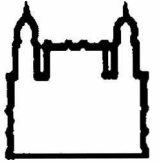




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO PRELIMINAR SOBRE O PAPEL DO
SUÍNO DOMÉSTICO (*Sus scrofa domesticus*) como possível
reservatório para Leishmania**

EVANDRO MORAES SILVA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

Estudo preliminar sobre o papel do suíno doméstico (*Sus scrofa domesticus*) como possível reservatório para *Leishmania*

Evandro Moraes Silva

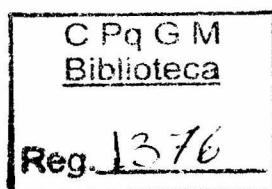
Orientadores: Prof. Dr. Carlos Roberto Franke

Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre em
Patologia Experimental.

Salvador – Bahia – Brasil

2003



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ – Salvador – BA

Silva, Evandro Moraes.

S586i Estudo preliminar sobre o papel do suíno doméstico
(*Sus scrofa domesticus*) como possível reservatório para
Leishmania.

I / Evandro Moraes Silva. - Salvador: Universidade Federal da
Bahia / CPqGM / FIOCRUZ, 2003.
95. : ils.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) -
Universidade Federal da Bahia, 2003.

1 Leishmaniose visceral. 2 Suínos. 3. Epidemiologia.
4. Bahia. I. Título.

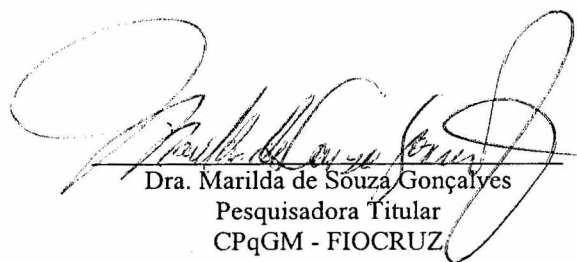
CDU 593.1: 614.4 (813.8)

ESTUDO PRELIMINAR SOBRE O PAPEL DO SUÍNO DOMÉSTICO (*Sus scrofa domesticus*)
COMO POSSÍVEL RESERVATÓRIO PARA *Leishmania*.

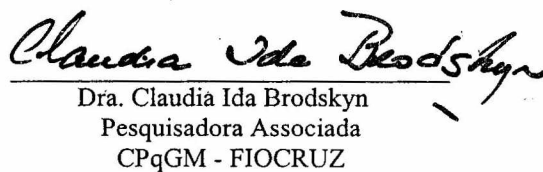
EVANDRO MORAES SILVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

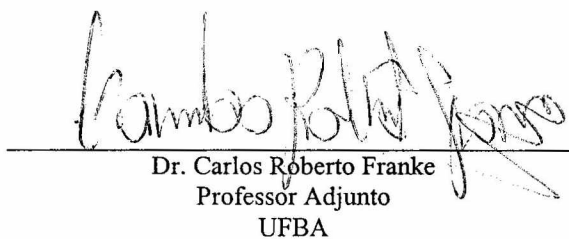
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisadora Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dra. Claudia Ida Brodskyn
Pesquisadora Associada
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Carlos Roberto Franke
Professor Adjunto
UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO:

Este trabalho foi realizado no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador - Bahia, sob a coordenação do Dr. Ítalo Sherlock, e faz parte do projeto: "Estudos da Ecologia dos Endemismos Parasitários das Leishmanioses no Estado da Bahia", financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (CNPq 521130/98 (NV)) e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

"Aos meus pais, Esmeraldo e Yolanda, com muito carinho e amor".

AGRADECIMENTOS.

- Aos **meus pais Esmeraldo e Yolanda**, pelo esforço e dedicação em manter-me durante esta jornada, fazendo-me consciente de que na vida, tudo depende da nossa própria vontade, mesmo tendo que passar por algumas dificuldades.

- A **Elisabete Santana dos Santos**, minha fiel companheira em todos os momentos desta jornada.

- Ao **Dr. Ítalo Sherlock**, pela sua dedicação, apoio, incentivo e orientação, que foi e está sendo muito importante para minha formação acadêmica e científica.

- Ao **Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho**, pela colaboração, apoio e orientação na realização e conclusão deste trabalho.

- Ao **Professor Dr. Ramiro Batista Neto** (In memória), que me deu a oportunidade de iniciar minha jornada dentro da pesquisa.

- Ao **Professor Dr. Carlos Roberto Franke** que, além de orientador, vêm sendo um grande incentivador da minha iniciação científica, dando-me o apoio necessário para poder desempenhar minhas atividades e alcançar os objetivos almejados.

- Aos amigos do Laboratório de Parasitologia e Entomologia (LAPEN): **Antônio Carloş dos Santos, Artur Gomes Dias Lima, Fabiana Rodrigues Antunes, Fred Julião, Nilva Mota, Uelinton Batista de Oliveira**, pelo companheirismo e agradável convívio durante todo o período em que estive no laboratório, sendo estes de fundamental importância para a realização do projeto.

- Ao **Médico Veterinário Márcio Silva Rodrigues**, incansável companheiro na realização do projeto desde o seu início.

- Ao **Biólogo Marco Antonio Silvany**, pela amizade e todo apoio dado para a finalização deste trabalho.

- Ao **Professor Dr. Roberto Badaró e Dra. Maria Nakatani**, pela grande colaboração na realização deste projeto.

- Ao **Professor Dr. Elúzio Cerqueira** que também vem me orientando na realização das minhas atividades.

- Ao **Professor Dr. Moacir Paranhos Silva**, pela ajuda inicial na realização das punções de órgãos dos animais e culturas de *Leishmania*.

- Ao **Professor Dr. Mytermaier Galvão dos Reis**, por toda ajuda e incentivo na realização de atividades no Laboratório de Patologia e Biologia molecular, o qual coordena.

- A Sra. **Eliana Reis**, por toda ajuda e orientação nos ensaios de biologia molecular.

- Ao **Professor Dr. Hélio Vilela Barbosa Jr.**, pelo apoio incentivo e a ajuda nas análises estatísticas.

- Aos **Amigos dos Laboratórios de Imunologia Molecular (LIMC) e de Patologia e Biologia Molecular (LPBM)**, pelo fundamental apoio na realização das minhas atividades.

- A Sra. **Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio** coordenadora da biblioteca do CPqGM, pela valorosa contribuição na normatização da dissertação e das referências bibliográficas e as bibliotecárias do CPqGM pelo auxílio na busca de referências bibliográficas.

- A Sra. **Rosália Meire de Oliveira da Silva** por sua inestimável ajuda e competência em todos os momentos do curso de Mestrado.

- Aos meus amigos e colegas que trilharam comigo esta dura jornada, cujos nomes, para não incorrer em omissões, não me arrisco listar.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
SUMMARY	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS GERAIS	1
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL	3
1.3 RESERVATÓRIOS JÁ CONHECIDOS DE <i>Leishmania chagasi</i> .	5
1.3.1 O homem.....	5
1.3.2 O cão (<i>Canis familiaris</i>)	6
1.3.3 O gato.....	10
1.3.4 Raposas.....	11
1.3.5 Marsupiais.....	14
1.3.6 Roedores.....	15
2. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Geral.....	16
3.2 Objetivos Específicos.....	16
3. JUSTIFICATIVAS	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 ÁREA DE ESTUDO	22
4.2 COLETA DE AMOSTRAS	25
4.2.1 Obtenção de soro.....	25
4.2.2 Biópsia e preparo de esfregaço de pele.....	29
4.2.3 Punção e esfregaço do fígado.....	29
4.2.4 Biópsia esplênica.....	30
4.2.5 Punção de medula.....	30
4.3 ELISA	31

4.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE DODECIL SUFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) E “WESTERN BLOT”.....	33
4.5 PESQUISA DE FORMAS AMASTIGOTAS EM ESFREGAÇOS DE TECIDOS EM LÂMINA.....	35
4.6 CULTIVO PARA TENTATIVA DO ISOLAMENTO DE <i>Leishmania sp.</i>	36
4.7 XENODIAGNÓSTICO COM <i>Lutzomyia longipalpis</i>	36
4.8 XENODIAGNÓSTICO COM <i>Triatoma Infestans</i>	37
4.9 INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DE <i>L. chagasi</i> EM <i>Sus scrofa domesticus</i>	39
4.10 NECROPSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE MATERIAL PARA PCR.....	40
4.11 REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA.....	41
4.11.1 Extração de DNA.....	41
4.11.2 Amplificação do DNA por PCR.....	42
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5. RESULTADOS.....	44
5.1 ANTICORPOS CONTRA LISADO TOTAL DE <i>Leishmania</i> E CONTRA O ANTÍGENO RECOMBINANTE rK39.....	45
5.2 ESTIMATIVA DA PREVALENCIA DE SUINOS COM ANTICORPOS ANTI- <i>Leishmania</i>	48
5.3 RECONHECIMENTO DE POLIPEPTÍDEOS DE <i>L. chagasi</i> POR SORO DE SUÍNOS DE ÁREA ENDÊMICA PARA LV.....	49
5.4 PESQUISA DA PRESENÇA DE <i>Leishmania</i>	52
5.5 XENODIAGNÓSTICO.....	54
5.6 INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DE <i>L. chagasi</i> EM <i>Sus scrofa domesticus</i>	54
5.6.1 Quadro geral.....	54
5.6.2 Pesquisa de formas amastigotas em esfregaços de tecidos em lâmina e cultivo para o isolamento do parasito.....	54
5.6.3 Evolução da resposta imune humoral.....	55

5.6.4 Xenodiagnóstico com <i>Lutzomyia longipalpis</i>	57
5.6.5 Reação de polimerase em cadeia.....	57
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÃO / SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Taxa de incidência de Leishmaniose visceral, segundo o ano de ocorrência, no Brasil entre 1980 e 1998.....	4
Figura 2.	Proposta de cadeia epidemiológica da leishmaniose visceral sugerindo a participação dos suínos (adaptado de SHERLOCK, 1964). Linhas cheias - transmissão habitual; linhas pontilhadas - transmissão ocasional. A seta ligando o desenho de um porco diretamente a de um homem, sem a interrupção pelo desenho de um flebotomo representa a possibilidade da contaminação pelo manuseio das vísceras durante o abate do animal.....	20
Figura 3.	Mapa do Estado da Bahia, destacando o município de Jequié (verde escuro) e a região sudoeste do Estado (verde claro).....	23
Figura 4.	Uma das localidades, do município de Jequié-BA, onde foi realizada a coleta de amostras, destacando-se as condições de pobreza e a presença dos suínos no peridomicílio.....	24
Figura 5.	Método de contenção dos suínos (com o cambão), realizado para coleta de sangue dos animais.....	27
Figura 6.	Coleta de sangue de suínos, do município de Jequié-BA, através da punção da veia cava cranial, utilizando tubos à vácuo.....	28
Figura 7.	Suíno imobilizado e sedado, sendo submetido aos xenodiagnósticos com triatomíneos (seta verde) e flebotomíneos (seta amarela).....	38
Figura 8.	Resultados obtidos nos testes de ELISA, para detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> em suínos da cidade de Jequié-Ba, no período de 1996 a 1998. Os ELISAs foram realizados com lisado de promastigotas de <i>L. chagasi</i> (ELISA I) ou com o antígeno recombinante rK39 (ELISA II) como antígeno. Os valores sobre cada coluna correspondem ao número de animais representado por ela e a percentagem desse número em relação ao total examinado. A diferença entre os resultados obtidos no ELISA I e o ELISA II foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).....	46
Figura 09.	Resultados obtidos nos ELISAs, para detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> , em suínos da cidade de Jequié, Bahia, no período de 1996 a 1998. A. Resultados obtidos utilizando lisado de promastigotas de <i>L. chagasi</i> como antígeno (ELISA I). B, resultados obtidos utilizando antígeno recombinante rK39 como antígeno (ELISA II). Cada símbolo corresponde ao resultado obtido de um animal individualmente. As linhas pontilhadas indicam os valores do "cut off" dos testes. A diferença entre os resultados obtidos no ELISA I e o ELISA II foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).....	47

- Figura 10** “Western blot” de soros de suínos, de área endêmica para leishmaniose visceral humana e canina, contra lisado de promastigota de *L. chagasi*. As colunas de A a F correspondem a tiras de nitrocelulose incubadas com soros de porcos com anticorpos contra *L. chagasi* detectáveis por ELISA; as colunas de G a I correspondem a tiras incubadas com soros de suínos sem anticorpos contra *L. chagasi* detectáveis por ELISA. As posições de marcadores de peso molecular estão indicadas por setas..... 50
- Figura 11** Número de antígenos com diferentes pesos moleculares sendo reconhecidos por 20 soros de suínos provenientes de área endêmica de leishmaniose visceral com positividade para anticorpos anti-*Leishmania* em ELISA (a). Os números de antígenos reconhecidos por soros controle, sem anticorpos anti-*Leishmania* no ELISA (cinco de área endêmica e cinco de área não endêmica para leishmaniose), estão marcados em b. Os soros de região não endêmica estão representados por área da coluna não preenchida. Cada coluna representa o número de soros reconhecendo um número de antígenos indicado nas abscissas..... 51
- Figura 12** Evolução da resposta imune humoral dos suínos inoculados com *L. chagasi*, medida através da semi-quantificação da atividade de anticorpos anti-rK39 por meio de ELISA. A linha pontilhada indica o valor do cut off 0,595. Cada ponto relacionado aos meses representa um dos animais do experimento..... 56
- Figura 13** Evolução da resposta imune humoral dos suínos inoculados com *L. chagasi*, medida através da semi-quantificação da atividade de anticorpos anti-*Leishmania* por meio de ELISA. A linha pontilhada indica o valor do cut off 0,476. Cada ponto relacionado aos meses após a inoculação representa um dos animais do experimento..... 56
- Figura 14** Eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio, de um dos nossos ensaios, demonstrando que não houve amplificação de segmento de KDNA de nossas amostras. Os números abaixo da figura correspondem ao seguinte: 1-marcador de 100pb; 2-água; 3-controle negativo; 4-poço vazio; 5 a 12-amostras teste; 13-poço vazio; 14-controle positivo..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Resultados do inquérito sorológico para detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> na população suína de diferentes bairros da cidade de Jequié, Bahia, no período de 1996 a 1998.....	45
Tabela II	Número de suínos submetidos aos diferentes exames parasitológicos, todos com resultados negativos.....	53

- RESUMO

ESTUDO PRELIMINAR SOBRE O PAPEL DO SUÍNO DOMÉSTICO (*Sus scrofa domesticus*) COMO POSSÍVEL RESERVATÓRIO PARA *LEISHMANIA*. **Evandro Moraes Silva**. A leishmaniose visceral é endêmica no Estado da Bahia, ocorrendo com uma das maiores incidências no País. Embora o suíno esteja constantemente presente nas áreas endêmicas, é desconhecido seu papel na epidemiologia da leishmaniose visceral. Com o fim de esclarecer algo neste aspecto, foi realizado um inquérito sorológico numa amostragem da população suína de Jequié, usando-se testes de ELISA (o ELISA I utiliza um lisado de promastigotas (*Leishmania chagasi*) como antígeno, e o ELISA II utiliza a proteína recombinante rK39 como antígeno), ambos expostos a um conjugado anti IgG de suíno ligada a peroxidase. Foram também feitas pesquisas do parasito em esfregaços de tecido, tentativas para o isolamento em meio de cultura para identificação de leishmanias em amostras de fígado e pele do animal. Em alguns animais soropositivos foram feitos xenodiagnósticos com triatomíneos e flebotomíneos. Foi realizado também um estudo experimental objetivando verificar a susceptibilidade do porco doméstico à infecção por *L. chagasi* e acompanhar a evolução da resposta imune humoral dos animais. O ELISA I resultou em 41,3% de positivos (38/92) e ELISA II em 51,1% positivos (47/92); contudo não foi isolado nem identificado *Leishmania sp.* dos animais. O *Sus scrofa domesticus* tem baixa susceptibilidade a infecção por *L. chagasi* e tem a capacidade de responder à exposição ao parasito produzindo anticorpos circulantes.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmaniose visceral, suínos, epidemiologia, Estado da Bahia.

- SUMMARY

PRELIMINARY STUDY ON THE ROLE OF DOMESTIC PIGS (*Sus scrofa domestica*) AS POSSIBLE RESEIVOIR TO LEISHMANIA. **Evandro Moraes Silva**. Visceral leishmaniasis is endemic in the Northeast, with one the highest incidences in the State of Bahia. Although suines are frequently seen in the endemic area, their role in the epidemiology of visceral leishmaniasis is unknown. To clarify anything in this aspect, a serological survey using sera samples of pigs from Jequié, Bahia was carried out. The detection of *Leishmania chagasi*- specific antibodies in suines was accomplished by either using ELISA with promastigote lisate (ELISA I) or with rK39 recombinant protein as antigen (ELISA II), both displayed to an anti pig IgG conjugate with peroxidase. Attempts for isolation of the parasite were carried out by aspiration of liver and skin biopsies in culture media, besides direct smear from these tissues stained by Giemsa. Xenodiagnosics using triatomines and phlebotomines were performed in seropositive animals. Besides that, an experimental study was carried out to verify the susceptibility of domestic pigs to *L. chagasi* infection and follow the imune response. The ELISA I showed 41,3% (38/92) and ELISA II in 51,1% (47/92) of positive animals, but no *Leishmania* parasite was isolated neither identified. The *Sus scrofa domestica* are less susceptible to infection with *L. chagasi* and are able to produce antibodie due the parasite exposition.

KEY-WORDS: Visceral leishmaniasis, pigs, epidemiology, Bahia State.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

A leishmaniose visceral (LV) representa um problema de grande importância para a saúde pública no Brasil, e está geralmente associada a áreas de clima seco, pouco arborizadas, onde a pobreza se faz constante, ocorrendo principalmente no nordeste do país (DEANE 1956; ALENCAR 1959; PESSOA 1963; WHO 1992; SHERLOCK 1996).

No Continente Americano, pensa-se que o homem e os animais domésticos sejam apenas hospedeiros secundários da *Leishmania chagasi*, Cunha e Chagas, 1936, agente etiológico da LV, pois certos aspectos epidemiológicos da doença levam à suposição da existência de um animal silvestre que agiria como reservatório primário; o cão e o homem seriam apenas vítimas da infecção haurida desse reservatório até então desconhecido (CHAGAS et al. 1937/1938; LAINSON e SHAW 1979).

Os parasitos são encontrados em muitas espécies de mamíferos, dentre elas a dos canídeos principalmente. A *Leishmania* adaptou-se ao organismo dos mamíferos, e esses hospedeiros agora representam não somente uma fonte de alimentação para o *Lutzomyia longipalpis*, vetor da doença, como também fonte de infecção por amastigotas localizadas na pele e sangue dos vertebrados (LAINSON 1985).

A baixa prevalência de casos humanos e a presença de animais silvestres infectados na região Amazônica sugeriram que a leishmaniose visceral (LV) fosse principalmente uma doença de animais silvestres (CHAGAS et al. 1937/1938;

DEANE e DEANE 1954a; ALENCAR 1959; LAINSON e SHAW 1979; SILVEIRA et al. 1982; LAINSON et al. 1983a).

Provavelmente, devido ao desflorestamento indiscriminado de extensas áreas, a população de *L. longipalpis* (LUTZ e NEIVA, 1912) vem aumentando no peridomicílio, onde esse vetor facilmente se adapta, tornando-se um grande fator de risco para a formação de novos focos de LV (LAINSON 1983b).

Na Bahia, alguns fatores que interagem entre si na ecologia da LV, como a pobreza, a desnutrição e a conseqüente deficiência imunitária, principalmente na faixa etária de 0-10 anos, combinados com a elevada densidade de flebótomos, são similares aos observados em outras áreas endêmicas do Brasil. Mas ainda não está clara a existência ou não de um outro fator determinante da manutenção e/ou transmissão da LV em áreas endêmicas, que poderia ser um reservatório primário ainda desconhecido. Este reservatório poderia ser importante tanto na hipótese de ser a *Leishmania* importada ou nativa (SHERLOCK 1996). MOREIRA Jr. e colaboradores (2000a), realizando estudo soropidemiológico da infecção por *Leishmania chagasi* em área e população humana da cidade de Jequié, Bahia, observaram alta prevalência da infecção humana, indicando transmissão continuada da LV, apesar das medidas de prevenção e controle executadas na área. Este fato sugere a existência de um elo, ainda desconhecido, na cadeia epidemiológica da LV que estaria contribuindo para manutenção da doença nessas áreas, perpetuando o endemismo.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV sempre foi considerada uma doença endêmica da zona rural, principalmente no nordeste brasileiro (figura 1), agravada pelas precárias condições de vida e pela falta de vigilância sanitária, e de aplicação de medidas efetivas contra as doenças endêmicas que assolam essas áreas (ALENCAR 1959; SHERLOCK 1969; DEANE 1962; ALENCAR et al. 1974/75; SHERLOCK 1996). Entretanto, este quadro vem gradativamente mudando, pois a LV está se expandindo por vasta extensão do Brasil, ocorrendo como surtos epidêmicos ou instalando-se endemicamente na zona urbana, inclusive em grandes centros urbanos ou próximos a estes (COSTA et al. 1990; JERONIMO et al. 1994; MONTEIRO et al. 1994; CUNHA et al. 1995; NASCIMENTO et al. 1996; SHERLOCK 1997; BRASIL 1999, MOREIRA Jr. et al. 2000b; FRANKE et al. 2002a). Esta ocorrência de surtos urbanos e peri-urbanos estende-se desde o México até o norte da Argentina (OPAS 1994).

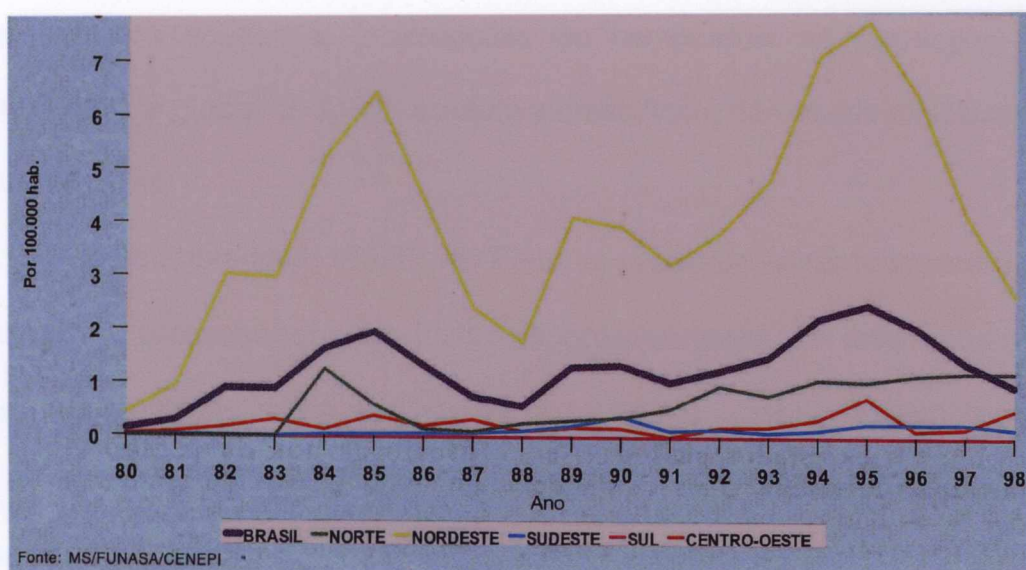


Figura 1 – Taxa de incidência de leishmaniose visceral, segundo o ano de ocorrência no Brasil, entre 1980 e 1998, segundo BRASIL/MS (1999).

A leishmaniose nas últimas décadas tem ocorrido na região nordeste de modo endêmico, apresentando, no entanto, surtos epidêmicos com duração de três a quatro anos. O conhecimento das razões pelas quais ocorrem esses surtos poderá contribuir para melhoria das medidas de controle e prevenção da doença (SHERLOCK 1997). Recentemente, FRANKE e colaboradores (2002b) observaram, com o auxílio de modelos estatísticos, que o *El Niño* influencia na incidência anual de LV no estado da Bahia, sendo este resultado potencialmente importante para definir estratégias de controle da doença, pois os anos em que existe um alto risco para o aumento da ocorrência da doença poderiam ser definidos previamente.

TESH (1995) atribui o importante aumento de casos de LV no Continente Americano aos seguintes fatores: mudanças demográficas e ecológicas, fato

muito claro na América Latina, onde a LV ocorre agora em muitas regiões que antes ela não era notificada; interrupções de campanhas de borrifação de inseticida; epidemia global de AIDS; e relativa ineficiência dos atuais métodos de vigilância e controle.

COSTA e colaboradores (1990), no Piauí, observaram, durante um surto de LV, que o fato do processo ter se reduzido espontaneamente, em área onde não se tentou o seu controle, indica que não se pode atribuir apenas às medidas de controle o fim da epidemia, e que outros fatores além da interferência na população vetorial, participam do desenvolvimento da doença.

O controle efetivo da doença parece depender essencialmente da combinação de três medidas: controle de reservatórios, controle do vetor e detecção e tratamento de casos humanos (DEANE 1956; ALENCAR 1959; LACERDA 1994; MONTEIRO et al. 1994).

DYE (1996) sugere que o uso de inseticida para o controle dos vetores e a redução da susceptibilidade por vacinação de pessoas ou de cães, ou a eliminação da má nutrição infantil, são as melhores estratégias de controle da LV, sendo mais eficiente que a eliminação e/ou tratamento de cães.

1.3 RESERVATÓRIOS JÁ CONHECIDOS DE *Leishmania chagasi*

1.3.1 O homem

BADARÓ (1998) cita que os estudos dos reservatórios de *Leishmania chagasi* não trouxeram novas observações que explicassem o número crescente de casos de LV, sugerindo a importância do homem como reservatório de *Leishmania*. COSTA e colaboradores (2000) reforçam a hipótese de que o

homem pode atuar como reservatório da *L. chagasi* no Brasil, servindo de fonte de infecção para o inseto vetor, reforçando o citado por EVANS e colaboradores (1992), que alertam para a possível importância da transmissão humano-flebótomo- humano.

1.3.2 O cão (*Canis familiaris*)

O papel de reservatório da *L. chagasi* é atribuído, por muitos autores, quase que exclusivamente ao cão, desde quando NICOLLE (1908) encontrou em Tunis formas amastigotas de *Leishmania* em um cão emagrecido, descrevendo assim o primeiro foco de leishmaniose visceral canina (LVC) do mundo. Após esse achado, diversos pesquisadores notificaram a infecção do cão em focos endêmicos de LV em várias partes do mundo. SERGENT e SERGENT (1910) demonstraram a existência do calazar canino na Argélia; PRINGAULT (1917), citado por LAINSON e SHAW (1979), demonstrou o aparecimento do primeiro foco da doença canina em Marselha; PEREIRA (1932) identificou a leishmaniose canina em Lisboa; ANDREWS (1933) e LEE (1937) observaram os primeiros casos de leishmaniose canina na China.

No Brasil, CHAGAS e colaboradores (1937), no Ceará, fizeram os primeiros achados de cães parasitados com *Leishmania*. A partir desses achados, diversos autores notificaram o encontro de cães infectados em diversos Estados do Brasil: PONDÉ e colaboradores (1942), DEANE e DEANE (1954), ALENCAR e colaboradores (1956) e ALENCAR (1959) no Estado do Ceará; NUSSENZWEIG e colaboradores (1957) e OLIVEIRA e colaboradores (1959) em Minas Gerais; LOPES e SARNO (1956), SHERLOCK e SANTOS (1964) e SHERLOCK e

ALMEIDA (1970) na Bahia; COELHO e colaboradores (1965) em Goiás; MARTINS e colaboradores (1968) e DIETZE e colaboradores (1997) no Espírito Santo; GUEDES e colaboradores (1974) na Paraíba; COSTA e colaboradores (1990) no Piauí; JERÔNIMO e colaboradores (1994) no Rio Grande do Norte; COSTA e colaboradores (1995) no Maranhão.

Diversos autores relataram nos últimos anos a falta de correlação entre a eliminação de cães soropositivos e a ocorrência de casos humanos de LV, dando a entender que o cão não representa o principal fator de risco associado à infecção humana (LIMA et al. 1996; NASCIMENTO et al. 1996; DIETZE et al. 1997; CALDAS 1998; SOARES 1998).

EVANS e colaboradores (1992) observaram que, mesmo após a eliminação de cães soropositivos, não houve uma redução na taxa de soroprevalência em humanos. E relataram que, apesar de uma alta porcentagem de cães positivos na região em que trabalharam, não existiu aumento do risco de infecção para crianças vivendo na mesma casa e/ou vizinhança. Ainda, os referidos autores salientam que crianças em casas com casos prévios de leishmaniose visceral humana (LVH) tinham o risco de infecção aumentado em três vezes. No entanto, alguns fatores dificultam a interpretação desses resultados tais como: o grande intervalo entre a coleta das amostras, a realização dos exames e a eliminação dos cães (no momento da eliminação, o cão já teria disseminado a infecção para flebotomíneos e para outros cães); a utilização de imunofluorescência indireta como método de triagem de cães soropositivos, que apresenta baixa sensibilidade produzindo muitos resultados falso-negativos, permitindo, portanto a permanência de muitos cães infectados na área endêmica.

Um levantamento sorológico na população canina urbana de Jequié, realizada por PARANHOS-SILVA e colaboradores (1996), demonstrou uma soroprevalência global de 23,5% (n = 1.681) de cães positivos para *Leishmania*, e uma variação de 0% a 64% na soroprevalência em diferentes locais da cidade. Esta pesquisa reafirma a importância dos cães como reservatórios da *Leishmania chagasi*. No entanto, foram observados alguns aspectos epidemiológicos da doença que não puderam ser esclarecidos. O primeiro aspecto foi à ausência total de registros de LVH em algumas áreas da cidade onde os autores detectaram taxas elevadas de soroprevalência em cães; o segundo aspecto foi à disparidade nas taxas de soroprevalência observadas entre subgrupos de cães que habitavam áreas contíguas, indicando que a transmissão do parasita pelos vetores, por alguma razão, não vem proporcionando um padrão uniforme de distribuição da infecção na população canina. PARANHOS-SILVA e colaboradores (1998), em um estudo de coorte no município de Jequié, Bahia, encontraram uma taxa anual de incidência de LVC de 6,55 casos / 100 cães por ano, havendo áreas de alto e baixo risco. Os resultados encontrados demonstraram claramente a distribuição irregular da infecção canina no município de Jequié, inclusive a presença dessa infecção onde casos humanos não foram notificados, o que sugere a presença de outros fatores envolvidos no desenvolvimento da doença humana ou na transmissão da *Leishmania* do cão para o homem.

VIEIRA e COELHO (1998) observaram que há, em certas áreas endêmicas, uma tendência decrescente dos índices médios globais de cães positivos. Contudo, uma observação conjunta da curva de casos humanos e dos índices médios da sorologia em cães, revela fenômenos paradoxais, pois, nos

últimos anos, foi constatado aumento de casos humanos, apesar da redução das taxas de soropositividade dos cães. Isto sugeriu, aos autores, a possível existência de outros fatores que pudessem estar envolvidos na cadeia epidemiológica da LV.

COSTA e colaboradores (1999) citam que é mais provável que o cão seja apenas outra vítima, a qual pode ocasionalmente proporcionar o aumento da taxa de infecção da população doméstica do inseto vetor. Por outro lado, em áreas endêmicas de leishmaniose visceral, é comum os cães não terem residência fixa, vivendo soltos, ficando freqüentemente dias ou várias horas por dia circulando em áreas circunvizinhas à casa de seu “dono”. Além disso, é também grande o número de cães vadios. Dessa forma, a informação de que em uma casa não existe um cão não implica necessariamente na inexistência de flebótomos alimentados nos cães dos vizinhos ou em cães de rua. Essa característica de pequena sedentariedade dos cães em área endêmica de LV seguramente dificulta a interpretação de trabalhos associando a presença do cão no domicílio à existência de seres humanos com LV.

COSTA e VIEIRA (2001) citam que a eliminação dos cães domésticos para o controle da LV tem o menor suporte científico entre as estratégias do programa de controle estabelecidas pelo Ministério da Saúde do Brasil, e indicam alguns pontos falhos na estratégia de controle, como: 1) a falta de correlação espacial entre a incidência cumulativa de LV humana com a soroprevalência canina; 2) a provável ausência de risco significativo da coabitação humana com cães soropositivos para aquisição de LV; 3) a demonstração de que outros reservatórios podem ser fonte de infecção do vetor pela *L. chagasi*, tais como as

peças (particularmente as crianças desnutridas que podem infectar o vetor que transmite o parasito para outras crianças), canídeos silvestres e marsupiais; 4) a grande velocidade com que a população canina é reposta, faz com que a retirada de todos cães soropositivos torne-se impraticável; 5) a baixa eficiência dos testes sorológicos em detectar a infecção canina; 6) a utilização de um único método para funções de teste de triagem e teste confirmatório da infecção por *L. chagasi*, o que conduz a elevado custo/benefício devido à alta proporção de resultados falso-positivos, particularmente quando a prevalência real é baixa; 7) falta de indicadores clínicos ou laboratoriais do grau de infectividade dos cães para o vetor, de acordo com a fase da doença; 8) a ausência de experiências anteriores que tenham demonstrado vantagens da eliminação exclusiva de cães, pois todos os relatos de sucesso de controle de programas de LV onde foram eliminados cães, foram feitos concomitantemente ao controle de vetores com inseticidas.

1.3.3 O gato (*Felix domesticus*)

Além do cão, em vários focos do mundo, diversas observações foram feitas sobre o gato, o qual foi encontrado, pela primeira vez, naturalmente infectado, na mesma casa em que viviam uma criança e um cão, ambos apresentando LV (SERGENT et al. 1912). O gato doméstico foi também encontrado parasitado uma vez na Argélia, Indochina (BERGEON 1927) e Espanha (ONDOVILLA 1933, citado por BRUMPT 1949).

No Brasil há o relato do encontro de amastigotas nas vísceras de um gato por CHAGAS e colaboradores (1938), porém não houve uma investigação mais aprofundada, tornando o achado muito duvidoso. MELLO (1940), no Pará, relata o

encontro de amastigotas em lesões cutâneas apresentadas por um gato (*Felix domesticus*) não chegando a caracterizar a espécie de *Leishmania* envolvida. DEANE (1956) examinou 142 gatos, contudo, não encontrou qualquer resultado positivo. ALENCAR e colaboradores (1974/75), em área endêmica no Estado do Ceará, examinaram 214 gatos obtendo apenas resultados negativos. SHERLOCK (1996) no Estado da Bahia, examinou 53 gatos por meio de Imunofluorescência e esfregaços de pele; tendo encontrado em um dos esfregaços um único amastigota típico, porém, permaneceram dúvidas sobre a espécie do achado, desde que os testes de imunofluorescência de todos os gatos foram negativos para *L. chagasi* e o felino suspeito não pôde ser reexaminado.

1.3.4 Raposas

Evandro Chagas e colaboradores foram os pioneiros no estudo de reservatórios (silvestres e comensais) de LV no Brasil, quando em 1936 realizaram uma intensa investigação à procura de um reservatório silvestre no Estado do Pará, embora sem êxito (CHAGAS et al. 1937/1938). PONDÉ e colaboradores (1942) realizaram uma investigação epidemiológica na qual examinaram possíveis reservatórios silvestres da LV em áreas endêmicas do Nordeste. E foi por este pensamento que DEANE e DEANE começaram a investigar, em 1954, possíveis reservatórios em área endêmica de LV no Estado do Ceará. Então, pela primeira vez no mundo, foi notificada a infecção natural de uma raposa por *Leishmania chagasi* (DEANE e DEANE 1954a); no mesmo ano os referidos autores, notificaram o encontro de mais três exemplares naturalmente infectados (DEANE e DEANE 1954b; DEANE e DEANE 1954c). ALENCAR e

colaboradores (1974/1975), atualizando os conhecimentos sobre os reservatórios de leishmaniose, assinalaram o encontro de mais sete exemplares de raposas naturalmente infectadas, entre os 173 que examinaram no Estado do Ceará.

LAINSON e colaboradores (1969), observando um aumento do número de raposas nos arredores de Belém, iniciaram um estudo para investigar o envolvimento dessa espécie na epidemiologia da LV e registram o encontro dos primeiros espécimes desse canídeo naturalmente infectado nessa região. Continuando aos seus estudos sobre reservatórios de LV no norte do Brasil, LAINSON e colaboradores encontraram um total de três raposas infectadas entre 23 examinadas de Belém e 11 infectadas entre 26 examinadas da Ilha de Marajó, portanto um total de 49 raposas examinadas, das quais, em 14 exemplares, foi isolada *L. chagasi*. Todos os animais que foram examinados na Região Amazônica estavam aparentemente saudáveis (LAINSON et al. 1969; LAINSON e SHAW 1971; SILVEIRA et al. 1982; LAINSON et al. 1983a; LAINSON et al. 1983b; LAINSON 1985; LAINSON et al. 1987; LAINSON et al. 1990).

Ainda na Região Amazônica, COURTENAY e colaboradores (1994), comparando a importância do cão e da raposa como reservatórios, examinaram 28 exemplares de raposas, entre os quais seis (21,43%) apresentaram imunofluorescência indireta positiva para leishmaniose.

MELLO e colaboradores (1988) em Corumbá, Mato Grosso do Sul, trabalharam com 11 exemplares desse canídeo, dentre os quais um (9,9%) estava naturalmente infectado.

Na Bahia, 27 exemplares foram examinados, sendo 14 da cidade de Jacobina e 13 em Jequié, mas nenhum desses encontrava-se parasitado por *Leishmania* (SHERLOCK e SANTOS 1964; SHERLOCK et al. 1988; SHERLOCK e MIRANDA 1993).

SILVA e colaboradores (2000), registraram o primeiro encontro de um exemplar do canídeo naturalmente infectado com *L. chagasi* no Estado de Minas Gerais.

Com referência aos outros Continentes, na França, RIOUX e colaboradores (1968) registraram o encontro de dois exemplares, de raposas, naturalmente infectadas entre 99 examinadas. Uma estava aparentemente sadia e a outra apresentava sinais clínicos da doença.

Em Portugal, ABRANCHES e colaboradores (1983), encontraram o primeiro exemplar naturalmente infectado por *Leishmania* em Portugal. Dando seqüência aos seus estudos, ABRANCHES e colaboradores (1984), encontraram mais três raposas infectadas e concluíram que, apesar da baixa taxa de prevalência, era provável a manutenção da endemicidade em ciclo silvestre semi-autônomo nessa área.

Em estudos no Irã, NADIM e colaboradores (1978) propõem também que os prováveis reservatórios seriam carnívoros selvagens, sendo a infecção do homem e do cão doméstico acidental e secundária. Foram estudados dez exemplares de raposas, encontrando-se um infectado.

Na Itália, BETTINI e colaboradores (1980) examinaram 16 raposas, encontrando um dos exemplares parasitado. Também na Itália, MANCIANTI e colaboradores (1994) examinaram 50 animais onde nove estavam soropositivos nos testes de imunofluorescência indireta e ELISA.

1.3.5 Marsupiais

LAINSON e SHAW (1979) isolaram promastigotas em cultura de baço e fígado de um marsupial, contudo não mantiveram o parasita *in vitro*, inviabilizando a identificação da espécie do parasito.

SHERLOCK e colaboradores (1984) registraram, na Bahia, o marsupial *Didelphis albiventris* Lund 1841, pela primeira vez no mundo um mamífero silvestre não canídeo naturalmente infectado pela *L. chagasi*.

Em áreas endêmicas de LV na Colômbia, diversos exemplares da espécie *Didelphis marsupialis* Weid 1926 foram, em seguida, encontrados infectados por *Leishmania* (CORREDOR et al. 1989, TRAVI 1994). Como esse marsupial americano não sofria a ação patogênica da *L. chagasi*, especulou-se sobre a existência de uma evoluída associação parasito/hospedeiro já em equilíbrio, o que conferiria ao marsupial, um papel de reservatório primário da leishmaniose visceral americana (SHERLOCK et al. 1984; SHERLOCK et al. 1988). Contudo, não foi possível, com os dados disponíveis, eliminar a hipótese de que o marsupial, que comumente torna-se um comensal, em suas incursões ao ambiente doméstico, tenha se infectado com a mesma *Leishmania* que ali infectava o homem e o cão.

1.3.6 Roedores

SHERLOCK e colaboradores (1988), examinaram 42 exemplares de *Mus musculus* (Waterhouse, 1837) e todos estavam negativos para *Leishmania*. Também neste mesmo trabalho foram examinados 20 espécimes de *Rattus rattus* (Linneus, 1758), capturados em Jacobina, Bahia, e nenhum desses estava infectado por *Leishmania*. Contudo, formas amastigotas foram vistas em esfregaços de sangue de dois espécimes desse roedor e promastigotas desenvolveram-se na cultura do sangue de um desses ratos. Porém, a espécie do flagelado não pôde ser identificada, além de não ter sido encontradas amastigotas nos esfregaços de baço e fígado desses roedores.

Estruturas suspeitas de serem amastigotas foram vistas em esfregaços corados de fígado e baço de quatro espécimes de *Dasyprocta aguti* (Linneus, 1766) e em esfregaços de baço de um *Cercomys cunicularius* (Fr.Cuvier, 1828) e um *Oryzomys eliurius* (Wagner, 1845). Infelizmente, esses possíveis parasitos não puderam ser isolados e identificados (SHERLOCK 1997).

O *Rattus rattus* e o *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) têm sido encontrados infectados no Mediterrâneo e Oriente Próximo, em áreas endêmicas de leishmaniose visceral (El-ADHAMI 1976; POZZIO et al. 1981). ALENCAR e colaboradores (1974/75) encontraram amastigotas em um *R. rattus* no Estado do Ceará, não conseguindo esclarecer se porventura tratava-se de *L. chagasi*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Estimar na população suína de Jequié-BA, a soroprevalência de animais apresentando anticorpos com atividade anti-*Leishmania sp.* e investigar a possível infecção de suínos por *L. chagasi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

a) Determinar a frequência de suínos com anticorpos contra *Leishmania*, detectáveis em dois testes ELISA, nas amostras de soro coletadas no município de Jequié-BA.

b) Estimar a prevalência de animais soropositivos para *Leishmania* na população suína da área estudada.

c) Investigar a possível presença de suínos naturalmente infectados por *Leishmania sp.*, no município de Jequié-BA.

d) Investigar a susceptibilidade dos suínos à infecção por *L. chagasi* em desafio experimental.

3. JUSTIFICATIVAS

O programa de controle da LV, adotado pela Fundação Nacional de Saúde não tem conseguido reduzir, a níveis aceitáveis, a incidência de casos humanos (BRAGA et al. 1998). No Estado da Bahia, a Fundação Nacional de Saúde vem realizando intenso levantamento sorológico da população canina, seguido da eliminação dos animais soropositivos. No entanto, os resultados obtidos são pouco significativos, ainda mais quando somados à crescente incidência da doença em regiões onde os procedimentos vêm sendo realizados regularmente, e à rápida dispersão que a LV vem tendo no país (BRASIL / MS, 1998; ASHFORD et al. 1998).

O papel dos cães como reservatório doméstico de *L. chagasi* atualmente está sendo reavaliado, pois outros fatores, até então não identificados, parecem estar envolvidos na cadeia epidemiológica (COSTA et al. 1990; EVANS et al. 1992; LIMA et al. 1996; NASCIMENTO et al. 1996; DYE 1996; DIETZE et al. 1997; ASHFORD et al. 1998; BRAGA et al. 1998; BRASIL/MS 1998; CALDAS 1998; SOARES 1998; PARANHOS-SILVA et al. 1996/1998; VIEIRA e COELHO 1998; COSTA et al. 1999; MOREIRA Jr et al. 2000a; COSTA e VIEIRA 2001). Contudo, o cão claramente não é um reservatório primário natural de *L. chagasi*, representa apenas uma vítima de infecção haurida de um outro reservatório. Embora possa ser uma fonte alternativa de infecção para o homem, outros reservatórios poderiam estar servindo como fonte de infecção de LV para o homem e para o próprio cão (CHAGAS et al. 1937/1938; ALENCAR 1959; DEANE 1961; LAINSON e SHAW 1979).

Com relação à participação de outros animais domésticos como reservatório da LV, o número de trabalhos é escasso. Quanto aos suínos, praticamente nada havia sido descrito quanto a sua participação ou não na epidemiologia da LV.

Os suínos estão freqüentemente presentes no peridomicílio das áreas onde a incidência da LV é alta. A criação de porcos em condições de higiene precárias (no fundo de quintais ou soltos em ruas de bairros pobres) é uma prática corrente no interior do Nordeste. Isto, além de servir para a ingestão de proteína, também proporciona algum acréscimo ao orçamento doméstico dos habitantes. Por isso, é bem provável que o número destes animais supere o número de cães existentes nesses bairros.

Os suínos atraem muito e são largamente sugados pelos flebotomíneos, o que viabilizaria a infecção destes animais por *Leishmania sp* (FORATINNI 1954; DEANE e DEANE 1957; SHERLOCK e GUITTON 1969; ZELEDÓN et al. 1984). Aliás, esta hipótese foi reforçada por BRAZIL e colaboradores (1988), ao registrarem o primeiro caso de suíno infectado naturalmente por *Leishmania sp*, em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Maranhão. Esses autores salientam a possibilidade deste animal atuar como fonte de infecção para os flebotomíneos devido ao grande número de amastigotas encontradas na lesão cutânea do animal.

MOREIRA Jr. e colaboradores (2001), investigando fatores de risco modificáveis para infecção por *Leishmania sp*. em cães de área endêmica para LVC, relatam que a presença dos suínos aumenta em 4,1 vezes (IC 95% 1,2 – 13,8 ; $p=0,02$) o risco de infecção dos cães.

A pocilga é uma fonte multiplicadora do vetor da LV, pois além dos suínos servirem para o repasto sanguíneo das fêmeas, os compostos orgânicos liberados no solo servem de alimento para as larvas, fator que completa o ciclo biológico do vetor (FORATINNI 1954; DEANE e DEANE 1957). Em foco endêmico de LV na Colômbia, FERRO e colaboradores (1997) encontraram onze larvas de *L. longipalpis* próximas a pocilgas. Comparando diferentes iscas e locais de capturas SHERLOCK e GUITTON (1969) e ZELEDÓN e colaboradores (1984) demonstraram que os suínos atraem mais flebótomos que outros animais, mais que o próprio homem, o que aumentaria a possibilidade de infecção por *Leishmania* nesses animais (figura 2).

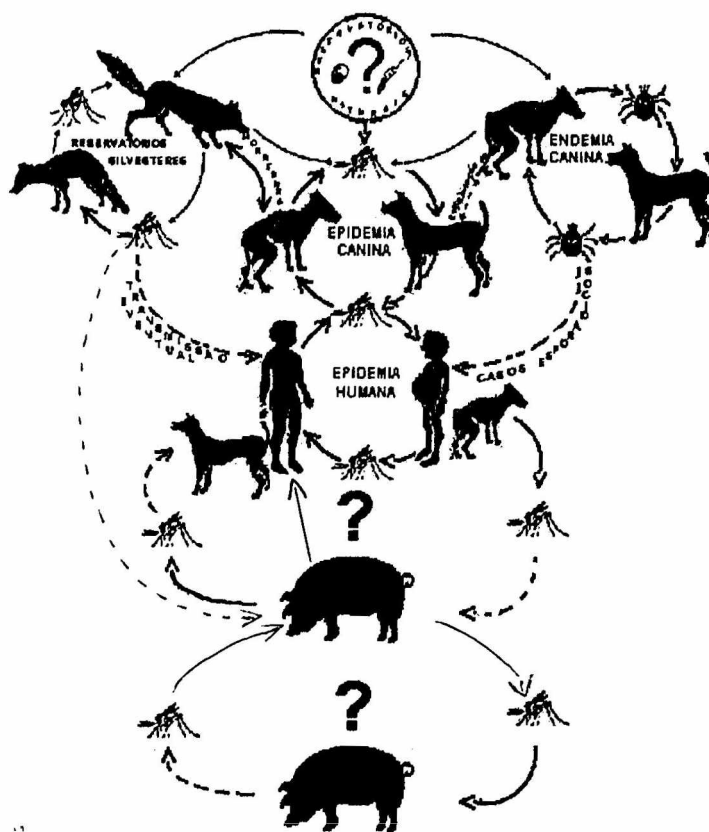


Figura 2 – Proposta de cadeia epidemiológica da leishmaniose visceral sugerindo a participação dos suínos (adaptado de SHERLOCK, 1964). Linhas cheias - transmissão habitual; linhas pontilhadas - transmissão ocasional. A seta ligando o desenho de um porco diretamente a de um homem, sem a interrupção pelo desenho de um flebotomo representa a possibilidade da contaminação pelo manuseio das vísceras durante o abate do animal.

Com base no exposto, fica clara a necessidade da obtenção de maiores esclarecimentos e de uma melhor compreensão sobre o envolvimento dos suínos na epidemiologia da LV, como possíveis reservatórios de *Leishmania chagasi*, que apesar da presença constante nas áreas endêmicas, não foram ainda sistematicamente investigados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no município de Jequié, que apresenta uma das maiores taxas de incidência de leishmaniose visceral no Estado Bahia.

A população do município aproxima-se de 200.000 habitantes. Ele possui uma área de 3.113 km² e está situado à 360 km de Salvador, entre a zona da mata e da caatinga, no sudoeste da Bahia, nas seguintes coordenadas geográficas: 13° 52' S e 40° 4' W (figura 3). O município está localizado na bacia do Rio de Contas, no planalto dos Geraisinho, e apresenta relevo acidentado, principalmente por causa das serras marginais e dos tabuleiros pré-litorâneos, além do pediplano sertanejo, que compõe a paisagem geológica da região.

A vegetação predominante é a caatinga arbórea aberta, com palmeiras. O clima é semi-árido, sendo a temperatura média anual de 24° C e a precipitação pluviométrica média de 500 mm por ano.

A pecuária e a agricultura formavam a base de todo o desenvolvimento econômico do município. Contudo, este vem se destacando, com o desenvolvimento industrial, pela implantação de indústria nacional de grande porte.

Na Unidade de Saúde do Centro Social e Urbano, pertencente à 13ª Diretoria Regional de Saúde (DIRES), sediada em Jequié, foram registrados 146 casos de leishmaniose visceral humana em 1996, dos quais, 80% foram diagnosticados em crianças na faixa etária de 0 a 9 anos. A densidade do vetor *Lutzomyia longipalpis* é bastante elevada, tanto no peri como no intradomicílio, tendo a espécie grande avidez para sugar freqüentemente o homem, o cão, as

galinhas, o porco e os eqüídeos (SHERLOCK e SANTOS, 1964). A criação de porcos em condições de higiene precárias, no fundo de quintais ou soltos nas ruas de bairros pobres, é uma prática comum neste município (figura 4).

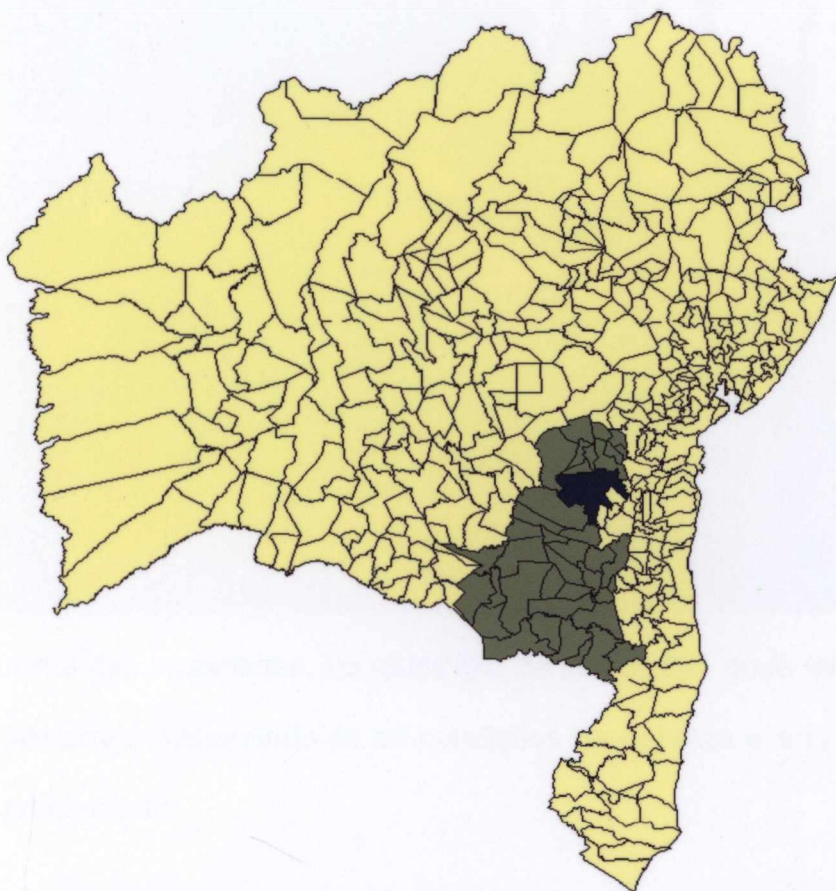


Figura 3 - Mapa do Estado da Bahia, destacando o município de Jequié (verde escuro) e a região sudoeste do Estado (verde claro).



Figura 4 – Uma das localidades, do município de Jequié-BA, onde foi realizada a coleta de amostras, destacando-se as condições de pobreza e a presença dos suínos no peridomicílio.

4.2. COLETA DAS AMOSTRAS

Em duas excursões ao município de Jequié, foram coletadas amostras de sangue em 92 suínos, para realização de exames sorológicos. Em 36 desses suínos retirou-se fragmento de pele e em 28 realizou-se a punção hepática (para tentativa de identificação e/ou isolamento de *Leishmania sp.* por meio de exames parasitológicos). A biópsia de pele e a punção do fígado foram realizadas simultaneamente à coleta de sangue nos animais amostrados. As aspirações de medula óssea e a retirada de fragmentos do baço foram efetuadas em apenas em dois animais, comprovadamente soropositivos pelo teste de ELISA, durante necrópsia.

4.2.1 Obtenção de soro

As amostras de sangue dos suínos, criados soltos, foram coletadas de animais de diferentes faixas etárias, objetivando alcançar o maior número possível. Marcamos os animais com brincos numerados, de fácil visualização e registramos os dados do animal e do proprietário em fichas de controle.

Os animais foram contidos com um instrumento apropriado, denominado de “cambão” (figura 5), e a coleta de 10ml de sangue foi realizada através da punção da veia cava cranial, em tubos à vácuo (figura 6). Para os animais maiores utilizou-se seringa de 20 ml com agulha de 70 x 12 mm.

O sangue coletado era mantido, nos tubos, em caixas térmicas com gelo. No laboratório, centrifugava-se o sangue a 2500 x g, durante 10 minutos, para separação do soro, que era estocado em tubos de Ependorfs e armazenado a -20°C.

Soros de 28 suínos, criados nas mesmas condições que os da nossa amostragem, da região de Santo Amaro, Bahia, onde os casos de LV são esporádicos (FRANKE et al. 2002), foram utilizados como controle negativo nos testes sorológicos.

Soros de 30 suínos criados confinados, de Santa Catarina, foram utilizados para comparar os resultados obtidos com as amostras de Santo Amaro (utilizadas como controle negativo nos ensaios imunológicos).



Figura 5 - Método de contenção dos suínos (com o cambão), realizado para coleta de sangue dos animais.



Figura 6 - Coleta de sangue de suínos, do município de Jequié-BA, através da punção da veia cava cranial, utilizando tubos à vácuo.

4.2.2 Biópsia e preparo de esfregaço de pele

Foram coletados fragmentos de pele sadia em 36 dos 92 animais amostrados, para o isolamento e/ou constatação da presença dos parasitos.

Os fragmentos foram coletados no ápice da orelha dos animais, que era pinçada para hemostasia, após a assepsia do local com álcool iodado, colocados em tubo estéril com salina (NaCl a 0.15M) e antibiótico e mantidos por um período de 12 horas a 4°C antes de serem transferidos para meio de cultura e incubados. Com a orelha ainda pinçada foram feitos esfregaços em lâminas.

4.2.3 Punção e esfregaço do fígado

Foram coletados aspirados hepáticos em 28 dos 92 animais estudados, para o isolamento e/ou constatação da presença de *Leishmania*.

Os aspirados foram coletados, com o auxílio de uma seringa de 20 ml com agulha 40 x 12mm, no penúltimo ou antepenúltimo espaço intercostal direito. Após assepsia do local com álcool iodado, a agulha foi introduzida transversalmente no espaço intercostal, aspirando-se o material hepático. Com parte do material puncionado, foram feitos esfregaços em lâminas. A outra parte foi transferida imediatamente para meio de cultura e colocada em caixas térmicas com gelo, para transporte, antes de ser cultivada à temperatura de 24°C, cerca de 4 horas depois.

4.2.4 Biópsia esplênica

O fragmento obtido, por meio de punção, era coletado, com o auxílio de uma seringa de 20 ml com agulha 40 x 12mm, no penúltimo ou antepenúltimo espaço intercostal esquerdo. Após assepsia do local com álcool iodado, uma agulha acoplada a seringa foi introduzida transversalmente no espaço intercostal, e aspirou-se o fragmento esplênico. Com parte do material puncionado, foram feitos esfregaços em lâminas e a outra parte acondicionada, na própria seringa, em caixas térmicas com gelo, para ser semeada em meio de cultura (no laboratório) e incubado em estufa à temperatura de 24°C.

4.2.5 Punção de medula

Os aspirados de medula eram coletados por meio de punção da tuberosidade ilíaca com o auxílio de uma seringa de 20ml com agulha 40 x 12mm. Após assepsia do local com álcool iodado, uma agulha acoplada a seringa foi introduzida transversalmente na tuberosidade ilíaca, aspirando-se o fragmento de medula, tomando-se o cuidado de não diluir a amostra. Com parte do material puncionado, foram feitos esfregaços em lâminas, outra parte acondicionada, na própria seringa, em caixas térmicas com gelo, e semeada em meio de cultura (no laboratório) sendo colocada em estufa à temperatura de 24°C, cerca de 4 horas depois.

4.3. ELISA

Foram realizados ELISAS (*enzyme-linked immunosorbent assay*) para identificar a presença de anticorpos específicos contra *L. chagasi*, utilizando-se como antígeno, em um dos testes, um lisado de promastigotas de *L. chagasi* (ELISA I) (REED et al. 1990) e, no outro, a proteína recombinante rK39, (ELISA II) (BURNS et al. 1993). Os antígenos utilizados nos testes foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. R. Badaró (Laboratório de Doenças Tropicais do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos – UFBA).

Os poços das placas, para realização do teste, foram sensibilizados com as seguintes quantidades de antígeno, em um volume de 100 µl: lisado de promastigotas – (1µg por poço) e (rK39) – 25 ng por poço. Os antígenos foram diluídos em tampão carbonato a 0,01M, pH 9,6. As placas foram mantidas a 4°C durante a noite. Após este período, os poços foram bloqueados, utilizando-se salina a 0,15 M tamponada com fosfato, pH 7,2 (PBS) com 1% de leite em pó desnatado e incubação a temperatura ambiente por duas horas.

O soro foi diluído a 1:100. O período de incubação entre cada etapa do teste foi de 15 minutos e a solução de lavagem utilizada foi o PBS com 0,05% de Tween 20, o qual foi também utilizado para lavar os poços por cinco vezes após cada etapa do teste. As concentrações de antígeno e diluição dos soros utilizados em nossos testes foram estabelecidas através de ensaios prévios (ELISA's).

Como conjugado, em ambos os testes foram utilizados anticorpos anti-IgG de porco marcado com peroxidase, desenvolvidos em coelhos, produzido pela Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). O conjugado foi diluído a 1:10000,

em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS – T 20) e 0,1% de albumina sérica bovina.

O substrato utilizado foi o TMB Microwell Peroxidase Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories). A solução utilizada para parar a reação do substrato foi ácido sulfúrico a 1N. A leitura dos poços foi realizada em leitor de densidade ótica, à luz de comprimento de onda de 450nm.

O valor de “ CUT-OFF” foi igual a média dos valores de densidade ótica de amostras de soro de 28 suínos criados nas mesmas condições que os da amostragem, mais três desvios padrões da média (adaptado de FREY e colaboradores 1998). A média do cut - off foi de 0,476 para o ELISA I, e de 0,595 para o ELISA II.

Para se estimar a soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania*, determinou-se o intervalo de confiança considerando-se, para efeitos matemáticos, a população infinita de suínos e usou-se a equação (LEVIN 1978; CANON e ROE 1982):

$$p \pm v \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} \text{ onde,}$$

p = proporção de animais positivos.

v = constante matemática = 2,58 (IC 95%).

n = tamanho da amostra testada = 92.

O uso simultâneo de ambos os testes de ELISA deve-se ao fato de que, em seres humanos, o teste com o lisado é geralmente positivo tanto os casos de infecção recente (assintomáticos) como aqueles que apresentaram cura

espontânea, enquanto que o teste com a proteína rk39 tem maior especificidade para dos casos de LV ativa (BADARÓ et al. 1996).

4.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) E "WESTERN BLOT".

Duzentos e cinqüenta microgramas de proteína de um lisado total de *L.chagasi*, suspensos em 200 ml de tampão de amostra (Tris a 0,125 M, SDS a 2,3%, glicerol a 10% e 2-B-mercaptoetanol a 0,01% em água destilada), pH 6,8, foi fervido por 3 min e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os géis de migração foram preparados na concentração final de 12% de acrilamida, montados em aparelho Mini-protein II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e colocados em tanque de eletroforese contendo tampão de corrida (3,02 g de Tris, 14,43 g de glicina, 1 g de SDS e água destilada q.s.p. 1 l, pH 8,3). Após aplicação de 100 µl da solução do antígeno por gel, a corrida foi realizada em voltagem constante de 100 a 120 V. Foi utilizado para o cálculo do peso molecular aparente das bandas protéicas o padrão de peso molecular BENCHMARK™ Protein Ladder (Gibco Laboratories, Hercules, CA, EUA), que correu ao mesmo tempo e contém 15 proteínas situadas em uma faixa de peso molecular de 10 a 220 kDa. Os polipeptídios do gel foram eletro-transferidos para membrana de nitrocelulose de 0,45 mm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) em tampão de transferência (Tris a 0,025 M, glicina a 0,93 M e metanol a 20% em água destilada) a 30 V por 16 horas, seguindo instruções do fabricante. Após a transferência, a membrana foi corada com vermelho de Ponceau S, para verificação do sucesso desse último

procedimento. Em seguida, após descoramento da membrana com água destilada para retirada do Ponceau S, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T20 e uma vez apenas com PBS, após ter sido bloqueada para reações inespecíficas por incubação de 2 h com uma solução de leite desnatado em pó a 10% em PBS. Para a imunodeteção, tiras de 3 mm de largura foram cortadas da membrana, previamente bloqueada, e incubadas com os soros (controles negativo e amostras testes), diluídos à 1:100, por uma hora. Depois da incubação com os anticorpos primários, as tiras foram lavadas como descrito e incubadas com um conjugado, anti-IgG de porco marcado com peroxidase, produzido pela Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA), diluído a 1:5.000, como no item anterior, por 1 h a temperatura ambiente. Depois da lavagem, as ligações dos anticorpos às tiras foram reveladas, através de incubação por 20 min, com uma solução de cromógeno (solução em água destilada de diaminobenzidina a 0,6 mg/ml com 0,1% de peróxido de hidrogênio a 20 volumes). A reação foi interrompida por remoção do substrato com água destilada. As tiras foram secas e armazenadas ao abrigo da luz. Para o cálculo do peso molecular foram medidas as distâncias em centímetros percorridas pelas proteínas do padrão de peso molecular e construído um gráfico de curva-padrão de migração protéica formado pelo logaritmo dos pesos moleculares e a distância linear percorrida pelas proteínas. Através deste gráfico foram determinados os pesos moleculares das proteínas de promastigotas de *L. chagasi* reconhecidas pelos soros.

Foram testados 20 soros de suínos, de área endêmica para leishmaniose, com sorologia positiva para anticorpos anti-*Leishmania* no ELISA, e cinco soros de

área endêmica e cinco soros de área não endêmica para leishmaniose, negativos para esses anticorpos.

4.5 PESQUISA DE FORMAS AMASTIGOTAS EM ESFREGAÇOS DE TECIDOS EM LÂMINA.

Para visualização do parasito foram realizados exames microscópicos dos esfregaços de biópsias de pele (da orelha) e esfregaços de fígado, baço e medula óssea, fixados em lâminas e corados com kit comercial, Panótico Rápido LB[®], produzido pela Laborclin (Pinhais - PR, Brasil). Este método utiliza três reagentes: um fixador (solução de trietiluetano a 0,1%) e dois corantes (xantenos a 0,1% e tiazinas a 0,1%) (COELHO et al. 1998; ANDRADE 1998). As lâminas foram submersas por cerca de trinta segundos em cada reagente, lavadas com água corrente e secas a temperatura ambiente.

Foram examinados um total de 198 esfregaços corados em lâminas de pele, fígado, baço e medula (uma média de dois esfregaços examinados de cada órgão), ao mesmo tempo em que o cultivo deste material era observado.

4.6 CULTIVO PARA A TENTATIVA DO ISOLAMENTO DE *Leishmania Sp.*

As amostras de pele, fígado e medula óssea foram semeadas assepticamente em meio de cultura bifásica NNN mais infusão de fígado – triptose (LAINSON e SHAW 1979; BRASIL/ M.S. 1996).

As culturas foram incubadas em estufa a 24° C, e examinadas semanalmente durante cinco semanas.

Os exames das culturas eram feitos a fresco, com uma gota da mesma em uma lâmina sobreposta por lamínula ao microscópio óptico, para percepção do movimento de flagelados.

4.7 XENODIAGNÓSTICO COM *Lutzomyia longipalpis*

Foram utilizados exemplares de *L. longipalpis*, com cinco dias de fase adulta, criados nos Laboratórios de Parasitologia e Entomologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ, os quais foram colocados para sugar dois suínos que apresentaram resultados positivos ao ELISA, sendo posteriormente necrópsiados (figura 7). Neste procedimento visava-se também, além de evidenciar a possível infecção dos animais, verificar a capacidade desses animais para atrair o flebótomo e o potencial dos suínos como fonte de alimentação de *L. longipalpis*.

O procedimento foi realizado em áreas glabras do animal, preferencialmente na orelha e na parte interna da coxa. Cerca de 30 fêmeas de *L. longipalpis*, acondicionadas em recipiente apropriado para a realização do procedimento, foram colocadas durante trinta minutos para se alimentarem nos animais.

As caixas com os insetos foram fixadas com gaze. A movimentação de pessoal em volta foi evitada para não inibir a atividade hematofágica dos flebotomíneos. Além disso, o animal foi contido e sedado para que ficasse imóvel e os insetos pudessem sugá-lo com maior avidez.

Após o repasto sanguíneo dos flebótomos, esses foram isolados individualmente em tubos e a partir do quarto dia da alimentação infectante foram dissecados e examinados.

4.8 XENODIAGNÓSTICO COM *Triatoma infestans*

O xenodiagnóstico com triatomíneos foi realizado com o objetivo de verificar a presença de algum tripanossomatídeo que pudesse estar parasitando naturalmente o suíno. Para realização deste procedimento foram utilizados triatomíneos criados nos Laboratórios de Parasitologia e Entomologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, os quais foram colocados para sugar dois suínos que apresentaram resultados positivos no ELISA, e sendo posteriormente necrópsiados (figura 7).

Foram utilizadas 10 ninfas de 5º estágio de *T. infestans*, acondicionadas em recipiente apropriado para a realização do procedimento, as quais foram colocadas para se alimentarem nos animais durante trinta minutos.

Os recipientes com os triatomíneos foram fixados no corpo dos animais por meio de gaze. O animal foi contido e sedado para que ficasse imóvel e os triatomíneos pudessem sugá-lo com maior intensidade.



Figura 7 - Suíno imobilizado e sedado, sendo submetido aos xenodiagnósticos com triatomíneos (seta verde) e flebotomíneos (seta amarela).

4.9 INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DE *L. chagasi* EM *Sus scrofa domesticus*

Foi construída uma pocilga de alvenaria com 2 m², telada e livre de frestas para evitar a entrada de insetos (principalmente hematófagos), em local onde não foi constatada a presença do vetor da leishmaniose visceral através do uso de armadilhas luminosas. Três suínos, fêmeas, em fase de desmame, criados confinados, com peso médio de 10 kg, negativos para anticorpos contra *L. chagasi* nos ensaios descritos acima, serviram para inoculação da *Leishmania*. Os animais apresentavam-se saudáveis, pois desde o nascimento foram isolados e cuidados para esta finalidade. Foram realizados exames parasitológicos de fezes dos animais antes da inoculação e durante a realização do experimento. Foram inoculados 10⁸ promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. chagasi*, cepa IOC Lc 2455, por quilograma de peso, em cada animal, por via intravenosa (adaptado do protocolo de GENARO 1993 para cães). Os animais foram identificados com brincos numerados, alimentados com ração balanceada, e observados diariamente, tendo sido realizada a tomada diária da temperatura retal durante os quatro primeiros meses após a inoculação. Dois hamsters foram inoculados com a mesma cepa de *Leishmania* que foi inoculada nos suínos, para servirem de controle de infectividade da mesma. Após 60 dias da inoculação, os animais passaram a ser examinados mensalmente até completar um ano do desafio, quando os mesmos foram necropsiados. Além de um exame clínico criterioso, eram realizados os seguintes procedimentos, da forma descrita nas seções 4.2 a 4.6: coleta de sangue, biópsia de pele, punção hepática, punção esplênica, punção de medula, e xenodiagnóstico com flebotomíneos. A biópsia esplênica in vivo só foi conseguida até quatro meses do experimento, pois os

animais cresceram muito e a camada de gordura espessa impossibilitava o acesso ao órgão. Parte do aspirado de medula dos animais foi utilizado para execução da técnica de PCR (após sete meses do início do experimento). As amostras destinadas para o PCR eram colocados em tubos de microcentrifuga estéreis e acondicionados em gelo. Chegando ao laboratório, imediatamente procedia a extração de DNA.

Para realizarmos estes procedimentos os animais eram sedados previamente.

4.10 NECROPSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE MATERIAL PARA PCR.

Após um ano da inoculação dos parasitos, os animais foram necropsiados, objetivando-se principalmente um posterior estudo histopatológico e ultraestrutural dos tecidos destes animais. Homogenatos de tecidos do fígado, baço e medula óssea foram inoculados em hamsters e semeados em meio de cultura, na tentativa de isolar a *Leishmania* destes animais. A grande vantagem da inoculação em hamster está no fato de que podemos utilizá-la nas condições de campo que não permitem técnicas de cultura estéreis. Contudo o período de incubação é longo (LAINSON e SHAW 1979). Também foram feitos esfregaços na tentativa de identificar formas amastigotas do parasito. Parte deste material (fígado, baço e medula óssea) foi acondicionado em tubos de microcentrifuga estéreis e colocados em caixas térmicas com gelo por no máximo duas horas, para posterior execução da técnica de PCR.

4.11 REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA.

4.11.1 Extração do DNA.

O DNA foi extraído com amostras de aspirado de medula óssea, utilizando-se o Kit *GFX™ Genomic Blood DNA Purification KIT* (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA). Quinhentos μl da solução de extração foram adicionados em tubos Eppendorf contendo 100 μl de aspirado de medula, seguido de agitação em vortex e incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi transferida para a coluna GFX e microcentrifugada a 8.000 rpm (rotações por minuto) ($\cong 5000 \times g$) por um minuto a temperatura ambiente, desprezando-se o conteúdo no tubo coletor. Adicionaram-se 500 μL da solução de extração à coluna GFX e microcentrifugou-se a coluna novamente 8.000 rpm por um minuto. Após a centrifugação, a mistura contida no tubo coletor foi novamente desprezada. Quinhentos μl da solução de lavagem foram adicionados à coluna GFX e microcentrifugados a 13.000 rpm por três minutos. Após esta etapa, desprezou-se o tubo coletor e a coluna GFX foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 ml. Foram adicionados à coluna GFX, 100 μl de água Mili-Q estéril a temperatura de 70⁰ C e incubou-se a mistura por um minuto à temperatura ambiente. Posteriormente o tubo foi centrifugado a 5000 $\times g$ para obtenção do DNA.

4.11.2 Amplificação do DNA por PCR

A reação de PCR foi realizada em ciclador de temperatura (*GeneAmp PCR System 2400 - Perkin Elmer*) e o produto da amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio a 0,002%, em tampão TAE; Tris-acetato a 0,4M, EDTA a 0,01M, pH 8,3. O corante azul-de-bromofenol/xilenocianol/sacarose (0,25%/0,25%/40%), na proporção de 1:6, foi utilizado para o acompanhamento visual das amostras durante a eletroforese. Cada reação possuiu controles negativo (medula óssea de cães saudáveis) e positivo (medula óssea de cães infectados por *L. chagasi*), para testar a presença de contaminantes e confirmar a fidelidade da reação (MATHIS e DELPLAZES 1995).

Para amplificar a região conservada do minicírculo do kDNA (DNA mitocondrial do cinetoplasto), foram utilizados oligonucleotídeos sintéticos que flanquearam a região da seqüência de DNA de interesse (primer A: 5' – (G/C) (G/C) (C/G) CC (A/C) CTAT (A/T) TTA CAC CAA CCCC; e primer B: 5'- CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC). A reação da PCR foi realizada utilizando-se um tampão Tris-HCl a 200 mM, pH 8,4, contendo 500 mM de KCl, 2,5 mM de cloreto de magnésio, e 200 μ M de uma mistura de desoxinucleosídeos trifosfato (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1 μ mol do oligonucleotídeo direto e 1 μ mol do oligonucleotídeo reverso; e 1,5 U da enzima *Taq DNA polimerase* (GibcoBRL *Life Technologies do Brasil*), em um volume final de 50 μ l. A reação foi incubada em ciclador de temperatura, consistindo de um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos e 35 ciclos de: 94° C por 45 segundos, 62° C por 45 segundos e 72° C por um minuto, mais um ciclo final de 70°C por 7 minutos (Adaptado de SCHUBACH et al. 1998).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste “Two Way Anova” foi utilizado para análise dos resultados obtidos nos testes de ELISA.

5. RESULTADOS

5.1 ANTICORPOS CONTRA LISADO TOTAL DE *Leishmania* E CONTRA O ANTÍGENO RECOMBINANTE rK 39

Após a análise sorológica dos 92 animais, foram obtidos os seguintes resultados: o ELISA em que se utilizou um lisado de promastigotas como antígeno (ELISA I) teve como resultado 41,3% de positivos (38/92) e o ELISA em que se utilizou a proteína recombinante rK39 como antígeno (ELISA II) teve como resultado 51,1% positivos (47/92). Apenas um soro com positividade no ELISA I não foi positivo no ELISA II. A diferença entre os resultados obtidos no ELISA I e o ELISA II, em termos de densidade óptica e frequência de animais soropositivos, é estatisticamente significativa ($p < 0,05$). E não há diferença estatística significativa ($p > 0,05$), em termos de densidade óptica, entre os nossos controle negativos e os soros de suínos de Santa Catarina criados confinados (tabela 1 e figuras 8 e 9).

Tabela I: Resultados do inquérito sorológico para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* na população suína de diferentes bairros da cidade de Jequié, Bahia, no período de 1996 a 1998.

Bairro	Nº de Casas Visitadas	Nº de Animais Examinados	Nº de Animais com Elisa Positivo (%)		
			ELISA I*	ELISA II**	ELISA I e ELISA II
Barro Preto	14	26	14 (53.8%)	21 (80.7%)	14 (53.8%)
Curral Novo	05	09	05 (55.5%)	05 (55.5%)	05 (55.5%)
Jequiezinho	13	20	04 (20.0%)	05 (25.0%)	04 (20.0%)
Joaquim Romão	04	18	04 (22.2%)	05 (27.7%)	04 (22.2%)
Km 3	06	07	05 (71.4%)	05 (71.4%)	05 (71.4%)
Fazenda Suíça	01	10	04 (40.0%)	04 (40.0%)	03 (30.0%)
Rodovia Barragem de Pedra	01	02	02 (100%)	02 (100%)	02 (100%)
TOTAL	44	92	38 (41.3%)	47 (51.1%)	37 (40,2%)

* utilizando um lisado de promastigotas como antígeno.

** utilizando a proteína recombinante rK39 como antígeno.

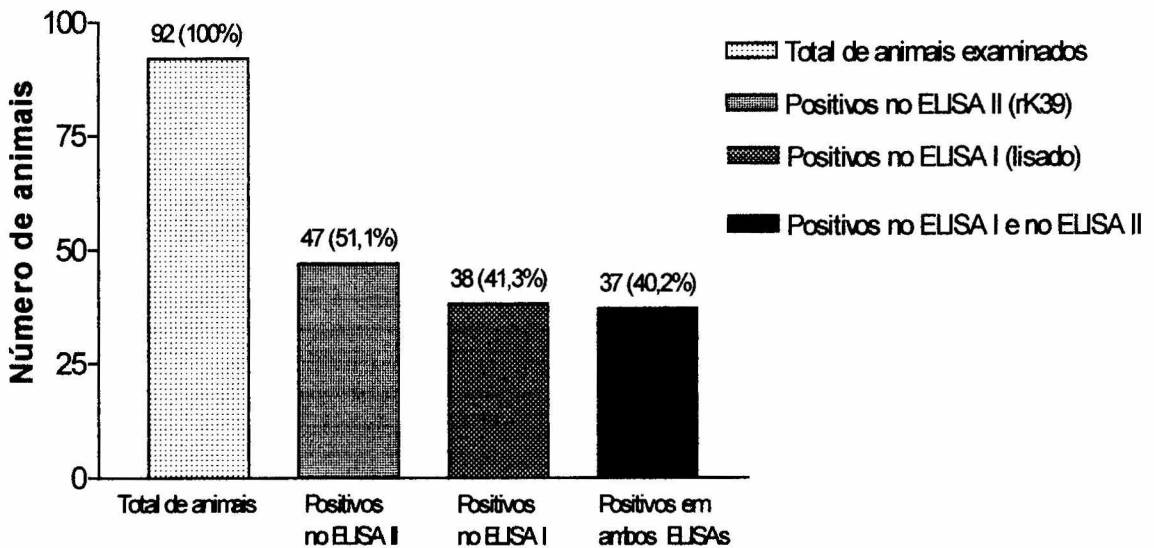


Figura 8 - Resultados obtidos nos testes de ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em suínos da cidade de Jequié BA, no período de 1996 a 1998. Os ELISAs foram realizados com lisado de promastigotas de *L. chagasi* (ELISA I) ou com a proteína recombinante rK39 (ELISA II) como antígeno. Os valores sobre cada coluna correspondem ao número de animais representado por ela e a percentagem desse número em relação ao total examinado. A diferença entre os resultados obtidos no ELISA I e o ELISA II foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

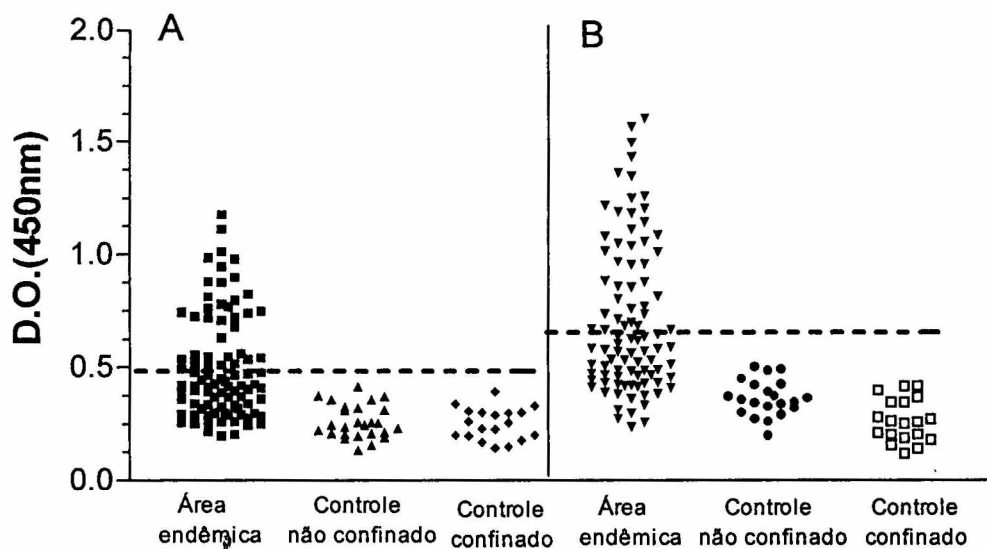


Figura 9 - Resultados obtidos nos ELISAs, para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, em suínos da cidade de Jequié, Bahia, no período de 1996 a 1998. A. Resultados obtidos utilizando lisado de promastigotas de *L. chagasi* como antígeno (ELISA I). B, resultados obtidos utilizando antígeno recombinante rK39 como antígeno (ELISA II). Cada símbolo corresponde ao resultado obtido de um animal individualmente. As linhas pontilhadas indicam os valores do "cut off" dos testes. A diferença entre os resultados obtidos no ELISA I e o ELISA II foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

5.2 ESTIMATIVA DA PREVALENCIA DE SUINOS COM ANTICORPOS ANTI-*Leishmania*

Considerando o resultado obtido no ELISA II, que é mais expressivo, a frequência encontrada na amostra foi de 51,1%. Estimamos que a prevalência de animais com anticorpos com atividade anti-*Leishmania* na população de suínos criados soltos em Jequié, no período em que foi realizada nossa amostragem, variava entre 37,5% e 64,4% (IC 95% 37,5 – 64,4; $p < 0,05$).

5.3 RECONHECIMENTO DE POLIPEPTIDEOS DE *L. chagasi* POR SORO DE SUÍNOS DE AREA ENDEMICA PARA LV

Os soros dos 20 suínos (com positividade para anticorpos anti-*Leishmania* detectáveis em ELISA) testados em “Western blot” contra polipeptídeos de *L. chagasi* reconheceram pelo menos três antígenos de peso molecular variando de 20 a 205 kDa. Os antígenos de 45,6; 54,1 e 63,7 kDa foram reconhecidos mais freqüentemente. Todos os soros, positivos no ELISA, testados reconheceram pelo menos um desses três antígenos e 80% reconheceram todos eles. Um exemplo do resultado do Western blot encontra-se na figura 10 e o número de diferentes bandas antigênicas reconhecidas pelos soros na figura 11. Cinco soros de suínos de área não endêmica testados nos mesmos ensaios não reconheceram nenhuma banda. E cinco soros de suínos de área endêmica, negativos no ELISA, reconheceram de 0 a três bandas.

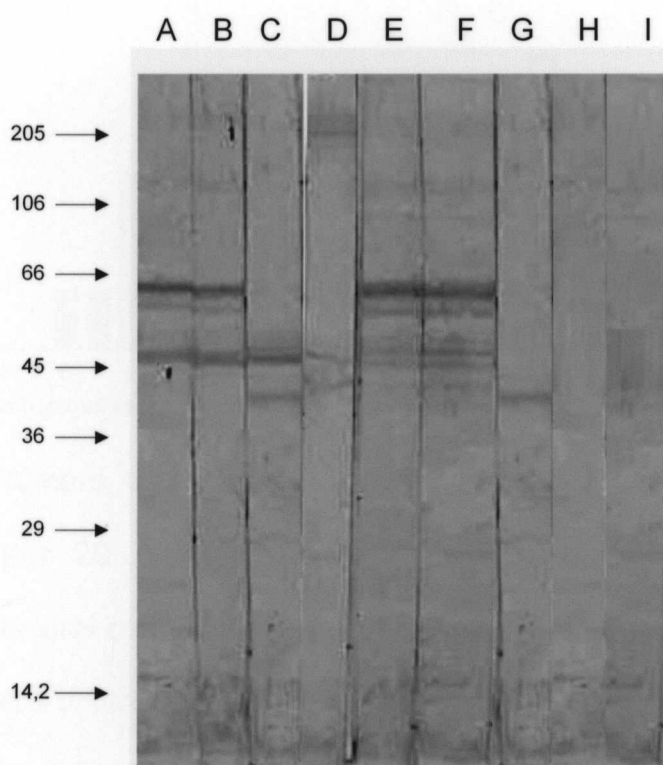


FIGURA 10 - "Western blot" de soros de suínos, de área endêmica para leishmaniose visceral humana e canina, contra lisado de promastigota de *L. chagasi*. As colunas de A a F correspondem a tiras de nitrocelulose incubadas com soros de porcos com anticorpos contra *L. chagasi* detectáveis por ELISA; as colunas de G a I correspondem a tiras incubadas com soros de suínos sem anticorpos contra *L. chagasi* detectáveis por ELISA. As posições de marcadores de peso molecular estão indicadas por setas.

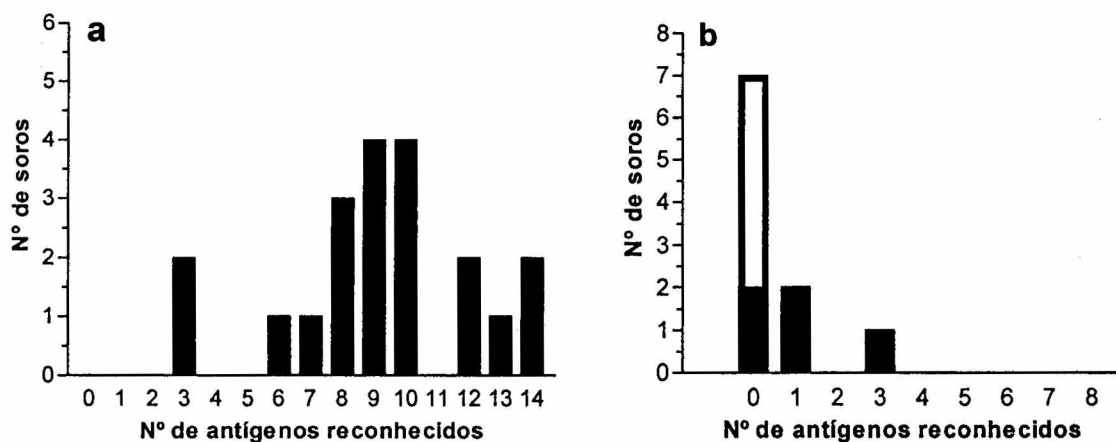


Figura 11 – Número de antígenos com diferentes pesos moleculares sendo reconhecidos por 20 soros de suínos provenientes de área endêmica de leishmaniose visceral com positividade para anticorpos anti-*Leishmania* em ELISA (a) e por 10 soros controle (b). Os soros controle foram negativos para anticorpos anti-*Leishmania* no ELISA (cinco de suínos de área endêmica e cinco de suínos de área não endêmica para leishmaniose). Os soros de região não endêmica estão representados por área da coluna não preenchida. Cada coluna representa o número de soros reconhecendo o número de antígenos indicado nas abscissas.

5.4 PESQUISA DA PRESENÇA DE *Leishmania*

Na análise microscópica dos 198 (72 de pele, 56 de fígado, 45 de baço e 25 de medula óssea), esfregaços corados, obtidos de um total de 36 animais (Tabela II) não foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania*.

No cultivo do material retirado de órgãos desses 36 suínos (Tabela II), não foi constatada a presença de formas promastigotas.

Tabela II: Numero de suínos submetidos aos diferentes exames parasitológicos, todos com resultados negativos.

Nº de animais submetidos a cada combinação de exames	PESQUISA DE PARASITOS EFETUADA APENAS EM:								
	Esfregaço de pele	Esfregaço de fígado	Esfregaço de baço	Esfregaço de medula óssea	Cultura de pele	Cultura de fígado	Cultura de baço	Cultura de medula óssea	Flebótomos
06	X				X				
02	X	X			X	X			
26	X	X			X	X			
02	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Total:	36								

A marcação com a letra X indica os exames parasitológicos que foram realizados.

5.5 XENODIAGNÓSTICO

Os xenodiagnósticos com flebotomíneos e triatomíneos em dois animais soropositivos não revelaram a presença de flagelados.

5.6 INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DE *L. Chagasi* EM *Sus scrofa domesticus*.

5.6.1 Quadro geral

Os animais apresentaram-se bastante sadios durante o experimento, tendo apenas um leve aumento de temperatura nos três primeiros meses após a inoculação da *L. chagasi*. Todos os parasitológicos de fezes foram negativos para a presença de parasitos gastrintestinais.

5.6.2 Pesquisa de formas amastigotas em esfregaços de tecidos em lâmina e cultivo para o isolamento do parasito.

Na análise microscópica dos esfregaços corados, não foram encontradas formas amastigotas do parasito. No cultivo do material retirado de órgãos dos suínos inoculados experimentalmente, não foi evidenciado parasitos, isto é, não foi identificada a presença de formas promastigotas.

Os hamsters inoculados com fragmento de órgãos (fígado, baço e medula óssea) dos animais desafiados foram necropsiados, seis meses após receberem o inóculo, e apresentavam-se negativos para presença de *Leishmania*.

Os hamsters inoculados com a mesma cepa de *L. chagasi* utilizada para infecção dos suínos apresentaram-se com um alto grau de infecção por amastigotas quando necropsiados (cinco meses após o início do experimento).

5.6.3 Evolução da resposta imune humoral.

A partir do terceiro mês após a inoculação houve um aumento significativo da atividade de anticorpo anti-*Leishmania* (isto é, atividade de ligação a antígenos de *Leishmania* em ELISA) nos soros dos animais, e esses níveis se mantiveram, com alguma oscilação, durante o período de realização do experimento. As densidades ópticas obtidas nos ELISAs foram semelhantes, o que reforça a possibilidade dos resultados expressarem uma resposta específica à *Leishmania* (figuras 12 e 13).

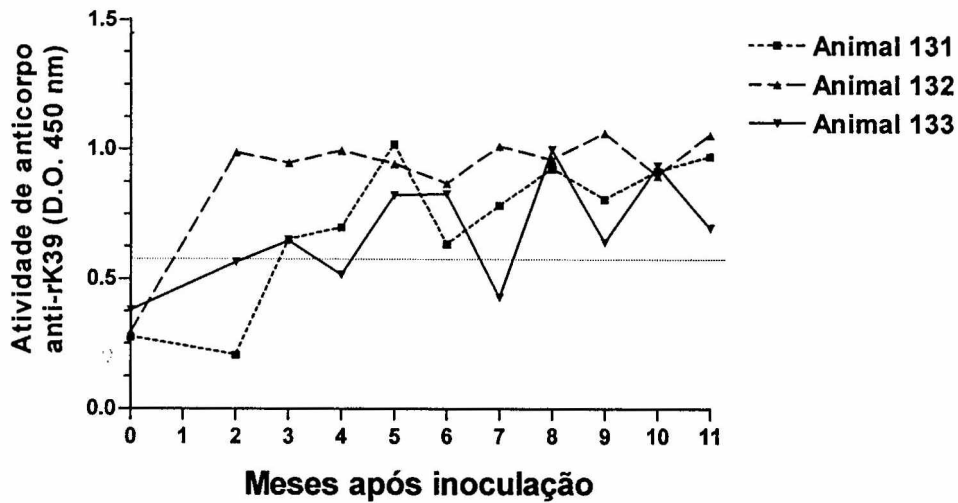


Figura 12 - Evolução da resposta imune humoral dos suínos inoculados com *L. chagasi*, medida através da semi-quantificação da atividade de anticorpos anti-rK39 por meio de ELISA. A linha pontilhada indica o valor do cut off (0,595). Cada ponto relacionado aos meses representa um dos animais do experimento.

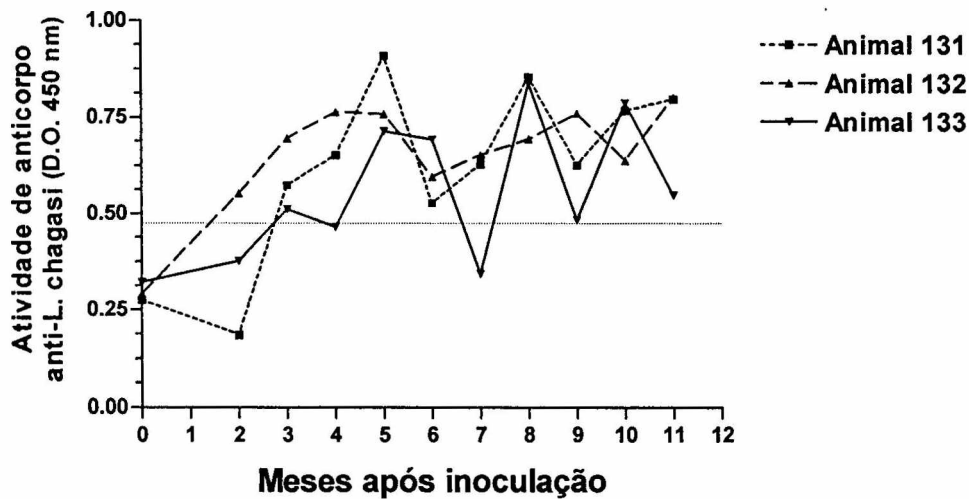


Figura 13 - Evolução da resposta imune humoral dos suínos inoculados com *L. chagasi*, medida através da semi-quantificação da atividade de anticorpos de anticorpos anti-*Leishmania* por meio de ELISA. A linha pontilhada indica o valor do cut off (0,476). Cada ponto relacionado aos meses após a inoculação representa um dos animais do experimento.

5.6.4 Xenodiagnóstico com *Lutzomyia longipalpis*

Não foi constatada a presença de flagelados nos flebótomos que foram submetidos ao repasto sanguíneo nos animais inoculados experimentalmente.

5.6.5 Reação de polimerase em cadeia

Os resultados obtidos pela reação de PCR não demonstraram amplificação do segmento de DNA esperado de 120pb da região conservada do minicirculo do kDNA de *L. chagasi* (figura 14).

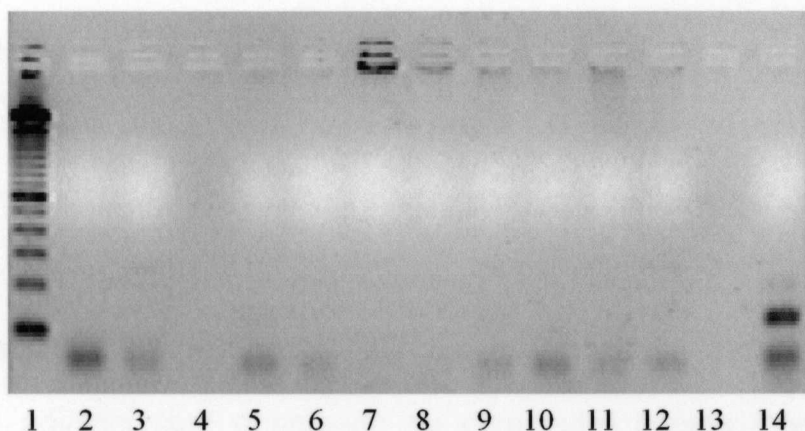


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio, de um dos nossos ensaios, demonstrando que não houve amplificação de segmento de kDNA de nossas amostras. Os números abaixo da figura correspondem ao seguinte: 1-marcador de pesos moleculares (variando de 100 a 1000 pares de bases); 2-água; 3-controle negativo; 4-poço vazio; 5 a 12-amostras teste; 13-poço vazio; 14-controle positivo.

6. DISCUSSÃO

O número de trabalhos tratando da participação dos suínos como reservatório da LV é escasso. O presente estudo é pioneiro na investigação do envolvimento desses animais na epidemiologia da LV, já que os porcos, apesar da presença constante nas áreas endêmicas, ainda não tinham sido sistematicamente investigados como possíveis reservatórios de *Leishmania chagasi*.

No período em que coletamos as amostras do presente estudo, estava ocorrendo um surto de LV nos bairros de Jequié onde elas foram coletadas, com incidência da doença humana e canina bastante elevada (NASCIMENTO et al. 1997; PARANHOS-SILVA et al. 1998). A intensa transmissão vetorial existente, tanto para os homens quanto para os cães, reforça a hipótese da possibilidade de mais um elo na cadeia epidemiológica da doença, que poderia ser representado pelos suínos.

A alta soropositividade encontrada em nosso estudo indica um contato prévio desses animais com o parasito ou com outro agente infeccioso com antígenos similares. Entretanto, mesmo que os animais estivessem infectados por *Leishmania*, a ausência de formas amastigotas na pele dos suínos indica que tais animais não seriam boas fontes de infecção para o inseto vetor. Em um estudo similar ao nosso, MUKHTAR e colaboradores (2000) encontraram altos títulos de anticorpos anti *Leishmania donovani* em animais domésticos (como boi, jumento e cabras), contudo não detectou a presença do parasito nestes animais.

A alta taxa de suínos soropositivos encontrados em nosso trabalho poderia ser explicada, em parte, pela possível existência de reação cruzada com outro

microorganismo com os quais os suínos estivessem em contato. Entretanto com a utilização de um antígeno recombinante em nosso ensaio, esta possibilidade fica menos provável, mas não impossível.

TEIXEIRA e VEXENAT (1996) e VEXENAT e colaboradores (1996) citam que na tentativa de resolver as dificuldades associadas com especificidade e sensibilidade de testes sorológicos, tem-se procurado utilizar antígenos recombinantes no diagnóstico de doenças endêmicas. Assim, diversos antígenos recombinantes têm sido isolados de genotecas de expressão de microorganismos, através de seleção com soros de pacientes portadores da infecção específica. Sua utilização tem mostrado que muitos desses antígenos apresentam grande especificidade.

Anticorpos anti-K39 são praticamente indetectáveis em pacientes humanos com tuberculose, toxoplasmose e malária, que são doenças em que ocorrem reações positivas em testes diagnósticos para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* com antígenos parasitários não fracionados (BURNS et al. 1993; BADARÓ et al. 1996). Em relação a microorganismos filogeneticamente próximos a *Leishmania chagasi*, o K39 é também bastante específico: anticorpos de pacientes infectados por *Trypanossoma cruzi* ou por espécies de *Leishmania* não visceralizante não o reconhecem (BURNS et al. 1993; QU et al. 1994; SINGH et al. 1995). No entanto, não foi investigada a possibilidade de reação cruzada do K39 com outros patógenos que infectam os suínos.

Por outro lado, através de "Western blot" foram observadas de 3 a 14 bandas reconhecidas por anticorpos dos suínos de área endêmica, o que torna bastante improvável a possibilidade de serem resultantes de uma reação cruzada

da *Leishmania* com um microorganismo filogeneticamente dela afastado. Os antígenos reconhecidos no nosso estudo são similares aos encontrados, em termos de peso molecular, através da reatividade com soros humanos por SILVANY (2001) e com soros caninos por QU e colaboradores (1998).

Com os resultados do estudo com infecção experimental, fica evidente que o *Sus scrofa doméstico* responde ao contato com *Leishmania* produzindo anticorpos circulantes. Pode-se observar que os títulos de anticorpos dos animais se mantiveram elevados até o final do experimento, sugerindo a possibilidade do *Sus scrofa domesticus* manter a infecção por *L. chagasi* em níveis indetectáveis pelos métodos de diagnósticos utilizados no nosso estudo, porém suficiente para manter o sistema imune especificamente estimulado.

Em estudo experimental com gatos domésticos, KIRKPATRIK e colaboradores (1984) observaram um desenvolvimento de elevados títulos de anticorpos, contudo não detectaram o parasito (após 24 semanas de infecção), nem sintomas de doença foram observados. CERQUEIRA (2001) inoculou *L. chagasi* em quatro eqüídeos e constatou um aumento dos níveis de anticorpos circulantes, apesar de não ter identificado o parasito nos exames parasitológicos realizados. Contudo em exame histopatológico de fragmento de fígado (obtidos pós-necropsia) de dois animais, foi constatada a presença do parasito.

A reação de polimerase em cadeia realizada em nosso estudo para analisar amostras dos animais inoculados foi negativa para amplificação de kDNA. Contudo, não se pode descartar uma inibição do ensaio, pois não houve condições de utilizar um gene constitutivo de *Sus scrofa domesticus* como controle interno do experimento.

Apesar da alta soropositividade para anticorpos anti-*Leishmania* e da diversidade dos anticorpos produzidos (comprovada por Western blot), verificada na amostragem de suínos de área endêmica estudada neste trabalho, os resultados obtidos indicam a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre a origem desses anticorpos, isto é, se eles são resultantes de contato prévio com a *Leishmania* ou de uma resposta imune cruzada. As constatações que; (1) porcos respondem à inoculação de *Leishmania* viva com a produção de anticorpos, conforme demonstrado nesta tese, (2) porcos são picados por flebótomos na área endêmica (FORATINNI 1954; DEANE e DEANE 1957; FERRO et al. 1997; SHERLOCK e GUITTON 1969; ZELEDÓN et al. 1984) e (3) flebótomos na área endêmica transmitem a *Leishmania* para mamíferos (DEANE 1962; ALENCAR et al. 1974/75; LAINSON E SHAW 1979; SHERLOCK 1996), consideradas em seu conjunto, são altamente indicativas de que a primeira constatação deve estar correta. De qualquer forma, seja qual for o resultado de futuras investigações, os suínos não parecem ser um reservatório importante de *Leishmania*, já que no estudo aqui descrito não detectamos o parasito nos animais examinados. Esta nossa afirmação é reforçada pelos nossos resultados obtidos após a inoculação experimental de *L. chagasi* nesta espécie animal, quando podemos constatar que o suíno tem pouca ou nenhuma susceptibilidade à infecção com o parasito, apenas produzindo uma resposta imune humoral bastante acentuada, semelhante à detectada na amostra coletada no município de Jequié. A importância deste animal na epidemiologia da leishmaniose visceral ficaria restrita apenas à atração do inseto vetor da infecção para próximo do peridomicílio.

7. CONCLUSÃO / SUMÁRIO DE RESULTADOS

Na cidade de Jequié, Estado da Bahia, área endêmica para LV, foi realizado um inquérito sorológico utilizando-se testes de ELISA, para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, em 92 suínos de diferentes bairros dessa cidade, seguido de um estudo experimental, tendo-se concluído que:

1. Havia alta prevalência de suínos (IC 95% 37,5 - 64,4; $p < 0,05$) apresentando anticorpos com atividade anti-*Leishmania* (determinado através dos ELISAs I e II).
2. Apesar de não podermos afirmar categoricamente que os anticorpos detectados em nossos ensaios são resultantes de infecção ou contato com *Leishmania*, o fato de vários peptídeos de *Leishmania* serem reconhecidos pelos soros dos suínos em "Western blot" sugere que a resposta foi realmente induzida por esse parasito.
3. De acordo com os nossos resultados, o *Sus scrofa domesticus* tem pouca ou nenhuma susceptibilidade à infecção por *Leishmania chagasi*.
4. O *Sus scrofa domesticus* tem a capacidade de responder à exposição a *L. chagasi*, produzindo anticorpos circulantes.
5. O *Sus scrofa domesticus* não é um bom candidato a reservatório de *L. chagasi*, sua importância na epidemiologia da leishmaniose visceral poderia estar restrita à atração e manutenção do inseto vetor no peridomicílio.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.M.; RIBEIRO, M.M.S.; LOPES, F.J.; TEIXEIRA-GOMES, L. Kalazar in Portugal - IV. The wild reservoir: the isolation of a *Leishmania* from a fox. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **77**:420, 1983.

ABRANCHES, P.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.M.; SILVA PEREIRA, M.C. Kala-azar in Portugal V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. **J. Trop. Med. Hyg.**, **87**:197-200, 1984.

ABRANCHES, P.; LOPES, F.J.; FERNÁNDEZ, P.S.; TEIXEIRA-GOMES, S. Kala-azar in Portugal. I- Attempts to find a wild reservoir. **J. Trop. Med. Hyg.**, **85**:123-126, 1982.

ALENCAR, J. E. **Calazar Canino**. Fortaleza, 1959. 342f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina da Universidade do Ceará, Imprensa Oficial.

ALENCAR, J.E.; ALMEIDA, Y.M.; SILVA, Z.F.; PAIVA, A.S.; FONSECA, M.F. Aspectos atuais do calazar no Ceará. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, **26/27**: 27-53, 1974/75.

ALENCAR, J.E.; HOLANDA, D.; CAVALCANTE, J.D.N. Calazar no vale do Jaguaribe, Ceará. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, **8**:33-47, 1956.

ANDRADE, S.L. **Leishmaniose tegumentar americana em área de ocupação recente na periferia da Cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil**. 1998. 131f. Mestrado (Dissertação em Biologia Parasitárias) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

ANDREWS, M.N. *Leishmaniasis* in the organs of a Shanghai dog. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **27**: 1, 1933.

ASHFORD, A.D.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M.C.; SAMPAIO, D.P.; BADARÓ, R. 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.**, **59**: 53-57, 1998.

BADARÓ, R. Progressos nas pesquisas de leishmaniose visceral na área endêmica de Jacobina – Bahia 1934-1989. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **21**: 159-164, 1998.

BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M.C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E.M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J.M.; HOUGHTON, R.L.; DAVID, J.R.; REED, S.G. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral *Leishmaniasis*. **J. Infect. Dis.**, **173**: 758-761, 1996.

BERGEON, C. Un cas de leishmaniose chez le chat. **Bull. Soc. Cit. Vet. Lyon.**, **30**: 92, 1927.

BETTINI, S.; POZIO, E.; GRADONI, L. *Leishmaniasis* in Tuscany (Italy) : (II) *Leishmania* from wild Rodentia and Carnivora in a human and canine *Leishmaniasis* focus. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **74**: 77-83, 1980.

BOELAERT, M.; CRIEL, B.; LEEUWENBURG, VAN DAMME W.; LE RAY, D.; STUYFT, P. van der. Visceral *Leishmaniasis* control: a public health perspective. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **94**: 465-471, 2000.

BRAGA, M.D.M.; COELHO, I.C.B.; POMPEU, M.L.M.; EVANS, T.G.; MacAULIFE, T.; TEIXEIRA, M.J.; OLIVEIRA-LIMA, J.W. 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 de filtro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **31**: 419-424, 1998.

BRAZIL, R.P.; NASCIMENTO, M.D. S.B.; MACAU, R.P. Infecção natural de um porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de leishmaniose tegumentar na ilha de São Luís, Maranhão. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **82**: 145, 1987.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. **Bol. Epidemiol.**, **3**: 15, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Controle, Diagnóstico e Tratamento de Leishmaniose Visceral (Calazar) – Normas Técnicas**. Brasília, 1996. 103p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil de 1980 a 1998. **Bol. Epidemiol.**, 1999. 48p. Edição especial.

BRUMPT, E. **Précis de Parasitologie**. 6.ed. Paris: Masson Ed., 1949. 2138p. v.2.

BURNS JUNIOR, J.M.; SHREFFLER, W.G.; BENSOR, D.R.; GHALIB, H.W.; BADARÓ, R.; REED, S.G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral *Leishmaniasis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **90**: 775-791, 1993.

CALDAS, A. J. M. **Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na ilha de São Luís – Maranhão, Brasil**. 1998. 149f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente.) – Universidade Federal do Maranhão – Centro de Ciências da Saúde, São Luís.

CANON, R.M. e ROE, R.T. **Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians**. Australian Government Publishing Service, 1982. 35p.

CERQUEIRA, E.J.L. **O papel dos eqüídeos na ecologia da leishmaniose visceral no Estado da Bahia, Brasil.** 2001. 132f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitárias) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

CHAGAS, E.; CUNHA, A.M.; CASTRO, G.O.; FERREIRA, L.C.; ROMANA, C. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada dos estudos sobre a leishmaniose visceral americana em 1936. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 32:** 321-335, 1937.

CHAGAS, E.; CUNHA, A.M.; FERREIRA, L.C.; DEANE, L.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F.N.; PAUMGARTTEN, M.J.; SÁ, B. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada dos estudos sobre a leishmaniose visceral americana em 1937. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 33:** 89-229, 1938.

COELHO, M.V.; CUNHA, A.S.; FALCÃO, A.R. Nota sobre um foco de calazar no sudoeste do Estado de Goiás. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop., 17:** 143-148, 1965.

COELHO, L. I.A.R. C.; SOUZA, J.U.; OLIVEIRA, R. Diagnóstico parasitológico em leishmanioses por método de coloração alternativo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 31:** 172-173, 1998. Suplemento. I

CORREDOR, A.; GALLEGU, J.F.; TESH, R.B.; PELAEZ, D.; DIAZ, A.; MONTELA, M.; PAULASE, M.T. *Didelphis marsupialis* an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani* chagasi in Colômbia, South America. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 83:** 195, 1989.

COSTA, C.H.N.; PEREIRA, H.F.; ARAÚJO, M.V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Rev. Saúde. Públ., 24:** 361-372, 1990.

COSTA, C.H.N.; GOMES, R.B.B.; SILVA, M.R.B.; GARCEZ, L.M.; RAMOS, P.K.S.; SANTOS, R.S.; SHAW, J.J.; DAVID, J.R.; MAGUIRE, J.H. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **J. Infect. Dis.**, **182**: 997-1000, 2000.

COSTA, C.H.N.; PEREIRA, H.F.; PEREIRA, F.C.A.; TAVARES, J.P.; ARAÚJO, M.V.; GONÇALVES, M.J.O. Is the household dog a risk factor for American visceral *Leishmaniasis* in Brazil? **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **93**: 464, 1999.

COSTA, C.H.N.; VIEIRA, J.B.F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **32**: 223-228, 2001.

COSTA, J.M.L.; VIANA, G.M.C.; SALDANHA, A.C.R.; NASCIMENTO, M.D.S.B.; ALVIM, A.C. Leishmaniose visceral no Estado do Maranhão, Brasil. A evolução de uma epidemia. **Rep. Public Health**, **11**: 321-323, 1995.

COURTENAY, O.; MACDONALD, D.W.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; DYE, C. Epidemiology of canine *Leishmaniasis*: a comparative serological study of dogs and foxes in Amazon Brazil. **Parasitology**, **109**: 273-279, 1994.

CUNHA, S.; FREIRE, M.; EULALIO, C.; CRISTOVÃO, J.; NETTO E, JOHNSON JUNIOR, W.D.; REED, S.G.; BADARÓ, R. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **89**: 155-158, 1995.

DEANE, L.M. Epidemiologia e profilaxia do calazar americano. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, **10**: 431-449, 1958.

DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizado no Estado do Ceará.** 1956. 162f. Tese (Livro Docência) - Faculdade de Medicina do Estado de São Paulo. Rio de Janeiro.

DEANE, L.M. Reservatórios da *Leishmania* Donovanii no Brasil. **Rev. Ass. Bras. Med., 7:** 161-169, 1961.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani*, no Ceará. **O Hospital, 45:** 43-47, 1954a.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Encontro de *Leishmanias* nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **O Hospital, 45:** 45-47 , 1954b.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Infecção experimental do Phlebotomus Longipalpis em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente parasitada pela *Leishmania donovani*. **O Hospital, 46:** 651-653, 1954c.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Observações sobre abrigos e criadouros de flebótomos no noroeste do Estado do Ceará. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop., 9:** 225-246, 1957.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Visceral *Leishmaniasis* in Brazil: Geographical distribution and transmission. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 4:** 198-212. 1962.

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral *Leishmaniasis* in Brazil. **Clin. Infect. Dis. 25:**1240-2,1997.

DYE, C. The logic of visceral *Leishmaniasis* control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55**:125-130, 1996.

EVANS, T.G.; TEIXEIRA, M.J.; MCAULIFFE, I.T.; VASCONCELOS, I.A.B.; VASCONCELOS, A.W.; SOUSA, A.Q.; LIMA, J.W.O.; PEARSON, R.D. Epidemiology of visceral *Leishmaniasis* in northeast Brazil. **J. Infect. Dis.**, **166**: 1124-1132, 1992.

FERRO, C.; PRADO, R.; TORRES, M.; MORRISON, A.C. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral *Leishmaniasis* in Colombia. **J. Med. Entomol.**, **34**: 719-728, 1997.

FORATINNI, O.P. Algumas observações sobre a biologia de flebótomos (Diptera, Psychodidae) em região da bacia do rio Paraná (Brasil). **Arq. Fac. Hig. Saúde Publ. São Paulo**, **8**: 14-136, 1954.

FRANKE, C.R.; STAUBACH C.; ZILLER M.; SCHLÜTER H. Trends in temporal and espacial distribution of visceral and cutaneous *Leishmaniasis* in state of Bahia, Brazil, from 1985 to 1999. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **96**: 236-241, 2002a.

FRANKE, C.R.; ZILLER M.; STAUBACH C.; LATIF M. Impact of El Niño/Southern oscilation on visceral *Leishmaniasis*, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** **8(9)**: 914-917, 2002b.

FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI D. A statistically defined edpoint titer determination meted for imumunoassays. **J. Immunol. Methods.**, **221**: 35-41,1998.

GENARO O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993. 202f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais.

GUEDES, G.E.; MAROJA, A.; CHAVES, E.; ESTÉLIO, J.; CUNHA, M.J.; ARCOVERDES, S. Calazar no litoral do Estado da Paraíba, Brasil. Encontro de 70 casos humanos e 16 caninos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **16**: 265-269, 1974.

JERÔNIMO, S.M.B.; OLIVEIRA, R.M.; MACKAY, S.; COSTA, K.G.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E.T.; LUZ, K.G.; FERNANDES, M.S.; JERNINGAN, J.; PEARSON, R.D. An urban outbreak of visceral *Leishmaniasis* in Natal, Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **88**: 386-388, 1994.

KIRKPATRICK, E.C.; FARRELL, J.P.; GOLDSCHMID, M.H. *Leishmani chagasi* and *L. Donovanii*: Experimental infections in domestic cats. **Exp. Parasitol.** **58**: 125-131, 1984.

LACERDA, M.M. The Brazilian *Leishmaniasis* control program. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **86**:489-495, 1994.

LAINSON, R. The American *Leishmaniasis*: some observations on their ecology and epidemiology. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **77**: 569-596, 1983b.

LAINSON, R. Our present knowledge of the ecology and control of *Leishmaniasis* in the Amazon region of Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **18**: 47-56, 1985.

LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J.J.; MACDONALD, D.W.; COUTENAY, O. SOUZA, A.A.A.; SILVEIRA, F.T. Amazonian visceral *Leishmaniasis* - Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ e NEIVA) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (LINN.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **85**: 135-137, 1990.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiological considerations of the *Leishmanias* with particular reference to the New World. In: FALLIS, A.M. (Ed.). **Ecology and Physiology of parasites**. Toronto: University of Toronto Press, 1971. p. 21-57.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. The rôle of animals in the epidemiology of south America *Leishmaniasis*. In: LUMSDEN, W.H.R. e EVANS, D.A. (Ed.). **Biology of the Kinetoplastida**. London : Academic Press, 1979. v. 2, p.1-116.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; LINS, Z.C. *Leishmaniasis* in Brazil: IV. The fox, *Cerdocyon thous*(L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para State, Brasil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **63**: 741-745, 1969.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIR, F.T.; FRAIHA, H. *Leishmaniasis* in Brazil. XIX: Visceral *Leishmaniasis* in the Amazon Region, and the presence of *Lutzomyia longipalpis* on the Island of Marajó, Pará State. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **77**: 323-330, 1983a.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIR, F.T.; BRAGA, R.R. American visceral *Leishmaniasis*: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **81**: 517, 1987.

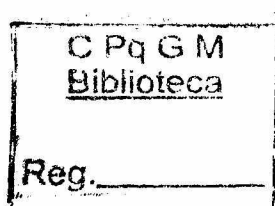
LEE, C.U. Canine *Leishmaniasis* in Peiping. **Chin. Med. J.**, **51**: 1281-1300, 1937.

LEVIN J. **Estatística aplicada a ciências humanas**. 2ed. Harper e Row do Brasil Ltda, 1978. 392p.

LIMA, J.W.O.; FIUZA, I.R.; BRANCO, F.J.D. Correlação entre a prevalência do calazar no cão e incidência no homem, em áreas endêmicas do Estado do Ceará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **29**: 146/147, 1996. Suplemento. I

LOPES, J.A.S.; SARNO, P. Leishmaniose visceral em Jacobina, Bahia, Brasil. **Bol. Fund. Gonçalo Moniz.**, **11**: 1-11, 1956.

MANCIANTI, F.; MIGNONE, W.; GALASTRI, F. Serologic survey for *Leishmaniasis* in free-living red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. **J. Wildlife Dis.**, **30**: 454-456, 1994.



MARTINS, J.; SOUZA, J.C.; SILVA, E. Primeiros casos autóctones de calazar no Espírito Santo. **O Hospital.**, **73**: 745-774, 1968.

MATHIS, A. e DEPLAZES, P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania spp.* in diagnostic samples for humans and dogs. **J. Clin. Microbiology.** **33**(5): 1145-1149, 1995.

MELLO, D.A.; REGO JUNIOR, F.A.; OSHOZO, E.; NUNES, V.L.B. *Cerdocyon thous* (L.) (Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania donovani* chagasi (CUNHA e CHAGAS, 1973) in Corumbá (Mato Grosso do Sul State, Brazil). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **83**: 259, 1988.

MELLO, G.B. Verificação da infecção natural do gato (*Felix domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. **Brasil Méd.**, **54**: 180, 1940.

MONTEIRO, O.S.; LACERDA, M.M.; ARIAS, J.R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **27**: 67-72, 1994. Suplemento. III

MOREIRA JUNIOR, E.D.; LOPES, N.L.; SILVA, R.B.B.; SOZA, V.M.M.; CRUZ, M.F.A.; NASCIMENTO, E.G. Estudo soroepidemiológico da infecção por *Leishmania chagasi* em 1304 crianças numa área endêmica da cidade de Jequié, Bahia, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **33**: 99-100, 2000a. Suplemento. II.

MOREIRA JUNIOR, E.D.; NASCIMENTO, E.G.; LÔBO, C.F.L. Urbanização da leishmaniose visceral ou ruralização da periferia dos centros urbanos? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **33**: 100, 2000b. Suplemento II.

MOREIRA JUNIOR, E.D.; SOZA, V.M.M.; CRUZ, M.F.A.; TORRES, E.B.; LOPES, N.L.; SILVA, R.B.B. Fatores de risco modificáveis para leishmaniose visceral canina (LVC): Resultados de um estudo prospectivo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **34**: 12, 2001. Suplemento I.

NADIM, A.; NAVID-HAMIDID, A.; JAVADIAN, E.; TAHVILDARI-BIDRUNI, G.H.; AMINI, H. Present status of kala-azar in Iran. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **27**: 25-287, 1978.

MUKTHAR, M.M.; SHARIEF, A. H.; EL SAFFI, S.H.; HARITH, A.E.; HIGAZZI T.B.; ADAM, A.M.; ABDALLA H.S. Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminary report. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **94**: 33-36, 2000.

NASCIMENTO, E.G.; RIBEIRO, A.R.S.; PARANHOS-SILVA, M.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J.; MELRO, M.C.; DOS-SANTOS, W.L.C.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; MOREIRA, E.D. Epidemiologia da leishmaniose visceral humana em Jequié, Bahia, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 15., 1997, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 1997.

NASCIMENTO, M.D.S.B.; COSTA, J.M.L.; FIORI, B.I.P.; VIANA, G.M.C.; FILHO M.S.G.; ALVIM, A.C.; BASTOS, O.C.; NAKATANI, M.; REED, S.; BADARÓ, R.; SILVA, A.R.; BURATTINI, M.N. Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da leishmaniose visceral no Estado do Maranhão – Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **23**: 233-240, 1996.

NICOLLE, C. Origine canine du kala-azar infantile. **Bull. Soc. Pathol. Exot.** **1**: 299-301, 1908.

NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R.S.; ALENCAR, J.E. Leishmaniose visceral canina nos arredores de Fortaleza, Estado do Ceará: inquérito sorológico utilizando a reação de fixação de complemento com antígeno extraído do bacilo da tuberculose. Observações sobre o diagnóstico e epidemiologia da doença. **O Hospital**, **52**: 111-129, 1957.

OLIVEIRA, A.C.; BATISTA, S.M.; FALCÃO, L.A. Calazar em Minas Gerais. Revisão dos dados epidemiológicos obtidos até 1958. **O Hospital**, **56**: 625-643, 1959.

OLIVEIRA, G.G.S. **Contribuição ao estudo da forma subclínica da leishmaniose visceral canina (Estudo experimental. Aspectos anatomo patológicos e laboratoriais)**. 1988. 100f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. Las condiciones de salud en las Américas. **Organ Panam Salud, Org Mundial de la Salud**, **1**: 154-160, 1994.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L.A.R.; SANTOS, W.C.; GRIMALDI JUNIOR, G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; ORIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. A cross-sectional serodiantic survey of canine *Leishmaniasis* due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55**: 39-94, 1996.

PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E.G.; MELRO, M.C.B.F.; OLIVEIRA, G.G.S.; SANTOS, W.L.C.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; ORIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for visceral *Leishmaniasis*. Implications for the disease control. **Acta Trop.**, **69**: 75-83, 1998.

PEREIRA, M.B. Contribuição para o estudo do Kala-azar infantil na região duriense. **Portugal Méd.**, **24**: 505-511, 1932.

PESSOA, S.B. Protozooses Rurais. In: **Endemias Parasitárias da Zona Rural Brasileira**. São Paulo: Fundo Editorial Prociex, 1963. p.295-599.

PONDÉ, R.; MANGABEIRA-FILHO, O.; JANSEN, G. Alguns dados sobre a leishmaniose visceral americana e doença de Chagas no Nordeste Brasileiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **83**: 259, 1942.

QU, J.Q.; ZHONG, L.; MASOOM-YASINZAI, M.; ABDUR-RAB, M.; ASKU, H.S.K.; REED, S.G.; CHANG, K.P. Serodiagnosis of Asian *Leishmaniasis* with a recombinant antigen from the repetitive domain of a *Leishmania* Kinesin. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **88**: 543-545, 1994.

REED, S.G.; SHREFFLER, V.G.; BURMS JUNIOR, J.M. e colaboradores An improved serodiagnostic procedure for visceral *Leishmaniasis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **43**: 632-691, 1990.

RIOUX, J.A.; ALBARET, J.L.; HOUIN, R.; DEDET, J.P.; LANOTTE, G. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France 2. - Les réservoirs sevaltiques. **Ann. Parasitol.**, **37**: 333-352, 1968.

ROBBINS, S.L., CONTRAN, R.S., KUMAR, V. **Pathologic Basic of Disease**.5ª ed., W.B. Saunders Company, 1994, 1399p.

SCHUBACH, A.; HADDAD, F.; PAES-OLIVEIRA NETO, M.; DEGRAVE, W.; PIRMEZ, C.; GRIMALDI Jr., G.; FERNANDES, O. Detection of *Leishmania* DNA by polimerase chain reaction in scars of treated human patients. **J. Infec. Dis.** **178**: 911-914, 1998.

SERGEANT, E.; SERGENT, E. Kala-azar existence de la leishmaniose chez lês chiens d'Alger. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, **3**: 510, 1910.

SERGEANT, E.; SERGENT, E.; LOMBARD, G.; QUILICHINI, B. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant d'un chien et d'un chat dans la même habitation. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, **5**: 93-98, 1912.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **91**: 671-683, 1996.

SHERLOCK, I. A. **Interações ecológicas da leishmaniose visceral no Estado da Bahia, Brasil**. 1997. 205f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitárias) – Instituto Oswaldo Cruz. Salvador.

SHERLOCK, I. A. Nota sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, **16**: 19-26, 1964.

SHERLOCK, I. A. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia. I – Histórico e dados preliminares. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, **21**: 523-534, 1969.

SHERLOCK, I.A.; ALMEIDA, S.P. Notas sobre leishmaniose visceral canina no Estado da Bahia. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, **22**: 231-242, 1970.

SHERLOCK, I. A.; GUITTON, N. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia - III – Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, **21**: 541-548, 1969.

SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J.C. Ecology of the visceral *Leishmaniasis* in the State of Bahia, Brasil. In: Research and control of *Leishmaniasis* in Brazil. In: PROCEEDINGS OF A NATIONAL WORKSHOP, 1993, Recife. **Anais...** Recife: Fundação Oswaldo Cruz / Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 1993.

SHERLOCK, I.A.; MIRANDA, J.C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI JUNIOR, G. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia. VI - Investigações sobre reservatórios silvestres e comensais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **21**: 23-27, 1988.

SHERLOCK, I.A.; SANTOS, A.C. Leishmaniose visceral na zona de Jequié, Estado da Bahia. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, **16**: 441-448, 1964.

SHORTT, H.E.; CRAIGHEAD, A.C.; SMITH, R.O.A.; SWAMINATH, C.S. Infection of hamsters with kala-azar by oral route. **Indian J. Med. Res.**, **17**: 335-338, 1928.

SILVA, E.S.; PIRMEZ, C.; GONTIJO, C.M.F.; FERNÁNDEZ, O.; BRAZIL, R.P. Visceral *Leishmaniasis* crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. **Vet. Record**, **147**: 421-422, 2000.

SILVANY, M.A.A. **Avaliação de antígenos recombinantes visando o desenvolvimento de teste imunodiagnóstico para leishmaniose visceral.** 2001. 139f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Federal da Bahia / CPqGM / FIOCRUZ.

SILVEIRA, F.T.; LAISON, R.; SHAW, J.J.; POVOA, M.M. *Leishmaniasis* in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox . *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of Amazonian visceral *Leishmaniasis*. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **76**: 830-832, 1982.

SINGH, S.; GILMAN-SACHS, A.; CHANG, K.P.; REED, S.G. Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen India *Leishmaniasis*. **J. Parasitol.**, **81**: 1000-1003, 1995.

SOARES, Ê. S. **Fatores de risco da leishmaniose visceral americana no distrito Barra da Fundação Nacional de Saúde do Estado da Bahia.** 1998. 30f. Universidade Federal da Bahia , Escola de Medicina veterinária, Salvador. Monografia.

TEIXEIRA, A.R.L.; VEXENAT, A.C. O real significado de exames sorológicos no diagnóstico de doenças endêmicas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **29**: 379-382, 1996.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral *Leishmaniasis*: Is time to change strategies. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, **52**: 287-292, 1995.

TRAVI, B.L.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONÇALVES, A.; VELEZ, I.D. *Didelphys marsupialis*, an important reservoir of *Trypanossoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colômbia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **50**: 557-565, 1994.

VEXENAT, A.C.; SANTANA, J.M.; TEIXEIRA, A.R.L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by Kinetoplastid Protozoa *Tripanossoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **18**: 177-185, 1996.

VIEIRA, J.B.F.; COELHO, G.E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **31**: 85-92, 1998. Suplemento II.

WHO. **Information on the epidemiology and control of the *Leishmaniasis* by country or territory**. Suíça, 1992. 47p.

ZELEDÓN, R.; MURILLO, J.; GUTIERREZ, H. Observaciones sobre la ecología de *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ e NEIVA, 1912) posibilidades de existencia de *Leishmaniasis* visceral en Costa Rica. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **79**: 455-459, 1984.