onde houve redução de casos humanos e da soroprevalência canina, a fim de se evitar o recrudescimento da doença.

A atual proposta de mudança dos testes diagnósticos utilizados é uma medida importante, uma vez que a utilização de exames mais sensíveis e específicos possibilitará melhoria na identificação de cães sororreativos, inclusive em áreas com prevalência reduzida.

A inclusão no PCLV de variáveis que possibilitem a identificação de áreas com características para desenvolvimento dos vetores é uma necessidade premente. Um exemplo seria o trabalho desenvolvido em BH, que utilizou





indicadores de vulnerabilidade à saúde humana na priorização de áreas para controle vetorial, visto que essa estratégia, nos moldes em que é realizada atualmente, tem como principal resultado esperado a redução da transmissão da LV para o homem. A inclusão de dados sobre prevalência de infecção canina e de densidade de cães positivos por habitantes também demonstrou ser de utilidade no planejamento de intervenções de controle.

A educação ambiental e o manejo de ambientes urbanos densamente povoados constituem um grande desafio para o programa de controle. Sua inclusão na estratégia de saúde da família, modelo de atenção básica atualmente adotado no Brasil, pode ser uma saída para esta e demais endemias e agravos que tendem a se tornar cada vez mais urbanos.

Pelo exposto, o controle da LV precisa ser tratado como prioridade, seja pela sua complexidade, seja pelo padrão de resultados apresentado até o presente momento. Faz-se imprescindível, nos dias atuais, a integração entre a sociedade civil, no que diz respeito à posse responsável de animais e dos seus ambientes domésticos; entre diferentes categorias profissionais, como veterinários que comercializam cães e tratam deles; entre organizações não governamentais que trabalham questões relativas ao bem-estar animal; além de outros possíveis parceiros e do poder público, para a efetivação da prevenção e do controle da LV.

Referências

- 1 CHAPPUIS, F. et al. Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. *Trop. Med. Int. Health*, v.11, p.31-40, 2006.
- 2 WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva: *World Health Organization*: 172 p. 2010.
- 3 CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.*, v.5, p.873-882, 2007.
- 4 DUJARDIN, J.C. et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, v.14, 2008.
- 5 BRASIL. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. SAÚDE. Brasília: Editora do Ministério da Saúde: 120 p. 2006.
- 6 _____. Leishmaniose Visceral – Situação epidemiológica. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010
- 7 MAIA-ELKHOURY, A.N.S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saude Publica*, v. 24, p.2941-2947, 2008.
- 8 DE ARAÚJO, V.E.M. et al. Early Clinical Manifestations Associated with Death from Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v.6, p.1-9, 2012.
- 9 MORAIS, M.H.F. et al. Casos e óbitos por LV em Belo Horizonte, MG, 2008 a 2011. In: In: XV REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSES, 2011, *Anais...* Uberaba, MG, 2011.
- 10 BRASIL. 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. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010.
- 11 WERNECK, G.L. et al. Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial - 2004. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v.17, p.87-96, 2008.
 - 12 IBGE. Noções Básicas de Cartografia. http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/cartografia/manual_nocoos/elementos_representacao.html. Acessado em 08/01/2011.
 - 13 CAIAFFA, WT. et al. Saúde urbana: "a cidade é uma estranha senhora, que hoje sorri e amanhã te devora". *Cienc. & Saúde Coletiva*, v.13, p.1785-1796, 2008.
 - 14 COSTA, C.H.N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? a critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.44, p.232-242, 2011.
 - 15 DEANE, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre os reservatórios e transmissores realizados no Ceará. 1956. 162 (Tese de livre docência). Faculdade de Medicina da USP, Universidade de São Paulo, São Paulo.
 - 16 MAGALHÃES, P.A. et al. Calazar na zona do Rio Doce-Minas Gerais; Resultado das medidas profiláticas. *R. Inst. Med. Trop.* v.22, p.197-202, 1980.
 - 17 DIETZE, R. et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin. Infect. Dis.*, v.25, p.1240-2, 1997.
 - 18 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.59, p.53-7, 1998.
 - 19 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.*, v.31, p.419-424, 1998.
 - 20 PARANHOS-SILVA, M. et al. Cohort study on canine emigration and Leishmania infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Trop.*, v.69, p.75-83, 1998.
 - 21 CAMARGO-NEVES, V.L.F. Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo, Brasil. 2004. 205 Doutorado (Doutor). Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo.
 - 22 MOREIRA, E. D. et al. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine Leishmania transmission. *Vet. Parasitol.*, v.122, p.245-52, 2004.
 - 23 NUNES, C.M. et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.153, p.19-23, 2008.
 - 24 OLIVEIRA, S.S.; ARAÚJO, T.M. Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em uma área endêmica do Estado da Bahia, Brasil (1995-2000). *Cad. Saude Publica*, v.19, p.1681-1690, 2003.
 - 25 COSTA, C.H.; TAPETY, C.M.; WERNECK, G.L. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.40, p.415-9, 2007.
 - 26 SOUZA, V.M.M.D. et al. Ensaio comunitário para avaliação da efetividade de estratégias de prevenção e controle da leishmaniose visceral humana no Município de Feira de Santana, Estado da Bahia, Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 17, p.97-106, 2008.
 - 27 COSTA, C.H.; PEREIRA, H.F.; ARAÚJO, M.V. Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986. *Rev. Saude Publica*, v.24, p.361-72, 1990.





- 28 DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.55, p.125-30, 1996.
- 29 DAVID, J.R. et al. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.96, p.839-847, 2001.
- 30 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*, v.360, p.374-9, 2002.
- 31 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? *Int. J. Parasitol.*, v.34, p.55-62, 2004.
- 32 MAROLI, M. et al. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med. Vet. Entomol.*, v.15, p.358-63, 2001.
- 33 GIFFONI, J.H. et al. Evaluation of 65% permethrin spot-on for prevention of canine visceral leishmaniasis: effect on disease prevalence and the vectors (Diptera: Psychodidae) in a hyperendemic area. *Vet. Ther.*, v.3, p.485-92, 2002.
- 34 COURTENAY, O. et al. Deltamethrin-impregnated bednets reduce human landing rates of sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* in Amazon households. *Med. Vet. Entomol.*, v.21, p.168-176, 2007.
- 35 BERN, C. et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: Bed-net use is strongly protective. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.63, p.184-188, 2000.
- 36 RITMEIJER, K. et al. Evaluation of a mass distribution programme for fine-mesh impregnated bednets against visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Tropical Medicine & International Health*, v.12, p.404-414, 2007.
- 37 DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol. Infect.*, v.110, p.647-56, 1993.
- 38 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. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.100, p.197-203, 2005.
- 39 LIRA, R.A. et al. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet. Parasitol.*, v.137, p.11-16, 2006.
- 40 DA 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. *Vet. Res. Commun.*, v.30, p.637-43, 2006.
- 41 COURA-VITAL, W. et al. Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v.5, p.1291-2011, 2011.
- 42 PAHO. Pan American Health Organization/World Health Organization. In: 27th Pan American Sanitary Conference, 59th Session of The Regional Committee, 2007, *Anais...* Washington, D.C., USA, 2007.
- 43 ROMERO, G.A.S.; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America-A Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v.4, 2010.
- 44 BRASIL. Nota Técnica N01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. TRANSMISSÍVEIS. 2011.
- 45 BADARÓ, R. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J. Infect. Dis.*, v.154, p.639-49, 1986.
- 46 EVANS, T.G. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. *J. Infect. Dis.*, v.166, p.1124-1132, 1992.
- 47 WERNECK, G.L. et al. The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak





- of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.*, v.83, p.13-8, 2002.
- 48 PAMPIGLIONE, S. et al. Studies on Mediterranean leishmaniasis. 2. Asymptomatic cases of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v.68, p.447-53, 1974.
- 49 PIARROUX, R. et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, p.746-9, 1994.
- 50 OLIVEIRA JÚNIOR, A. et al. Asymptomatic *Leishmania chagasi* Infection in Relatives and Neighbors of Patients with Visceral Leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.92, p.15-20, 1997.
- 51 JERÔNIMO, S.M.B. et al. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in northeastern Brazil: Long-term follow-up. *Clinical Infectious Diseases.*, v.30, p.608-609, 2000.
- 52 CALDAS, A.J. et al. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v.96, p.21-8, 2002.
- 53 GAVGANI, A.S. et al. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg.*, v.67, p.511-5, 2002.
- 54 JERÔNIMO, S.M. et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Scand J Infect Dis.*, v.36, p.443-9, 2004.
- 55 MORENO, E.C. et al. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.39, p.421-7, 2006.
- 56 MORENO, E.C. et al. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.38, p.456-63, 2005.
- 57 NASCIMENTO, M.D.D.S.B. et al. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermorreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. *Cad. Saude Publica.*, v.21, p. 1801-1807, 2005.
- 58 FAKHAR, M. et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. *Ann Trop Med Parasitol.*, v. 102, p. 577-83, 2008.
- 59 VIANA, L.G. et al. Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic *Leishmania (Leishmania) chagasi* carriers who present modulated cytokine profiles. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v.102, p.548-555, 2008.
- 60 CARNEIRO, M. et al. Visceral Leishmaniasis: Challenges in Identifying Subclinical *Leishmania* Infection. *Drug Development Research.*, v.72, p.442-450, 2011.
- 61 ROMERO, H.D. et al. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 81, p.27-33, 2009.
- 62 FELIPE, I.M.A. et al. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v.106, p.207-211, 2011.
- 63 MORAIS, M.H.F. *Avaliação das atividades de controle da leishmaniose visceral na Regional Noroeste de Belo Horizonte, 2006 a 2010.* 2011. 191 (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 64 MORENO, E.C. et al. Inaccuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using soluble and recombinant antigens to detect asymptomatic infection by *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.3, p. e536, 2009.
- 65 BERN, C. et al. The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leish-





- manial infection in a highly endemic Bangladeshi village. *Am J Trop Med Hyg*, v.76, p.909-914, 2007.
- 66 KHANAL, B. et al. Serological markers for *Leishmania donovani* infection in Nepal: agreement between direct agglutination test and rK39 ELISA. *Tropical Medicine & International Health*, v.15, p.1390-1394, 2010.
- 67 ZIJLSTRA, E.E. et al. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.5, p.717-720, 1998.
- 68 COSTA, C.H. et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*, v.66, p.334-7, 2002.
- 69 COSTA, C.H.; VIEIRA, J.B. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.34, p.223-8, 2001.
- 70 SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Ministério da Saúde. II Fórum de discussão sobre o tratamento da leishmaniose visceral canina, Brasília/DF, 2009. Disponível em www.saude.org.br/svs. Acesso em 18 de abril de 2012.
- 71 GENARO, O. et al. Occurrence of kala-azar in the urban area of Grande Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.23, p.121, 1990.
- 72 OLIVEIRA, C.L.; COSENZA, G.; MATOS, S.G. A epidemia de leishmaniose visceral em Belo Horizonte, de 1993 a 1996. IN: XXXIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 1996, Anais... Belo Horizonte, MG, 1996.
- 73 FIUZA, V.O.P. et al. Perspectivas para a produção de insumos estratégicos para vigilância e controle das leishmanioses. A situação e as necessidades de grandes centros urbanos no Brasil: o exemplo de Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.41, Suplemento III: p.82-88. 2008.
- 74 BRASIL. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. MINISTÉRIO DA SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Brasília, 1, 2003.
- 75 BELO HORIZONTE. Boletim Epidemiológico. Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte. p. 12, 2006.
- 76 MENEZES, F.C. Sistema de Informação de Leishmaniose Visceral (LV) em Belo Horizonte - Minas Gerais: avaliação do subcomponente Inquérito Canino no período de 2006 a 2010. 2011. (Mestre). Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte.
- 77 BELO HORIZONTE. Dados da leishmaniose visceral no município de Belo Horizonte. Disponível em <http://portalpbh.pbh.gov.br/secretarias/saude/leishmaniose>. Acessado em 16 de março de 2012., 2012.
- 78 LUZ, Z.M.P.D. et al. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.34, p.249-254, 2001.
- 79 OLIVEIRA, C.D. et al. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. *Cad Saude Publica*, v.17, p.1231-9, 2001.
- 80 SOUZA, C.M.D. et al. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, p.795-803, 2004.
- 81 CAIAFFA, W.T. et al. The urban environment from the health perspective: the case of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Cad. Saude Publica*, v.21, p.958-67, 2005
- 82 OLIVEIRA, C.D. et al. A case-control study of microenvironmental risk factors for





- urban visceral leishmaniasis in a large city in Brazil, 1999-2000. *Rev. Panam. Salud Pública*, v.20, p.369-76, 2006.
- 83 BORGES, B.K.A. et al. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, p.1035-1043, 2009.
- 84 ARAÚJO, V.E. Análise da distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral e perfil clínico-epidemiológico dos casos e óbitos, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1994 a 2009. 2011. Doutorado Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 85 OLIVEIRA, C.L.A. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Humana em Belo Horizonte, 1994 - 1997. 1999. 128 (Mestre). Departamento de Medicina Preventiva e Social da Faculdade de Medicina da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 86 BELO HORIZONTE. Índice de vulnerabilidade à saúde 2003. Prefeitura Municipal. Secretaria Municipal de Saúde. Belo Horizonte: Brasil; 2003. Disponível em: pbh.gov.br/smsa/biblioteca/gabinete/risco2003.pdf. Acessado em: 3de março de 2010. p.12, 2003.
- 87 MORAIS, M.H.F. et al. Uso de ferramentas espaciais para aprimorar as ações de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral em Belo Horizonte. In: 7ª EXPOEPI - MOSTRA NACIONAL DE EXPERIÊNCIAS BEM-SUCEDIDAS EM EPIDEMIOLOGIA, PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS, 2007, *Anais...* Brasília, DF, 2007.
- 88 EVANS, T.G. et al. Canine visceral Leishmaniasis in northeast Brazil - Assessment of serodiagnostic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.42, p.118-123, 1990.
- 89 RESENDE, M.C. et al. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.39, p.51-5, 2006.
- 90 SARAIVA, L. et al. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.105, p.1033-1039, 2010.
- 91 SANTANA FILHO, F.C. Recusas de borrifação de imóveis e a ocorrência de casos humanos de Leishmaniose Visceral na Regional Noroeste de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006 a 2008. 2010. 142 (Mestre). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 92 MAGALHÃES, D.F. et al. Dissemination of information on visceral leishmaniasis from schoolchildren to their families: a sustainable model for controlling the disease. *Cad. Saúde Pública*, v.25, p.1642-1646, 2009.
- 93 BORGES, B.K.A. et al. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v.24, p.777-784, 2008.
- 94 FREITAS, A.C.P. et al. Avaliação do trabalho educativo diário dos Agentes de Combate a Endemias sobre leishmaniose visceral e posse responsável de animais em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2009-2010. In: XIV REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSES, 2010, *Anais...* Uberaba, MG, 2010.
- 95 RIBEIRO, L.M.L. et al. Análise do conhecimento, sobre leishmaniose visceral, apresentado por docentes que lecionam nos três primeiros anos do ensino fundamental em escolas da região Noroeste de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2008. In: XIV REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSES, 2010, *Anais...* Uberaba, MG, 2010.





Clínica, diagnóstico e tratamento da LVC



Eliane Gonçalves Paiva Lopes

Avanços, limitações e perspectivas

Adriane Pimenta da Costa-Val¹, Maria Norma Melo²

¹ Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

² Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

E-mail: adriane@vet.ufmg.br

Apresentações clínicas da leishmaniose visceral canina

Na leishmaniose visceral (LV) canina, assim como em todas as doenças parasitárias, fatores específicos dependentes do hospedeiro e do parasita determinam o desenvolvimento dos mecanismos patogênicos da doença, das lesões e, em última análise, dos sinais no animal doente. Tais processos patogênicos têm como fator comum a presença do parasita e como fator de distinção as reações orgânicas, sejam elas de resposta imune ou não, de efetividade e intensidade distintas.¹

Após a inoculação pelos flebotomíneos, na pele dos cães susceptíveis, a maioria dos parasitas é eliminada pelos fatores do complemento, enquanto outros sobrevivem usando diferentes estratégias.^{2,3,4} No segundo caso, em alguns animais há o desenvolvimento de resposta imune adequada e controle da infecção, enquanto em outros há disseminação dos parasitas da pele para os linfonodos, o baço e a medula óssea e desses órgãos para todo o organismo.⁵ Entre esses dois extremos existem diferentes graus de gravidade da doença, sendo que a evolução da infecção está relacionada com o equilíbrio da resposta imune celular e humoral do cão infectado.^{6,7,8} Portanto, na LV, a infecção não é igual à sintomatologia clínica⁹, e o



período de incubação da doença é extremamente variável, podendo ser de alguns meses a anos.^{10, 11, 12}

Classicamente, a LV canina é uma doença crônica^{13, 14}, mas cursos agudos são descritos na literatura.^{7,15} Há três fases distintas para a evolução da infecção de cães por *L. infantum*¹⁶: a primeira fase seria a pré-patente longa, na qual os cães seriam assintomáticos, com pequena expressão de citocinas. Na segunda fase, dita pré-patente curta, os cães ainda seriam assintomáticos, porém haveria aumento significativo da expressão das citocinas INF- γ e IL-2. Por fim, na terceira fase ou fase patente, os animais apresentariam sintomas da doença e diminuição da expressão de citocinas. Os autores ressaltam que, em qualquer das fases, há resposta humoral específica.

A apresentação clínica da LV canina é consequência de interações complexas entre o parasita e a resposta imune do hospedeiro.¹⁶ O aumento na produção das imunoglobulinas, além de não protetor, é potencialmente danoso.^{11,13} Anticorpos específicos opsonizam algumas amastigotas, levando à sua fagocitose pelos macrófagos, permitindo ao parasita

Existem diferentes graus de gravidade da doença, sendo que a evolução da infecção está relacionada com o equilíbrio da resposta imune celular e humoral do cão infectado.

contínua multiplicação dentro dessas células. No entanto, o efeito deletério resultante da hiperglobulinemia é a formação de imunocomplexos circulantes (CIC) que se depositam em vários órgãos e tecidos.¹⁷ Autoanticorpos também podem ser

causadores de alterações autoimunes.¹³ Em linhas gerais, as alterações causadas na LV canina se devem tanto pela ação direta do parasita nos tecidos, o que leva à formação de lesões inflamatórias não supurativas, quanto pela deposição dos CIC em vários órgãos e tecidos.¹⁸

Nieto *et al.*¹⁹ atribuem aos níveis mais elevados de IgG1 a presença de mais sinais em cães, pois, como a imunoglobulina é fator de ativação do complemento, consequentemente maiores seriam o grau inflamatório e o número de alterações patológicas observadas.

Assim sendo, os cães apresentam sintomatologia clínica variada, que vai desde aparente estado sadio até grave estado terminal.^{9,14} Diante dessa grande gama de apresentações clínicas, foi proposto que os cães

portadores da infecção fossem classificados²⁰ em: assintomáticos, aqueles que não apresentassem sinais clínicos; oli-

O efeito deletério resultante da hiperglobulinemia é a formação de imunocomplexos circulantes que se depositam em vários órgãos e tecidos.





gossintomáticos, aqueles nos quais se observariam perda de peso moderada, lesões de pele discretas e linfadenomegalia; e, finalmente, os sintomáticos, aqueles que também apresentassem vários sinais graves da doença, como dermatopatias (perda de pelos, dermatite furfurácea e úlceras) e onicogribose (ceratoconjuntivite e rigidez dos membros posteriores). Somente 50-60% de uma

população canina infectada apresentam sinais evidentes²⁰, sendo os restantes, em sua maioria, casos pré-patentes, cuja infecção pode, ou não, evoluir para a fase patente. Embora a classificação proposta tenha sido de extrema valia por muitos anos, ela possui valor limitado, pois não considera as alterações de patologia clínica, bem como cães com graves alterações sistêmicas porém aparentemente sadios.²¹ Desta forma, atualmente, consideram-se cães com leishmaniose clínica aqueles com alterações clínicas, de patologia clínica e com infecção confirmada, e cães com leishmaniose subclínica ou clinicamente sadios aqueles que não apresentam sinais clínicos ou alterações de patologia clínica, mas que tenham infecção confirmada.⁹

A literatura é contraditória no que diz respeito ao teor total de imunoglobulinas e à apresentação clínica da

Cães com leishmaniose clínica aqueles com alterações clínicas, de patologia clínica e com infecção confirmada, e cães com leishmaniose subclínica ou clinicamente sadios aqueles que não apresentam sinais clínicos ou alterações de patologia clínica, mas que tenham infecção confirmada.

doença canina: alguns autores dizem não haver qualquer correlação entre os parâmetros^{22,23,24}, outros afirmam que quanto maiores os títulos de anticorpos de um cão, mais sintomas este apresentará.^{6,9,25,26,27,28,29,30}

Alterações dermatológicas

Dentre os sinais da LV canina, as alterações dermatológicas são as mais comuns.^{5, 14, 23, 24, 27, 31,}

³² Diante do pleomorfismo da resposta cutânea dos cães frente à infecção por *L. infantum*, há quatro padrões dermatológicos distintos³³, após estudo macro e microscópico da pele de 43 cães portadores de LV, sendo o primeiro deles alopecia e descamação. Os animais com esse quadro dermatológico apresentaram alopecia simétrica bilateral, especialmente na cabeça, e graus variáveis de seborreia seca. Tal alopecia iniciou-se na cabeça, progredindo posteriormente para o tronco e os membros. Dez animais apresentaram alopecia periorbital. Microscopicamente, há presença de infiltrado inflamatório difuso, não supurativo, composto de macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Muitas formas amastigotas foram observadas dentro dos macrófagos em quase toda a extensão da lesão. Hiperqueratose ortoqueratótica foi observada na epiderme dos





animais, e em oito deles houve progressão do processo inflamatório para a hipoderme e o tecido adiposo subjacente.

Tanto os aspectos macroscópicos quanto os microscópicos são atribuídos à presença das formas amastigotas, que, por sua vez, alcançaram a pele por via hematogena. O segundo quadro descrito foi a dermatose ulcerativa, no qual os cães examinados apresentavam ulcerações evidentes nos membros, principalmente sobre as articulações. Os achados histológicos consistiam em ulcerações francas, cercadas por hiperplasia epidérmica, apresentando ainda exocitose e dermatite difusa e mista, composta de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos, associada a uma carga parasitária pequena. A reação inflamatória intensa seria causada pelas formas amastigotas liberadas dos macrófagos e de sua rápida destruição, o que explicaria a baixa carga parasitária.

A dermatite nodular foi o terceiro padrão encontrado em número menor de cães e foi descrita como nódulos na pele, de tamanhos variados, desde poucos milímetros até 10 centímetros. Ao exame histológico, verificou-se que cada nódulo correspondia a um acúmulo focal de macrófagos, células multinucleadas gigantes, alguns linfócitos e plasmócitos e que a carga parasitária era muito elevada. A resposta imune deficitária seria responsável pelos achados.

Os autores sugerem que cães da raça Boxer sejam mais propensos a apresentar esse tipo de lesão. Por fim, descrevem a dermatite pustular em um número pequeno de animais. Esses animais apresentavam pústulas generalizadas por todo o tronco, abdome, axilas e virilhas, das quais nenhuma bactéria pôde ser isolada. Ao estudo microscópico observaram-se pústulas subcorneais compostas de neutrófilos, porém sem acantólise. Exocitose e dermatite discreta não supurativa, especialmente abaixo das pústulas, foram também observadas.

Poucos parasitas foram encontrados, sempre fora das pústulas.

A patogênese da dermatose ulcerativa³⁴ é atribuída à deposição de CIC nos vasos, o que determinaria vasculite necrótica, enquanto para Feitosa *et al.*¹⁵ o estado

de emaciação do animal determinaria a patogênese de tais úlceras cutâneas. A migração de macrófagos portadores de formas amastigotas por via hematogena para pontos específicos da pele, levando à hiperatividade da resposta imune, seria também responsável pela formação de úlceras nos pontos de pressão das articulações.³⁵

A função das células apresentadoras de antígenos da epiderme em cães com diferentes manifestações dermatológicas de LV foi estudada por Fondevila *et al.*³⁶ O grau de imunocompetência

Há quatro padrões dermatológicos. Primeiro: alopecia e descamação. Segundo: dermatose ulcerativa. Terceiro: dermatite nodular. Quarto: dermatite pustular.





epidérmica foi avaliado pela presença de células de Langerhans (LC) e queratinócitos, que expressam complexos de histocompatibilidade da classe II (MHC II), bem como pela presença de macrófagos, plasmócitos e formas amastigotas na derme. Os autores demonstram que cães com quadro de alopecia possuem quantidades adequadas de LC e de queratinócitos MHC II positivos, além de quantidades discretas de células T e números insignificantes de parasitas. Por outro lado, quando a epiderme apresentava-se imunoincompetente, lesões nodulares, formadas por intensa presença de macrófagos parasitados, foram observadas. Nos animais com dermatose ulcerativa, foram observados padrões inflamatórios intermediários, além da ausência de LC. Os queratinócitos apresentavam níveis elevados de moléculas MHC II. Embora não tenham avaliado parâmetros de resposta imune Th, os autores sugerem que há correlação positiva entre alopecia e resposta imune celular efetiva, o que não aconteceria nas lesões nodulares.

Estudando 150 cães naturalmente infectados por *L.infantum*, Ciaramella *et al.* (1997) observam os padrões dermatológicos descritos por Ferrer *et al.*³³, corroborando os estudos destes, embora descrevam a forma nodular da doença em outras raças de cães e não apenas no Boxer. Em estudo feito em cães portadores de LV na região metropolitana de Belo Horizonte, Xavier²³ também relatou os mesmos padrões dermatológicos

descritos por Ferrer *et al.*, em 1998.³³

Em alguns cães, uma lesão específica pode surgir no local da inoculação das formas promastigotas. Tal lesão é dita cancro de inoculação e apresenta três fases distintas, sendo a primeira a fase precoce, na qual a lesão apresenta-se como pápula eritematosa, de 10-15mm de diâmetro, e é rodeada por um anel eritematoso. Na fase intermediária, o cancro de inoculação tem o aspecto de nódulo ulcerado e mede 2-3 cm de diâmetro. Por fim, vem a fase pré-cicatrizial, que antecede o desaparecimento da lesão. O cancro é normalmente observado no focinho, nos lábios e na face interna das orelhas, surge de um a seis meses após a picada do flebotomíneo e persiste de três a nove meses.³⁷

Linfadenopatias

Após as alterações cutâneas, o sintoma clínico mais comumente descrito na LV canina é a linfadenomegalia, seja localizada ou generalizada.^{5,24,27,31,32} Alguns autores descrevem esta como a alteração clínica mais comum nos animais afetados.^{14,15}

É conhecida a importância clínica e fisiopatológica dos linfonodos na LV canina, entretanto poucos trabalhos relatam de forma sistemática seu envolvimento na doença. Tafuri³⁸ encontrou maior reatividade dos linfonodos cervicais quando comparados com os mesentéricos ou poplíteos de cães experimental e naturalmente infectados com *L. chagasi*, diferentemente das ob-





servações de Alvar *et al.*³⁹, Ciaramella *et al.*¹⁴, Feitosa *et al.*¹⁵ e Zaragoza *et al.*⁴⁰, que relataram maior reatividade dos linfonodos poplíteos nos cães portadores de LV.

Estudos de Martinez-Moreno *et al.*⁴¹ relatam predominância de plasmócitos sobre linfócitos em linfonodos de cães natural e experimentalmente infectados com *L. infantum*, sugerindo depleção das células T e proliferação das células B, com consequente hiperglobulinemia.

Alterações nas unhas

A onicogribose é um sinal marcante da doença canina, observada em cerca de 25% dos animais com LV.¹⁴ Além do crescimento excessivo, outras alterações na morfologia ungueal, como a onicorrexia, também são relatadas³¹. Alguns autores atribuem a onicogribose à ação do parasita na matriz ungueal (Lestoquard e Donatiem, 1938, citados por Genaro, 1993⁴²), e outros à ausência do desgaste natural das unhas devido à apatia do cão nos estágios mais avançados da doença.¹⁰

Alterações oculares

As alterações oculares descritas na LV canina são variadas, sendo que a blefarite, conjuntivite, ceratoconjuntivite seca e uveíte são as mais comuns.²²

⁴³ Provavelmente, tais lesões possuem

duas causas primárias, ou seja, podem tanto ser causadas pela presença das formas amastigotas e do infiltrado leucocitário quanto pela consequência de depósitos de CIC nos vasos oculares.⁴⁴

Sinais inespecíficos

A perda de peso e a atrofia da musculatura das fossas temporais estão presentes em boa parte dos casos de LV canina, porém em graus variáveis.^{8, 14, 15} Segundo Marzochi *et al.*¹⁰, o emagrecimento seria resultante de grave desequilíbrio proteico, que desencadearia a hipoalbuminemia. Genaro⁴² observou desde discreto até acentuado emagrecimento em animais experimentalmente

infectados com *L. chagasi*, sempre em consonância com a forma clínica apresentada pelo animal. Para o autor, o emagrecimento não se deve apenas a um fator mas a vários, embora não explique quais fatores sejam esses. Martinez-Moreno⁴⁵ *et al.*

demonstram ainda que, associada com a ausência da resposta linfoproliferativa frente ao antígeno de *Leishmania*, haveria diminuição de resposta imune aos mitógenos ConA e PHA, sugerindo que uma imunodeficiência celular não específica poderia fazer parte dos processos de caquexia e de enfraquecimento orgânico progressivos da doença. A literatura não registra hipóteses ou discussões sobre a origem da atrofia da

Após as alterações cutâneas, o sintoma clínico mais comumente descrito na LV canina é a linfadenomegalia, seja localizada ou generalizada.





musculatura das fossas temporais.

Cerca de 5-10% dos cães portadores de LV apresentam episódios de sangramento nasal⁸. Embora as causas da epistaxe não estejam totalmente esclarecidas, é provável que ela seja resultante de inflamação, deposição de CIC nos vasos e ulcerações na mucosa nasal e não de alterações no perfil de coagulação.^{46,47}

A presença das formas amastigotas nos órgãos provoca resposta inflamatória, inicialmente com predominância de neutrófilos e eosinófilos, que são seguidos por um grande número de macrófagos. Os linfócitos são observados posteriormente, e com a progressão da doença a inflamação se torna tipicamente granulomatosa.⁵

Espleno e hepatopatias

A frequência dos cães portadores de LV que apresentam esplenomegalia é bastante variável segundo a literatura. Em estudo recente sobre aspectos clínicos da doença no interior do estado de São Paulo, Feitosa *et al.*¹⁵ não descrevem tal achado. Por outro lado, em estudo semelhante realizado por Ciaramella *et al.*¹⁴ na Itália, a esplenomegalia foi observada em 53,3% dos cães estudados. Já para Slappendel e Greene¹³, essa alteração está presente em apenas 9,3% dos animais acometidos. Estudando cães experimentalmente infectados com *L. chagasi*, Oliveira, Santoro e Sadigursky⁴⁹ descrevem a esplenomegalia como o achado necroscópico mais importante. Ao exame histológico, os autores obser-

varam a presença de granulomas, formados por linfócitos e neutrófilos em todas as peças estudadas. Foram descritos grupos de macrófagos nas áreas subcapsulares, bem como hiperplasia dos folículos linfóides. Genaro⁴² também descreve hiperplasia intensa da polpa branca, com confluência dos folículos linfóides, além de pronunciado parasitismo das células macrofágicas. O autor registra intensa congestão da polpa vermelha, com dilatação dos vasos e dos seios venosos.

Tafuri⁴⁸, em estudo detalhado sobre o baço e o fígado de cães natural e experimentalmente infectados com *L. chagasi*, encontrou aspectos microscópicos semelhantes nos dois grupos. Os folículos linfóides apresentavam-se hiperplásicos e, muitas vezes, confluentes, compostos de células dispostas em diferentes camadas, sendo que aquelas centrais tinham núcleo vesiculoso, citoplasma acidófilo, com ou sem parasitas. Pequenos linfócitos foram também observados. Mais externamente, o autor descreve a presença de pequenos linfócitos dispostos em camadas mais finas e, por fim, células com as mesmas características daquelas centrais, porém intensamente parasitadas. Grande proliferação celular de macrófagos marginais, bem como daqueles dos cordões sinusoides, e neoformação de tecido conectivo foram as alterações descritas na polpa vermelha. Em toda a espessura da cápsula, nas regiões subcapsulares e perifoliculares, foi descrito intenso parasitismo.. Achados semelhantes, mas





com organização de macrófagos intensamente parasitados em granulomas, foram descritos por Tafuri *et al.*⁵⁰ e Ferrer.⁵ Esplenomegalia com hiperplasia de pólpa branca foi descrita por Ikeda *et al.*⁵¹ em cães portadores de LV, no município de Araçatuba, em São Paulo.

As hepatopatias associadas à LV, bem como a hepatomegalia, são raras em pacientes caninos^{13, 14, 15, 52}, embora os estudos cito-histológicos de fígado de cães doentes apontem sempre envolvimento do órgão.^{49, 48, 53}

Os granulomas descritos no baço de cães experimentalmente infectados, estudados por Oliveira, Santoro e Sadigursky⁴⁹, foram também encontrados no fígado desses animais. Tais lesões foram vistas no parênquima, bem como nos espaços portais, e apresentavam arquitetura celular variável, indo desde pequenos e irregulares grupos de macrófagos e linfócitos, sem organização evidente, até granulomas ovais ou redondos, de limites precisos, com disposição celular concêntrica e contendo macrófagos, parasitados ou não, linfócitos e, também, plasmócitos em sua periferia. Os autores descrevem ainda um granuloma contendo um canal de eritrócitos, mas sem células endoteliais em seu limite e hipertrofia hiperplasia das células de Kupffer.

Genaro⁴² observou a presença de infiltrado mononuclear e de neutrófilos nos espaços portais, assim como de pequenos nódulos macrofágicos com intenso parasitismo, neoformação colagênica intralobular e hiperplasia das cé-

lulas de Kupffer, que, por sua vez, apresentavam muitas formas amastigotas em seu interior.

Achados semelhantes aos de Oliveira, Santoro e Sadigursky⁴⁹ foram descritos por Tafuri⁴⁸, Ferrer⁸ e Tafuri *et al.*⁵⁰, que observaram ainda infiltrado inflamatório mononuclear por todo o órgão, parasitismo nos hepatócitos, atrofia por compressão dessas células quando em torno dos granulomas e intensa congestão dos sinusoides.

Nefropatias

De forma diferente do fígado, os rins são extremamente afetados no curso da LV canina.^{8, 14, 43} Estudando os rins de cães natural e experimentalmente infectados com *L. chagasi*, tanto pela microscopia óptica quanto pela eletrônica, Tafuri *et al.*³⁸ descrevem como principais alterações: glomerulonefrite mesangioproliferativa, focal ou difusa, com pronunciada hipertrofia e hiperplasia das células e alargamento da matriz mesangial; espessamento da membrana basal glomerular com depósitos eletrodensos subendoteliais e em sua espessura; nefrite intersticial intertubular crônica com exsudação de plasmócitos e macrófagos e degeneração tubular. Os autores sugerem que os encontros patológicos são prováveis consequências da deposição de complexos antígenos/anticorpos nas estruturas renais e atribuem tais encontros ao intenso infiltrado inflamatório plasmocitário, sempre presente nas peças estudadas.





Corroborando a suspeita da gênese imunomediada das nefropatias em cães portadores de LV, Mancianti, Poli e Bionda⁵⁴ identificaram frações de IgG anti-*Leishmania* em depósitos glomerulares de 13 animais doentes. As descrições anatomopatológicas das lesões renais, semelhantes àquelas relatadas por Tafuri *et al.*³⁸, foram feitas por Genaro⁴² e Tafuri⁴⁸.

A correlação entre a função renal e os CIC de cães naturalmente infectados por *L. infantum* foi elucidada por Lopez *et al.*¹⁷ Os autores demonstraram que cerca de 50% dos animais doentes possuíam taxas elevadas de CIC quando comparados com cães-controle sadios e, ainda, quando os níveis séricos de creatinina foram usados nos primeiros como indicadores da função renal, houve associação com o aumento de CIC em 90% dos casos.

Recentemente, Costa *et al.*⁵⁵ descreveram predomínio das alterações glomerulares sobre aquelas intersticiais e tubulares em 55 cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, provenientes da região Norte do Brasil. Os autores classificaram as modificações glomerulares, presentes nos 55 animais estudados, como: anormalidades glomerulares menores, glomeruloesclerose focal segmentar, glomerulonefrite mesangial proliferativa difusa, glomerulonefrite membranoproliferativa difusa, glomerulonefrite crescente e glomerulonefrite crônica. As alterações tubulares estavam presentes em 53 dos animais estudados,

82

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº 65 - maio de 2012

sendo a degeneração vacuolar e hialina a mais frequente delas. Por fim, infiltrado inflamatório, predominantemente cortical, caracterizando nefrite intersticial, estava presente em 43 cães, organizado em focos e composto por linfócitos e plasmócitos, com raros histiócitos e neutrófilos.

Alterações na medula óssea

A literatura é bastante escassa no que tange às alterações patológicas da medula óssea de cães portadores de LV. Estudando os achados de necropsia de um cão portador de LV proveniente da Grécia, Anosa e Idowu⁵⁶ relataram intensa substituição da medula amarela por medula vermelha na tíbia, no úmero e no fêmur, com predominância de precursores de granulócitos. Os autores ainda descrevem infiltrado inflamatório intenso, constituído de linfócitos, plasmócitos e macrófagos parasitados, nas áreas medulares estudadas.

Tafuri⁴⁸ relatou nítido aumento do número das células em estudo histológico de cães natural e experimentalmente infectados com *L. chagasi*. Esse aumento deveu-se às séries linfocítica e monocítica, com concomitante escassez de granulócitos. Em outro estudo, Tafuri *et al.*⁵⁰ descrevem hipoplasia de todas as células medulares, principalmente da série branca. Tal hipoplasia foi descrita também por Amusatogui *et al.*²⁴, que observaram correlação entre o agravamento das alterações medulares e o aumento da sintomatologia clínica do animal.





Achados de patologia clínica

Embora os encontros de hematologia, bioquímica sérica e urinálise possuam limitado valor para o diagnóstico da LV canina, estes valores fornecem importante subsídio para avaliação do estado clínico do animal e entendimento da patogênese da doença.^{27, 51}

Alterações do eritrograma e dos eritrócitos

A anemia é um achado frequente na doença canina, sendo encontrada em cerca de 50 a 70% dos pacientes, tendo como características marcantes a normocitose, a normocromia e a arregaçamento.^{14, 22, 23, 27, 42, 51, 57} Por outro lado, alguns autores consideram a anemia um achado pouco frequente.^{24, 46} Segundo a literatura, anemia pode ser atribuída a: perda sanguínea pela epistaxe e ulcerações da pele^{13, 22}; eritrólise^{13, 56}; inflamação generalizada e insuficiência renal crônica²² e, ainda, hipoplasia ou aplasia medulares.^{13, 22} Para alguns autores, a anemia está relacionada à severidade do quadro clínico do animal: os animais sintomáticos seriam aqueles com menor número de hemácias, menor valor do hematócrito e menores teores de hemoglobina.^{23, 24, 27, 30, 58}

De Luna *et al.*⁵⁹, estudando cães naturalmente infectados por *L. infantum*, observaram diminuição da fluidez da membrana dos eritrócitos, o que aumentaria sua rigidez e alteraria o me-

canismo de citoaderência. Tais fatos favoreceriam o sequestro esplênico das células, sua retirada da circulação, determinando, conseqüentemente, a anemia.

Alterações do leucograma

As contagens total e diferencial de leucócitos não obedecem a qualquer padrão em cães portadores de LV: alguns animais apresentam leucocitose com desvio à esquerda regenerativo, enquanto outros possuem leucopenia, geralmente por neutropenia ou mesmo perfil leucocitário normal.^{22, 23, 24, 46, 47, 51, 56} Porém, alguns autores procuraram estabelecer qual o papel de algumas células brancas no curso da LV canina. Brandonisio *et al.*⁶⁰ demonstraram que granulócitos oriundos de cães doentes possuíam maior capacidade fagocitária quando comparados com aqueles de cães-controle sadios. Por outro lado, a capacidade de produção de radicais de oxigênio dos granulócitos e monócitos dos cães infectados mostrou-se reduzida, mas foi restabelecida após terapia com antimoniato de meglumina.

Bourdoiseau *et al.*⁶¹, estudando as populações de linfócitos periféricos de cães portadores de LV, demonstraram diminuição dos linfócitos B. Quando comparados com cães sadios ou assintomáticos, cães sintomáticos apresentavam, além de diminuição de linfócitos B, redução intensa na população de linfócitos T. Linfocitopenia grave foi observada por Reis²⁷ em cães sintomáticos. Já Ikeda *et al.*⁵¹ e Amusategui *et*





al.²⁴ não correlacionaram o número de linfócitos circulantes com a severidade do quadro clínico do animal, no entanto os últimos autores observaram eosinofilia nos cães em que as lesões cutâneas predominavam sobre as viscerais.

Alterações nas plaquetas

Segundo a literatura, a trombocitopenia ocorre em 29,0¹⁴ a 50%^{13, 23, 39} dos cães portadores de LV. Embora algumas alterações hemostáticas sejam atribuídas por alguns autores ao decréscimo no número de plaquetas, Koutinas *et al.*²², Juttner *et al.*⁴⁷, Costa-Val³⁰ e Freitas *et al.*⁵⁸ observaram a presença de epistaxe em animais sem alterações no perfil hemostático ou no número de plaquetas. A mesma constatação foi feita por Moreno, Lucena e Ginel⁴⁶, que atribuem o aumento no tempo de coagulação nos animais estudados, além das alterações citadas anteriormente, a prováveis trombocitopatias, por sua vez associadas à uremia, comum em cães com insuficiência renal crônica secundária à LV. Frente ao estado de hipercreatininemia, as plaquetas teriam sua capacidade de agregação reduzida, disfunção na liberação do fator plaquetário três, ligação anormal ao fibrinogênio, adesividade anormal e diminuição no tempo de retração do coágulo.

Função hepática

Aumentos na atividade das enzimas hepáticas, bem como aumento nos teores de bilirrubinas, não ocorrem

com frequência nos cães portadores de LV^{24, 51}, sendo observados em apenas 16% dos casos.¹⁴ Insuficiência hepática, com aumento de atividade das enzimas hepáticas alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST), assim como aumento sérico das bilirrubinas, foi descrita por Valladares *et al.*⁵², em um cão experimentalmente infectado por *L. infantum*. Koutinas *et al.*²² descreveram aumento de AST e ALT em dois cães portadores de LV, que apresentavam também ascite.

Disproteïnemia

Uma característica marcante da LV canina é a disproteïnemia^{27, 42}, caracterizada por hiperproteïnemia e ocorrendo na maioria dos cães infectados por *Leishmania* em índices que variam de 68¹⁴ a 100%.⁴⁷ Todavia, os autores são unânimes quanto à composição do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas dos cães doentes: a ativação policlonal das frações β e γ seria responsável pelo aumento geral das gamaglobulinas; enquanto a diminuição da albumina seria devido a perdas por nefropatia, doença hepática, subnutrição crônica ou até mesmo a combinação desses fatores.^{13, 14, 22, 24, 27, 30, 46, 51, 58} Assim sendo, a relação albumina/globulinas (A/G) estaria invertida na maioria dos animais doentes^{14, 22, 27}, sendo tanto menor quanto mais sintomas o animal apresentasse. Por outro lado, em alguns animais, principalmente aqueles com sintomatologia grave, a disproteïnemia





seria caracterizada por hipoproteïnemia.⁵¹

Segundo Koutinas *et al.*²², em alguns animais, a hipoalbuminemia poderia agir como um mecanismo de equilíbrio à hipergamaglobulinemia, o que resultaria em valores de proteínas plasmáticas totais normais, ressaltando a importância da determinação do perfil eletroforético.

Amusatogui *et al.*²⁴ encontram rigorosa correlação entre os sintomas e o os valores de proteínas totais, albumina, relação A/G e as frações β e γ do proteiograma, bem como dessas frações com os valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito. De acordo com os autores, em todos os animais examinados, a fração α encontrava-se dentro dos valores normais, portanto pouco contribuiria para o aumento do valor das proteínas totais, entretanto cães portadores de sintomas viscerais teriam maiores valores dessa fração.

Função renal

Azotemia ocorre em cerca de 45% dos cães portadores de LV¹³, sendo que em 38% apenas a creatinina está elevada. Também para Nieto *et al.*¹⁹, aumento nos níveis de ureia são mais comuns que nos níveis de creatinina. Segundo Lopez *et al.*¹⁷, a hipercreatininemia correlaciona-se de forma positiva com os CIC determinantes das nefropatias na LV canina, sugerindo que os níveis de creatinina possam ser usados como indicadores da presença de CIC. Koutinas *et al.*²²

observaram azotemia por hipercreatininemia e aumento dos níveis de ureia em 38% dos cães por eles estudados, sendo que todos eles apresentavam histórico ou sinais clínicos de insuficiência renal crônica. Amusatogui *et al.*²⁴ descreveram aumento nos níveis de ureia em 40 de 61 cães com LV enquanto a creatinina estava elevada em apenas três dos 44 cães avaliados. Xavier²³ observou que cães sintomáticos apresentavam maiores índices de ureia sérica que aqueles oligossintomáticos ou assintomáticos.

Costa *et al.*⁵⁵ demonstraram que cães com alterações histopatológicas renais glomerulares discretas não apresentavam elevação nos níveis de creatinina, sugerindo importante participação dessas alterações na hipercreatininemia, que geralmente é atribuída apenas às disfunções tubulares.⁶²

Tendo em vista a urinálise, a proteinúria é a alteração mais frequentemente descrita, sendo encontrada em 71²² a 85%^{13, 14} ou até mesmo 100%¹⁹ dos animais portadores de .

LV, seja em graus discretos ou até mesmo graves. Em alguns animais, a proteinúria pode ser tão grave que chegaria a determinar valores de proteínas séricas normais.¹⁹

Conforme Costa *et al.*⁵⁵, a proteinúria é mais severa nos cães em que o estudo histológico dos rins demonstrou nefrite intersticial e/ou glomerulonefrite, sendo tanto mais grave quanto mais severas fossem as alterações patológicas. Cilindros hialinos e/ou cilindros granu-





lares finos podem ser observados em até 100% dos casos de LV canina.¹³

Estudando a correlação entre as lesões renais e a proteinúria, Zатели *et al.*⁶³ demonstraram que a maioria dos cães portadores de LV estudados apresentava proteinúria glomerular não seletiva, pois tanto albumina quanto proteínas de peso molecular semelhantes à albumina, transferrina e IgG foram evidenciadas quando a urina desses animais foi submetida à eletroforese. Em estudo semelhante, Zaragoza *et al.*⁶⁴ demonstraram a presença de 11 diferentes bandas proteicas de pesos moleculares variando entre 10 e 150kDa. Quando submetidas ao *immunoblotting*, as amostras de urina indicavam a perda de IgG e IgA.

Diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral canina

Tal diversidade de sintomas clínicos e de aspectos laboratoriais torna o diagnóstico clínico da LV canina uma tarefa difícil, o que faz com que os exames complementares sejam de fundamental importância.^{11, 14, 22, 43}

Métodos parasitológicos

Devido a sua grande especificidade, pois o encontro de uma só amastigota é suficiente para determinar a positividade do exame, o melhor método la-



Detalhe da pata de um cão positivo para LVC no teste sorológico com onicografose

boratorial para o diagnóstico da LV é a demonstração do parasita, tanto em esfregaços de material obtido por aspiração quanto em esfregaços por aposição de fragmentos de tecidos.⁶⁵ A identificação das formas amastigotas depende de treino, experiência e habilidade do examinador.³¹

Os aspirados de medula óssea e linfonodos são os mais usados pelos clínicos veterinários. A principal desvantagem desse método é a sensibilidade de apenas 50% nos aspirados de medula óssea e menos de 30% naqueles de linfonodos.⁶⁶ Segundo Genaro⁴², a grande variabilidade do parasitismo medular, que altera entre positivo e negativo indiscriminadamente, seria responsável pela pequena sensibilidade do método.

Para Ciaramella *et al.*¹⁴, a sensibilidade do exame parasitológico de aspirados de linfonodos e medula óssea é de cerca de 60%, devido ao grande nú-





Necropsia de cão positivo para LVC no teste sorológico com esplenomegalia

mero de amostras com baixa densidade parasitária, ou seja, de 1-10 parasitas/campo. Para Aisa *et al.*⁶⁷, quanto mais sintomas o animal apresenta, maior será a sensibilidade do exame parasitológico do aspirado de linfonodo.

Koutinas *et al.*²² apresentaram taxas de positividade do exame parasitológico do aspirado de linfonodos de 84,9%, sugerindo que a punção de medula óssea apenas deve ser feita nos casos em que o exame citológico do aspirado de linfonodos for negativo. Em estudo sobre a prevalência de LV canina na região de Manisa, oeste da Turquia, Ozbel *et al.*⁶⁸ observaram 65% de positividade em aspirados de linfonodos poplíteos.

Embora pouco utilizado como método de diagnóstico, o esfregaço por aposição de fragmento de pele pode demonstrar a presença de formas amastigotas⁶⁶. Genaro⁴² demonstrou a presença do parasita na pele de 70% dos

cães experimentalmente infectados com *L. chagasi*, mas em taxas que variavam de oito a 14 até 30 formas amastigotas/100 células nucleadas. Ainda que não haja detalhamento, o autor descreveu o encontro das amastigotas tanto em áreas hídidas quanto em áreas com lesões na pele dos animais. Ele observou que animais com intenso parasitismo cutâneo apresentavam também intenso parasitismo medular.

A cultura do material aspirado aumenta a probabilidade de encontro do parasito^{42, 68}, porém o método é demorado e não é muito sensível, não sendo adequado para diagnóstico clínico rotineiro.⁶⁶ Para Gradoni⁶⁹, a sensibilidade da cultura depende de vários fatores, a saber: uso de meios de cultura adequados, pois meios bifásicos são mais eficientes que meios líquidos; forma de plantio do material, uma vez que algumas gotas do material aspirado distribuído em vários tubos contendo o meio de cultura fornecem melhores resultados que grandes quantidades distribuídas em poucos frascos; por fim, o número de amostras obtidas do mesmo cão, já que vários aspirados de linfonodos diferentes aumentam em 10% quando comparados com um único aspirado.

Xavier²³, estudando a pele de regiões anatômicas diferentes, ou seja,





da orelha, do abdome e do focinho de cães naturalmente infectados, observou maior grau de parasitismo nos fragmentos de pele de orelha, seguida pela pele do focinho e, por fim, do abdome, bem como maior grau de parasitismo quanto mais sintomas o animal apresentasse, atribuindo tais diferenças ao tipo de resposta imune do cão frente à infecção por *Leishmania*. Por outro lado, o autor ressalta dificuldade na demonstração das formas amastigotas nos casos de parasitismo discreto.

As técnicas de imuno-histoquímica (IHQ) podem resolver os problemas relacionados à evidenciação do parasita, pois anticorpos específicos marcados detectam com grande sensibilidade as formas amastigotas nos cortes de tecidos.^{61,66}

Xavier²³, comparando o grau de parasitismo do mesmo fragmento de pele quando corado pela HE e pela IHQ, demonstrou maior sensibilidade da segunda técnica, já que esta propiciou a visualização dos parasitas em cortes considerados negativos ou duvidosos pela primeira. O autor não correlaciona o grau de parasitismo dos fragmentos de pele, independentemente da sua localização anatômica, com o grau da inflamação plasmó-histiocitária. De fato, em algumas amostras foram observados macrófagos intensamente parasitados em fragmentos sem infiltrado inflamatório, bem como fragmentos com infiltrado inflamatório intenso sem evidenciação de formas amastigotas, mes-

88

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº 65 - maio de 2012

mo pela IHQ. Resultados semelhantes no que tange ao grau de parasitismo e ao infiltrado inflamatório foram descritos por Solano-Gallego *et al.*³², que usaram apenas a IHQ para determinação da intensidade do parasitismo.

Métodos sorológicos

Visando evitar os problemas relacionados à demonstração do parasita, foram desenvolvidos métodos de diagnóstico não invasivos, sendo os que detectam anticorpos no soro do paciente os mais utilizados, já que os portadores de LV apresentam hipergamaglobulinemia.⁶⁵

A RIFI é amplamente utilizada no diagnóstico da LV canina^{11,70}, apresentando elevadas taxas de sensibilidade mesmo quando se utilizam como antígeno outras espécies de *Leishmania*, tais como *L. mexicana* e *L. braziliensis*.⁷¹ Por outro lado, segundo Solano-Gallego *et al.*³², a especificidade da técnica fica comprometida quando é utilizada em áreas em que o cão sofre também de leishmaniose tegumentar ou doença de Chagas.

Quando comparada com o diagnóstico parasitológico pela citologia de material obtido de aspirado de linfonodo, a RIFI mostrou-se mais sensível, sendo as taxas encontradas de 84,9% para o primeiro método e de 96,9% para o segundo.²²

Para Gradoni⁶⁹, a RIFI é considerada o padrão ouro para o diagnóstico sorológico da LV canina, pois, além de ser





o teste mais utilizado por pesquisadores europeus em um período de 12 anos, é também a técnica recomendada pelo “Office International dês Epizooties”.⁷² O autor ressalta que a especificidade da técnica não é ameaçada, nos países da bacia do Mediterrâneo, pelas reações cruzadas com outras doenças parasitárias que acometem o cão em países da América Latina.

A RIFI utiliza como antígeno promastigotas de *Leishmania*, portanto sua preparação exige pessoal qualificado.⁶⁵ Embora existam kits comerciais, as lâminas feitas nos laboratórios de diagnóstico produzem resultados melhores e mais repetitivos.⁶⁶ Além disso, o método é demorado, caro, demanda pessoal treinado.⁶⁵

O ELISA é também amplamente utilizado no diagnóstico da LV canina, sendo a segunda técnica mais utilizada pelos pesquisadores europeus.^{69, 73} É atualmente indicada como triagem para posterior confirmação pela RIFI nos inquéritos epidemiológicos no Brasil (Ministério da Saúde, 2003), embora apresente índices de sensibilidade superiores aos daquele método.^{69, 73, 74, 75} Por esta razão, é a técnica de eleição para o diagnóstico de LV humana⁶⁵ e de leishmaniose tegumentar americana canina.⁷⁶

Os erros de leitura subjetivos, observados nas reações fracamente positivas na RIFI, são suprimidos no ELISA, cuja leitura é automatizada.^{69, 73, 77} No ELISA, os antígenos utilizados são derivados de

promastigotas cultivadas *in vitro*, geralmente rompidas por ultrassom, expondo cerca de 30 antígenos somáticos e inúmeros componentes de superfície. Esse método também tem seus níveis de especificidade comprometidos por reações cruzadas com outras espécies de tripanossomatídeos ou até mesmo por espécies filogeneticamente distantes.⁶⁵

Para aumentar a especificidade do método, tem-se buscado a caracterização molecular dos componentes do antígeno de *Leishmania* para ELISA tem sido feita.⁶⁹

O antígeno ligante fucose manose (FML) é uma glicoproteína de superfície, isolada de promastigotas de *L. donovani*, necessária para interações com macrófagos *in vitro*. Quando esse antígeno foi utilizado no diagnóstico sorológico de cães de área endêmica do Rio Grande do Norte, Cabrera *et al.*⁷⁵ demonstraram taxas de sensibilidade e de especificidade de 100% para o ELISA, enquanto a sensibilidade da RIFI foi de apenas 2,9%. O FML também demonstrou valor preditivo de 100%, pois dos 27 animais assintomáticos que foram positivos ao FML ELISA, 21 morreram de leishmaniose em um período de seis meses.

Métodos de biologia molecular

A sensibilidade das técnicas sorológicas e de demonstração do parasita, comumente empregadas no diagnóstico da LV canina em áreas endêmicas, é ge-





ralmente insuficiente.⁷⁸ As técnicas sorológicas necessitam de níveis elevados de anticorpos e não fazem distinção entre as fases da doença quando os níveis de anticorpos estão próximo ou no ponto de corte.⁶⁷ Desta forma, os testes que identifiquem o antígeno por métodos que empregam a biologia molecular assumem grande importância.⁶⁵ Dentre as técnicas existentes, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se mostrado muito útil, tanto no diagnóstico quanto no acompanhamento de cães com LV⁶⁶, pelo aumento da sensibilidade associada à grande especificidade.⁷⁸

Mathis e Deplazes⁷⁹ descreveram um ensaio de diagnóstico de LV canina com iniciadores selecionados da sequência da pequena subunidade do gen de rRNA, que é repetido mais de 100 vezes no genoma de *Leishmania*. As amostras utilizadas foram aspiradas de linfonodo e sangue total, onde as hemácias foram lisadas, e os resultados demonstram sensibilidade de 100 e 38,4%, respectivamente.

Em estudo sobre a aplicabilidade clínica da PCR, Roura, Sanchez e Ferrer⁸⁰ desenvolveram e otimizaram um ensaio com amplificação de um fragmento de 120 pares de base (bp) pertencente ao DNA do cinetoplasto e comum a todas espécies de *Leishmania*. Foram utilizados aspirados de medula óssea da região costocodral. Quarenta e cinco

resultados positivos para a PCR, o que não ocorreu em nenhum dos 41 cães-controle sadios.

Quinnell *et al.*²⁶ realizaram estudo comparativo do desempenho do ELISA, do exame microscópico, da cultura e da PCR em biópsias de medula óssea para estudo longitudinal de cães expostos à infecção natural por *L. chagasi* na Ilha de Marajó. Foram utilizados iniciadores do minicírculo e ribossomais nas amostras também para comparação. Nas amostras positivas para demonstração do parasita, a PCR demonstrou sensibilidade de 98%, mostrando variações durante o curso da infecção, sendo mais alta (78-88%) no início da infecção, ou seja, até 135 dias, para depois cair em cerca de 50% até 300 dias pós-infecção. A PCR realizada nas amostras obtidas de cães clinicamente doentes forneceu maior sensibilidade que aquelas obtidas de animais sem sintomas. A sorologia por ELISA também apresentou



Fotos: Eliane Gonçalves e Ivai Lopes

90 Cão soropositivo para LVC

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº 65 - maio de 2012





resultados que variavam de acordo com o curso da infecção: 41% no início da infecção e 93-100% depois. Os autores concluem que a PCR teve mais utilidade na detecção da doença ativa e que a sorologia é mais sensível para a detecção da infecção em todos os cães.

A técnica da PCR é também útil nas investigações epidemiológicas da doença canina.⁶⁶ Estudando 30 cães assintomáticos, porém residentes em áreas endêmicas, Berrahal *et al.*⁸¹ (1996) demonstraram que, enquanto as técnicas sorológicas clássicas (RIFI e ELISA) não foram capazes de identificar anticorpos no soro, a PCR identificou DNA do parasita em 80% das amostras de pele e conjuntiva desses animais, e o *immunoblotting*, por sua vez, identificou anticorpos específicos em 56% dos soros desse grupo. O *immunoblotting* foi considerado positivo quando ao menos uma das bandas de peso molecular 14 ou 16kDa foi identificada. Correlacio-

nando os achados, 90% dos cães positivos ao *immunoblotting* foram também positivos à PCR, enquanto 71% dos cães PCR positivos foram também *immunoblotting* positivos. Os autores concluem que a maioria dos cães residentes em áreas endêmicas foi exposta à infecção e que a PCR e o *immunoblotting* são suficientemente sensíveis para detectar infecção assintomática. Reale *et al.*⁸² e Solano-Gallego *et al.*²⁸ chegaram a conclusões semelhantes quanto à prevalência de cães assintomáticos infectados em áreas endêmicas. Os últimos autores utilizaram a PCR para o diagnóstico de LV em amostras de aspirado de medula óssea, pele de focinho e conjuntiva de cães que seriam submetidos à eutanásia por razões sanitárias. Somados aos resultados da sorologia por ELISA, a prevalência da infecção por *Leishmania* chegou a 67%. Os autores utilizaram amostras frescas e congeladas até a utilização, bem como iniciadores para am-

plificação de fragmento de 120 pares de base no minicírculo do DNA do cinetoplasto do parasita. As altas taxas de infecção por *Leishmania* encontradas em amostras de pele e conjuntiva nos dois estudos supra- citados levaram Gradoni⁶⁹ a um questionamento interessante: qual DNA é detectado pelo teste nestas amostras: o DNA de infecções estabelecidas



Fotos: Eliane Gonçalves Paiva Lopes

Cão soropositivo para LVC com ceratoconjuntivite

Clínica, diagnóstico e tratamento da LVC





ou de qualquer *Leishmania* depositada pelo vetor?

Ainda usando PCR, Lachaud *et al.*⁸³ encontraram taxa de infecção de 79,8% em 263 cães avaliados em um foco em Cévenne, França, contra 29,6% apontados pela sorologia por RIFI e contra-imunoelektroforese. Os autores chegam à conclusão de que 89,4% dos cães sintomáticos e 65,2% dos assintomáticos albergam parasitas no sangue periférico, confirmando a alta prevalência de portadores assintomáticos.

Visando ao uso da PCR como ferramenta auxiliar no diagnóstico histológico rotineiro, Muller *et al.*⁸⁴ adequaram a técnica de PCR para o diagnóstico de LV em amostras de pele de cães fixadas em formalina e embebidas em parafina. Como tal preparação causa destruição parcial do DNA, os autores utilizaram iniciadores específicos para a sequência genética α -actina, comum a várias espécies de mamíferos, para o pré-diagnóstico de 18 amostras. Destas, nove apresentaram resultado positivo para a presença de DNA de *Leishmania*. Tais amostras haviam apresentado resultado anterior positivo para *Leishmania* pelo IHQ. Os autores concluem que a técnica desenvolvida poderá ser utilizada em vários tipos de estudo, particularmente naqueles retrospectivos em que apenas as coleções histológicas estão disponíveis.

Resultados concordantes entre a IHQ e a PCR foram também obtidos por Solano-Gallego *et al.*³² em amostras

de pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, mas estes autores usaram amostras frescas e congeladas a -20 °C até o momento da extração do DNA.

Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico é uma técnica utilizada para detecção e isolamento do patógeno usando seu vetor artrópode. Embora não possa ser utilizado como técnica diagnóstica de rotina, é um instrumento para resolução de questões epidemiológicas sobre o estado clínico do animal e relativas ao tratamento do cão infectado.^{39, 69}

A habilidade de se estabelecer colônias fechadas de *L. longipalpis*, desde que Killick-Kendrick *et al.*⁸⁵ descreveram métodos de criá-las em laboratório, tem permitido diversos estudos sobre o desenvolvimento, o ciclo e a morfologia de *Leishmania* nesse inseto vetor a partir da manutenção de colônias de diferentes procedências em vários institutos de pesquisa^{86, 87}, bem como o xenodiagnóstico direto, visando à monitoração da infectividade de cães portadores de LV.⁸⁸

Em estudos com o xenodiagnóstico, Gradoni *et al.*⁸⁹ demonstraram diferenças significativas entre as taxas de infecção de fêmeas de *Phlebotomus perniciosus* alimentadas em cães com diferentes sintomas clínicos, sendo que aqueles animais com mais sintomas infectavam maior número de fêmeas. Já Molina *et al.*⁸⁸ não encontraram diferenças entre as taxas de infectividade de fêmeas dos flebotomíneos *P. perniciosus* entre cães





assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, embora a porcentagem de fêmeas infectadas tenha apresentado grande variação. Os mesmos resultados foram encontrados por Guarga *et al.*⁹⁰, tanto no xenodiagnóstico direto quanto naquele indireto, em que as fêmeas de *P. perniciosus* foram alimentadas com sangue dos cães colocado em um recipiente de vidro e através de um fragmento de pele de pinto de três dias. Os cães usados nesses trabalhos eram soropositivos e/ou tiveram exame parasitológico também positivo. Courtenay, Quinell e Dye⁹¹, citados por Gradoni⁶⁹, demonstraram que cães só são infectantes para as fêmeas de *L. longipalpis* depois de apresentarem sorologia positiva e que, portanto, os títulos de anticorpos podem ser usados como fator preditivo de infectividade.

Utilizando xenodiagnósticos seriados para acessar a infectividade de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, Travi *et al.*⁹² e Costa-Val³⁰ demonstraram que os cães assintomáticos não infectaram as fêmeas de *L. longipalpis* e que os oligossintomáticos infectaram os insetos em taxas discretas. Os animais sintomáticos não só infectavam maior número de fêmeas como o faziam em maior intensidade, pois as fêmeas alimentadas nesses indivíduos possuíam maior número de promastigotas nos intestinos médio e anterior. Os autores também demonstram que a pele da orelha é mais infectante que a pele do abdome. Resultados semelhantes foram encontrados

por Travi *et al.*⁹² quando estudaram a possibilidade de *L. youngi* e *L. shanoni* serem transmissoras de LV, contribuindo, assim, para a disseminação da doença em novas áreas.

Tratamento da leishmaniose visceral canina

Talvez em nenhuma outra doença dos cães o termo “tratamento efetivo” tenha tantos significados⁹³, pois, apesar de este tratamento recuperar clinicamente o animal, com concomitante diminuição da carga parasitária e dos títulos de anticorpos circulantes³⁹, por meio dele ocorre apenas diminuição de sua capacidade infectante para o inseto transmissor⁸⁹, e, ainda, as recidivas são frequentes¹³, atingindo 75% dos casos no período de dois anos após o tratamento.⁵²

As principais drogas usadas na terapia da doença canina são o antimoniato de meglumina, anfotericina B e alopurinol. Muitos outros compostos, tais como estibogluconato de sódio, pentamidina, aminosidina, miltefosina, metronidazol e cetoconazol, foram também testados.⁹⁴ Protocolos atuais de tratamento da LV podem ser vistos no Quadro 1.

Embora apenas os animais clinicamente doentes sejam submetidos ao tratamento, aqueles assintomáticos apresentam maiores chances de recuperação que aqueles com sintomas viscerocutâneos.²⁰ O estágio clínico da doença, o grau de anticorpos apresentados pelo animal e os achados de patologia clínica





Cão soropositivo para LVC com lesões de pele

permitted to decide the therapy and be used and the prognosis of the case (Quadro 2).

The treatment of LV canine, especially with the combination of antimony/allopurinol, frequently leads to clinical cure, but relapses can occur, indicating the non-elimination of the infection.⁹ The animals can still harbor parasites on the skin and be infective for the flebotomines, even if to a lesser degree.^{95,96,97,98}

Uso de lipossomas

The use of conventional liposomes represents a promising strategy for the treatment of LV canine, as it increases the efficacy of antimonials, tan-

to by its ability to prolong the presence of the drug in the organism as much as the fact of liberating it specifically within the macrophages.^{99,100}

The initial studies on the use of antimony meglumine encapsulated in liposomes for the treatment of dogs are attributed to Alving *et al.*¹⁰¹ In this work, the authors experimentally infected dogs with *L. donovani*, and after 12 days of infection, the animals were treated both with the drug encapsulated and with the free drug, by intravenous (IV), for one, four or 10 consecutive days. At the end of the treatments, the dogs were sacrificed, and the parasitic load was evaluated by smears for trypsin digestion. The authors observed that the suppression of 50% of the parasitic load was achieved with 24mg/Sb/kg, when the free drug was used, and with only 0,029 mg/Sb/kg encapsulated in liposomes, when the compound was used, concluding that the drug, when encapsulated, is 700 times more efficient than in its free form for the treatment of LV canine.

Comparing the pharmacokinetics of antimony meglumine encapsulated in liposomes, administered both by intramuscular (IM) and by subcutaneous (SC) in a single dose, Valladares *et al.*⁵² observed that, in any of the two routes of application, the compound presented a behavior similar when the values of





níveis plasmáticos em diversos tempos após a aplicação e os demais parâmetros farmacocinéticos foram estudados. Os autores concluem ser a via SC a mais indicada para o uso do composto, partindo da premissa de que, para o tratamento da LV canina atingir picos plasmáticos maiores, que é conseguido pela administração por via SC, é preferível a manutenção da dose inibitória mínima da droga, que, por sua vez, é conseguida pela aplicação por via IM. Advertem ainda para o possível risco de indução de trombocitopenia, esplenomegalia e hemorragias, atribuídas ao uso de lipossomas que contenham fosfatidilcolina, colesterol e dicetil fosfato.

Valladares *et al*¹⁰² realizaram estudo em que a eficiência terapêutica do antimoniato de meglumina livre e en-

capsulado em lipossomas é comparada em cães experimentalmente infectados por *L. infantum*. A droga encapsulada produzia níveis plasmáticos mais altos de Sb que em estado livre, além de ser eliminada mais lentamente. Tais níveis, que teriam como média 9,8mg/Sb/kg, portanto inferiores àqueles de 20,4mg/kg preconizados pelo mesmo grupo em 1996, seriam efetivos contra a doença canina, pois, após um ano de acompanhamento, os cães tratados com o composto não apresentaram recidivas ou elevações nos níveis de proteínas plasmáticas ou gamaglobulinas, o que foi observado em três meses após o uso da droga livre. Os autores atribuem o sucesso da dose baixa ao fato de que os lipossomas possuem melhor acesso aos tecidos e aos macrófagos, eliminando os

Quadro 1: Protocolos de tratamento da LV canina.

Protocolo	Drogas e dosagens	Principais efeitos colaterais
Primeira linha	Antimoniato de glucamina (75-100mg/kg/IV/SID/4-8 semanas +alopurinol (10mg/kg/PO/BID/6-12 meses)	Potencial nefrotoxicidade e abscessos cutâneos nos locais de aplicação
Segunda linha	Miltefosina (2mg/kg/4 semanas/PO/SID) +alopurinol (10mg/kg/PO/BID/6-12 meses) Alopurinol (10mg/kg/PO/BID/6-12 meses)	Vômitos e diarreia
Terceira linha	Anfotericina B (0,5—0,8mg/kg/IV/2 vezes por semana/2 meses)	Potencial nefrotoxicidade

Adaptado de Solano-Gallego et al.⁹





parasitas mais facilmente e permitindo que quantidades menores da droga sejam necessárias para manter os níveis terapêuticos, diminuindo, assim, os efeitos colaterais do Sb.

Schettini *et al.*¹⁰³ estudaram a farmacocinética de antimoniato de meglumina sintetizado no Departamento de Química do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG¹⁰⁴, de fórmula $C_7H_2ONO_9Sb.3H_2O$, e encapsulado em lipossomas convencionais, com métodos mais eficientes, em cães saudáveis, porém visando ao tratamento de cães acometidos pela LV. Quatro cães machos receberam o composto em uma dose única de 3,8mg/Sb/kg por via EV e foram sacrificados três, 48, 96 horas e sete dias após a administração. Amostras de fígado, baço, medula óssea, sangue e urina foram recuperadas e submetidas à digestão com ácido nítrico para determinação do teor de antimônio. A maior concentração de antimônio na medula óssea foi de 2,8µg/Sb/g, sendo observada no tempo de três horas. Às 48 horas, os autores constataram as maiores concentrações no fígado, de 43,6µg/Sb/g, e no baço, de 102,48µg/Sb/g. No sangue, níveis de 120ng/Sb/mL foram observados, sendo considerados baixos pelos autores, os quais concluíram que a aplicação da dose única do composto produz concentrações elevadas de Sb no fígado e no baço por longo tempo, sugerindo um intervalo de quatro dias entre as doses para o tratamento da doença canina com o composto.

96

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº 65 - maio de 2012

Usando a formulação supracitada, em quatro aplicações por via endovenosa a cada 96 horas, Costa-Val³⁰ concluiu que composto antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas não foi capaz de curar parasitologicamente os cães, embora contribuísse de forma significativa para a melhora do estado clínico dos animais, entretanto foi capaz de reduzir a intensidade da infecção de *Lutzomyia longipalpis*.

Recentemente, da Silva *et al.*¹⁰⁵ utilizaram outra formulação, composta por 6,8mg/ Sb/kg encapsulado em lipossomas, em seis aplicações endovenosas intervaladas de quatro dias, em associação com alopurinol (20mg/kg/24h/oral) durante o tratamento com o composto. Os animais permaneceram por 140 a 200 dias sem tratamento. A associação promoveu significativa melhora clínica dos animais, bem como redução da carga parasitária na medula óssea e no baço dos cães tratados e redução de 100% do parasitismo hepático, avaliados por PCR quantitativa. Tanto o xenodiagnóstico quanto a PCR quantitativa da pele da orelha demonstraram que a associação das drogas foi efetiva em não permitir a transmissão dos parasitas da pele para os flebotomíneos. Os autores chegaram à conclusão de que 50% dos animais tratados foram curados da infecção por *L. infantum*.

Referências

1. EZQUERRA, J.P.A. *Las leishmaniasis: de la biología al control*. 2 ed. Madri: [s.ed.], 2001. p. 157-159.





Quadro 2: Estadiamento clínico da LV canina baseado no teor de anticorpos, nos sinais clínicos, nos achados laboratoriais, na terapia e no prognóstico para cada estágio.

Estadia- mento clínico	Sorologia	Sinais clínicos	Achados de patologia clínica	Terapia	Prog- nósti- co
Estádio I-Doença discreta	Negativa ou discretos níveis de anticorpos (infecção confirmada por imunoi-toquímica ou PCR)	Cães com sinais clínicos discretos como linfadenopatia discreta ou dermatite papular	Sem alterações, perfil renal normal: creatinina <1,4 mg/dL e relação de proteína creatinina urinária < 0,5	Acompanha-mento ou alopurinol apenas ou alopurinol associado ao antimoniato de meglumina ou miltefo-sina	Bom
Estádio II Doença mode-rada	Níveis de anticorpos discretos ou elevados	Além dos sintomas listados no estágio I: dermatite esfoliativa difusa, onicogribose, ulce-rações, anorexia, perda de peso e epistaxe	Anemia não rege-nerativa, hiperga-maglobulinemia, hipoalbuminemia, creatinina <1,4mg/dL e relação de proteína creatinina urinária 0,5-1	Alopurinol associado ao antimoniato de meglumina ou miltefo-sina	Bom a reser-vado
Estádio III Do-ença grave	Níveis de anticorpos elevados	Além dos sinais listados anterior-mente, os cães podem apresentar lesões advindas da deposição de imunocomplexos: vasculites, artrites, uveíte e gromeru-lonefrite	Alterações lista-das no estágio II, doença renal crônica (IRIS I) relação de pro-teína creatinina urinária>1 ou IRIS II, creatinina 1,4-2mg/dL	Alopurinol associado ao antimoniato de meglumina ou miltefo-sina. Seguir o protocolo IRIS para doença renal crônica	Reser-vado a desfa-vorável
Estádio IV Doença muito grave	Níveis de an-ticorpos muito elevados	Além das lesões citadas anterior-mente, os cães podem apresentar troboembolis-mo pulmonar, síndrome nefrótica e estágio final de doença renal	Alterações listadas no es-tádio III, doença renal crônica IRIS III(creatinina 2-5mg/dL) ou IRIS IV (creatini-na>5 mg/dL) ou síndrome nefrótica , com proteinúria acentuada e re-lação de proteína creatinina urinária >5	Apenas alopurinol. Seguir o protocolo IRIS para doença renal crônica	Desfa-vorável

Adaptado de Solano-Gallego.⁹ IRIS staging of chronic renal disease (International Renal Interest Society. http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging_ckd.shtml).





2. MOSSER, D.M. e ROSENTHAL, L.A. *Leishmania* macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Cell Biology*, v.4, [s.n.], p.315-322, 1993.
3. PETERS, C. *et al.* The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *Journal of Cell Science*, v.108, [s.n.], p.3715-3724, 1995.
4. DOMINGUEZ, M. e TORAÑO, A Immune adherence –mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *Journal Experimental Medicine*, v.189,n. 1, p. 25-35, 1999.
5. FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: Moving Towards a Solution , 2, 2002, Sevilha. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*. Sumène,: [s.ed.], maio, 2002. p.21-24.
6. 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.229-225, 1994.
7. PINNELI, E. RUTTEN, V.P.M.G. e RUITENBERG, E.J. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: AN UPDATE, 1, 1999, Barcelona. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*. Sumène,: [s.ed.], agosto, 1999. p.60-64.
8. FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: AN UPDATE, 1, 1999, Barcelona. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*. Sumène,: [s.ed.], agosto, 1999. p.6-10.
9. SOLANO-GALLEGO, L, KOUTINAS A, MIRÓ G, CARDOSO L, PENNISI MG, FERRER L, BOURDEAU P, OLIVA G, BANETH G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 28;165(1-2):1-18. 2009
10. MARZOCHI, M.C. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.80, n.3, p.349-357, 1985.
11. FERRER, L. *et al.* Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Records*, v136, [s.n.], p.514-516, 1995.
12. NELSON, R.W e COUTO, C.G. Doenças protozoárias polissistêmicas. In: NELSON *et al.* *Medicina interna dos pequenos animais*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 104, p.1031-1038.
13. SLAPPENDEL, R.J. e GREENE, C.E. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the dog and cat*. Filadélfia. W.B. Saunders Company, 1990. Cap.79, p.769-777.
14. CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Records*, v.141, [s.n.], p. 539-543, 1997.
15. FEITOSA, M.M. *et al.* Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil) Clínica Veterinária, v.5, n.28, p.36-44, 2000.
16. SANTOS-GOMES, *et al.* Citokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.88, [s.n.], p.21-30, 2002.
17. LOPEZ, R. *et al.* Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Journal Veterinary Medicine B*, v.43, [s.n.], p.469-474, 1996.
18. NOLI, C. Leishmaniosis canina. *Waltham Focus*, v.9, n.2, p.16-23, 1999.
19. NIETO, C.G. *et al.* Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, v.45, [s.n.], p.33-47, 1992.
20. MANCIANTI, F. *et al.* Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of in-





- fection on different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, p. 566-567, 1988.
21. SOLANO-GALLEGO, L., BANETH, G., Canine leishmaniasis—a challenging zoonosis. *European Journal of Companion Animal Practice*. 18, 232–241. 2008.
 22. KOUTINAS *et al.* Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.35, [s.n.], p. 376-383, 1999.
 23. XAVIER, S.C. *Aspectos clínicos, histopatológicos e parasitológicos da pele de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2002. 46f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
 24. AMUSATEGUI, I. *et al.* Distribution and relationships between clinical and pathological parameters in canine leishmaniasis. *European Journal of Epidemiology*, v.18, [s.p.], p.147-156, 2003.
 25. CABRAL, M., GRADY, J.O., ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasitic Immunology*, v.14, [s.n.], p.531- 39, 1992.
 26. QUINNELL, R.J. *et al.* Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *Journal Infectious Diseases*, v.183, [s.n.], p. 1421-1424, 2001.
 27. REIS, A. B. *Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi, portadores de diferentes formas clínicas da infecção*. 2001. 180 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte.
 28. SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in a area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.2, p. 560-563, 2001.
 29. MENDES C.O. *et al.* IgG1/IgG2 dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v.21, [s.n.]. p.2589-2597, 2003.
 30. COSTA-VAL, A. P. *Tratamento da leishmaniose visceral canina com antimonial encapsulado em lipossomas*. 2004. 125 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte.
 31. AYALI, D. S; BANETH, G. Canine Visceral Leishmaniasis, 2001. Disponível em <www.ivos.org.> acessado em ago., 2002.
 32. SOLANO-GALLEGO, L. *et al* Histological and Immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* infected dogs. *Journal Comparative Pathology*, v.130, [s.n.], p.7-12, 2004.
 33. FERRER, L. *et al.* Skin lesions in canine leishmaniasis. *Journal Small Animal Practice* , v.29, [s.n.], p.381-388, 1988
 34. PUMAROLA, M. *et al.* Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *Journal Comparative Pathology*, v.105, [s.n.], p.279-286, 1991.
 35. PRATS, N. e FERRER, L. A possible mechanism in the pathogenesis of cutaneous lesions in canine leishmaniasis. *The Veterinary Records*, v.134, [s.n.], p.103-104, 1995.
 36. FONDEVILLA, D. VILAFRANCA, M. e FERRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 56, [s.n.], p.319-327, 1997
 37. VIDOR, E. *et al.* Le chancre d'inoculation dans la leishmaniose canine a *Leishmania infantum*. *Pratique Médecine Chirurgie Animal Compagnie*, v.26, [s.n.], p.133-137, 1991.
 38. TAFURI, W.L. *et al.* Estudo, ao microscópio óptico e eletrônico, do rim de cães natural e





- experimentalmente infectados com *Leishmania (leishmania) chagasi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.31, n.3, p. 139-145, 1989.
39. ALVAR, J.A.; *et al.* Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.88, n.0, p.1-8, Liverpool, 1994.
40. ZARAGOZA, C. *et al.*, SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. *Veterinary Research*, v.34, [s.n.], p.137-151, 2003.
41. MARTINEZ-MORENO *et al.* Immunological and histological study of T-and B- lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v.51, [s.n.], p.249-59, 1993.
42. GENARO, O *Leishmaniose Visceral Canina Experimental* Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.146 p Tese (Doutorado em Parasitologia) Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Parasitologia, 1993
43. BLAVIER A. *et al.* Atypical forms of canine leishmaniasis. *The Veterinary Journal*, v.162, [s.n.], p.108-120, 2001.
44. GARCIA-ALONSO *et al.* Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.18, [s.n.], p.617-623, 1996.
45. MARTINEZ-MORENO *et al.* Humoral and cell mediated immunity responses in natural and experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.48, [s.n.], p.209-220, 1995.
46. MORENO, P.; LUCENA, R. E GINEL, P.J. Evaluations of primary homeostasis in canine leishmaniasis. *Veterinary Records*, v. 142, [s.n.], p.81-83, 1998.
47. JUTTNER, C. *et al.* Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. *Veterinary Records*, v. 149, [s.n.], p.176-179, 2001.
48. TAFURI, Wg L. Leishmaniose visceral em cães natural e experimentalmente infectados: histopatologia estudo imunocitoquímico dos receptores do tipo 3 (CR3-CD11b/CD18) e 4(CR4-CD11b/CD18) do complemento e dos antígenos de histocompatibilidade da classe II no fígado e órgãos linfoides. 1995 207f. Tese (Doutorado em Patologia Geral) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995.
49. OLIVEIRA, G.G.S., SANTORO, F.e SADIR-GURSKY, M. The subclinical forms of experimental leishmaniasis in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 88, n.2, p.243-248, 1993.
50. TAFURI, Wg L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology*, n.96, [s.n.], p.203-212, 2001.
51. IKEDA, F.A. *et al.* Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP: um estudo retrospectivo. *Clínica Veterinária*, n.47, [s.n.], p.42-48, 2003.
52. VALLADARES, J.E. *et al.* Hepatobiliar and renal failure in a dog experimentally infected with *Leishmania infantum*. *The Veterinary Records*, v.141, [s.n.], p.574-575, 1997a.
53. NATAMI, A. *et al.* Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Marroco. *Veterinary Research*, v.31, [s.n.], p. 355-363, 2000.
54. MANCIANTI, F, POLI, A. e BIONDA, A Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parassitologia*, v.31, n..2-3, p.213-230, 1989.
55. COSTA, F.A.L. *et al.* Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology*, n.40, [s.n.], p.677-684, 2003.
56. ANOSA, V.O. e IDOWU, A.L. The clinical features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigeria. *Zentralbl Veterinarmed B*,





- p.34, 1986
57. ABRANCHES P. *et al.* An experimental model for canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.13, n.5, p.537-550, 1991.
 58. FREITAS J.C. *et al.* Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*;45(1):24-9. 2012
 59. De LUNA, R. *et al.* Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis associated anemia. *Journal Comparative Pathology*, v.122, [s.n.], p.213-216, 2000.
 60. BRANDONISIO, O *et al.* Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum* infected dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.53, [s.n.], p.95-103, 1996.
 61. BOURDOISEAU, G. *et al.* Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 56, [s.n.], p.345-351, 1997b
 62. LEES, G.E., WILLARD, M.D. E GREEN, R.A. Urinary disorders In: WILLARD, M.D., TVEDTEN, H., e TURNWALD, G.H. *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, 2a ed., Philadelphia, 7:115-146, 1994.
 63. ZATELI, A *et al.*, Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *American Journal of Veterinary Research*, v.64, n.5, p.558-560, 2003
 64. ZARAGOZA, C. *et al.*, SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. *Veterinary Research*, v.34, [s.n.], p.137-151, 2003.
 65. TAVARES, C. A; FERNANDES, A.P. e MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Review Molecular Diagnosis*, v.3, n5, p.657-667, 2003.
 66. FERRER, L. Leishmaniasis: update in diagnosis and therapy. *Proceedings of European Society of Veterinary Dermatology*, PISA, 1997.
 67. AISA, M.J. *et al.* Diagnostic potential of Western Blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of pattern. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.58, n.2, p. 154-159, 1998
 68. OZBEL, Y *et al.* A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Tropica*, v.74, [s.n.], p.1-66, 2000.
 69. GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: Moving Towards A Solution , 2, 2002, Sevilha. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*. Sumène: [s.ed.], maio, 2002. p.21-24.
 70. MANCIANTI, F. PEDONESE, F e POLI, A. Evaluation of dot enzyme linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Veterinary Parasitology*, v. 65, [s.n.], p.1-9, 1996.
 71. COSTA, C. A *et al.* Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 24, n.1, p.21-25, 1991.
 72. OIE, 2000 citado por GRADONI, L. The diagnose of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: Moving Towards A Solution , 2, 2002, Sevilha. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*. Sumène: [s.ed.], maio, 2002. p.21-24.
 73. CARRERA, L. *et al.* Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Experimental Parasitology*, v.82, [s.n.], p. 139-146, 1996.
 74. CABRAL, M. *et al.* The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, v.76, [s.n.], p.173-180, 1998.
 75. CABRERA, M.A. *et al.* Canine Visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assesement of risk factors. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*,





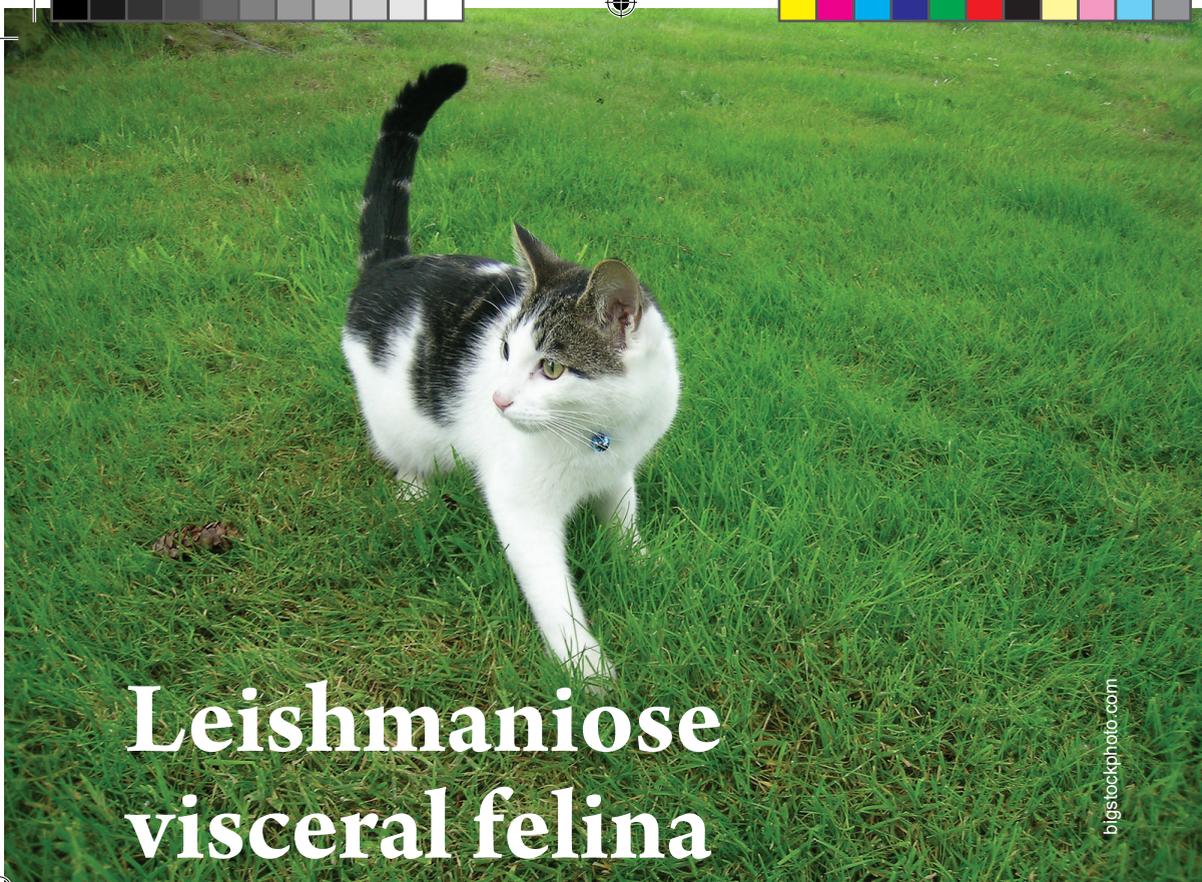
- São Paulo, v.45, n.2, p.79-83, 1999.
76. COSTA-VAL, A.P. Tratamento da leishmaniose visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas. 2004 126f. Tese (doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.
 77. SCALONE, A. *et al.* Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked assay. *Veterinary Parasitology*, v.104, [s.n.], p.275-285, 2002.
 78. FISA, R *et al.* Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology*, v. 99, [s.n.], p.105-111, 2001.
 79. MATHIS, A e DEPLAZES, P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. In diagnostic samples from humans and dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n.5, p.1145-1149, 1995.
 80. ROURA, X; SANCHEZ, A e FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Veterinary Records*, v. 144, n.10, p. 262-264, 1999.
 81. BERRAHAL, F *et al.* Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.55, n.3, p. 273-277, 1996.
 82. REALE, S. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n.9, p. 2931-2935, 1999.
 83. LACHAUD, L *et al.* Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and detection of asymptomatic carriers. *Parasitology*, v.125, [s.n.], p. 197-207, 2002.
 84. MULLER, N *et al.* PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Veterinary Parasitology*, v.114, [s.n.], p. 223-229, 2003.
 85. KILLICK-KENDRICK R., LEANEY, A.J., READY, P.D. A laboratory culture of *Lutzomyia longipalpis*. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, v.67, n.4p. 434, 1974.
 86. MOLYNEUX DH, KILLICK-KENDRICK R, ASHFORD RW. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. III. The ultrastructure of *Leishmania mexicana amazonensis* in the midgut and pharynx of *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of London B. Biological Sciences*, v. 19, [s.n.], p. 341-57, 1975
 87. LAINSON, R. SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution: In: PETERS, W., KILLICK-KENDRICK, R. *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. v.1, [s.n.], p.1-120, Londres. Academic Press. 1987.
 88. MOLINA, R. *et al.* Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Londres, n.88, v.4, p.491-493. 1994.
 89. GRADONI, L. *et al.* *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Medicine Veterinary Entomology*, v. 1, n.4, p. 339-342, 1987.
 90. GUARGA, J.L. *et al.* Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Tropica*, v.77, [s.n.], p.203-2000.
 91. COURTENAY, O , QUINNELL, R.J. e DYE, C. *Infection and infectiousness in a cohort of sentinel dogs naturally exposed to Leishmania infantum: implications for control*. *Proceedings of the Second World Congress on Leishmaniosis*. Creta, Grécia, Maio 20-24, p. 39, 2001 citado por GRADONI, L. The diagnose of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: Moving Towards A Solution , 2,





- 2002, Sevilha. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*. Sumène,: [s.ed.], maio, 2002. p.21-24.
92. TRAVI, B.L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitological status and infectivity for sand flies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.64, n.3-4, p.119-124, 2001.
93. BANETH, G. A review of the treatment of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: Moving Towards A Solution , 2, 2002, Sevilha. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*. Sumène,: [s.ed.], maio, 2002. p.21-24.
94. LAMOTHE, J. Treatment of canine leishmaniasis from A (Amphotericin B) to z (Zylo-ric □). In: CANINE LEISHMANIASIS: AN UPDATE, 1, 1999, Barcelona. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*. Sumène,: [s.ed.], agosto, 1999. p.60-64.
95. RIBEIRO, V.M. *et al* Alternativas para o tratamento de cães idosos e/ou portadores de insuficiência renal crônica em animais acometidos de Leishmaniose Visceral e a infectividade da pele destes animais durante o tratamento. IN: *Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais*, 20. Anais, p.26. 1999.
96. 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*, 2007,143, 254–259.
97. MANNA, L *et al.*, Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The Veterinary Journal*, 2008,177, 279–282
98. RIBEIRO, R.R. *et al.*, . Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2008. 52, 2564–2572.
99. CROFT, S.L. Liposomes in the treatment of parasitic diseases. *Pharmacy International*, [s.v.], [s.n.], p.229-233, 1986.
100. SCHETTINI, D. A Estudo da biodistribuição em cães de antimoniate de meglumina na forma encapsulada em lipossomas. Dissertação Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Maio 2002.
101. ALVING *et al.* Liposomes in leishmaniasis: effects of parasitic virulence on treatment of experimental leishmaniasis in hamsters. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.78, n.3, p.279-286, 1984.
102. VALLADARES, J.E. *et al* Long term improvement in the treatment of canine leishmaniasis using an antimony liposomal formulation. *Veterinary Parasitology*, v. 97, [s.n.], p.15-21, 2001.
103. SCHETTINI, D.A., *et al.*, Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, v.36, n.32, p.269-272, 2003..
104. DEMICHELI, C; *et al.* Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate. *Biomaterials*, v.12, p.63-66, 1999.
105. SILVA S.M. *et al.* Efficacy of Combined Therapy with Liposome-Encapsulated Meglumine Antimoniate and Allopurinol in the Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012 *In press*





Leishmaniose visceral felina

bigstockphoto.com

Aspectos clínicos e epidemiológicos

Sydnei Magno da Silva

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

E-mail: sydmagno@yahoo.com

Introdução

O homem desenvolveu contato com os gatos há cerca de 9.000 anos, principalmente pela habilidade desses animais para caçar e, conseqüentemente, controlar populações de roedores. No Egito Antigo, onde foram efetivamente domesticados, há cerca de 5.000 anos, os gatos passaram a habitar casas, foram deificados e adorados em templos. Na Europa, durante a Idade Média,

104

os gatos receberam tratamento oposto, sendo perseguidos por associação às bruxas e considerados a incorporação do mal. Nos dias de hoje, além de importantes no controle de roedores, são considerados animais de companhia ou estimação.¹

Com o passar do tempo, os gatos assumiram a segunda posição no contexto da afetividade humana, visto que a população felina está atrás apenas da

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº 65 - maio de 2012





canina em número absoluto de animais de estimação. Somente no Brasil, a população felina foi estimada em mais de 16 milhões de indivíduos, e 44% dos lares do país possuem cães e/ou gatos.²

A mudança de conduta em relação aos felinos, agora considerados animais de estimação, aumentou a expectativa de vida desses animais, dado o acesso a melhores condutas de manejo, diagnósticas e terapêuticas. Esse fato cria uma espécie de viés, porque quanto mais longevos, mais os gatos estariam expostos e susceptíveis ao desenvolvimento daquelas doenças de curso crônico, como no caso das leishmanioses. Por representarem grande número de indivíduos susceptíveis a contrair doenças e permanecerem maior período de tempo expostos a patógenos, além de manterem convivência

próxima ao homem, os gatos podem assumir importante papel como reservatórios de diversos agentes infecciosos e parasitários, inclusive aqueles relacionados a zoonoses, como toxoplasmose e leishmanioses.^{1,3}

Após a descrição de casos de gatos infectados por *Leishmania*, estudos que ajudem a elucidar a participação dos gatos na epidemiologia das leishmanioses tornam-se necessários, uma vez que se trata de um complexo de doenças que

determinam grave problema de saúde pública, cuja incidência anual global é de 1,5 a 2,0 milhões de casos, e destes, 1,0 a 1,5 milhão de pessoas são acometidas pelas formas tegumentares, leishmaniose tegumentar (LT) e cerca de 500.000 pela forma visceral, leishmaniose visceral (LV), das quais aproximadamente 59.000 evoluem para o óbito, quando a doença não é diagnosticada e tratada em tempo.^{4,5}

A LV está distribuída por todos os continentes, com exceção da Oceania e da Antártida, sendo que mais de 90% dos 500 mil casos de LV estão concentrados na Índia, no Nepal, no Sudão, em Bangladesh e no Brasil.^{4,5} No Brasil, a doença possui caráter zoonótico, cujo agente etiológico é *Leishmania infantum* (sin = *L. chagasi*), e a transmissão do parasito é feita por fêmeas infectadas de

flebotomíneos (Diptera: Psychodidae; Phlebotominae), sendo *Lutzomyia longipalpis* considerada a principal espécie transmissora do parasito para o homem e reservatórios mamíferos.^{5,6} O cão doméstico é o mais importante reservatório do parasito da LV zoonótica, devido à alta prevalência da doença nestes animais, intenso parasitismo na pele e convívio próximo ao homem.⁷

Além do cão, a infecção por *L. infantum* já foi descrita também em outros

Os gatos podem assumir importante papel como reservatórios de diversos agentes infecciosos e parasitários, inclusive aqueles relacionados a zoonoses, como toxoplasmose e leishmanioses.





animais, como marsupiais (*Didelphis albiventris*, *D. marsupialis*)⁸, roedores (*Rattus rattus*; *Nectomys squamipes*; *Proechimys canicollis*)⁹ e o gato doméstico (*Felis catus*).¹⁰ Recentemente foi demonstrada, por meio de xenodiagnóstico, a capacidade de gatos, naturalmente infectados, em transmitir o parasito para os hospedeiros invertebrados, na Itália¹¹ e no Brasil.¹⁰ Entretanto, o papel destes animais e de outros mamíferos sinantrópicos na epidemiologia da LV ainda necessita de mais estudos, principalmente aqueles que determinem sua relevância no contexto da transmissão para o homem.^{8,10}

Leishmaniose visceral felina

Sinais clínicos

Na leishmaniose visceral felina (LVF), à semelhança da leishmaniose visceral canina (LVC), os sinais clínicos, quando presentes, são caracterizados por um amplo e inespecífico espectro de alterações. O período de incubação da doença é de difícil determinação e, possivelmente, outros fatores influenciam esse período, como o estado nutricional do animal e as condições imunossupressoras.¹

Dentre as manifestações clínicas, o acometimento do tecido cutâneo é a al-

A infecção por L. infantum já foi descrita no gato doméstico. Foi demonstrada a capacidade de gatos em transmitir o parasito para os hospedeiros invertebrados.

teração mais comumente relatada na LVF, embora de variável extensão e caracterização. As lesões cutâneas podem ou não estar associadas a outros sinais clínicos e/ou anormalidades clínico-patológicas. Dentre as manifestações cutâneas

citadas na literatura, destacam-se os mais variados tipos de dermatite: não pruriginosa, pruriginosa, furfurácea, ulcerativa, papular; lesões nodulares; lesões ulceradas; alopecias localizadas ou generalizadas; descamações; eritemas; crostas hemorrágicas e onicogrifose.^{10,12}

Em um estudo envolvendo 27 gatos naturalmente infectados, os autores relatam que 55,5% dos animais apresentaram alterações dermatológicas na região cefálica, sendo as áreas mais afetadas o pavilhão auditivo e o focinho; 22,2% apresentaram lesões nos membros; 22,2% na região dorsal; 11,1% na cauda e 11,1% no abdômen.¹²

Além das dermatopatias, outros sinais têm sido relatados na literatura, em variados graus de acometimento e intensidade, como as linfadenopatias (principalmente nos linfonodos submandibulares e poplíteos), perda de peso, anorexia, êmese, caquexia, atrofia muscular, desidratação, diarreia, secreção ocular mucopurulenta, ulcerações na cavidade oral, dispneia, secreção nasal purulenta, uveíte, opacidade e úlcera de córnea.^{10,12,13,14}





As alterações clínico-patológicas relacionadas à LVF, assim como os sinais clínicos, não apresentam um padrão clássico que as associe à carga parasitária e/ou à evolução da doença. A casuística dessas alterações clínico-patológicas na LVF ainda é reduzida na literatura, entretanto estão descritos casos de discreta a moderada anemia, de leucocitose, neutrofilia, monocitose, além de azotemia e hipergamaglobulinemia.^{10, 13,14} Recentemente, foi relatado um caso de pancitopenia em um gato com LVF.¹⁴

Diagnóstico

O diagnóstico de LVF baseado exclusivamente no exame físico do animal torna-se impossível, em decorrência da ausência de um padrão de alterações patognomônicas e pelo fato de os sinais, quando presentes, poderem mimetizar outras doenças. Além disso, grande percentual dos gatos infectados poderia não apresentar sinais da doença por longo período da vida deles.^{1,10,15,16}

Um diagnóstico acurado de LVF geralmente é extremamente difícil, e só é possível de ser estabelecido após se proceder a cuidadoso exame físico, seguido de testes sorológicos, exames parasitológicos, além dos laboratoriais de rotina, como hemograma completo, provas bioquímicas e urinálise.^{10, 16,17}

Os exames laboratoriais, em especial os de hematologia, bioquímica sérica e urinálise, embora possuam limitado valor para o diagnóstico, fornecem importantes subsídios para a avaliação do estado clínico do animal infectado e para o prognóstico da evolução da doença.¹⁶

Os testes sorológicos, como a RIFI (reação de imunofluorescência indireta) e ELISA (ensaios enzimáticos), baseados na detecção sérica de IgG anti-*Leishmania*, possuem sensibilidade e especificidade variadas, dependentes do antígeno e da metodologia de execução empregada.¹ A sorologia é a ferramenta mais utilizada para o diagnóstico da LVF porque, assim como ocorre na LVC, é um teste menos invasivo e de sensibilidade elevada.^{1, 16} Atualmente no Brasil, os testes sorológicos para LVF estão padronizados e disponíveis comercialmente.

O diagnóstico de LVF baseado exclusivamente no exame físico do animal torna-se impossível.

O diagnóstico molecular realizado, sobretudo, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) é baseado na amplificação de uma sequência conhecida de oligonucleo-

tídeos específicos do parasito. É um teste altamente sensível e específico para *Leishmania*. A grande vantagem de sua utilização no diagnóstico da LVF, assim como ocorre na LVC, é a possibilidade do uso de uma variedade de materiais clínicos, como sangue, aspirados de medula ou linfonodos, biópsias de pele,





dentre outros.^{10,16}

Os exames diretos são fundamentados na demonstração de formas amastigotas de *Leishmania* em material biológico obtido por esfregaços de aspirados de medula óssea, e linfonodos, por aposição de fragmentos de pele ou de outros tecidos, e, indiretamente, pelo isolamento do parasito presente nestes materiais, em meio de cultura.⁵

Na rotina clínica, a abordagem diagnóstica do paciente com suspeita de LVF deve ser individualizada e, para cada caso, devem ser considerados os motivos que levaram à suspeita, bem como a possibilidade de coinfeções (Toxoplasmose, FIV e FeLV) ou co-morbidades, ou, ainda, outras condições que dificultam um diagnóstico preciso. Após esta avaliação inicial, o clínico deve traçar um roteiro que envolva as técnicas diagnósticas específicas que se apliquem a cada caso, os exames complementares para a condução de diagnósticos diferenciais e outros, quando necessário.

Tratamento

Poucos são os relatos na literatura sobre protocolos terapêuticos aplicados na LVF. Na maioria dos casos, a droga de escolha é o alopurinol (10mg/kg/12h) associado à terapia de suporte, como antibioticoterapia, suplementação, renoproteção, imunoestimulação,

108

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº 65 - maio de 2012

dentre outros.^{13,14,18} Todavia, pelo fato de a casuística de tratamento da LVF ser incipiente na literatura, os resultados relacionados à terapêutica da LVF

ainda são controversos.

Mais estudos são necessários para determinar a eficácia de protocolos terapêuticos convencionalmente utilizados na LVC, como a associação

de antimoniato de meglumina ou miltefosina com o alopurinol, ou mesmo de protocolos alternativos, como o uso de derivados imidazólicos (cetoconazol, fluconazol, dentre outros) e seus efeitos adversos associados, na terapia da LVF.

Aspectos epidemiológicos

No início do século passado, mais precisamente em 1912, o Dr. Edmond Sergent, então chefe do Instituto Pasteur da Argélia (1910-1963), relatou pela primeira vez um gato naturalmente infectado por parasitos do gênero *Leishmania*. No relato, Sergent e seus colaboradores descrevem uma residência em que foram encontrados uma criança, um cão e um gato infectados por *Leishmania* sp.¹⁹ A partir deste relato pioneiro, casos esporádicos de leishmaniose em gatos (LF) têm sido descritos, a maioria envolvendo espécies causadoras das formas tegumentares da doença, como *L. (L.) mexicana*²⁰, *L. (L.) amazonensis*²¹, *L. (L.) venezuelensis*²², *L. (V.) braziliensis*.²³

Os resultados relacionados à terapêutica da LVF ainda são controversos.





Luiz Felipe Nunes Menezes Borges

Em 1984, foi relatada pela primeira vez a infecção experimental de gatos domésticos com *L. donovani* e com *L. chagasi*. Nesse estudo, os autores observaram a presença de títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, de formas evolutivas do parasito em esfregaços por aposição e no cultivo de células mononucleares de tecidos dos gatos poucas semanas após a inoculação, descrevendo os primeiros casos de leishmaniose visceral felina (LVF).²⁴

Desde então, casos de gatos naturalmente infectados por *L. infantum* foram descritos em diversos países, principalmente do continente europeu, como França²⁵, Espanha²⁶, Itália¹⁷ e Portugal²⁷. No ano de 2004, foi relatado no estado de São Paulo o primeiro caso de LVF autóctone do continente americano.²⁸

Nos 90 anos que separam a primei-

ra descrição de LF e o ano de 2002, poucos estudos envolvendo a LVF são encontrados na literatura científica, sendo a grande maioria relatos de leishmaniose tegumentar felina (LTF). Em contrapartida, nos 10 últimos anos tem ocorrido inversão nesta relação, com aumento expressivo no número de estudos relacionados à LVF. Em parte, este fenômeno pode ser explicado pelo fato de que há, atualmente, uma corrente de pensamento que acredita que, além do cão, os gatos, bem como outros mamíferos sinantrópicos, possam estar envolvidos no ciclo da LV em áreas endêmicas, atuando como fonte alternativa de infecção para os flebotomíneos.^{15, 29} Na tentativa de entender tal dinâmica, tem ocorrido este aumento no número de trabalhos envolvendo a LVF, principalmente aqueles que objetivam determi-



nar a presença e a prevalência da doença nas áreas endêmicas para LV e LVC.

Os inquéritos sorológicos para LVF realizados nos países europeus onde a LV é endêmica mostram prevalência variando de 1,63% em certas regiões de Portugal³⁰ a 70,6% na Espanha.²⁶

No Brasil, autores têm sugerido prevalência elevada de LVF em áreas endêmicas.

Recentemente, em um estudo conduzido em Araçatuba (SP), a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* determinada por ELISA, utilizando-se antígenos brutos do parasito, foi de 23% (n=113).³¹ Em outro estudo na mesma cidade, autores relataram prevalência de 21,85% (n=302) de LVF e associação da infecção com FIV.³² Em estudo no estado do Rio de Janeiro, autores identificaram a infecção por *L. infantum* em 25% das amostras testadas.³³ No ano de 2009, um inquérito sorológico realizado em amostras de 120 gatos provenientes de Belo Horizonte (MG) identificou anticorpos anti-*Leishmania* em 42,5% dos soros testados.¹

A partir da confirmação de que gatos domésticos poderiam desenvolver LVF e de que a doença está presente nas áreas em que ocorrem a LV e a LVC, alguns questionamentos surgiram: i) Além de se infectarem, os gatos

No Brasil, autores têm sugerido prevalência elevada de LVF em áreas endêmicas.

seriam capazes de transmitir o parasito para os vetores naturais? Se afirmativo, eles poderiam ser considerados reservatórios do parasito? ii) Qual a influência disto na epidemiologia da leishmaniose visceral?

Parte destes questionamentos começou a ser respondida quando, em 2007, autores relataram a infecção de *Phlebotomus perniciosus* com *L. infantum*

após o repasto sanguíneo destes insetos em um gato naturalmente infectado na Itália.¹¹ Este foi o primeiro relato da transmissão de parasitos de um gato com LVF para o seu hospedeiro invertebrado natural, que também é incriminado na transmissão de *L. infantum* para os cães e o homem naquela região. Associando este achado com resultados de inquéritos soroepidemiológicos que apontam a presença da LVF em áreas endêmicas, os autores sugerem que os gatos poderiam ser considerados reservatórios alternativos do parasito nestas áreas.¹¹

Três anos após o primeiro relato, a capacidade de flebotomíneos alimentados em gatos com LVF de se infecta-

rem com *L. infantum* foi novamente demonstrada, agora em Belo Horizonte, Brasil.¹⁰ Nesse estudo, um gato macho, sem raça definida, oito anos de idade, apresentando aumento de linfonodos poplíte-

A capacidade de flebotomíneos alimentados em gatos com LVF de se infectarem com L. infantum foi demonstrada no Brasil.





os, dermatite furfurácea, onicogribose, caquexia, anorexia e ferida na orelha esquerda, foi submetido à sorologia (RIFI e ELISA) e PCR específica para *L. infantum* em aspirado de medula óssea, para confirmar a suspeita de LVF. Os resultados foram positivos em ambos os testes e negativos para FIV e FeLV. Confirmada a infecção, o animal foi submetido a xenodiagnóstico, por meio do qual fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* realizaram o repasto sanguíneo na região das orelhas e abdômen do animal previamente anestesiado. Cinco dias após o repasto, os insetos foram dissecados, e formas promastigotas de *L. infantum* visualizadas no interior do trato digestório de 13,1% dos insetos dissecados. Além de corroborar o caso reportado na Itália, este é o primeiro relato de transmissão de *L. infantum* de um gato com LVF para *L. longipalpis* das Américas e do Brasil, um dos cinco países responsáveis por cerca dos 90% casos de LV no mundo.¹⁰

Estes resultados reforçam a hipótese de que gatos com LVF poderiam atuar como reservatórios alternativos do parasito em áreas endêmicas. Entretanto, os dados de prevalência de LVF e a comprovada capacidade destes animais em infectarem os flebotomíneos em condições laboratoriais seriam, por si só, capazes de sustentar a hipótese de que gatos são reservatórios de *L. infantum*?

No ciclo zoonótico da LV, os cães são reconhecidamente os reservatórios mais importantes do parasito nos meios

urbanos e periurbanos, porque, em linhas gerais, até onde se sabe, a infecção na população canina é mais frequente do que em outros mamíferos sinantrópicos; a infecção nos cães, em geral, é de evolução crônica independentemente do fato de o animal apresentar ou não sinais clínicos da LVC; nos cães é alto o parasitismo cutâneo, associado ao fato de que esses animais são fonte regular de alimento e capazes de infectar com eficiência os hospedeiros invertebrados naturais do parasito; em meios urbanos, são os animais de convivência mais estreita com seres humanos; e os parasitos isolados de cães com LVC são indistinguíveis daqueles isolados de seres humanos.^{5,7, 15}

No caso dos gatos, ainda é controverso o papel que esses animais exerceriam, se é que de fato exercem, na epidemiologia da LV zoonótica. Autores têm sugerido que gatos poderiam ser incriminados como potenciais reservatórios domésticos de *L. infantum*, porque estes animais são comprovadamente susceptíveis à infecção pelo parasito, e a doença, assim como nos cães, parece ser de curso crônico, com a maioria dos infectados não desenvolvendo sinais clínicos; também são fonte de alimento, e foi demonstrada sua capacidade de infectar os hospedeiros invertebrados naturais do parasito; além disso, são a segunda espécie de animal de estimação mais popular em todo o mundo, e estão presentes em domicílios e áreas peridomiciliares onde a LV é endêmica.^{15,29}





Baseados nestas evidências, autores consideram que os gatos poderiam ser considerados reservatórios alternativos de *L. infantum*, uma vez que são capazes de transmitir o parasito para os vetores, entretanto não poderiam manter o ciclo de transmissão do parasito em determinada região, na ausência do hospedeiro primário ou reservatório, no caso da LV, o cão doméstico.^{15, 29}

Outra hipótese é que os gatos seriam hospedeiros acidentais do parasito e que, em áreas onde ocorre a doença, mesmo infectados, não desempenham papel relevante na manutenção do ciclo zoonótico da LV.^{15, 26}

Assim, para posicionar corretamente os gatos na epidemiologia da LV zoonótica, é fundamental a condução de estudos que avaliem: (a) se a transmissão do parasito entre gato e flebotomíneos ocorre naturalmente e em qual proporção; (b) qual a real prevalência de LVF em áreas endêmicas, e se há transmissão de *L. infantum* do cão para os flebotomíneos e destes para os gatos e vice-versa; (c) se em áreas endêmicas os gatos são capazes de manter e difundir a LV na ausência de cães; (d) se os parasitos que infectam os homens são os mesmos que infectam os gatos.

Outra questão importante a ser estabelecida é que, independentemente do papel exercido pelos gatos na epidemiologia da LV, qual a conduta a ser tomada no sentido de prevenir a infecção destes

animais por *L. infantum* e a transmissão do parasito dos gatos para o hospedeiro vertebrado natural?

Mesmo antes de elucidar a importância dos gatos no contexto da LV, faz-se necessária a discussão sobre o controle da LVF. Uma questão a ser avaliada é o fato de que, dentre as medidas profiláticas recomendadas para a prevenção da infecção, aquela tida como a mais eficaz contra picadas dos flebotomíneos é o uso de soluções tópicas e colares inseticidas que utilizam piretroides em sua composição.⁵ É sabida e notória a contra-indicação do uso dessa classe

de produtos químicos em felinos.³⁴ Até o momento, não há nenhum relato na literatura sobre produtos profiláticos para LVF, como soluções repelentes de flebotomíneos ou vacinas.

Importante ressaltar que é imperativa e urgente a busca de novas estratégias profiláticas para auxiliar no controle da dispersão da doença nos gatos. Essas estratégias devem ser adotadas, do ponto de vista de saúde pública, se comprovada a participação desses animais como reservatórios alternativos do parasito no ciclo de transmissão da LV; do ponto de vista individual, elas serão fundamentais para evitar que os gatos, agora sob a ótica de animais de estimação, muitas vezes tido como membro da família, sejam picados pelos flebotomíneos e infectados com o parasito.

Gatos domésticos podem ser infectados por L. infantum em áreas endêmicas para LV e LVC.





Conclusões

Atualmente, sabe-se que gatos domésticos podem ser infectados por *L. infantum* em áreas endêmicas para LV e LVC, que esta infecção pode se traduzir em doença clínica, a leishmaniose visceral felina, e que estes animais são capazes de transmitir o parasito para o hospedeiro invertebrado natural. Entretanto, em termos epidemiológicos, a literatura não suporta maiores conclusões a respeito da participação destes animais no contexto de transmissão da LV zoonótica. Mais estudos precisam ser conduzidos para determinar o real papel dos gatos na epidemiologia da LV, além daqueles que visam ao aperfeiçoamento das condutas diagnósticas, terapêuticas e profiláticas da LVF.

Referências

1. Rabelo, PFB. Infecção experimental de *Lutzomyia longipalpis* em gatos (*Felis catus domesticus*) naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* e sua transmissão para hamsters (*Mesocricetus auratus*) 98f. [Monografia]. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. 2009. p.98
2. Marthe, M. O censo do bichos. Revista Veja. Editora Abril, ed.2122, ano 42, n.29, p. 84-32, 22 de julho de 2009.
3. Simões-Mattos, L. O gato doméstico (*Felis catus*) como potencial hospedeiro reservatório de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 180f [Tese] - Universidade Estadual do Ceará. Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária. 2005. p.180
4. Alvar J, Yactayo S, Bern C 2006. Leishmaniasis and poverty. Trends Parasitol, 22: 552-557.
5. WHO 2010. Control of the leishmaniasis: re-

port of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. In: WHO Technical Report Series, Organization, W.H., ed. (Genebra, World Health Organization), p. 201.

6. Lainson R, Shaw JJ 2005. Leishmaniasis in the New World. In: L Collier, A Balows, M Sussman (eds), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th ed., Vol 5, Parasitology, Arnold, London, p. 313-349.
7. Moreno J, Alvar J 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol, 18: 399-405.
8. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 48: 151-156.
9. Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS 2005. 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, 129: 219-227.
10. da Silva SM, Rabelo PF, Gontijo Nde F, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, Michalick MS 2010. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. Vet Parasitol, 174: 150-154.
11. Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M 2007. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. Vet Parasitol, 145: 357-360.
12. Vides JP, Schwardt TF, Sobrinho LS, Marinho M, Laurenti MD, Biondo AW, Leutenegger C, Marcondes M. 2011. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol, 178(1-2):22-28.
13. Leiva M, Lloret A, Peña T, Roura X. 2005. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. Vet Ophthalmol, 8(1):71-75.
14. Marcos R, Santos M, Malhão F, Pereira R, Fernandes AC, Montenegro L, Roccabianca P. 2009. Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis. Vet Clin Pathol, 38(2):201-205.





15. Maia C, Campino L. 2011. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol*, 27(8):341-344.
16. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 165(1-2):1-18.
17. Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, Mancianti F. 2002. Feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol*, 106:181-191.
18. Hervás J, Chacón MDLF, Sanchez-Isarria MA, Pellicer S, Carrasco L, Castilho JA, Gomez-Villamandos JC. 1999. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. *J. Fel Med and Surg*, 1:101-105.
19. Sergent ED, Sergent ET, Lombard J, Quillichini M. 1912. La leishmaniose a` alger infection simultane`e d'un enfant d'un chien et d'un Chat dans la me`me habitabion. *Bull Soc Pathol Exot*, 5: 93-98.
20. Craig TM, Barton CL, Mercer SH, Droleskey BE, Jones LP. Dermal leishmaniasis in a Texas cat. *Am Journal Trop Med and Hyg*, 35: 1100-1102.
21. De Souza AI, Barros SEM, Ishikawa E, Ilha IMN, Marin GRB, Nunes VLH. 2005. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brasil. *Vet Parasitol*, 128: 41-45.
22. Bonfante-Garrido R, Urdaneta I, Urdaneta R, Alvarado J. 1991. Natural infection of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. *Trans Royal Soc of Trop Med and Hyg*, 85: 53.
23. Shubach TM.P, Figueiredo FB, Okamoto T, Barbieri I, Pereira AS, Cuzzi-Maya T, Andrade MV, Madeira MF, Leal CA, Silva RMM, Schubach AO. 2003. Leishmaniose tegumentar americana em gato doméstico (*Felis catus*) naturalmente infectado no Rio de Janeiro – Relato de isolamento de *Leishmania* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*, 36:342.
24. Kirkpatrick CE, Farrel JP, Goldschmidt MH. 1984. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. *Exp Parasitol*, 58:125-131..
25. Ozon C, Marty P, Pratlong F, Breton C, Blein M, Lelièvre A, Hass P. 1998. Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in southern France. *Vet Parasitol*, 75: 273-277.
26. Martín-Sánchez J, Acedo C, Munoz-Perez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Marquez F. 2007. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol*, 145: 267-273.
27. Maia C, Nunes M, Campino L. 2008. Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8:555-559.
28. Savani ES, de Oliveira Camargo MC, de Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Auria SR, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. 2004. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*, 120(3):229-233.
29. Quinnell RJ, Courtenay O. 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 36(14): 1915-1934.
30. Maia C, Gomes J, Cristóvão J, Nunes M, Martins A, Rebêlo E, Campino L. 2010. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol*, 174(3-4):336-340.
31. da Silveira Neto L, Sobrinho LS, Martins CO, Machado RZ, Marcondes M, de Lima VM. 2011. Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*. *Vet Parasitol*, 177(3-4):374-377.
32. Sobrinho LS, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AA, de Lima VM, Perri SH, Generoso D, Langoni H, Leutenegger C, Biondo AW, Laurenti MD, Marcondes M. 2012. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol. in press*
33. da Silva AV, de Souza Cândido CD, de Pita Pereira D, Brazil RP, Carreira JC. 2008. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop*. 105(1):92-94.
34. Bessant C, Sparkes A. 2010. Permethrin toxicity in cats. *Vet Rec*, 66(9):281.





Vacinação canina e a vacina de FML

Uma revisão

Stefanne Aparecida Gonçalves*, Ana Cláudia Parreiras de Freitas, Esperança Lourenço
Alberto Mabandane Guimarães

Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

*E-mail: stefannegoncalves@hotmail.com

1. Introdução

O controle da leishmaniose visceral (LV) constitui um desafio para a saúde pública brasileira¹. O cão (*Canis familiaris*) tem sido apontado, por diversas investigações científicas, como o principal reservatório da doença em meio urbano, atuando como um importante mediador na transmissão zoonótica da infecção².

Fatores como a mudança do papel do cão na sociedade contemporânea, antes visto como objeto ou guarda, hoje tratado como membro da família; o crescimento do mercado *pet*; a necessidade premente de se controlar a doença e a pouca aceitabilidade da eutanásia têm estimulado a pesquisa de métodos preventivos, tais



Uma revisão sobre a vacinação canina e a vacina de FML

como vacinas e substâncias repelentes.

Para que uma vacina contra leishmaniose seja eficiente, é necessário que ela induza uma resposta imune celular do tipo Th1 estável e duradoura³. Desse modo, é fundamental que os antígenos e adjuvantes selecionados sejam bons estimuladores da produção *in vivo* de citocinas⁴.

Além disso, para que um imunobiológico tenha o registro aprovado pelos órgãos que regem sua comercialização, é requisitado inicialmente o atendimento a três das quatro fases de testes⁵.

Durante a fase I, são conduzidos estudos laboratoriais de segurança para verificar a ausência de efeitos adversos relevantes em animais saudáveis, bem como a toxicidade local e sistêmica para doses únicas e repetidas⁵.





Na etapa II, além de confirmar a inocuidade, é avaliada a imunogenicidade, determinada a via de administração, a dose e o esquema terapêutico. Identificam-se os métodos para diferenciar cães vacinados de cães naturalmente infectados e demonstra-se o efeito protetor contra infecção e doença. Também é realizada uma estimativa preliminar da eficácia em animais sensíveis da espécie-alvo⁵.

A fase III tem por objetivo avaliar, mediante ensaios controlados, randomizados e mascarados, a eficácia vacinal. O imunógeno precisa demonstrar efeito na redução da incidência de infecção, da doença e de transmissão do parasito para o vetor. É necessário que o desenho amostral considere a prevalência de LV em cães e os resultados obtidos na fase anterior. O desafio deve ser realizado a campo, preferencialmente em municípios endêmicos, com comprovada transmissão canina, sendo requeridos monitoramento das reações adversas e descrição das interações clínicas relevantes, assim como as restrições de uso do produto⁵.

Finalmente, a fase IV compreende estudos realizados em larga escala, após o registro da vacina, com indivíduos vacinados e expostos ao desafio natural, sendo dispensado o emprego de grupo-controle⁶.

Atualmente, são licenciadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) duas vacinas de antígeno purifica-

do ou recombinantes, conhecidas como vacinas de segunda geração^{7,8}.

2. Vacina de FML

O desenvolvimento de vacinas efetivas para o combate à leishmaniose visceral canina (LVC) é um fator de grande importância como medida de prevenção e controle da doença⁹.

Em 2003, foi lançada em Belo Horizonte-MG a primeira vacina comercial brasileira, por meio de um projeto de cooperação entre uma universidade pública e um laboratório particular¹⁰: Leishmune®, do laboratório FortDogde.

O produto é composto pelo antígeno complexo glicoproteico Ligante de Fucose e Manose (FML) de *Leishmania donovani* e do adjuvante saponina. Ao complexo glicoproteico é atribuída a ação de inibir a penetração de promastigotas e amastigotas em macrófagos murinos *in vitro* de forma espécie-específica¹¹.

O FML está presente na superfície do parasita, sendo um bom imunógeno para camundongos e coelhos e um antígeno sensível, específico e preditivo no sorodiagnóstico de LV humana e canina^{12,13}. A saponina é considerada um potente adjuvante por estimular a resposta imune ao antígeno, levando à síntese de citocinas como IFN- γ , IL2, IL-12 e TNF¹⁴.

O potencial protetor do FML em associação com o adjuvante saponina foi testado em ensaios das fases I e II em camundongos Balb/C, Swiss Albino e





hamsters CB, sendo observados aumento no título de anticorpos anti-FML e redução de carga parasitária hepática ou esplênica superiores a 80%. Nos estudos em camundongos, os vacinados mostraram níveis significativamente diferentes de anticorpos anti-FML, proliferação de esplenócitos *in vitro* e parasitas no fígado, em relação ao grupo-controle¹¹.

Os testes da fase III foram realizados em São Gonçalo do Amaranto (RN). Os cães amostrados foram examinados por meio de ELISA-FML e intradermorreação ao lisado de *Leishmania* (IDR), aos dois, sete, 13 e 24 meses após a conclusão do esquema vacinal¹⁵.

Os valores de absorbâncias determinados pelo ensaio de FML-ELISA nos soros e o tamanho das IDRs foram maiores no grupo vacinado com FML que nos controles¹⁵.

Após dois anos, 33% dos animais-controle desenvolveram sinais clínicos de LV ou doença fatal, enquanto 8% dos cães vacinados apresentaram sinais moderados da enfermidade, sem nenhum registro de óbito nesse grupo. Os autores relataram 92% de proteção contra LV no grupo vacinado, correspondendo a 76% de eficácia vacinal¹⁵.

Segundo o fabricante, a vacina de FML é indicada para cães não sororreagentes, acima de quatro meses de idade. É recomendada inicialmente a aplicação de três doses, com intervalo de 21 dias e reforço anual para a manutenção da resposta imune¹⁰.

Em um estudo conduzido nos mu-

nicípios paulistas de Andradina, Bauru e Dracena, 39 cães saudáveis, soronegativos, com protocolo de vacinação FML completo, foram testados sorologicamente para diagnóstico da LVC. Os exames foram realizados com os kits ELISA Biogene, ELISA e RIFI, ambos produzidos por Bio-Manguinhos, sendo obtidos, respectivamente, 100%, 87,2% e 97,4% de soronegatividade. Uma vez que nenhum animal foi soropositivo em mais de um teste, o percentual de cães sororreagentes foi atribuído à ocorrência de resultados falso-positivos⁸.

3. Considerações finais

As vacinas registradas no MAPA, respectivamente em 2003 e 2006, cumpriram os requisitos técnicos de eficácia até então vigentes⁷.

No entanto, o Ministério da Saúde ainda não recomenda a utilização dessas vacinas como medida de prevenção e controle de LV em âmbito de saúde pública⁷ até que se comprovem a alta efetividade associada a baixo custo, a viabilidade operacional, a segurança, a eficácia, a indução de proteção duradoura e também a contribuição para a redução expressiva da incidência de leishmaniose visceral¹⁶.

No caso de vacinas direcionadas ao cão, é necessário ainda que haja adesão dos profissionais de saúde, dos proprietários de cães, das entidades de proteção animal e da população em geral para que possa ser alcançada uma cobertura vacinal satisfatória (>80%)¹⁶.





Assim, dada a importância e complexidade do tema, é fundamental que novos estudos sejam realizados, para que, em um futuro próximo, a vacinação canina, e quiçá humana, possa compor a relação de ferramentas classificadas como eficazes, eficientes e efetivas para o até então difícil controle da leishmaniose visceral.

4. Referências

- 1- MONTEIRO, E.M.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T. *et al.* Leishmaniose visceral: estudo de flebotômicos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.38, p.147-152, 2005.
- 2- DEANE, L. M. Epidemiologia e profilaxia do calazar americano. *Rev. Bras. Malar.*, v.10, p.431-49, 1958.
- 3- GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Veterinary Parasitology*, v.100, p.87-103, 2001.
- 4- AMORIM, I.F.G. *Avaliação do perfil humoral de cães vacinados com leishmune® e de cães naturalmente infectados procedentes de área endêmica de leishmaniose visceral.* 2007. 75f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 5- INSTRUÇÃO NORMATIVA INTERMINISTERIAL MAPA/MS Nº 31, DE 9 DE JULHO DE 2007. Brasília, DF.
- 6- WHO, 1997. Guidelines for the evaluation of *Plasmodium falciparum* vaccines in populations exposed to natural infection TDR/MAL/VAC. 1-54.
- 7- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Ministério da Saúde. Nota de esclarecimento sobre as vacinas antileishmaniose visceral canina registradas no Mapa. Brasília, 03 de maio de 2009.
- 8- BARICHELLO, F.F.G. *Avaliação da resposta imunológica de cães vacinados com a vacina fml (leishmune®) e cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral canina por meio de dois métodos sorológicos: ELISA e RIFI.* 2011. 126p. . Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas.
- 9- COURTENAY, O.; QUINELL, R. J.; GARCEZ, L. M. *et al.* Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology*, v.125, p.407-414, 2002.
- 10- SOUSA, C.P. Desenvolvimento da vacina em subunidade – FML (Fucose Manose Ligand). Manual Técnico-Leishmune. Seção IV. Fort Dodge. 2004.
- 11- SOUSA, C.B. P; SOUZA, E.P.; GOMES E.M. *et al.* Experimental murine *Leishmania donovani* infection immunoprotection by the Fucose Mannose Ligand (FML). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.27, p.547-551, 1994.
- 12- SOUSA, C.B.P.; DUTRA, H.S.; BOROJEVIC, R. *Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the Fucose-Mannose Ligand (FML). *Acta Trop.*, v.53, p.59-72, 1993.
- 13- SOUSA, C.B.A.; GOMES, E.M.; PARAGUAI, E.S. *et al.* *Leishmania donovani*: Titration of antibodies to the Fucose Mannose Ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.89, p.390-393, 1995.
- 14- COX, J.C. & COULTER, A.L. Classification and review of their modes of action. *Vaccine*, v.15, p.248-256, 1997.
- 15- SILVA, V.O.; BORJA-CABRERA, G.P.; PONTES, N.N.C. *et al.* A phase III trial of efficacy of the FML – vaccine against canine kalazar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine*, v.19, p.1082-1092, 2001.
- 16- MAIA, A.N.S.; ALVES, W.A.; OLIVEIRA, G.M. *et al.* Reunião nacional das leishmanioses. Oficina de trabalho: vacina antileishmaniose visceral canina. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*, Brasília, DF ano 3, n.5, outubro de 2003. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_05_ano03.pdf>. Acesso em: 30 março 2012.





Desenvolvimento de vacinas contra a LVC

Formulações com antígeno A2

Ana Paula Fernandes¹, Miriam Conceição Sousa¹, Mariana Silva dos Santos¹, Eduardo Antonio Ferraz Coelho², George Luiz Lins Machado-Coelho³ Ricardo Tostes Gazzinelli^{4,5}

* Conflito de interesses: Os autores participaram do desenvolvimento da vacina junto ao laboratório Hertape Calier.

¹Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

²Colégio Técnico - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

³Universidade Federal de Ouro Preto - Ouro Preto, MG

⁴Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

⁵Fundação Oswaldo Cruz - Belo Horizonte, MG

E-mails: anav@uai.com.br; anapaula.fernandes@pq.cnpq.br

A leishmaniose visceral (LV) é uma infecção fatal se não diagnosticada e tratada rapidamente. A LV zoonótica causada por *Leishmania infantum* é

uma doença emergente em países ao redor do Mediterrâneo, Oriente Médio e América Latina.¹ Canídeos selvagens constituem reservatórios silvestres, e cães domésticos são o principal hospedeiro e reservatório urbano da infecção para vetores flebotômíneos. Por essa razão, a eutanásia de cães soropositivos tem sido adotada como medida de controle em alguns países. Entretanto, programas de controle falham, dentre outras razões, devido à alta incidência de infecção canina e à baixa sensibilidade de testes de diag-



bigstockphoto.com

Desenvolvimento de vacinas contra a LVC

119





nóstico. Nesse contexto, vacinas para a população humana e a canina, além de testes de diagnóstico sensíveis, são fortemente desejados.

Formulações vacinais contendo o antígeno A2

Imunogenicidade e eficácia de proteção em camundongos

O antígeno A2 foi inicialmente identificado em *L. donovani* como abundantemente expresso em amastigotas e está relacionado à visceralização e virulência dos parasitas, já que sua inibição gerou amastigotas não infectantes.² Diferentes antígenos foram avaliados comparativamente contra infecção por *Leishmania* em camundongos, para identificar e caracterizar antígenos para vacina contra LV. Dentre estes antígenos, A2 foi capaz de induzir anticorpos IgG2a e altos níveis de IFN-g, levando à redução do tamanho da lesão e do número de parasitas em animais imunizados quando comparados ao grupo-controle.^{3,4}

Dos antígenos, A2 foi capaz de induzir anticorpos IgG2a e altos níveis de IFN- γ , levando à redução do tamanho da lesão e do número de parasitas em animais imunizados.

Mapeamento de epítomos do antígeno A2

A análise *in silico* revelou que a proteína A2 tem alta afinidade por diferen-

120

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº 65 - maio de 2012

tes haplotipos de MHC de classe I, TAP e também receptores de célula B. Após essa análise, peptídeos sintéticos foram obtidos e avaliados. Por meio de ensaios de ELISA, o epítipo de célula B foi mapeado. Os peptídeos de CD4 foram associados à produção de IFN-g por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados ou vacinados com A2, e os peptídeos de CD8, além de produzirem IFN-g, também apresentaram atividade citotóxica *in vivo*.⁵ Esses achados representam um avanço significativo no desenvolvimento de vacinas contra infecção por *Leishmania*, dada a relevância das respostas imunes no controle da infecção por *Leishmania sp.*

Vacina contra LV canina baseada no antígeno A2

Em 2004, foi realizada a transferência de tecnologia em acordo entre a UFMG e o Laboratório Hertape, permitindo a produção da proteína recombinante A2 em condições GMP (Good Manufacture Practice).

Os estudos de fase II, feitos em colaboração com o laboratório Hertape Calier, foram conduzidos para avaliar a resposta imune celular e humoral em cães Beagle imunizados com a vacina Leish-Tec®. Animais vacinados apresentaram altos níveis de anticorpos IgG e IgG2,





em resposta ao antígeno da vacina. Esses animais também produziram altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10 em resposta à vacinação, um padrão que está relacionado a respostas protetoras. Após o desafio com cepas altamente infectivas de *L. chagasi*, a maioria dos animais-controle (5 entre 7) apresentou, com menos de três meses, graves sinais da LV, como diarreia sanguinolenta e intensa perda de peso. Em contraste, cinco entre sete animais vacinados permaneceram assintomáticos ao longo dos testes. Animais vacinados sintomáticos apresentaram sinais leves, que apareceram somente um ano depois da infecção. Além disso, após a vacinação, os cães permaneceram negativos em testes sorológicos (ELISA e IFI) que usaram antígenos de promastigotas, indicando que a vacinação com A2 permite a distinção sorológica entre cães imunizados e cães infectados.⁶

Após o desafio a maioria dos animais-controle apresentou graves sinais da LV.

Estudos clínicos de fase III duplo-cega e aleatória em área hiperendêmica para LV

Antes dos estudos de fase III, um teste piloto foi conduzido, em colaboração com o laboratório Hertape Calier, para avaliar a reatividade e a imunogenicidade da Leish-Tec[®] em uma população

heterogênea de cães. Para isto, cento e quarenta cães de diferentes raças, negativos para LV, foram selecionados. Metade deles recebeu a vacina Leish-Tec[®], e a outra metade um controle mimetizando o procedimento e os demais componentes da vacina, exceto o antígeno A2.

A avaliação sorológica para a seleção dos animais consistiu na coleta de amostras de soro em três meses consecutivos, as quais foram encaminhadas a dois laboratórios distintos para possível diagnóstico de leishmaniose. Para tanto, ambos os laboratórios empregaram as técnicas de imunofluorescência com antígenos totais de formas promastigotas do parasito e ELISA. O kit Bio-Manguinhos foi utilizado para imunofluorescência em ambos os laboratórios; com relação à ELISA, um dos laboratórios utilizou um kit contendo o antígeno recombinante S7 (Biogene Indústria e Comércio Ltda.), e o outro utilizou um kit contendo extrato solúvel de formas promastigotas do parasito (Bio-Manguinhos). Ao final do processo de seleção, os animais caracterizados como suspeitos, como soropositivos, que apresentaram intercorrências foram excluídos do estudo.

Após o período de seleção, 140 cães foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo, composto por 70 animais, recebeu a vacina Leish-Tec[®] de acordo com o protocolo de imunização preco-





nizado; o segundo grupo, controle do teste, composto pelos demais 70 animais, recebeu solução salina tamponada por via subcutânea, com os mesmos intervalos entre doses propostos para a vacina.

Após a administração das três doses da vacina, os animais foram submetidos periodicamente às avaliações clínica e sorológica para detecção de sinais indicativos de leishmaniose visceral canina, ao longo de dois anos, como descrito anteriormente. As amostras de soro obtidas em diferentes momentos foram também submetidas a reações de ELISA para determinação da resposta humoral ao antígeno vacinal (rA2) por meio da determinação de anticorpos anti-A2 do isotipo IgG e para as subclasses IgG1 e IgG2.

Foi observado que os cães vacinados permaneceram completamente negativos nos testes sorológicos rotineiros empregados para detecção sorológica da infecção, confirmando resultados anteriores obtidos durante a condução do estudo de fase II da Leish-Tec[®]. Assim, mesmo em uma população heterogênea, os cães vacinados com a Leish-Tec[®] não se tornaram reativos nos testes convencionais empregando antígenos de formas promastigotas ou o antígeno recombinante S7,

122

utilizados comumente para diagnóstico da leishmaniose. Isso implica que os cães vacinados com Leish-Tec[®] podem ser distinguidos de cães soropositivos e infectados com *Leishmania*.

É interessante ressaltar que esse resultado persistiu ao longo de todo o período de observação (23 meses), independentemente de esses animais estarem expostos a condições em que poderia ocorrer transmissão da infecção, como evidenciado pela taxa de cães diagnosticados como positivos

para LVC durante a seleção de animais para este teste, o que demonstra a taxa de incidência dessa parasitose nos canis incluídos neste trabalho.

Ao final do período de acompanhamento, houve soroconversão em apenas três animais, sendo um do grupo va-

cinado e os dois outros do grupo-controle. Apenas um animal do grupo-controle apresentou sinais clínicos da infecção. Esses dados indicam que, embora os cães estivessem em ambientes em que poderia ocorrer a transmissão, essa possibilidade foi sensivelmente minimizada pelas condições em que o teste foi conduzido, que consistiram, primeiramente, na seleção rigorosa dos cães incluídos no teste, minimizando a possibilidade de que cães previamente infectados representassem um viés nos

Cães vacinados permaneceram completamente negativos nos testes sorológicos rotineiros empregados para detecção sorológica da infecção.





resultados. Além disso, foram selecionados proprietários de canis que se mostram conscientes de bons tratamentos com os animais e que adotam continuamente medidas

sanitárias padrão. Importante salientar que em nenhum dos animais, ao longo do experimento, foram administrados quaisquer tipos de repelente, nem sob formas líquidas nem sob a forma de coleira.

Os cães vacinados com a Leish-Tec[®] foram capazes de responder ao antígeno rA2, como demonstrado pelos elevados níveis de anticorpos IgG total e IgG2 anti-rA2, logo após a terceira dose da vacina, enquanto os animais do grupo-controle permaneceram com baixos níveis de anticorpos anti-A2, em todos os momentos avaliados. Anticorpos da subclasse IgG2 são associados à resposta imune celular do tipo 1, que se caracteriza por elevada produção da citocina IFN- α , fundamental para a ativação de macrófagos e a eliminação dos parasitos.

Observou-se que, de modo geral, aos seis e aos 11 meses após a vacinação, houve uma queda nos níveis de anticorpos anti-A2, como seria esperado, por se tratar de um antígeno proteico. Apesar da queda nos níveis

Seis e aos 11 meses após a vacinação, houve uma queda nos níveis de anticorpos anti-A2.

de anticorpos nas avaliações conduzidas aos seis e aos onze meses, ocorre uma manutenção da porcentagem de cães positivos para resposta imune à vacina, ou seja,

com níveis de anticorpos anti-rA2 do isotipo IgG total e da subclasse IgG2 acima do ponto de corte do teste. No entanto, posteriormente à dose de reforço administrada aos 12 meses após a vacinação, os níveis de anticorpos se elevaram novamente. Esses dados indicam que a dose de reforço administrada aos 12 meses é necessária para a manutenção dos níveis elevados de resposta humoral.

Ensaio de *Western blotting* foram conduzidos a fim de avaliar a especificidade da resposta anti-A2 em amostras de soro obtidas de alguns animais pertencentes aos grupos controle e vacinado. Soros de cães vacinados apresentaram reatividade com a recombinante proteína A2 equivalente àquela revelada pelo anticorpo monoclonal anti-A2, enquanto nos soros dos animais do grupo-controle, essa reatividade nas bandas não foi observada. Assim, torna-se evidente que os resultados obtidos nos ensaios de ELISA devem-se realmente a anticorpos específicos anti-A2, e não à reativi-

A dose de reforço administrada aos 12 meses é necessária para a manutenção dos níveis elevados de anticorpos.





dade inespecífica.

Em seguida, um estudo duplo-cego de fase III foi realizado para testar a eficácia da Leish-Tec® em área endêmica para LVC, localizada na cidade de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil. Nesse estudo, foram incluídos 1650 cães assintomáticos com o exame parasitológico e a sorologia negativos. Os cães selecionados foram distribuídos em dois grupos que receberam as doses de Leish-Tec® e o controle. Avaliação clínica e análises parasitológica, sorológica e laboratorial, além de testes para caracterizar as respostas imunes, foram realizadas durante dois anos para avaliar a resposta à vacinação e o desenvolvimento da infecção. O estudo foi concluído em 2011, e um relatório dos resultados foi enviado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para avaliação.

Testes pré-clínicos em primatas não humanos (*Macaca mulata*)

Um estudo pré-clínico em macacos (*Macaca mulata*) foi conduzido com o objetivo de testar a segurança, a imunogenicidade e a capacidade de induzir a proteção de vacinas contendo A2, administradas por meio de protocolos homólogos e heterólogos, em grupos de cinco macacos, com ade-

Os macacos vacinados mostraram uma capacidade significativa de controlar a replicação do parasita.

novírus ou plasmídeo expressando A2 ou A2 recombinante.

Os macacos foram desafiados com 2×10^7 promastigotas de *L. (L.) infantum*. Animais que

receberam rA2 responderam à vacinação com níveis aumentados de anticorpos IgG anti-A2. Em comparação ao grupo-controle, que manteve alto número de parasitas e granuloma no fígado durante o período de avaliação, os macacos vacinados mostraram uma capacidade significativa de controlar a replicação do parasita. Em alguns grupos, a eliminação completa do parasita e da resolução do granuloma foi observada em biópsia hepática. Análise pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real de biópsias do fígado confirmou uma redução expressiva do parasitismo tecidual, especialmente em animais vacinados com o protocolo heterólogo rA2-AdA2. Esses resultados são promissores na perspectiva do desenvolvimento de vacinas contra LV humana, já que macacos Rhesus constituem um dos modelos de infecção mais próximos à LV humana.

Em conjunto, os dados científicos acumulados, ao longo dos estudos conduzidos com a vacina Leish-Tec® e

outras formulações vacinais contendo o antígeno A2, confirmam a sua imunogenicidade, segurança e capacidade

Cães vacinados com a Leish-Tec® não apresentaram soroconversão





de induzir proteção em camundongos, cães e primatas. Outro aspecto relevante refere-se ao fato de cães vacinados com a Leish-Tec® não apresentarem soroconversão, quando testes sorológicos de rotina são empregados para detecção da infecção. Como perspectivas, formulações vacinais contendo A2, visando à condução de estudos clínicos em humanos, estão sendo desenvolvidas e testadas.

Referências

1. DESJEUX P. Leishmaniasis. Nat Rev Microbiol. 2004 Sep;2(9):692.
2. ZHANG, W.W., MATLASHEWSKI, G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, n.94,p. 8807-8811, 1997.
3. COELHO, E.A.F.; TAVARES, C.A.P.; CARVALHO, F.A.A.; CHAVES, K.F.; TEIXEIRA, K.N.; RODRIGUES, R.C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Immune response induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. Infect. Immun., 71: 3988-94, 2003.
4. ZANIN, F. H. C., COELHO, E. A. F., MARQUES-DA-SILVA, E., REZENDE, S. A., COSTA, M. M. S., TAVARES, C. A. P., GAZZINELLI, R. T., FERNANDES, A. P. Evaluation of Immune Responses and Protection Induced by A2 and Nucleoside Hydrolase (NH) DNA vaccines Against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* Experimental Infections. Microbes and Infection. , v.9, p.1070 - 1077, 2007.
5. RESENDE, D. M., CAETANO, B, DUTRA, M., BRUNA-ROMERO, O, FERNANDES, A. P., GAZZINELLI, R. T. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania amastigote* specific A2 antigen: Correlation with IFN-g and cytolytic activity by CD8+ T cells. Vaccine, v.26, p.4585 - 4593, 2008.
6. FERNANDES, A.P; COSTA, M.M.S; COELHO, E.A.F; FREITAS, E; ABRANTES, C.F; HERMONTS, V; TAFURI, W.L; MELO, M.N; MICHALICK, M.S.M; GAZZINELLI, R.T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. Vaccine, v.26, p.5888-5895, 2008.





Educação em saúde e guarda responsável

Luiz Felipe Nunes Menezes Borges

Ferramenta no controle da LVC

Danielle Ferreira de Magalhães Soares¹, Ana Liz Ferreira Bastos², Ana Cláudia Parreiras de Freitas², Stefanne Aparecida Gonçalves, Esperança Lourenço Alberto Mabandane Guimarães

¹ Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

² Médica Veterinária Autônoma

^{*} Autor para correspondência: E-mail: daniellef@ufmg.br

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose que gera graves problemas para a saúde pública devido ao seu difícil controle e à sua ampla distribuição no Brasil, já sendo encontrada nas cinco regiões do país.^{1,2} O Ministério da Saúde (MS) propõe, por meio de manuais **126**

e programas, a adoção de medidas de prevenção e controle que visam reduzir a morbidade e a letalidade, assim como os riscos de transmissão da doença.³ Dentre as ações de controle da LV preconizadas pelo MS, está a educação em saúde, que deve ser implantada em con-

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº 65 - maio de 2012



junto com o diagnóstico precoce e o tratamento dos casos humanos, o controle vetorial e a eliminação do reservatório canino.⁴

Outra importante ação que deve ser adotada como prevenção e controle de doenças é o manejo e a guarda responsável de cães e gatos, orientados e amparados por disposições legais, como formação dos oficiais de controle animal, programas permanentes de controle de reprodução e educação para propriedade, posse ou guarda de animais.

Cuidados com o meio ambiente e com o bem-estar animal podem colaborar para a diminuição do risco da incidência de doenças, como a leishmaniose, bem como de agravos tanto à saúde humana quanto animal. O desenvolvimento de um programa educativo de longo prazo contribui para restringir comportamentos que acarretam intensa renovação de animais domésticos. Esse é um caminho para a mudança de hábitos e posturas, a qual pode impactar o processo de redução do abandono e do número de cães suscetíveis a doenças infectocontagiosas, assim como a ocorrência de zoonoses na população humana.⁵

A literatura relata o insucesso de intervenções centradas apenas em um ou mais elos da cadeia epidemiológica da LV, como eliminação canina e borrifação de inseticida, ratificando, dessa forma, a interdependência e comple-

mentaridade das atividades propostas, as quais não devem ser implantadas separadamente.^{6;7}

A educação em saúde consiste em um emaranhado de saberes e práticas voltados para a prevenção de enfermidades e a promoção da saúde.⁸ É por meio dela que o conhecimento científico re-

A literatura relata o insucesso de intervenções centradas apenas em um elo da cadeia epidemiológica.

lativo ao processo saúde-doença e seus determinantes é introduzido na realidade local pelos profissionais de saúde, dentre eles os médicos veterinários.⁹ Tal iniciativa produz mudanças nos hábitos e

nos comportamentos da população assistida, no que tange às condutas de saúde.¹⁰ Esse conceito frequentemente se entrelaça ao de promoção da saúde, que é a participação de toda a população na vida cotidiana em busca de bem-estar e não apenas dos indivíduos sob o risco de adoecer.¹¹

A educação em saúde aplicada ao controle da LV vem sendo trabalhada por alguns autores, os quais avaliaram a aquisição de conhecimento, a qualidade da informação disponível para a população e as melhorias conseguidas após intervenções no campo da saúde.^{12,13}

Nesse cenário, a guarda responsável, caracterizada pela tutela adequada e digna dos animais, apresenta papel de destaque. Ela tem como objetivo diminuir o abandono e a eutanásia deles, bem como os danos à saúde, mediante atividades baseadas no bem-estar animal,





na promoção da saúde, na melhoria da qualidade de vida e da relação homem-animal.¹⁴ Resultados promissores vêm sendo alcançados, já que em qualquer programa de controle, para que se logre êxito, é primordial que ações educativas e comunitárias sejam implantadas.¹⁵

Aquisição de conhecimento

Em um estudo conduzido em três cidades maranhenses, de agosto de 1996 a janeiro de 1997, verificou-se que a população possuía conhecimento básico dos aspectos epidemiológicos da LV e pouca informação sobre suas formas de prevenção. Os autores salientaram a necessidade de divulgação da enfermidade, de qualificação profissional e de campanhas educativas com o intuito de mobilizar a coletividade e reduzir-lhe a exposição à doença.¹⁶

A falta de acesso à educação parece influenciar a ocorrência de casos humanos de leishmaniose. Indivíduos com baixa ou nenhuma escolaridade, no município de Belo Horizonte, em 2006, apresentaram uma chance oito vezes maior de serem acometidos por LV, quando comparados àqueles que haviam concluído o processo de alfabetização. Conhecer a doença foi considerado um fator de proteção, evidenciando a necessidade de associar educação em saúde às medidas de controle da LV, de modo a

128

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº 65 - maio de 2012

incentivar a participação popular ativa e permanente.¹⁷

O conhecimento relacionado à LV foi avaliado no município paulista de Birigui, por meio de entrevistas com escolares de nível fundamental, antes e após aulas expositivas e jogos sobre LV, no ano de 2008. Na segunda entrevista, o índice de acertos foi maior, indicando que as atividades educativas agregaram conhecimento aos escolares. Isso ratifica a importância do desenvolvimento contínuo de programas educativos permanentes nas escolas como forma de favorecer mudanças de ordem prática no controle da endemia.¹⁸

A escola e os professores são importantes propagadores de conteúdos de interesse sanitário. Uma pesquisa realizada junto a docentes da Regional Noroeste de Belo Horizonte, em 2009, concluiu que havia pouca familiaridade com a prática escolar do tema zoonoses e que a maioria das informações estava vinculada a vivências pessoais. Parte considerável das docentes afirmou confiar em seus alunos como importan-

tes multiplicadores da informação sobre a LV e outras zoonoses, tomando como exemplo, para apoiar essa credibilidade, os trabalhos escolares já consolidados sobre dengue. Elas também indicaram os médicos veterinários do serviço pri-

A população possuía pouca informação sobre suas formas de prevenção.

Conhecer a doença foi considerado um fator de proteção





vado como importante fonte de informação sobre a doença. A autora sugeriu a elaboração de projetos concisos para a abordagem do assunto nos anos iniciais do ensino fundamental, com o objetivo de fortalecer as ações de prevenção e controle da LV e de outras doenças.¹⁹

A atuação dos Agentes de Combate de Endemias (ACEs) como difusores de informação sobre LV também vem sendo alvo de investigações científicas. Questionários aplicados a proprietários de cães soronegativos para a doença em Belo Horizonte, nos anos de 2009 e 2010, revelaram que os entrevistados apresentaram pouca informação sobre as medidas específicas de prevenção e controle da LV e posse responsável de animais. Além disso, um grande número de imóveis visitados apresentou características de risco ambiental para a manutenção do vetor e transmissão da doença, o que poderia sugerir que a informação repassada pelos ACEs não foi suficiente para promover mudanças de comportamento dos moradores em relação ao ambiente domiciliar. Concluíram que os ACEs, apesar de boa qualidade técnica durante a contenção e coleta de sangue dos cães, necessitam melhorar o repasse da informação ao morador, de forma que a educação e a participação dos mesmos os tornem parceiros do serviço de saúde no combate à doença.¹³

A qualidade da informação veiculada sobre o tema LV requer padronização e monitoramento.

Em Montes Claros, no período de setembro de 2008 a março de 2009, foi verificado que a população não conhecia suficientemente sobre a leishmaniose, mesmo sendo elevada a incidência da doença no município. A escassez de informações, principalmente entre proprietários de cães com sorologia reagente ou indeterminada, aponta a necessidade de ações educativas na localidade, com foco nas atitudes de proteção individual e coletiva.²⁰

Avaliação do material informativo disponível

A qualidade da informação veiculada sobre o tema LV requer padronização e monitoramento. A análise de 18 materiais brasileiros distintos sobre a doença revelou a ocorrência de limitações que comprometiam o conteúdo trabalhado. Tal constatação pode ser classificada como preocupante, dado o valor desse recurso pedagógico na construção de conhecimento transformador.²¹

Profissionais de saúde e leigos da Região Metropolitana de BH foram arguídos antes e depois de lerem um folheto informativo sobre LV, criado para facilitar a compreensão dos leitores por meio de ilustrações e boa didática. O percentual de respostas certas após a leitura do material foi significativamente maior, sinalizando a adequação do método quanto à transmissão da infor-



mação.²²

A mídia, seja qual for sua natureza, pode contribuir para o esclarecimento ou o confundi-mento do público. Por essa razão, foram submetidos à análise os conteúdos de 24

páginas brasileiras (governamentais, comerciais e outras) da internet, os quais se propunham a informar sobre LV, no período de março a outubro de 2005. De modo geral, as informações veiculadas eram pouco relevantes, o que destaca o mérito da criação de mecanismos de disseminação de informação correta sobre a LV pela internet, para que tal ferramenta seja aproveitada na prevenção e no controle da doença no país.³³

Medidas de intervenção

No município de Caeté, Minas Gerais, foi avaliado um modelo de repasse da informação sobre LV, bem como a mudança de risco ambiental da doença nos domicílios, nos anos de 2005 e 2006. Foram realizadas atividades de aquisição de conhecimento com alunos de

Luiz Felipe Nunes Menezes Borges



uma escola municipal e, posteriormente, avaliada a atuação deles como multiplicadores do conhecimento, levando-o aos seus familiares. Foi verificado que houve melhora do conhecimento dos indivíduos que receberam a intervenção educativa, o que refletiu na diminuição do número de domicílios com condições de risco para LV.¹²

Guarda responsável

A convivência do ser humano com cães e gatos pode e deve ser uma relação saudável e gratificante. Alguns cuidados devem ser dispensados sistema-

ticamente aos animais de estimação por meio da guarda responsável, para garantir condições de saúde a eles, aos proprietários, familiares e vizinhos, bem como à comunida-

Houve melhora do conhecimento dos indivíduos que receberam a intervenção educativa, o que refletiu na diminuição do número de domicílios com condições de risco para LV.



Luiz Felipe Nunes Menezes Borges



Luiz Felipe Nunes Menezes Borges

de em geral.²³

Guarda responsável é a condição na qual o guardião de um animal de companhia aceita uma série de deveres centrados no atendimento das necessidades físicas, psicológicas e ambientais do animal, assim como na prevenção dos riscos (potencial de agressão, transmissão de doenças ou danos a terceiros) que ele possa causar à comunidade ou ao ambiente, e se compromete a assumi-los.²⁴

A guarda responsável está diretamente relacionada ao papel do médico veterinário na sociedade, fornecendo subsídios para conscientização no que diz respeito às premissas de uma relação saudável homem-animal, independentemente do senso comum, muitas vezes equivocado.²⁵

O enfoque predominante do paradigma atual é o da saúde pública em detrimento do bem-estar animal, porém ambos devem caminhar juntos. São por

vezes aparentemente antagônicos, mas necessariamente complementares. É preciso atuar embasado nas prerrogativas da saúde pública, sem negligenciar o sofrimento animal, multiplicando seres humanos sensíveis à causa.⁵

Com o progressivo controle da raiva canina e de outras zoonoses, esforços foram iniciados para a adoção de novas políticas públicas para controle da população animal. Exemplos disso foram as recomendações do Comitê de Especialistas em Raiva, reunido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1992, as quais contemplaram, além da vacinação contra a raiva, o controle ambiental, o fomento à educação em saúde e o controle populacional, por meio da esterilização.²⁶



O conceito de posse responsável dos animais de estimação e o incentivo às ações para o controle reprodutivo foram introduzidos no Brasil por uma organização não governamental (WSPA, World Society for the Protection of Animal) em parceria com a Organização Mundial da Saúde durante a Conferência "Pet Respect" realizada em junho de 1995, em São Paulo. O primeiro registro de desenvolvimento de ações para o controle reprodutivo de pequenos animais, associado ao registro e à identificação, à educação, à participação social e aos cuidados com a saúde animal no Brasil, ocorreu em Taboão da Serra, São Paulo, em 1996.²⁷ Após mais de 10 anos sem diretriz nacional para o equilíbrio populacional desses animais, foi lançado, em 2007, o primeiro programa estadual para o controle populacional de cães e gatos, em São Paulo.²⁸

Atualmente, além dos municípios paulistas, outras cidades brasileiras realizam ações de controle populacional de cães e gatos, baseadas no fundamento de que um dos principais problemas oriundos da superpopulação decorre de eles estarem expostos a todo tipo de doenças, intempéries e perigos, sendo vítimas de várias zoonoses, doenças carenciais e mutilações.²⁵

Estudos específicos abordando a dinâmica da população canina em conjunto com o controle da leishmaniose visceral (LV) ainda são escassos. Entretanto, já existem relatos da diminuição da prevalência e/ou índice de positividade canina após introdução de ações de controle reprodutivo. Desse modo, o incentivo a iniciativas dessa natureza se faz necessário, principalmente em áreas endêmicas da doença, uma vez que dentro das ações de controle populacional estão previstos programas de adoção e manutenção de cães comunitários, os quais precisam ter diretrizes e critérios específicos nessas regiões.

Em áreas de foco ou risco de transmissão de zoonoses, principalmente LV, a implantação de programas de adoção deve ser rigorosamente avaliada e discutida com a comunidade, com base em conhecimentos científicos, dados epidemiológicos e normas técnicas. Caso seja acordada a adesão ao programa, a população deve ser esclarecida sobre o risco de os animais adotados estarem em período de incubação de doenças infectocontagiosas, bem como sobre a obrigatoriedade de notificar ao órgão responsável qualquer manifestação suspeita, comprometendo-se a seguir as medidas indicadas. Devem-se, ainda, realizar exames clínicos e laboratoriais previamente,

Existem relatos da diminuição do índice de positividade canina após a introdução de ações de controle reprodutivo.





minimizando o risco de adoção de animais com infecção subclínica.⁵

Outra questão relevante que precisa ser elucidada é a eutanásia de cães sororreagentes para LV. Muito se debate sobre a eficiência dessa ação no controle da doença, mas, para que tal prática possa ser extinta, é preciso passar por um período de transição, no qual as ações de controle da população canina sejam implantadas com enfoque na guarda responsável e na prevenção de doenças. É importante que tais procedimentos sejam comparados ao método anterior (eutanásia) e analisados cientificamente, a fim de que soluções satisfatórias possam substituir a eliminação canina em massa, prática discutível e malvista pela sociedade.

Alguns trabalhos já sinalizam possíveis mudanças no modo de combate à doença. Em estudo sobre a reposição canina pelos proprietários de animais eliminados devido à infecção por LV realizado em Araçatuba, São Paulo, foi verificada uma reposição de 44,5% dos cães eutanasiados no período de um ano, sendo a companhia ou guarda os principais motivos da aquisição do novo cão. Cerca de 20% das reposições foram feitas com mais de um animal, contri-

A eutanásia, em vez de diminuir a ocorrência de leishmaniose, pareceu influenciar a estrutura da população canina, o que deve ser levado em consideração nos programas de posse responsável.

buindo para que o impacto da reposição canina fosse ainda maior após um ano. Entre os proprietários que não adquiriram outro animal, o temor da leishmaniose visceral foi a principal razão para a não-reposição (41%). A população canina reposta, na sua maioria por animais jovens, representa graves implicações epidemiológicas, como maior suscetibilidade a diferentes doenças, maior prolificidade e baixa resposta imunológica frente a diversas vacinas.

Os autores concluíram que a eutanásia, em vez de diminuir a ocorrência de leishmaniose, pareceu influenciar a estrutura da população canina, o que deve ser levado em consideração nos programas de posse responsável, além do

controle populacional em áreas endêmicas para a doença.²⁹

Uma experiência bem-sucedida no controle de zoonoses foi o caso da raiva em Jaipur (Índia), onde 24.986 cães comunitários foram capturados de forma humanitária, esterilizados, vacinados contra a doença e devolvidos para seu local de origem, no período de 1994 a 2002. Constatou-se que 65% das fêmeas haviam sido castradas, tendo ocorrido queda de 28% da densidade populacional canina. Não houve registro de caso





de raiva humana, durante o intervalo acompanhado, na área abrangida pelo programa.³⁰

É papel do poder público monitorar a saúde, o bem-estar e o crescimento populacional de cães e gatos. Desse modo, é imprescindível identificar a origem de qualquer antroponose que venha a surgir em uma comunidade, a fim de que interferências possam ser realizadas com antecedência, evitando-se, assim, aumento do número de casos de doenças.¹⁴ O conhecimento dos hábitos da população com relação aos animais de estimação poderia auxiliar também na programação e na execução das ações direcionadas ao controle de zoonoses. É de fundamental importância a realização de medidas de educação em saúde abordando o manejo e a convivência com animais, com o intuito de diminuir a exposição a doenças.³¹

A atuação governamental precisa priorizar os seguintes aspectos: a) ser eficiente: no sentido de modificar condutas e prevenir o abandono futuro de animais; b) ser humanitário e justo: pois os animais são vítimas da falta de responsabilidade das pessoas; c) ser de responsabilidade de todos: autoridades, profissionais de saúde, educadores, especialistas em bem-estar animal, organizações não governamentais e cidadãos em geral.¹⁴

A discussão ética no controle das populações de cães e gatos acontece

num período transacional na saúde pública veterinária, no qual os animais não são percebidos apenas como potenciais zoonóticos, mas sim como integrantes das famílias e comunidades, e com valor intrínseco agregado.³² Nesse contexto, é cada vez mais urgente a difusão e a implementação de práticas que não inflijam sofrimento aos animais e que sejam condizentes com o conceito de bem-estar animal e com as premissas da educação em saúde e guarda responsável.

Referências

1. RESENDE, S.M.; MOREIRA, E.F.; PINTO, I.M. Public and private health network integration as instrument for the organization of serologic diagnosis for american visceral leishmania in Minas Gerais. *BEPA, Bol. epidemiol. paul. (Online)*, São Paulo, v. 6, p.4-12, 2009.
2. PRADO, P.F.; ROCHA, M.F.; SOUSA, J.F. et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.44, p. 561-566, 2011.
3. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Vigilância e Controle das Leishmanioses. Brasília/ DF; 2008. Disponível em : <www.portal.saude.gov.br> Acessado em 12 de março de 2012.
4. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília /DF; 2006.
5. SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Manual: Programa de Controle Populacional de Cães e Gatos. São Paulo:





- SMSP, 2006. 157p.
6. ARAÚJO, VEM.; MORAIS, MHF.; REIS, IA. et al. Early Clinical Manifestations Associated with Death from Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, p.1-9, 2012 .
 7. SARAIVA, L.; LEITE, C.G.; CARVALHO, L.O.A. et al. "Information System and Geographic Information System Tools in the Data Analyses of the Control Program for Visceral Leishmaniasis from 2006 to 2010 in the Sanitary District of Venda Nova, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil," *Journal of Tropical Medicine*, v.2012, p.3-9, 2012.
 8. COSTA, M.; LÓPEZ, E. *Educación para la salud*. Madrid: Pirámide, 1996. p.25-58.
 9. BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº. 218 de 06 de março de 1997. Conselho Nacional de Saúde. Brasília: 1997.
 10. ALVES, V. S. A health education model for the Family Health Program: towards comprehensive health care and model reorientation, *Interface - Comunic., Saúde, Educ.*, v.9, p.39-52, 2005.
 11. MACHADO, M.F.A.S; MONTEIRO, E.M.L.M; QUEIROZ, D.T. et al. Integralidade, formação de saúde, educação em saúde e as propostas do SUS - uma revisão conceitual. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.12, p.335-342, 2007.
 12. -MAGALHÃES, D. F.; SILVA, J.A.; HADDAD, J.P.A. et al. Dissemination of information on visceral leishmaniasis from schoolchildren to their families: a sustainable model for controlling the disease. *Cad. Saúde pública*, v.25, p.642-646, 2009.
 13. -FREITAS, A.C.P; MAGALHÃES, D.F.; BARBOSA, L.S.B. et al. Avaliação do trabalho educativo diário dos Agentes de Controle de Zoonoses sobre leishmaniose visceral e posse responsável de animais em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2009-2010. *Rev.Vet. e Zoot.em Minas*, v.107, p.10-13, 2010.
 14. SANTANA, L. R.; OLIVEIRA, T. P. Guarda responsável e dignidade dos animais. 2008. Salvador, Relatório Ministério Público. 41 p.
 15. LACERDA, M.M. The Brazilian Leishmaniasis Control Program. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.89, p.489-495, 1994.
 16. GAMA, M.E.A.; BARBOSA, J.S.; PIRES, B. et al. Avaliação do nível de conhecimento que populações residentes em áreas endêmicas têm sobre leishmaniose visceral, estado do Maranhão, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v.14, p.381-390, 1998.
 17. - BORGES, B.K.A.; SILVA, J.A.; HADDAD, J.P.A. et al. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v.24, p.777-784, 2008.
 18. GENARI, I.C.C. *Conhecimento de escolares sobre leishmaniose visceral*. 2009. 41f. Dissertação (Mestrado) –Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária.
 19. RIBEIRO, L.M.L. *Análise do conhecimento, sobre Leishmaniose Visceral e outras zoonoses, de docentes dos três primeiros anos do ensino fundamental em escolas da região noroeste de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2008*. 2010. 113 f. Dissertação de Mestrado (Ciência Animal). 2010.
 20. BORGES, B.K.A. *Fatores de risco associados ao perfil sorológico da Leishmaniose visceral em cães, Montes Claros/MG*. 2011. Tese (Doutorado) -Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
 21. LUZ, Z.M.P; PIMENTA, D.N.; RABELLO, A. et al. Evaluation of informative materials on leishmaniasis distributed in Brazil: criteria and basis for the production and improvement of





- health education materials. *Cad. Saúde Pública*, v.19, p.561-569, 2003.
22. LUZ, Z.M.P., SCHALL, S., RABELLO, A. Evaluation of a pamphlet on visceral leishmaniasis as a tool for providing disease information to healthcare professionals and laypersons. *Cadernos de Saúde Pública*, v.21, p.608-621, 2005.
 23. REICHMANN, L.A.B.; FIGUEIREDO, A.C.C.; PINTO, H.B.F. et al. Controle de populações de animais de estimação. Manual Técnico do Instituto Pasteur, n.6, São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. 44 p.
 24. WORLD SOCIETY FOR THE PROTECTION OF ANIMAL (WSPA); PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Recomendaciones In: reunión latino americana de expertos em tenencia responsable de mascotas y control de poblaciones, 1., Anais... Rio de Janeiro. 2003, 13 p.
 25. SILVANO, D. ; BENDAS, A.J.R. ; MIRANDA, M.G.N. et al. Divulgação dos princípios da guarda responsável: uma vertente possível no trabalho de pesquisa a campo. *Revista Eletrônica Novo Enfoque*, v.9, p.64-86, 2010.
 26. WORLD HEALTH ORGANIZATION, Expert Committee on Rabies. WHO technical report series n.824, 65p, 1992.
 27. GARCIA, R. C. M. Programa de controle populacional de cães e gatos em Taboão da Serra. Palestra proferida no I Congresso Brasileiro de Bem-estar Animal, ARCA Brasil, Associação Humanitária de Proteção e Bem-estar animal, São Paulo, 1997.
 28. GARCIA, R. C.M. *Estudo da dinâmica populacional canina e felina e avaliação de ações para o equilíbrio dessas populações em área da cidade de São Paulo, SP, Brasil*. 2009. 265f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
 29. ANDRADE, A. M.; QUEIROZ, L. H., NUNES, G. R. et al. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.40, p.594-595, 2007.
 30. REECE, J.F.; CHAWLA, S.K. Control of rabies in Jaipur, India, by the sterilisation and vaccination of neighbourhood dogs. *The Veterinary Record*, v.159, p.379-383, 2006.
 31. DOMINGOS, I. H.; RIGO, L. HONER, M. R. Perfil das populações canina e felina no município de Campo Grande, MS. *Ensaio e Ciência*, v.11, p.97-103, 2007.
 32. GARCIA, R. C. M.; MALDONADO, N. A. C.; LOMBARDI, A. Aspectos éticos para o controle populacional de cães e gatos. *Revista Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 11, p. 106-11, 2008.
 33. SOUZA, C.L.N.; LUZ, Z.M. P.; RABELLO, A. Análise da informação sobre a leishmaniose visceral disponível em portais brasileiros da rede mundial de computadores – Internet. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.41, p.352-357, 2008.

