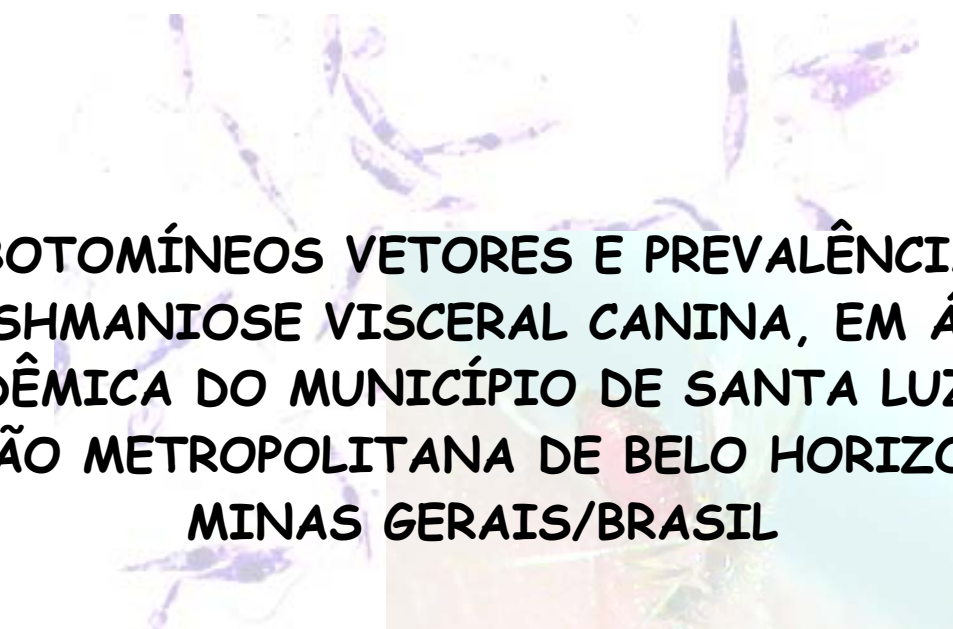


Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz / FIOCRUZ

Centro de Pesquisas René Rachou / CPqRR

Laboratório de Leishmanioses



**FLEBOTOMÍNEOS VETORES E PREVALÊNCIA DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, EM ÁREA
ENDÊMICA DO MUNICÍPIO DE SANTA LUZIA,
REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE,
MINAS GERAIS/BRASIL**



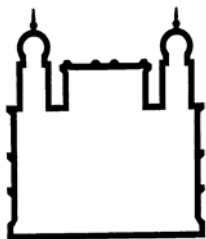
Gustavo Mayr de Lima Carvalho

Orientadora: Pesquisadora Alda Lima Falcão

Co-orientadora: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo



Belo Horizonte
2006



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ
Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

GUSTAVO MAYR DE LIMA CARVALHO

**FLEBOTOMÍNEOS VETORES E PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA, EM ÁREA ENDÊMICA DO MUNICÍPIO DE
SANTA LUZIA, REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE,
MINAS GERAIS/BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Pesquisadora Alda Lima Falcão

Co-orientadora: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

**Belo Horizonte
2006**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C331f Carvalho, Gustavo Mayr de Lima.
2006

Flebotomíneos vetores e prevalência da Leishmaniose visceral canina, em área endêmica do município de Santa Luzia, região metropolitana de Belo Horizonte / Gustavo Mayr de Lima Carvalho. – Belo Horizonte, 2006.

xviii, 129 f.: il; 29,7 x 21,0 cm.

Bibliografia: f. 107 - 126

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Pesquisas René Rachou/Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Flebotomíneos 2. Leishmaniose visceral canina 3. Santa Luzia
I. Título. II. Falcão, Alda Lima (Orientadora) III. Gontijo, Célia Maria Ferreira (Co-orientadora).

CDD – 22. ed. – 614.534

“Aprendi que crescer não significava só fazer aniversário
Que o silêncio é a melhor resposta quando se ouve uma bobagem
Que trabalhar não significa só ganhar dinheiro
Que a natureza é a coisa mais bela da vida
Que quando penso saber tudo, ainda não sei nada
Que sonhar é preciso
E finalmente aprendi... que não se pode morrer para aprender a viver.”

(Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

O meu primeiro gesto é de agradecimento a Deus – que me dá sabedoria para descobrir o correto, a vontade para elegê-lo e a força para que seja duradouro.

À D. Alda Lima Falcão, pelo exemplo de vida e dedicação à formação de várias pessoas no ramo da ciência. Pelo acompanhamento imprescindível e constante na minha formação e pelos valiosos conselhos nas minhas tomadas de decisões. Muito obrigado!

À Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (Celinha), que foi um “anjo” que não caiu do céu, mas que apareceu na minha vida no momento em que eu mais precisava. Obrigado pela orientação competente durante a realização deste trabalho e pela busca contínua do meu aperfeiçoamento.

Ao amigo José Dilermando Andrade Filho, pela participação ativa nas diversas atividades desenvolvidas até hoje, pelo grande apoio e conseqüentemente pela colaboração na minha formação profissional.

Ao chefe do Laboratório de Leishmanioses, na pessoa do Dr. Edelberto Santos Dias, pela oportunidade de desenvolvimento e concretização deste estudo científico.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, atualmente na pessoa do diretor Álvaro José Romanha, pela oportunidade concedida desde a Iniciação Científica, apoio financeiro e logístico, durante a realização deste projeto.

Ao Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde – CPqRR/Fiocruz, pelo conhecimento transmitido.

À Anna Carolina Lustosa Lima, pela assessoria nas análises estatísticas realizadas.

À amiga Ana Cristina Vianna Mariano da Rocha Lima, pela imprescindível colaboração, “braço direito” na realização das diversas etapas do projeto e pelos momentos de alegria.

Aos amigos de colaboração e força do Laboratório de Leishmanioses: Fábio Gatti de Lima, Patrícia Flávia Quaresma, Sidney Gonçalves dos Santos, Daniela Vieira Paes, Lara Saraiva,

Regina Maria de Oliveira Resende e Rogério Pereira. Muito Obrigado pelo apoio e desempenho, constante e indispensável!

Aos colegas do Laboratório de Leishmanioses: Hanna Haiane Silva Vitor, Cristiani de Castilho Sanguinette, Deborah Aparecida Alves de Carvalho, Érika Michalsky Monteiro, Eduardo de Castro Ferreira, Kênia Maria de Paula, Luciana Márcia de Oliveira e Renato de Abreu Fortes, por terem dividido comigo a alegria do trabalho em conjunto, pelo apoio e pelos conselhos.

À amiga Kenya da Silva Maciel, do Laboratório de Leishmanioses, pelo bom humor, alegria, disposição e desempenho nas tarefas do cotidiano.

Aos colaboradores da Secretaria Municipal de Saúde de Santa Luzia, setor de Zoonoses, Aloysio Nogueira da Gama Neto e Evandro Freitas Bouzada, pelo apoio logístico e pelo auxílio operacional na condução dos trabalhos de campo.

Aos moradores da área de estudo, o agradecimento pela solidariedade prestada durante o desenvolvimento dos trabalhos, tornando a realização da pesquisa mais eficiente.

Aos grandes companheiros de “idas e vindas”, Antônio José Caetano e Cláudio Raimundo Alves de Oliveira, pela condução segura nas saídas para os trabalhos de campo.

Aos companheiros da inseparável sinuca do almoço, pelas boas jogadas e risadas.

Aos amigos Alysson, Daniela Peralva, Fernanda Fortes, Daniela Nabak, Bruno Sanchez e Karla, pelas excelentes companhias no dia a dia, nos encontros de final de semana, viagens e etc...Valeu!!!

Aos amigos Luciano Augusto e Frederico Peres, por dividirem comigo vários momentos de alegria e pela presença constante em diversas fases da minha vida.

Ao casal, Ricardo Barata e Suedali Barata, pela amizade sincera, incentivo e diversos momentos agradáveis do nosso convívio.

Às minhas futuras, sogra, Ana Maria Prates e cunhada, Rafaela Prates Xavier, pela concessão de “espaço” na família, pela confiança e demonstração de afeto.

Ao meu amigo, Raul Xavier Mégre, que perpassa em minha mente, com nitidez e em “flashes” coloridos, a sua figura saudosa, exemplo de vida e caráter.

À “Vó” Anna Liese Prates, pelo enorme carisma demonstrado e pela tranquilidade contagiante.

Aos “não ainda familiares”, mas muito queridos, José Julio Mascarenhas, Flávia Mégre Mascarenhas e respectivas filhas, Luciano Souto, Lívia Mégre Souto e respectivos filhos, Sílvia Álvares da Silva Mégre e respectivas filhas e Maria Elisa Álvares da Silva Mégre, pelo tratamento atencioso e tão querido, pela amizade conquistada, força e pelos momentos agradáveis de descontração.

Aos meus gloriosos familiares: tias, tios, primas, primos, vó... a todos vocês, mesmo os mais distantes, mas sempre presentes, o meu agradecimento pela torcida empolgante e pelo desejo de minha felicidade hoje e sempre.

Ao meu querido afilhado, Fernando de Lima Sérgio (Fefê), pela alegria irradiante, gargalhadas e seu jeito único conquistador e cativante.

Aos queridos, irmã e cunhado, Daniela Mayr de Lima Carvalho e Juliano Guanais Pinto, por acreditarem em mim com tanto afínco, por sempre almejarem o meu crescimento e por demonstrarem preocupação e carinho com a minha pessoa. Obrigado!

Aos meus pais, Ronaldo e Wilmara, que na segurança de um lar bem estruturado, “desenharam” a minha personalidade e projetaram o meu caráter, fazendo de mim a pessoa feliz e vitoriosa que sou. A estrada da vida é longa e muitas vezes árdua, mas a viagem está sendo maravilhosa e graças a vocês. Muito obrigado... Amo vocês!

Ao meu Grande Amor, Ana Amélia, infindáveis agradecimentos pela doce companhia, sempre acreditando em mim, impelindo-me a constantes buscas, inculcando-me o desejo enorme de superar as minhas próprias e humanas limitações, empenhada literalmente no desenvolvimento deste trabalho... enfim aguçando a minha vontade de crescer e despertando o meu desejo de viver. Obrigado por tudo e te amo muito!

RESUMO

O Brasil enfrenta atualmente a expansão e urbanização das leishmanioses com um grande número de casos humanos e cães positivos em várias cidades de grande e médio porte. A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível. O presente trabalho avaliou aspectos epidemiológicos das leishmanioses relacionados à infecção canina e aos flebotomíneos em uma área endêmica do município de Santa Luzia/MG, com registros recentes de casos humanos autóctones de LVA e LTA. Foram realizadas coletas sistematizadas mensais durante um ano, utilizando armadilhas luminosas de Falcão e não sistematizadas, com capturas manuais utilizando o capturador de Castro. As fêmeas capturadas foram identificadas e destinadas à verificação de infecção natural através da dissecação e detecção de DNA do parasito (PCR) em “pools” específicos contendo até 20 fêmeas cada. A densidade total de flebotomíneos foi correlacionada com dados climatológicos. No estudo da infecção canina foi verificada a soroprevalência, prevalência da infecção e da doença nos cães, utilizando técnicas sorológicas (RIFI e ELISA) e moleculares (PCR) para o diagnóstico. Foram utilizadas na PCR amostras clínicas de pele, medula óssea (de 43 cães sorologicamente positivos) e sangue periférico (202 cães). O isolamento e caracterização do parasito foram realizados utilizando amostras positivas da cultura de aspirado de medula óssea e amostras clínicas positivas dos 43 cães reativos na sorologia. Foi coletado um total de 1552 exemplares, sendo 1154 machos e 398 fêmeas, pertencentes a sete espécies de flebotomíneos, sendo a mais abundante a *Lutzomyia whitmani* (75%) seguida por *L. longipalpis* (19%), que são vetoras da LTA e LVA respectivamente. Não foi observada nenhuma correlação estatisticamente significativa entre a densidade total de flebotomíneos e os dados climatológicos durante o período de estudo. Foram dissecadas 102 fêmeas pertencentes a cinco espécies e em nenhuma foi observada a presença de formas flageladas. Para a detecção através da PCR foram constituídos 11 “pools” a partir de 211 fêmeas vivas, pertencentes a cinco espécies. Em dois “pools” foi possível verificar infecção natural, sendo um de *L. whitmani*, infectado por *L. braziliensis* e um de *L. cortelezzii* infectado por *L. chagasi*. Estes resultados sugerem a possível participação de *L. whitmani* na transmissão da LTA na área de estudo e a necessidade de estudos mais aclaradores sobre o envolvimento de *L. cortelezzii* no ciclo de transmissão da LVA. No estudo da infecção canina a *L. chagasi* foi a espécie responsável pela LVC no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG. A soroprevalência, prevalência da infecção e da doença nos cães foi de 57, 54 e 16% respectivamente. A alta soroprevalência e a baixa prevalência da doença encontrada nos nossos resultados ilustram o grande problema enfrentado atualmente no diagnóstico clínico e sorológico da LVC, com uma grande quantidade de cães assintomáticos (159/201 no nosso estudo) e de diagnósticos falso-positivos (37/201) e falso-negativos (30/201). Sobre as amostras clínicas utilizadas na PCR (pele, medula óssea e sangue) podemos dizer que a amostra de sangue foi a menos eficiente no grupo dos 43 cães com sorologia positiva, entretanto esta apresentou resultados semelhantes aos observados com os métodos sorológicos na amostragem de 202 cães. Outra observação importante foi a positividade apresentada pelas amostras de pele e sangue independente da sintomatologia dos cães ($P > 0,05$), ao contrário do que foi verificado para a medula, com um número maior de cães positivos (87%) no grupo dos assintomáticos ($P < 0,05$). Assim, a alta prevalência da infecção canina e a presença predominante e abundante de espécies de flebotomíneos vetoras apresentadas nos nossos resultados podem clarear a escolha das medidas de controle mais adequadas à situação atual, pelos órgãos competentes do município. De fato há que se valorizar e incentivar novas investigações e pesquisas aplicadas como fontes importantes de informações para subsidiar o Programa de Controle das Leishmanioses no Brasil.

ABSTRACT

At present, Brazil is facing an increased urbanization of leishmaniasis with a high number of human and canine cases in several cities. The occurrence of leishmaniasis is basically determined by the presence of both a susceptible vector and a host/reservoir equally susceptible to the infection. The present investigation sought to assess leishmaniasis epidemiological aspects related with the canine infection and phlebotomine sand flies in an endemic area in the municipality of Santa Luzia, state of Minas Gerais. Recent autochthonous human cases of American cutaneous leishmaniasis (ACL) and visceral leishmaniasis (VL) have been reported in this area. Monthly sand fly collections were carried out throughout one year by means of Falcão Light Traps. During the same period, non-systematized collections were manually performed through suction tube. Female phlebotomine sand flies were identified and submitted to a natural infection assessment through dissection and parasite DNA detection by polymerase chain reaction (PCR) in specific pools including up to 20 female sand flies. The total density of phlebotomine has been correlated with climate data. In the study on canine infection, seroprevalence, prevalence of infection and the canine disease were determined by means of serological (RIFI and ELISA) and molecular (PCR) techniques. For PCR procedures, clinical samples included: skin and bone marrow from 43 serologically positive dogs and peripheral blood from 202 dogs. Parasite isolation and characterization were carried out by using positive samples from cultures of bone marrow aspirates and positive clinical samples from 43 serologically reactive dogs. A total of 1552 specimens were collected, 1154 males and 398 females, belonging to seven phlebotomine species, being the most frequent *Lutzomyia whitmani* (75%), followed by *L. longipalpis* (19%), which are ACL and VL vectors, respectively. No statistically significant correlation was observed between the total density of phlebotomine sand flies and climate data during the period of the present investigation. After dissecting a number of 102 females, belonging to five different species, no flagellate forms were found. As for PCR, the number of 211 live females, belonging to five species, comprised 11 pools for the parasite DNA detection. In two pools, natural infection was observed: one pool of *L. whitmani*, infected with *L. braziliensis* and, one pool of *L. cortelezzii* infected with *L. chagasi*. Such results suggest a likely participation of *L. whitmani* in ACL transmission in the area under study, requiring further investigation on the participation of *L. cortelezzii* in the VL transmission cycle. In the study on canine infection, *L. chagasi* showed to be responsible for VL in the local district of Baronesa, in Santa Luzia. Seroprevalence, prevalence of infection and the canine disease were 57%, 54% and 16%, respectively. The high seroprevalence and low prevalence of the canine disease found in the present study mirror one of the biggest difficulties to be overcome nowadays regarding VL clinical and serological diagnoses: a high number of asymptomatic dogs (159/201), false-positive dogs (37/201) and false-negative animals (30/201). Concerning clinical samples used for PCR (skin, bone marrow and peripheral blood), although blood has provided to be less efficient in positive serology, for the group of 43 dogs, it has shown similar results with serological techniques in the sampling of 202 animals. Another important remark concerns the positivity degree shown by skin and blood samples, regardless the symptomatology of the dogs ($P > 0.05$); differently from that shown by bone marrow samples with higher positivity (87%) in the group of asymptomatic dogs ($P < 0.05$). Thus, the high prevalence of canine infection and the predominant and abundant presence of phlebotomine sand fly vectors shown here may provide helpful data to design control measures that would be more suitable for the present condition in the municipality. Indeed, further investigation and applied research should be valued and supported in order to have important information provided for the implementation of the Leishmaniasis Control Program in Brazil.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG	38
Figura 2 – Região Metropolitana de Belo Horizonte – Município de Santa Luzia/MG	39
Figura 3 – Armadilha luminosa de Falcão modificada	40
Figura 4 – Distribuição dos pontos de coleta no Bairro Baronesa – Área urbana e área verde	41
Figura 5 – Local de captura dos flebotomíneos nas coletas não sistematizadas	42
Figura 6 – Representação do total de flebotomíneos coletados por espécies, no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – no período entre Nov/04 e Out/05	56
Figura 7 – Ocorrência de <i>L. longipalpis</i> e <i>L. whitmani</i> segundo a área de captura no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – Nov/04 a Out/05	58
Figura 8 – Distribuição por espécies das coletas não sistematizadas realizadas no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG, entre Mai/05 e Set/05	60
Figura 9 – Número de machos e fêmeas de <i>L. longipalpis</i> e <i>L. whitmani</i> capturados nas coletas não sistematizadas, Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005	60
Figura 10 – Gel de Poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata a 0,2%, mostrando produtos amplificados na PCR genérica de “pools” de fêmeas capturadas no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG	63
Figura 11 – Gel de Poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata a 0,2%, mostrando o diagnóstico específico do “pool” infectado de <i>L. whitmani</i>	64
Figura 12 – Gel de Poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata a 0,2%, mostrando o diagnóstico específico do “pool” infectado de <i>L. cortelezzii</i>	64
Figura 13 – Gel de Poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata a 0,2%, mostrando produtos amplificados na PCR do gene constitutivo do gênero <i>Lutzomyia</i> (gene da cacofonia)	65
Figura 14 – Gráfico de densidade mensal de flebotomíneos segundo variáveis climáticas no período entre Novembro de 2004 e Outubro de 2005, Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG	66
Figura 15 – Gráfico para comparação da proporção de positivos nos testes: RIFI, ELISA e PCR em amostras de sangue periférico de Cães do Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005	71

Figura 16 – Gráfico para comparação entre as amostras clínicas utilizadas nas reações da PCR – Cães Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005	71
Figura 17 – Gráfico para comparação da proporção de cães sintomáticos e positivos nos testes RIFI, ELISA e PCR sangue, Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005.....	72
Figura 18 – Gráfico para comparação da proporção de cães assintomáticos positivos nos testes RIFI, ELISA e PCR sangue, Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005	73
Figura 19 – Gráfico para comparação da proporção de cães sintomáticos positivos na PCR utilizando amostras clínicas de pele, medula e sangue, Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005	73
Figura 20 – Gráfico para comparação da proporção de cães assintomáticos positivos na PCR utilizando amostras de pele, medula e sangue, Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005	74
Figura 21 – Gráfico para comparação dos resultados obtidos na PCR das amostras de pele e sangue segundo os géis de agarose e poliacrilamida, Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005	75
Figura 22 – Gel de Poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata a 0,2%, mostrando o diagnóstico específico de amostras positivas	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Flebotomíneos coletados no período de Nov/04 a Out/05 por mês e sexo, no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG	55
Tabela 2 – Distribuição total das espécies de flebotomíneos capturadas	56
Tabela 3 – Flebotomíneos coletados mensalmente no período de Nov/04 a Out/05 por sexo e pontos de exposição das armadilhas no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG	57
Tabela 4 – Comparação da proporção de <i>L. longipalpis</i> e <i>L. whitmani</i> segundo a área de captura – Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – Nov/04 a Out/05	58
Tabela 5 – Coletas não sistematizadas realizadas entre Mai/05 e Set/05 – Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG	59
Tabela 6 – Total de Fêmeas coletadas mensalmente no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG, entre Nov/04 e Abr/05	61
Tabela 7 – Total de fêmeas coletadas mensalmente no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG, no período de Mai/05 a Out/05	62
Tabela 8 – Coletas não sistematizadas - fêmeas capturadas entre Mai/05 e Set/05 - Bairro Baronesa - Santa Luzia MG	62
Tabela 9 – Correlação entre a densidade total de flebotomíneos coletados no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG e as variáveis climáticas – Nov/04 a Out/05	66
Tabela 10 – Resultados dos testes sorológicos realizados nos cães do Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005	67
Tabela 11 – Diagnóstico molecular em amostras clínicas de cães do Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005	68
Tabela 12 – Resultados dos testes de diagnóstico para Leishmaniose Canina segundo sinais clínicos – Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005	69
Tabela 13 – Resultados da Sorologia x PCR dos cães do Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005	70
Tabela 14 – Coeficientes de concordância <i>Kappa</i> entre os testes de diagnóstico realizados	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
COBEA: Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou
CRNIF: Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos
RMBH: Região Metropolitana de Belo Horizonte
SMSSL: Secretaria Municipal de Saúde de Santa Luzia
PCL: Programa de Controle das Leishmanioses
WHO: World Health Organization
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
INMET: Instituto Nacional de Meteorologia
5° DISME: 5° Distrito de Meteorologia
SEOMA: Seção de Observação e Meteorologia Aplicada
OMS: Organização Mundial de Saúde
PSF: Programa de Saúde Família
LVA: Leishmaniose Visceral Americana
LVC: Leishmaniose Visceral Canina
LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FP: Falso-Positivos
FN: Falso-Negativos
CA: Cão assintomático
CS: Cão sintomático
NNN: Nicolle, Novy & Neal
LIT: Liver Infusion Tryptose
PCR: Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase
GPS: Sistema de Posicionamento Global
Km²: quilômetro quadrado
Km: quilômetro
mm³: milímetros cúbicos
min: minutos
µl: microlitro

DNA: Ácido Desoxirribonucléico
pb: pares de bases
M: Molar
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
mM: milimolar
HCl: Ácido clorídrico
NaCl: Cloreto de sódio
pmoles: picomoles
U: unidade
°C: Grau centígrado
Tris: Tris hidroximetilamino metano
pH: Potencial hidrogeniônico
PBS: Phosphate buffered saline
TBE: Solução de Tris-borato/EDTA
dNTP: Deoxinucleosídeos trifosfatos
KCl: Cloreto de potássio
MgCl₂: Cloreto de magnésio
kDNA: DNA do cinetoplasto
TE: Solução de Tris-EDTA
Ag: Antígeno
IgG: Imunoglobulina G
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
Fig.: Figura
IC: Intervalo de confiança

ÍNDICE GERAL

1 – INTRODUÇÃO	19
1.1 – Leishmanioses	20
1.2 – Leishmaniose Tegumentar	21
1.3 – Leishmaniose Visceral	23
1.3.1 – Leishmaniose Visceral Canina	26
1.3.2 – Diagnóstico da LVC	27
1.4 – Importância dos flebotomíneos na transmissão das leishmanioses	30
1.5 – Urbanização das leishmanioses	32
1.6 – Justificativa	33
2 – OBJETIVOS	35
2.1 – Objetivo Geral	36
2.2 – Objetivos Específicos	36
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 – Área de estudo	38
3.2 – Estudo da fauna e infecção natural dos flebotomíneos	39
3.2.1 – Métodos de captura dos flebotomíneos	39
3.2.1-1 – Coletas sistematizadas	39
3.2.1-2 – Coletas não sistematizadas	41
3.2.2 – Preparação e montagem dos flebotomíneos	42
3.2.3 – Acondicionamento das fêmeas	43
3.2.4 – Identificação específica dos flebotomíneos	43
3.2.5 – Verificação da infecção natural dos flebotomíneos	43
3.2.5-1 – Dissecção	43
3.2.5-2 – PCR dos flebotomíneos	44
3.3 – Dados climatológicos	45
3.4 – Estudo da infecção canina	45
3.4.1 – Amostra dos cães	46
3.4.2 – Método de alocação	46
3.4.3 – Trabalho de campo	47
3.4.4 – Consentimento	47
3.4.5 – Certificado de licença do projeto	47
3.4.6 – Condução do trabalho de campo	47
3.4.7 – Ficha de identificação e clínica	47

3.4.8 – Mascaramento	48
3.4.9 – Diagnóstico sorológico	48
3.4.10 – Destino dos cães positivos	49
3.4.11 – Diagnóstico Molecular	49
3.4.11-1 – Extração de DNA	49
3.4.11-2 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)	50
3.4.11-3 – PCR para amplificação do gene codificador da proteína β globina	50
3.4.11-4 – Análise dos produtos da PCR	51
3.5 – Mielocultura para isolamento dos parasitos e caracterização de amostras	51
3.6 – Processamento e análise dos dados	52
4 – RESULTADOS	53
4.1 – Estudo da fauna e infecção natural dos flebotomíneos	54
4.1.1 – Coletas sistematizadas	54
4.1.2 – Coletas não sistematizadas	59
4.1.3 – Verificação de infecção natural	61
4.1.3-1 – Dissecção	61
4.1.3-2 – PCR das fêmeas capturadas	62
4.2 – Correlação com dados climatológicos	66
4.3 – Estudo da infecção canina	67
4.3.1 – Diagnóstico sorológico e soroprevalência	67
4.3.2 – Diagnóstico molecular e prevalência da infecção	67
4.3.3 – Grupos clínicos e prevalência da doença	68
4.3.3-1 – Sorologia x PCR	70
4.3.4 – Comparação da proporção de positivos nos testes RIFI, ELISA e PCR sangue	70
4.3.5 – Comparação das amostras clínicas utilizadas na PCR	71
4.3.6 – Comparação da proporção de cães sintomáticos positivos nos testes RIFI, ELISA e PCR sangue	72
4.3.7 – Comparação da proporção de cães assintomáticos positivos nos testes RIFI, ELISA e PCR sangue	72

4.3.8 – Comparação da proporção de cães sintomáticos positivos na PCR utilizando amostras de pele, medula e sangue	73
4.3.9 – Comparação da proporção de cães assintomáticos positivos na PCR utilizando amostras de pele, medula e sangue	74
4.3.10 – Comparação da proporção de amostras positivas na PCR (pele e sangue) em géis de agarose e poliacrilamida	74
4.3.11 – PCR para amplificação do gene codificador da proteína β globina ..	75
4.3.12 – Concordância entre os testes de diagnóstico da LVC	76
4.3.13 – Mielocultura para isolamento dos parasitos e caracterização das amostras	77
5 – DISCUSSÃO	78
5.1 – Fauna flebotomínica e as leishmanioses no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG	79
5.2 – Infecção natural de flebotomíneos	82
5.3 – Cão como reservatório de <i>Leishmania</i>	88
5.4 – Leishmaniose canina no bairro Baronesa	91
5.5 – Diagnóstico da leishmaniose canina	93
5.6 – Urbanização e controle das leishmanioses	102
6 – CONCLUSÃO	104
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
8 – ANEXOS	127
8.1 – Anexo I – Ficha de identificação e clínica	128
8.2 – Anexo II – Certificado de licença do projeto (CEUA)	129

Introdução

1 – Introdução

1.1 – Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas causadas por protozoários parasitos morfológicamente similares do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), todos com grau variável de especificidade pelo hospedeiro invertebrado (Chance 1985). A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. A multiplicidade de espécies do parasito, de insetos vetores e reservatórios, diferentes ambientes, entre outros fatores, propiciam a existência de várias modalidades clínico-epidemiológicas desta parasitose (Young & Lawyer 1987, Marzochi & Marsden 1991, Ashford 1992).

No Novo Mundo, a leishmaniose humana apresenta duas formas clínicas básicas: a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). A importância das leishmanioses neste continente reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas graves, com altas taxas de mortalidade nos casos não tratados de LV e alta morbidade nos casos de LT, que podem muitas vezes levar a lesões destrutivas e desfigurantes.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera as leishmanioses como uma das principais zoonoses mundiais, com ocorrência de casos em 88 países de quatro continentes, estimando que cerca de 350 milhões de indivíduos estejam expostos ao risco de contrair alguma das várias formas clínicas que as leishmanioses podem apresentar, e que cerca de 12 milhões de pessoas se encontram realmente infectadas. Como a notificação é obrigatória em apenas 33 dos 88 países afetados pelas leishmanioses, um número substancial de casos nunca foi relatado. De fato, as ocorrências dos dois milhões de novos casos estimados anualmente, apenas 600.000 são notificados (WHO 2003).

No Brasil, as leishmanioses ocorrem em quase todos os estados. Nos últimos anos o Ministério da Saúde registrou uma média anual de 35 mil novos casos de LT e quatro mil de LV. Ultimamente tem sido observado um aumento da incidência de ambas as leishmanioses em todas as regiões geográficas do país (Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia, 2001). Provavelmente devido a sua baixa taxa de

mortalidade a LTA não tem recebido tanta atenção das autoridades públicas como a LV. Esta última, ainda assim, apresenta alta taxa de mortalidade, e ambas estão incluídas entre as seis grandes endemias a serem estudadas com prioridade pela Organização Mundial de Saúde.

1.2 – Leishmaniose Tegumentar

No Brasil a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) está associada a uma variedade de espécies de *Leishmania* dermatrópicas, estando a maior diversidade desses parasitos na Amazônia. A transmissão do agente causal de LTA envolve diferentes espécies de flebotomíneos em associações estreitas com parasitos e reservatórios, compondo os elos de diversos ciclos de transmissão que ocorrem no território nacional. As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão da LTA no Brasil são as seguintes: *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* Lutz & Neiva, 1912, *Lutzomyia migonei* França, 1920, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* Antunes & Coutinho, 1939, *Lutzomyia* (*Pyntomyia*) *fischeri* Pinto, 1926, *Lutzomyia* (*Pyntomyia*) *pessoai* Coutinho & Barreto, 1940, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *umbratilis* Ward & Fraiha, 1977, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *wellcomei* Fraiha, Shaw & Lainson, 1971, *Lutzomyia* (*Tricophoromyia*) *ubiquitalis* Mangabeira, 1942, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *complexa* Mangabeira, 1941, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *ayrozai* Barreto & Coutinho, 1940, *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *paraensis* Costa Lima, 1941 e *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *flaviscutellata* Mangabeira, 1942 (Rangel & Lainson 2003), dentre outras, baseadas em evidências tais como grau de antropofilia, infecção natural por *Leishmania* e distribuição espacial coincidente com a doença.

Alexandre Cerqueira em 1885, na Bahia, foi o primeiro a identificar a moléstia e a suspeitar do papel dos flebotomíneos como vetores. Gaspar Vianna, em 1911, propôs a denominação de *Leishmania braziliensis* para o agente específico da LTA no Brasil (Vianna 1912). Até o momento, as formas tegumentares no Brasil, são determinadas por sete espécies, cinco do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. São elas: *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (Leishmania) amazonensis*. A *L. (V.) braziliensis* e eventualmente a *L. (V.) guyanensis* são responsáveis pela forma mucosa. Os parasitos do subgênero *Viannia*, só encontrado no Novo Mundo, causam leishmaniose tegumentar, infectam uma variedade de animais silvestres incluindo roedores, carnívoros, edentados e primatas. A espécie *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* é a mais freqüentemente encontrada parasitando o homem, causando

neste hospedeiro lesões que podem ser simples ou múltiplas, com caráter extensivo e tendência a produzir metástases nasobucofaríngeas (Lainson & Shaw 1987).

A alta prevalência da infecção entre cães de áreas endêmicas, a relação próxima entre casos humanos e caninos e a identidade de parasitos infectando homens e cães, sugere o possível envolvimento destes animais como reservatórios da LTA (Falqueto *et al.* 1986, 1991, Aguilar *et al.* 1989, Yoshida *et al.* 1990, Lainson *et al.* 1994). Existe uma evidência do papel dos cães como reservatórios de LT, suportados principalmente pela correlação entre casos em humanos e cães detectados por análises clínicas e sorológicas; mas o real papel dos cães no ciclo de transmissão permanece incerto (Reithinger and Davies, 1999). Estas características compartilhadas entre cães e humanos infectados podem implicar que os cães talvez exerçam um papel na transmissão da doença ou que eles são tão susceptíveis a infecção quanto os humanos, sem uma implicação fundamental na transmissão (Padilla *et al.* 2002).

A LTA acomete mais freqüentemente os trabalhadores que invadem as florestas tropicais ou moram próximos a elas. O período de incubação varia de duas semanas a vários meses. As lesões cutâneas constituem úlceras rasas, circulares, com bordas elevadas e bem definidas e com assoalho da úlcera de aspecto granular. Nas infecções pela *L. (V.) braziliensis* a linfadenopatia regional geralmente precede o surgimento de ulcerações por uma a doze semanas. O diagnóstico definitivo depende da identificação de amastigotas em tecido ou promastigotas em meio de cultura (Gontijo & Carvalho 2003).

Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), do total de casos já registrados de leishmaniose tegumentar (LT), 90% ocorreram em apenas seis países: Irã, Arábia Saudita, Síria e Afeganistão (Velho Mundo), Brasil e Peru, na América do Sul (Desjeux 1999). A LTA ocorre nas Américas desde o Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (WHO 2003). O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile. A incidência de LTA no Brasil tem aumentado, nos últimos 20 anos, em praticamente todos os Estados. Surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazônica, relacionados ao processo predatório de colonização (Marzochi 1992). Ao analisar a evolução da LTA no Brasil, observa-se uma expansão geográfica sendo que no início da década de 80 foram registrados casos em 20 unidades federadas e nos últimos anos todas as unidades federadas registraram casos autóctones da doença. As regiões Nordeste e Norte vêm contribuindo com o maior número de casos registrados no período (cerca de 36,9% e 36,2%

respectivamente), e a região Norte com os coeficientes mais elevados (99,85/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (41,85/100.000 habitantes) e Nordeste (26,50/100.000 habitantes) (Ministério da Saúde 2003).

Desde a metade do século passado tem sido registrada em Minas Gerais a ocorrência de surtos de LTA relacionados com atividades de desmatamento para a construção de estradas e implantação de projetos agro-pastoris (Orsini 1945, Martins *et al.* 1956, Furtado *et al.* 1966). Porém, a epidemiologia da doença tem sofrido alterações ao longo das últimas décadas, sendo descritos surtos em áreas de colonização antiga (Hermeto *et al.* 1994, Gontijo *et al.* 1995) como também o aparecimento de casos em áreas periurbanas de cidades como Caratinga (Mayrink *et al.* 1979) e vários municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte – RMBH (Passos *et al.* 1993). Em Belo Horizonte a leishmaniose começou a ser estudada quando Orsini (1945) detectou 13 casos humanos de leishmaniose tegumentar americana em 1940. Furtado *et al.* (1966), estudaram a origem desses casos e sugeriram que a transmissão poderia ter ocorrido em áreas periurbanas da Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) ou poderiam ser casos importados de outros municípios.

1.3 – Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma doença crônica grave potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado (Gontijo & Melo 2004). A leishmaniose visceral foi descrita na Grécia em 1835 quando então era denominada “ponos” ou “hapoplinacon”. Em 1869, recebeu o nome “kala-jwar” que, na Índia, quer dizer febre negra ou “kala-azar” devido ao discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (Marzochi *et al.* 1981). William Leishman, em 1900, identificou um protozoário no baço de um soldado que veio a óbito na Índia, em decorrência de uma febre conhecida no local como “febre Dum-Dum” ou “Kala-azar”. Donovan encontrou o mesmo parasito em outro paciente em 1903. Ainda no mesmo ano, Laveran & Mesnil descreveram o protozoário com o nome de *Piroplasma donovani*. Leonard Rogers, em 1904, foi o primeiro a conseguir cultivar o parasito e observou que nas culturas ele era visto sob a forma flagelada. Patton, em 1907 observou as formas *Leishmania* (amastigotas) em monócitos e as formas leptomonas (promastigotas) no intestino de insetos que eram alimentados sobre pacientes com calazar (Faust *et al.* 1974).

A LV é causada por espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* (Lainson & Shaw 1987). No Brasil, o agente etiológico é a *Leishmania chagasi*, espécie semelhante à *Leishmania infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia. Existe uma grande polêmica em torno da origem da LV no Novo Mundo – se ela foi introduzida recentemente, na época da colonização européia e causada pela espécie *Leishmania infantum*, ou há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser classificada como *Leishmania chagasi*. Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone (Lainson *et al.* 1987). Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *Leishmania chagasi* e a *Leishmania infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese da introdução recente nas Américas (Mauricio *et al.* 2000).

A leishmaniose visceral é transmitida através da picada de fêmeas de insetos dípteros pertencentes à família Psychodidae, Gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Os hospedeiros silvestres da *L. chagasi* até agora conhecidos são as raposas e os marsupiais. Duas espécies de raposas foram encontradas naturalmente infectadas: *Lycalopex vetulus* no Ceará (Deane 1956); e *Cerdocyus thous* no Mato Grosso do Sul (Mello *et al.* 1988), Pará (Lainson *et al.* 1990) e em Minas Gerais (Silva *et al.* 2000). *L. chagasi* foi isolada em marsupiais do gênero *Didelphis* na Bahia (Sherlock *et al.* 1984) e no Rio de Janeiro (Cabrera *et al.* 2003). O fato destes animais possuírem hábitos sinantrópicos poderia promover a ligação entre os ciclos silvestre e doméstico. Os cães são considerados os mais importantes reservatórios domésticos e talvez os responsáveis pela grande mudança no perfil epidemiológico desta doença (Marzochi *et al.* 1994), que inicialmente estabeleceu-se em áreas rurais e peri-urbanas e que recentemente vem aumentando significativamente seu número de casos nos grandes centros urbanos, com o surgimento de focos em áreas até então indenes. O cão e a raposa apresentam um intenso parasitismo cutâneo, que permite a fácil infecção dos flebotomíneos (Deane & Deane 1954). Entretanto, é provável que em algumas situações específicas, existam outras fontes de infecção e que o homem esteja envolvido na cadeia de transmissão (Deane & Deane 1955 a e b, Badaró *et al.* 1994).

No ciclo de vida da *L. chagasi*, agente etiológico da LV no Novo Mundo, a transmissão ocorre, principalmente, através da picada de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912, embora trabalhos recentes tenham demonstrado a possibilidade de *Lutzomyia evansi* (Travi *et al.* 1996) e *Lutzomyia cruzi* (Galati *et al.* 1997, Santos *et al.* 1998), agirem como vetores, na Colômbia e Brasil, respectivamente. Outras

espécies podem abrigar, mesmo que experimentalmente, a *L. chagasi*, mas sem efeito sobre a transmissão da doença, pois se acredita na existência de certa especificidade do vetor para as espécies de *Leishmania* (Sherlock 1997, Lainson & Shaw 1998).

A leishmaniose visceral clássica acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos. Em alguns focos urbanos estudados existe uma tendência de modificação na distribuição dos casos por grupo etário, com ocorrências de altas taxas também no grupo de adultos jovens (Silva *et al.* 2001).

Considerada a mais severa das formas clínicas, a leishmaniose visceral, no homem, caracteriza-se por febre irregular de longa duração, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, hiperglobulinemia, edema, epistaxe, hematêmese, emagrecimento e debilidade progressiva. Quando não tratada em tempo, freqüentemente evolui para morte, como consequência do estado clínico do paciente (Alencar 1959).

O primeiro relato da leishmaniose visceral no Brasil foi feito em 1934, quando foram encontradas amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela (Penna 1934). Somente 20 anos depois é que se registrou o primeiro surto da doença em Sobral, no Ceará (Deane 1956). Em meados dos anos 80, constatou-se uma transformação drástica na distribuição da LV. Atualmente, a LV é endêmica em 62 países, com um total estimado de 200 milhões de pessoas sob risco de adquirirem a infecção. Aproximadamente 90% dos casos ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (WHO 2001).

O Brasil representa 90% dos casos humanos nas Américas (Grimaldi *et al.* 1989), com a doença distribuída em 19 das 27 unidades federadas e em 1600 municípios. A média anual é de 3.500 casos novos com uma taxa de letalidade em torno de 6%. No ano de 2004, houve um aumento desta taxa para aproximadamente 8%. Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos de LV ocorreram na Região Nordeste e atualmente esta região representa 74% do total de casos do país. O aumento do número de casos registrados, nos anos recentes em outras regiões, pode ser explicado pela modificação do padrão de ocorrência geográfica, com registros de casos em centros urbanos, como Belo Horizonte, Natal, São Luís, Teresina, Fortaleza, Montes Claros, Araçatuba, Imperatriz, Timon, Caxias e mais recentemente Palmas

e Campo Grande. Esta expansão da área tradicional de ocorrência a doença, é decorrente do intenso processo migratório da população rural de áreas endêmicas para a periferia das cidades de médio e grande porte. Além disso, o processo de organização da rede assistencial, associada ao melhor preparo para diagnóstico e tratamento, proporcionou uma maior detecção dos casos (Ministério da Saúde 2003).

Em vários municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) têm sido registrados casos autóctones de LV desde o final da década de 80 (Genaro *et al.* 1990). Belo Horizonte ilustra claramente o processo de urbanização das leishmanioses nas cidades brasileiras. Desde 1993 a cidade convive com a leishmaniose visceral, introduzida a partir de um município vizinho e tanto o número de casos humanos quanto caninos aumentaram na RMBH, indicando uma elevação da taxa de transmissão da doença nesta área (Silva *et al.* 2001). A proximidade entre as habitações, a alta densidade populacional, a adaptação dos vetores ao ambiente modificado e a grande suscetibilidade da população à infecção contribuíram para a rápida expansão da LV no ambiente urbano. De fato, na Região Metropolitana de Belo Horizonte, o percentual de municípios com notificação elevou-se de 6, no biênio 94/95, para 15 no biênio 98/99 (Profeta da Luz *et al.* 2001). As medidas de controle implementadas foram ineficientes tanto na eliminação da transmissão como na prevenção de novas epidemias.

1.3.1 – Leishmaniose Visceral Canina

A alta prevalência da infecção canina em áreas endêmicas, a estreita convivência entre humanos e cães e a mesma identidade dos parasitos isolados de casos humanos e caninos, sugerem a participação destes animais como reservatórios da infecção (Oliveira *et al.* 2001, Silva *et al.* 2001). No ambiente doméstico o cão é considerado um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores, sendo um dos alvos nas estratégias de controle da LV (Zerpa *et al.* 2003).

A existência da leishmaniose canina é relatada por um grande número de estudos epidemiológicos que levam em conta o contato íntimo entre flebotomíneos e hospedeiros vertebrados infectados, permitindo o desenvolvimento do ciclo biológico das espécies de *Leishmania*. Algumas espécies de canídeos preenchem as condições para serem incriminados reservatórios de *L. infantum* (= *L. chagasi*), pois carregam o parasito servindo de fonte de infecção para flebotomíneos, constituindo o ciclo silvestre. Entretanto, devido à baixa carga

parasitária e distância das habitações destes animais das moradias humanas, eles não são considerados como principais reservatórios para a ocorrência da infecção no homem. Por serem animais sinantrópicos, as raposas podem fazer a conexão entre o ciclo silvestre e o doméstico que é mantido pelos cães que atuam como reservatórios domésticos da infecção (Alvar *et al.* 2004).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença crônica, sistêmica e os sinais clínicos frequentemente incluem linfadenopatia, dermatites, alopecia, ulcerações cutâneas, onicogribose, locomoção anormal, anorexia (perda de apetite), perda de peso, caquexia, lesões oculares, epistaxes, anemia, diarreia e insuficiência renal (Koutinas *et al.* 1999). Cães severamente afetados não sobrevivem à doença. Entretanto, mais da metade dos animais infectados permanecem assintomáticos. Existem vários estudos sugerindo que a taxa de infecção canina é muito superior aos achados em investigações sorológicas (Solano-Gallego *et al.* 2001).

A porcentagem de cães infectados vivendo em áreas onde a leishmaniose canina é endêmica tem grandes implicações em saúde pública. Alguns autores mostraram que cães infectados, mesmo assintomáticos, são fontes do parasito para flebotomíneos vetores sugerindo um papel ativo destes cães na transmissão de *Leishmania* (Molina *et al.* 1994, Guarga *et al.* 2000). Porém, são necessários mais estudos para certificar o potencial de cães assintomáticos em transmitir *Leishmania* aos flebotomíneos vetores. Recentemente, outro mecanismo de transmissão da *L. infantum* (= *L. chagasi*) em cães tem sido relatado, a transmissão via transfusão de sangue (Owens *et al.* 2001, Giger *et al.* 2002, Freitas *et al.* 2005). A transfusão sangüínea é uma prática constante na rotina da medicina veterinária e geralmente envolve o uso do sangue total podendo ser uma potencial fonte de infecção e disseminação da LVC (Freitas *et al.* 2006).

1.3.2 – Diagnósticos da LVC

A fim de reduzir a transmissão de *Leishmania* de cães para os vetores e devido à severidade da doença nestes animais, é necessário diagnosticar a LVC o quanto antes possível e por isto, há necessidade da utilização de técnicas de diagnóstico sensíveis e específicas. Alguns métodos de diagnóstico, como o exame parasitológico, cultura de aspirados de medula óssea e inoculação em hamster, são altamente específicos, mas não muito sensíveis (Piarroux *et al.* 1994). Essa sensibilidade é frequentemente diminuída devido a problemas de

contaminação da cultura e às dificuldades na manutenção de hamsters por um período relativamente longo de incubação. A inoculação em hamsters é dificultada devido ao alto custo ou a ausência de colônias mantidas em condições estéreis. A detecção de parasitos pelo exame microscópico de secreções é dependente da presença de muitos organismos no aspirado ou na amostra de tecido coletada.

Os testes sorológicos, de detecção de anticorpos específicos, são provavelmente os mais utilizados para a determinação da prevalência da infecção nos cães, por serem de fácil execução e fornecerem informações valiosas em curto tempo (Scalone *et al.* 2002, França-Silva *et al.* 2003). Entretanto, estes testes podem identificar uma exposição ao parasito, sem necessariamente indicar infecção ativa (Strauss-Ayali *et al.* 2004), o que pode complicar as medidas de controle da LV. Assim, os principais procedimentos convencionalmente utilizados para o diagnóstico sorológico da LVC incluem: reação de fixação de complemento (Hockmeyer *et al.* 1984), hemaglutinação direta (Harith *et al.* 1986), hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta (Badaró *et al.* 1983, 1986) e ELISA-enzyme-linked immunosorbent assay (Badaró *et al.* 1986). Porém, as mais utilizadas são a imunofluorescência indireta (RIFI) e a ELISA, devido à alta sensibilidade e especificidade das mesmas em comparação às demais (Badaró 1983, Guimarães *et al.* 1990). Em áreas endêmicas do Brasil, cães são periodicamente examinados através da sorologia, principalmente usando a RIFI. Contudo, essa técnica não permite a identificação de todos os cães positivos, fazendo com que um número significativo de cães infectados passe por negativo. Esse fato é relevante e pode ser muito grave, já que existe uma suspeita de que esses cães falso-negativos continuem servindo de fonte de infecção para os flebótomos do local.

Testes sorológicos resultam em um alto nível de reações cruzadas e, além disto, não podem discriminar entre infecções passadas e atuais (Schulz *et al.* 2003). É muito frequente haver reações cruzadas com outras protozooses quando se emprega a RIFI como método de triagem de cães infectados por *Leishmania*. Técnicas mais rápidas, simples e sensíveis têm sido testadas para a detecção da infecção canina. Oskam *et al.* (1996) avaliaram um novo teste de aglutinação direta (DAT) baseado em antígeno estável e liofilizado para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em soros caninos. Os resultados mostraram uma sensibilidade de 100% e especificidade de 98,8%. A técnica combina altos níveis de validade intrínseca e facilidade de execução. Ferreira (2005), em um estudo comparativo envolvendo as técnicas sorológicas RIFI, ELISA e DAT para diagnóstico da LVC, mostrou de forma clara que o DAT foi o teste mais específico. Nos testes de reação cruzada, o DAT apresentou o melhor

desempenho, sendo indicado o seu uso em regiões onde ocorram simultaneamente a LV, LT e ou Doença de Chagas. E ainda neste estudo, foi verificada uma concordância maior entre os testes ELISA e DAT, já que estes apresentaram maiores sensibilidade e especificidade em relação à RIFI, além de se mostrarem altamente reprodutíveis, sendo estes os testes sorológicos mais indicados nos casos em que forem necessárias mais de uma técnica de diagnóstico.

A erradicação da infecção de *Leishmania* em cães e conseqüentemente a erradicação da LV humana não são alcançadas, sem que sejam tomadas medidas de controle em relação aos animais assintomáticos soropositivos (Cardoso *et al.* 2004), uma vez que na maioria das regiões endêmicas de LV canina, os cães são assintomáticos e muitas vezes não são eliminados, devido à recusa do proprietário, mantendo o reservatório do parasito e o ciclo da doença, na presença de flebotomíneos vetores.

Na última década, o uso da PCR (polymerase chain reaction) para a demonstração de DNA de *Leishmania* em diferentes hospedeiros tem mostrado alta especificidade e sensibilidade. Vários estudos demonstraram esta alta especificidade e sensibilidade da PCR, quando comparada com as técnicas sorológicas de diagnóstico. Uma variedade de tecidos de cães, incluindo medula óssea, baço, linfonodos, pele e conjuntiva, tem sido utilizada como fonte de DNA de *Leishmania* para o diagnóstico da LV. Diversos iniciadores desenhados para amplificar seqüências alvo de multicópias, como os minicírculos do cinetoplasto, assim como métodos de amplificação, têm sido desenvolvidos e aplicados na técnica da PCR (Ashford *et al.* 1995, Mathis & Deplazes 1995, Berrahal *et al.* 1996, Reale *et al.* 1999, Roura *et al.* 1999, Campino *et al.* 2000, Quinnell *et al.* 2001, Fisa *et al.* 2001, Martín-Sanchez *et al.* 2001, Solano-Gallego *et al.* 2001). Entretanto, os diversos “primers” existentes devem ser testados antes de serem usados como método padrão de diagnóstico de infecção por *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*) do Velho e Novo Mundo, devido à possibilidade de ocorrer diversidade entre as amostras isoladas de regiões geográficas distintas (Cortes *et al.* 2004). A técnica da PCR ainda não foi padronizada para sua utilização no diagnóstico de rotina da doença, devido principalmente ao seu alto custo. Além disso, existe uma outra limitação que é a facilidade com que as reações podem se contaminar devido à presença de amplicons de DNA amplificado no ambiente. Porém, esta limitação pode ser evitada ao se utilizar ambientes isolados para cada uma das etapas do processo.

1.4 – A importância dos flebotomíneos na transmissão das leishmanioses

A subfamília Phlebotominae inclui todos os psicodídeos de importância médica. Alguns autores consideram que os flebotomíneos constituem uma família à parte, a família Phlebotomidae (Williams 1993), mas, como essa alteração gera ainda muita polêmica, os flebotomíneos são aqui incluídos na família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Os flebotomíneos são aqui incluídos na família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Os flebotomíneos são dípteros psicodídeos e, como tais, são insetos de pequeno porte medindo de 2 a 3 mm, apresentando em seu corpo intensa pilosidade. Como todos dípteros, são insetos holometábolos tendo em seu ciclo vital as fases de ovo, larva, que compreende quatro estádios, pupa e, finalmente, adulto. Distinguem-se, entretanto, dos demais insetos dessa família, por apresentarem corpo mais delgado, pernas mais longas e delgadas, além de suas fêmeas necessitarem de sangue para a produção de ovos, razão pela qual foram agregados pelos taxonomistas na subfamília Phlebotominae (Brazil & Gomes Brazil 2003). Existem cerca de 460 espécies de flebotomíneos nas Américas (Galati 2003). No Brasil estes insetos estão presentes em grande número, por todo o território nacional e cerca de 40 espécies são comprovadas ou suspeitas de transmitirem leishmanioses.

A capacidade vetorial das distintas espécies de flebotomíneos é determinada pela aptidão das formas do parasito de sobreviver, se multiplicar e se diferenciar dentro do trato digestivo do inseto, a fim de serem transmitidas aos vertebrados (Rangel & Lainson, 2003). Killick-Kendrick (1987), revisando vários estudos de infecções naturais ou experimentais em laboratório, sugere que as espécies do gênero *Lutzomyia*, os flebotomíneos do Novo Mundo, são mais susceptíveis a infecções por distintas espécies de *Leishmania* do que os do gênero *Phlebotomus*, flebotomíneos existentes no Velho Mundo. Os flebotomíneos são os vetores naturais de alguns agentes etiológicos de doenças humanas e de animais, como protozoários do gênero *Leishmania* e outros tripanossomatídeos, bactérias do gênero *Bartonella* e numerosos arbovírus. Após a colonização de flebotomíneos em laboratório, esses dípteros têm sido utilizados como fonte e ferramenta para diversas pesquisas no campo da biogenética, da bioquímica e da biologia molecular, o que aumenta ainda mais a sua importância sanitária (Sherlock 2003).

As fêmeas de flebotomíneos, excluindo raríssimas espécies autógenas, necessitam do sangue de vertebrados para a maturação de seus ovários, daí a importância na transmissão de agentes patogênicos. Algumas espécies alimentam-se de sangue apenas uma vez entre as posturas, enquanto outras podem tomar refeições sanguíneas múltiplas durante um único ciclo

de oviposição, tornando-as vetoras mais eficientes. Os machos sugam apenas sucos vegetais ou açúcares, o que a fêmea também costuma fazer antes ou após a alimentação sangüínea (Sherlock 2003).

Algumas espécies de flebotomíneos picam exclusivamente determinadas espécies de vertebrados, porém, outras têm hábitos oportunistas, picando indiferentemente várias espécies de mamíferos. Atualmente, uma grande variedade de animais já foi identificada como hospedeiros alimentares de flebotomíneos (Tesh *et al.* 1971, Boreham 1975, Lainson & Shaw 1979, Christensen *et al.* 1982), inclusive infectados por alguma espécie de *Leishmania*. A presença de animais domésticos e silvestres no peridomicílio atrai um grande número de flebotomíneos, e conseqüentemente espécies vetoras de leishmanioses, contribuindo assim, para o aumento do risco de transmissão da doença (Forattini 1953, 1960, 1976, Gomes *et al.* 1983, Brazil *et al.* 1991).

Os flebotomíneos distribuem-se por quase todas as regiões faunísticas do mundo, representados por diversas espécies. São mais abundantes na Região Neotropical, com maior número de espécies e densidade que flutua de acordo com a estação climática. Os métodos de localização geográfica de precisão utilizam atualmente GPS e as imagens satélite, para verificação da distribuição e dispersão de espécies de flebotomíneos importantes como vetoras (Sherlock 2003).

A distribuição geográfica de determinada espécie depende de sua capacidade em se adaptar a diferentes nichos ecológicos (Freire-Maia 1988). Apesar da pouca mobilidade mostrada pelos flebotomíneos, várias espécies apresentam ampla distribuição geográfica e algumas têm sido consideradas como importantes vetoras. Este fato, somado aos diferentes aspectos epidemiológicos das leishmanioses, incluindo os diferentes reservatórios encontrados para esta parasitose, têm dificultado muito as medidas de controle e vigilância nas áreas endêmicas, fazendo crescer significativamente o número de casos e óbitos humanos por LV.

O controle das leishmanioses em áreas endêmicas requer o conhecimento da distribuição geográfica de *Leishmania* spp. através da identificação de hospedeiros reservatórios e espécies vetoras potenciais envolvidas na transmissão do parasito. Na maioria dos estudos epidemiológicos, quando um flebotomíneo é encontrado com infecção natural existe uma necessidade urgente de identificação acurada da *Leishmania* spp. com o objetivo

de estabelecer a verdadeira relação vetor-parasito na natureza. Os métodos comumente utilizados são penosos e consomem muito tempo na pesquisa do parasito em loco, após a dissecação do trato digestivo do inseto (Pita-Pereira *et al.* 2005). Entretanto, com o aperfeiçoamento das técnicas baseadas em DNA, a pesquisa molecular tem sido usada como uma ferramenta para a detecção e identificação de *Leishmania* em flebotomíneos silvestres (Barker 1989, Silva & Grunewald 1999). Neste contexto, a técnica da PCR tem sido a mais comumente empregada com amostras entomológicas de diferentes regiões geográficas (Feliciangeli *at al.* 1994, Perez *et al.* 1994, Aransay *et al.* 2000, Michalsky *et al.* 2002, Jorquera *et al.* 2005).

Observações baseadas em dados epidemiológicos e/ou experimentais sugerem ou incriminam algumas espécies de flebotomíneos como transmissoras das leishmanioses, associadas às espécies de *Leishmania* pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Porém, apenas algumas espécies têm sido consideradas como importantes vetoras, com base em evidências tais como grau de antropofilia, infecção natural e distribuição espacial coincidente com a doença (Rangel & Lainson, 2003). Os vetores envolvidos na transmissão são principalmente espécies de flebótomos do gênero *Lutzomyia* e dos subgêneros *Nyssomyia* e *Psychodopygus* (Lainson & Shaw 1987). Dentre elas as mais comumente incriminadas em várias regiões do Brasil são *L. whitmani* e *L. intermedia*, vetoras de LTA, com diversos relatos de infecção natural por *L. braziliensis*. *L. longipalpis* é considerada como principal vetora da LVA no Brasil, baseado em vários estudos de infecção natural e experimental com *L. chagasi*, aspectos comportamentais biológicos e ecológicos desta espécie, além da distribuição coincidente com a doença.

Maiores estudos considerando a ocorrência de *Leishmania* nas diferentes espécies de flebotomíneos é essencial para uma melhor compreensão da ecoepidemiologia das leishmanioses e melhoria das medidas de controle da doença.

1.5 – Urbanização das leishmanioses

O Brasil enfrenta atualmente a expansão e urbanização das leishmanioses com um número grande de casos humanos e cães positivos em várias cidades de grande e médio porte. O ciclo de transmissão que anteriormente ocorria no ambiente silvestre e rural hoje também se desenvolve em centros urbanos (Gontijo & Melo 2004).

A chegada das populações carentes para periferias urbanas desprovidas de habitações condignas e de infra-estrutura sanitária, convivendo com animais domésticos tem contribuído enormemente para a urbanização das leishmanioses em áreas metropolitanas, somando-se a isto as condições epidemiológicas favoráveis, associadas à redução do espaço ecológico natural desta zoonose. Entretanto, a principal condição de transmissibilidade nesses novos ambientes está na adaptação dos vetores (Marzochi & Marzochi 1997).

A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível. O padrão focal na ocorrência das leishmanioses nas populações humanas sugere que um reservatório deve estar mantendo o parasito e servindo como fonte de infecção para o inseto vetor (Gontijo & Melo 2004).

Pelo fato da urbanização ser um fenômeno relativamente novo pouco se conhece sobre a epidemiologia das leishmanioses nos focos urbanos. As relações entre os componentes da cadeia de transmissão no cenário urbano parecem ser bem mais complexas e variadas do que no rural (Gontijo & Melo 2004). Portanto, é importante se conhecer a fauna de flebotomíneos em área urbana de transmissão, e a indicação da(s) possível(is) espécie(s) vetora(s) é fundamental, já que cada espécie apresenta sua peculiaridade biológica e ecológica, e este conhecimento pode racionalizar as ações de controle.

Um entendimento da interação entre as mudanças ambientais urbanas, cães e flebotomíneos vetores é um pré-requisito para a projeção de estratégias apropriadas de medidas de controle e prevenção das leishmanioses (Costa *et al.* 1999). Assim, a compreensão dos fatores sócio-econômicos, políticos e sociais que afetam nosso país, são essenciais nas decisões que envolvem as estratégias de controle das endemias existentes no nosso território nacional.

1.6 – Justificativa

Em Minas Gerais, no período de 1988 a 1999, a média anual do número de casos notificados de LTA foi de 1.910 e de LVA, 127. Neste mesmo período, verificou-se aumento expressivo de municípios com registro de leishmaniose. Em 1999, a LTA foi notificada em 400 municípios e a LVA em 47, representando ambos, o dobro de municípios com a doença, se comparado a 1988 (SES/MG: dados não publicados). Na Região Metropolitana de Belo

Horizonte (RMBH), com população residente predominantemente urbana, casos autóctones de LTA e LVA têm sido registrados pelos órgãos oficiais de saúde desde 1987 e 1989, respectivamente (Genaro *et al.* 1990, Passos *et al.* 1996). Nos últimos anos a soroprevalência canina em Santa Luzia aumentou significativamente, atingindo 23,0%, 18,5% e 31,6% nos anos de 2001, 2002 e 2003 respectivamente. O número de casos humanos acompanhou este perfil, com um total de 54 casos de leishmaniose tegumentar registrados no período de 2001 a 2005, e 120 casos confirmados de LV registrados no período de 2000 a 2005, sendo que só no ano de 2005 foram registrados 26 casos da LV neste município. No período de 2000 a 2004 a leishmaniose visceral foi registrada em 27 municípios pertencentes à Região Metropolitana de Belo Horizonte, totalizando 785 casos confirmados, sendo que o número anual foi crescente com 58 casos em 2000, 85 em 2001, 163 em 2002, 185 em 2003 e 294 no ano de 2004. O município de Santa Luzia ocupa o terceiro lugar no total de casos confirmados (94), perdendo apenas para Belo Horizonte (356) e Ribeirão das Neves (103) (Diretoria de Ações Descentralizadas de Saúde de Belo Horizonte 2005 – dados não publicados).

Baseado neste número crescente de casos humanos de leishmanioses registrados nos últimos anos no município de Santa Luzia, Minas Gerais, o presente trabalho estudou aspectos epidemiológicos desta parasitose relacionados à infecção canina e aos flebotomíneos, em uma área endêmica deste município.

Objetivos

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo geral

Estudar aspectos epidemiológicos das leishmanioses no bairro Baronesa, Santa Luzia, relacionados à infecção canina e aos flebotomíneos.

2.2 – Objetivos específicos

1. Realizar o levantamento da fauna de flebotomíneos;
2. Verificar a infecção natural por *Leishmania* nas fêmeas de flebotomíneos capturadas;
3. Correlacionar a densidade total de flebotomíneos com os dados climatológicos durante o período de coletas;
4. Determinar a soroprevalência, a prevalência da infecção e a prevalência da doença canina através de técnicas sorológicas e/ou moleculares;
5. Comparar e avaliar a concordância entre os métodos de diagnóstico da leishmaniose canina;
6. Caracterizar através de técnicas moleculares as amostras de *Leishmania* isoladas de cães e flebotomíneos.

Materiais e Métodos

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Área de estudo

O estudo foi realizado no município de Santa Luzia, em área de transmissão vigente de Leishmaniose Visceral, previamente estabelecida de acordo com os casos humanos autóctones registrados nos últimos dois anos pela Secretaria Municipal de Saúde de Santa Luzia. A área escolhida foi o Bairro Baronesa, que apresentou casos humanos de ambas as leishmanioses, além, da alta prevalência da leishmaniose canina (Fig.1).



Fig.1 – Bairro Baronesa – Santa Luzia/MG

Santa Luzia é um dos municípios pertencentes à Região Metropolitana de Belo Horizonte (MG), constituído por uma área de 235Km² e 209.000 habitantes (IBGE 2004) (Fig.2). Distanciada a 18 km de Belo Horizonte (latitude 19°48' sul, longitude 43°54' oeste e altitude 751 metros), apresenta clima ameno e temperatura anual em torno de 22,2 C°. A economia desta região é baseada na indústria e pecuária. O município teve seu primeiro caso autóctone de LV em 1997 e neste mesmo ano foi registrado o primeiro óbito por esta parasitose. Em 1998, o Departamento de Vigilância Sanitária e Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Santa Luzia deu início ao Programa de Controle de Leishmanioses (PCL) com a realização de visitas domiciliares periódicas, coleta de amostras de sangue para diagnóstico dos cães e borrifação das casas. Os cães positivos são retirados e sacrificados. Entretanto, o que tem sido observado é que desde 1999 a prevalência de LV canina e humana tem aumentado significativamente, com 26 casos humanos confirmados em 2005 (SMSSL: dados não publicados).

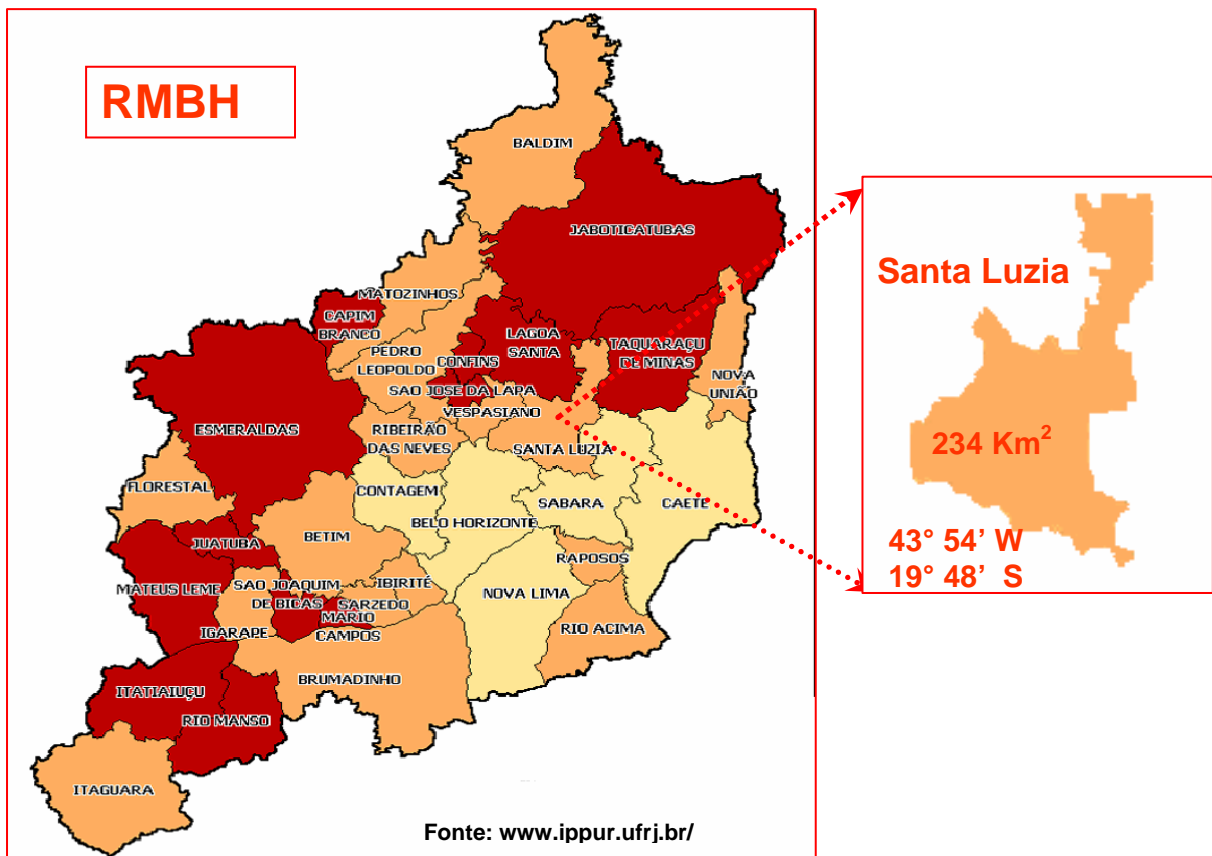


Fig.2 – Região Metropolitana de Belo Horizonte – Município de Santa Luzia/MG

3.2 – Estudo da fauna e infecção natural dos flebotomíneos

3.2.1 – Métodos de captura dos flebotomíneos

3.2.1-1 – Coletas sistematizadas

A coleta sistematizada dos flebotomíneos foi realizada durante o período de um ano, com capturas mensais, destinadas ao estudo da fauna, bem como à observação de infecção natural das fêmeas.

Para a realização das capturas mensais foram utilizadas 17 armadilhas luminosas de Falcão (Falcão 1981) modificadas (Fig.3). A armadilha de Falcão modificada consta de um tubo de PVC, que apresenta na sua parte superior uma pequena abertura circular, onde está inserida uma lâmpada de três volts, e na abertura inferior, encontra-se um motor de seis volts, cujas hélices criam um fluxo de ar sugando os insetos atraídos pela luz para o interior do tubo e impedindo que os mesmos retornem para o exterior, ficando retidos em uma rede de fina

espessura que recobre toda a abertura inferior. As armadilhas apresentam uma bateria de seis volts, em substituição às pilhas, responsável pela iluminação e pelo giro do motor.



Fig.3 – Armadilha luminosa de Falcão modificada

Os pontos de coleta foram selecionados de forma aleatória, abrangendo ao máximo a área selecionada para a realização do estudo, o Bairro Baronesa. Também foram realizadas coletas em área de vegetação secundária, subjacente ao bairro, destinadas ao estudo comparativo das espécies coletadas nos domicílios selecionados. As armadilhas foram expostas no peridomicílio, em locais previamente estabelecidos, sendo estes locais propícios à presença dos flebotomíneos, tais como canis, galinheiros, chiqueiros, ou ainda, locais com vegetação mais intensa. Cabe ressaltar que as armadilhas foram expostas tentando diminuir ao máximo, a interferência de outras fontes de luz presentes, minimizando a possível competição com a isca luminosa da armadilha.

Foram utilizadas 17 armadilhas, sendo que 14 armadilhas foram expostas na área urbana do bairro e três armadilhas foram expostas na verde (Fig.4). Na figura 4, a letra **A** corresponde ao somatório das três armadilhas expostas na área verde, e as letras de **B** a **O** correspondem às armadilhas expostas na área urbanizada.

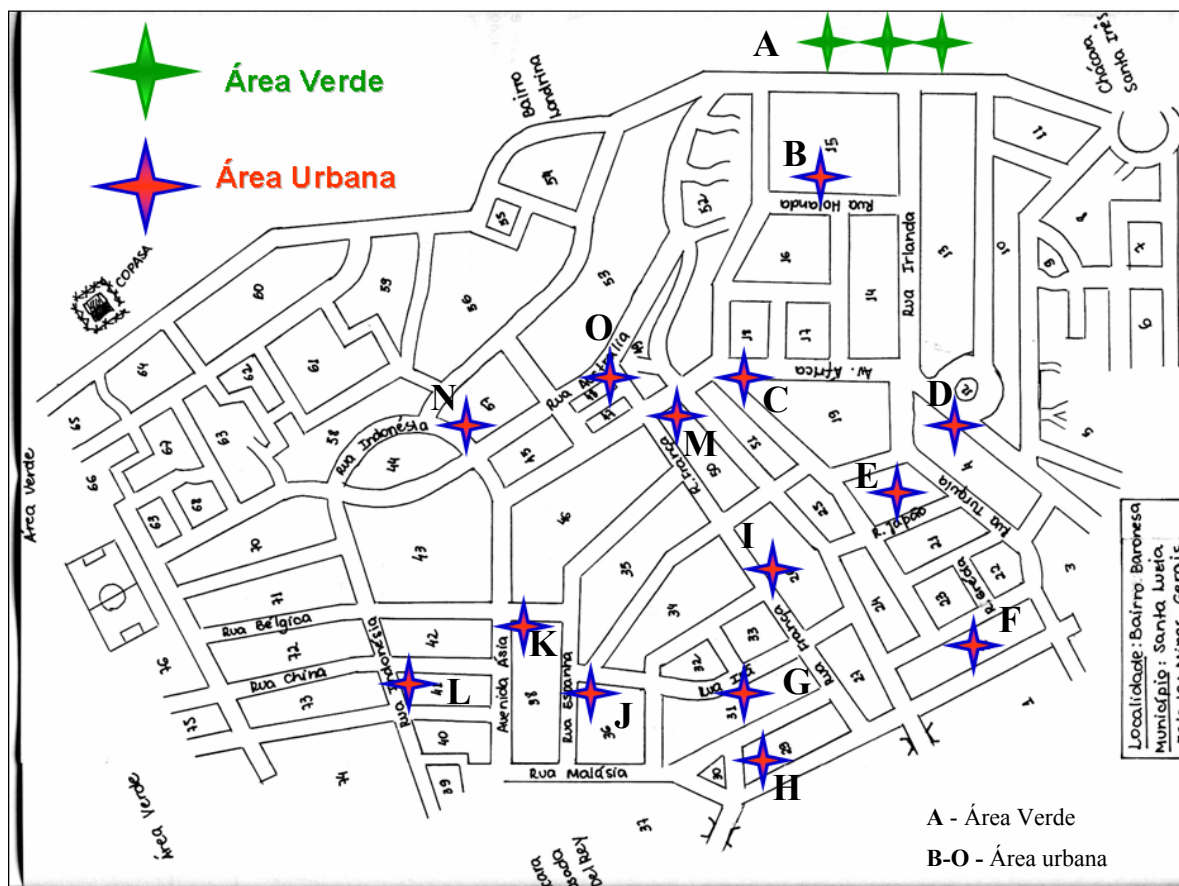


Fig.4 – Distribuição dos pontos de coleta no Bairro Baronesa – Área urbana e área verde

A exposição das armadilhas teve duração de 12 horas ininterruptas, sendo ligadas aproximadamente às 18 horas e retiradas às 6 horas do dia seguinte.

3.2.1-2 – Coletas não sistematizadas

As coletas não sistematizadas foram introduzidas no decorrer do projeto, no sexto mês de captura, com o objetivo principal de aumentar o número de exemplares fêmeas, destinados à verificação de infecção natural. Além disto, a introdução de outro método possibilitaria a captura de uma maior diversidade de espécies de flebotomíneos que constituem a fauna local.

A princípio foi introduzida a captura com a Armadilha de Shannon, que consiste de uma armação central em forma retangular, com duas superfícies externas igualmente de pano. No campo, a armadilha deve permanecer suspensa e fixada por meio de corda em quatro pontos amarrados em árvores ou a estacas. Em seu interior podem ser colocados outros atrativos, como fonte de luz, ou em alguns casos, animais. Neste caso, considera-se que o homem também pode funcionar como atrativo, objetivando avaliar a antropofilia. Os insetos atraídos são coletados nas paredes da armadilha, através do capturador de Castro (ou tubo

aspirador). Não obtendo sucesso com este método de captura, foi verificado que os flebotomíneos não estavam sendo atraídos para a armadilha de Shannon, que utilizava como isca principal a luz, mas se encontravam em grande número bem próximo da instalação da armadilha, mais precisamente no local onde se encontravam dois cães (Fig.5). Assim sendo, foi utilizado apenas o método manual de captura, com aspirador de sucção (capturador de Castro), diretamente no local onde se encontravam os flebotomíneos.



Fig.5 – Local de captura dos flebotomíneos nas coletas não sistematizadas

3.2.2 – Preparação e montagem dos flebotomíneos

As armadilhas foram encaminhadas ao laboratório, para realização da triagem e sexagem dos flebotomíneos. Os machos foram sacrificados em vapor de éter, acondicionados em tubos de ensaio contendo álcool a 70° e posteriormente preparados, montados e identificados, de acordo com as técnicas de rotina adotadas pelo Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos (CRNIF) do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. As fêmeas mantidas vivas foram destinadas à pesquisa de infecção natural, as demais também foram preparadas, montadas e identificadas como os machos.

3.2.3 – Acondicionamento das fêmeas

As fêmeas vivas provenientes de ambas as coletas, sistematizadas e não sistematizadas, foram utilizadas para a observação de infecção natural. Para isto, eram acondicionadas em potes apropriados para criação, mantidos em condições ideais de umidade e temperatura, sendo alimentadas apenas com solução açucarada, até o momento de identificação específica, para posterior pesquisa de parasitos.

3.2.4 – Identificação específica dos flebotomíneos

Todos os insetos provenientes das capturas realizadas foram identificados até ao nível de espécie através de microscopia óptica, dando prioridade à observação de estruturas que seguem a proposta do (Grupo Cipa 1991) e seguindo a classificação de (Young & Duncan 1994).

As fêmeas utilizadas para a pesquisa de infecção natural, foram identificadas através das espermatecas, utilizando-se para isto, o último segmento do abdômen. Também foi utilizada como caractere taxonômico, para a identificação específica, a visualização do cibário das fêmeas, mantendo no momento da dissecação a parte ventral da cabeça voltada para cima.

3.2.5 – Verificação da infecção natural dos flebotomíneos

Foram utilizados dois métodos de verificação de infecção natural nas fêmeas capturadas. Nos primeiros seis meses a pesquisa de infecção foi realizada através da dissecação do trato digestivo das fêmeas. Nos seis meses restantes, este estudo foi realizado através da pesquisa de DNA do parasito nas fêmeas capturadas. Este último método foi realizado utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.2.5-1 – Dissecação

Este procedimento teve por objetivo permitir a visualização de parasitos no interior do intestino das fêmeas de flebotomíneos de forma a demonstrar a infecção natural das mesmas. Consistiu em retirar todo o tubo digestivo dos insetos em solução salina com o auxílio de dois estiletes entomológicos sobre uma lâmina de microscopia em microscópio estereoscópio.

Retirado o intestino, o material foi recoberto com lamínula fazendo-se então a pesquisa de parasitos ao microscópio óptico (Gontijo 1989).

Caso encontrado alguma forma flagelada, estas seriam inoculadas em hamster associadas ao conteúdo de glândulas salivares de *Lutzomyia longipalpis* com o objetivo de aumentar a capacidade de infecção das mesmas. Observada positividade no hamster inoculado, seria realizado o isolamento do parasito, através de biópsia da lesão, para meio de cultura e posterior caracterização da amostra.

3.2.5-2 – PCR dos flebotomíneos

As fêmeas destinadas à verificação de infecção natural através da pesquisa de DNA foram identificadas e separadas em “pools” por espécie. Cada “pool” era constituído de 20 fêmeas, todas pertencentes à mesma espécie. Também foram utilizados como controles negativos, dois “pools” de fêmeas de *L. longipalpis* provenientes da colônia existente no laboratório e livres de infecção por leishmânias. Os controles positivos eram constituídos de fêmeas de *L. longipalpis* e DNA extraído de culturas de *Leishmania braziliensis* e *L. chagasi*.

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit comercial de extração GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation (Amersham Biosciences). O “pellet” de DNA foi ressuspendido em 100 µl da solução de hidratação.

O par de iniciadores escolhido para realização da PCR e detecção de *Leishmania* spp foi determinado a partir da região conservada do minicírculo da molécula de DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania*. As seqüências dos iniciadores utilizados para realização da técnica são as seguintes: Primer A: 5’-(G/C)(G/C)(C/G)CC (A/C)CT AT(A/T) TTA CAC AAC CCC 3’ e Primer B: 5’ GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3’ (Degrave *et al.* 1994). Para a amplificação do DNA foi utilizada a técnica de “hot start” conforme descrita por Michalsky *et al.* (2002) em equipamento termociclador automático (Perkin-Elmer-GeneampPCRSistem 2400).

Nas amostras positivas para a PCR genérica foi realizado o diagnóstico específico. Foram utilizados pares de iniciadores específicos para *L. infantum*, segundo metodologia descrita por Cortes *et al.* (2004), os pares de iniciadores B1/B2 específicos para espécies do complexo *L. braziliensis* (De Bruijn & Barker 1992) e M1/M2 específicos para espécies do

complexo *L. mexicana* (Eresh *et al.* 1994) de acordo com os protocolos descritos por Gomes *et al.* (1995).

A técnica de extração do DNA a partir das fêmeas foi avaliada utilizando um par de iniciadores que amplificam um gene constitutivo do gênero *Lutzomyia*, o gene da cacofonia, região IVS6 com a seguinte seqüência: 5Llcac [5'-GTGGCCGAACATAATGTTAG- 3'] e 3Llcac [5'CCACGAACAAGTTCA ACATC-3'] (Lins *et al.* 2002). O método para a amplificação do DNA foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Pita-Pereira *et al.* (2005).

A análise dos produtos da PCR foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata 0,2%. O marcador de peso molecular utilizado foi o ØX174, digerido por Hae III, com 11 fragmentos variando de 72 a 1357pb. Aplicou-se no gel 10µl da solução: 5µl de tampão (bromofenol blue) e 5µl do produto amplificado.

3.3 – Dados climatológicos

Os dados climatológicos de temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e pluviosidade (mm³), referentes ao período de estudo foram obtidos junto à Gerência de Zoonose, Belo Horizonte/MG. A coleta dos dados foi realizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), 5º Distrito de Meteorologia (5º DISME), Seção de Observação e Meteorologia Aplicada (SEOMA).

3.4 – Estudo da infecção canina

A soroprevalência, a prevalência da infecção e da doença dos cães na área foram calculadas através de estudo seccional no início dos trabalhos. Na observação do status clínico, os cães foram classificados em assintomáticos e sintomáticos. Foram considerados sintomáticos os cães que apresentavam sinais clínicos sugestivos da doença, tais como: emagrecimento, alopecia localizada e/ou generalizada, opacificação das córneas, ceratoconjuntivite, onicogribose, edema de patas, ascite e hemorragia. Os demais cães foram classificados como assintomáticos.

3.4.1 – Amostra dos cães

Para o cálculo da amostra de cães a serem trabalhados no estudo, foram considerados alguns parâmetros, de acordo com o “Cálculo de amostra para determinar prevalência” (WHO, 1995). Estes parâmetros estão citados abaixo:

- (1) prevalência esperada da infecção canina na área de estudo: para isto foi utilizada uma média das prevalências obtidas nos últimos três anos, através de exames sorológicos realizados no município pela Secretaria Municipal de Saúde de Santa Luzia;
- (2) número total de cães do bairro, estimado através da última campanha de vacinação contra a raiva (setembro de 2004);
- (3) intervalo de confiança a 95%;
- (4) precisão de 50%.

O cálculo da amostra foi realizado com a ajuda do Microsoft Excel. Sabendo-se que a população total de cães do bairro é estimada em 1200 e que a prevalência média de leishmaniose visceral canina está em torno de 20%, a amostra calculada para este estudo foi de 205 cães.

3.4.2 – Método de alocação

Para garantir representatividade da população canina da área e evitar vício de seleção, o seguinte processo foi utilizado para amostragem dos cães a serem investigados:

- (1) Divisão da área de estudo de acordo com o Programa de Saúde da Família (PSF) do bairro;
- (2) Seleção aleatória dos domicílios por área subdividida; realizada de acordo com o roteiro de visitas da equipe do PSF.

Este método de alocação para a seleção da amostra de cães que participariam do estudo foi testado anteriormente através de uma coleta piloto na região, verificando a viabilidade de condução deste método, verificando também as possibilidades de vício na amostragem.

A equipe do PSF foi responsável pela distribuição dos convites para a realização da coleta de sangue dos cães. A escolha dos domicílios foi feita aleatoriamente de forma a abranger todo o bairro.

3.4.3 – Trabalho de campo

O trabalho de campo foi realizado por uma equipe composta de dois técnicos responsáveis pela coleta de sangue e um veterinário que foi responsável pelo exame clínico dos animais, observando os sinais da leishmaniose visceral canina.

3.4.4 – Consentimento

Os proprietários dos cães que participaram do estudo foram comunicados sobre o objetivo deste estudo, solicitando o seu consentimento para a autorização da participação do cão no trabalho.

Os cães receberam um número de identificação de acordo com a ordem de entrada na pesquisa. Os mesmos números foram utilizados para identificação das amostras de sangue coletadas.

3.4.5 – Certificado de licença do projeto

Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados conforme as recomendações do Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação (COBEA), e em concordância com a Lei n°. 6.638, de 8 de maio de 1979, que estabelece normas práticas Didático-Científicas de conduta de pesquisa em animais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ recebendo a licença de número P.0243/05 (Anexo II).

3.4.6 – Condução do trabalho de campo

Todos os cães amostrados foram examinados para posterior preenchimento das fichas clínicas-epidemiológicas. Para a identificação da soroprevalência dos cães foram coletadas amostras de sangue e utilizados os testes sorológicos RIFI e ELISA, por serem testes com boa sensibilidade. Uma alíquota do sangue coletado foi congelada a -20°C para utilização no diagnóstico molecular. Foram considerados cães infectados aqueles que apresentaram pelo menos uma amostra clínica positiva na PCR e cães doentes quando a sorologia e/ou PCR positiva estava associada a sinais clínicos da leishmaniose. Um grupo de cães com sorologia

positiva foi utilizado na pesquisa parasitológica (molecular e mielocultura), para posterior comparação e tentativa de isolamento do parasito.

3.4.7 – Ficha de identificação e clínica

Na ficha clínica foram anotados os sinais e sintomas que são importantes na identificação da doença e as seguintes informações dos animais: idade, sexo, raça e procedência (Anexo I).

3.4.8 – Mascaramento

Para evitar o vício na interpretação dos resultados, os técnicos que processaram os testes no laboratório receberam as amostras codificadas e não tiveram conhecimento prévio dos animais que apresentavam sinais ou sintomas de leishmaniose. Os exames de laboratório foram processados de forma independente.

3.4.9 – Diagnóstico sorológico

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* nas amostras coletadas foi determinada através dos testes RIFI e ELISA. Para a execução dos testes foram incluídos soros apropriados para controle negativo e positivo das reações.

A *Reação de Imunofluorescência Indireta* (RIFI) foi realizada a partir de soro diluído em solução tampão fosfato (PBS – NaCl 15mM, Na₂HPO₄ 0,72 mM, NaH₂PO₄ 0,28mM) utilizando-se o kit para imunofluorescência indireta para diagnóstico de leishmaniose canina produzido por BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ. A reação antígeno-anticorpo é evidenciada pelo conjugado de anti-imunoglobulina de cão com isotiocianato de fluoresceína (FITC) em microscópio de fluorescência. Sua execução foi realizada de acordo com as especificações do fabricante em soros diluídos a partir de 1:40 até 1:1280.

A *Reação Imunoenzimática* (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay) permite a determinação de um resultado quantitativo pela detecção de imunoglobulinas da Classe IgG (anti – *Leishmania sp.*) presentes no soro canino. Os princípios do teste de ELISA são: os anticorpos específicos de animais positivos irão se ligar aos antígenos fixados à parede da

placa pelo processo de sensibilização; após o procedimento da primeira lavagem para remover o excesso de material e de anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania* não ligados aos antígenos, adiciona-se o conjugado anti-IgG de cão que se ligará especificamente aos anticorpos anti - *Leishmania*, resultando na formação de um complexo sanduíche: Ag Leish + IgG cão anti-Leish + Anti IgG cão-peroxidase. Após a segunda lavagem para remover o conjugado excedente não ligado, os complexos ligados são detectados pela incubação com substrato (OPD). Há o aparecimento da cor amarela que muda para laranja pela adição do ácido sulfúrico usado para interromper a reação enzimática; a intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de IgG anti-*Leishmania* presente na amostra.

3.4.10 – Destino dos cães positivos

Este trabalho foi realizado em cooperação com a Secretaria Municipal de Saúde de Santa Luzia/Setor de Zoonoses e de acordo com as medidas do Programa de Controle de Leishmanioses (PCL) do município. Todos os cães com exames sorológicos positivos foram retirados dos domicílios e sacrificados no canil do setor de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Santa Luzia. Cabe ressaltar que antes de serem sacrificados, foram coletados outros tecidos de alguns cães para posterior diagnóstico parasitológico (molecular e mielocultura).

3.4.11 – Diagnóstico Molecular

Para o diagnóstico molecular foram utilizadas alíquotas do sangue periférico total de todos os cães amostrados e punção de medula óssea e fragmento de pele da orelha de alguns animais com sorologia positiva. Todas as amostras clínicas coletadas foram congeladas e utilizadas como fonte de DNA para as reações de amplificação.

3.4.11-1 – Extração de DNA

Foi utilizado o Kit comercial (GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA) específico para amostras de sangue periférico total e medula óssea, conforme as especificações recomendadas pelo fabricante e para a extração de DNA do fragmento de pele foi utilizado o kit comercial de extração GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation (Amersham Biosciences).

3.4.11-2 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O par de iniciadores escolhido para realização da PCR e detecção de *Leishmania* spp foi determinado a partir da região conservada do minicírculo da molécula de DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania*. As seqüências dos iniciadores utilizados para realização da técnica são as seguintes: Primer A: 5'-(G/C)(G/C)(C/G)CC (A/C)CT AT(A/T) TTA CAC AAC CCC 3' e Primer B: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3' (Degrave et al., 1994). O método para a amplificação do DNA foi a técnica de “hot start” conforme descrita por Michalsky et al., 2002. Um equipamento termociclador automático (Perkin-Elmer-GeneampPCRSistem 2400) foi utilizado para a amplificação.

Para o diagnóstico específico das amostras positivas na PCR genérica foi realizada a PCR segundo metodologia descrita por Cortes et al., 2004 utilizando o par de iniciadores MC1/MC2 específicos para *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*). As amostras positivas na PCR genérica e negativas na PCR específica para *L. infantum* foram testadas com os iniciadores B1/B2 específicos para espécies do complexo *L. braziliensis* (de Bruijn & Barker, 1992) e M1/M2 específicos para espécies do complexo *L. mexicana* (Eresh et al., 1994) de acordo com os protocolos descritos por Gomes et al. 1995.

3.4.11-3 – PCR para a amplificação do gene codificador da proteína β globina

Com o objetivo de avaliar a extração de DNA das amostras clínicas com resultados negativos, foi realizada a amplificação de um fragmento de DNA presente num gene constitutivo de mamíferos, o qual codifica para a proteína β globina. Os iniciadores utilizados nessa PCR foram os seguintes: β globina: 5'CAACTTCATCCACGTTCCACC 3' e β globina 01: 5'ACACAACTGTGTTCACTAGC 3'. Uma mistura contendo 2,5mM de cada dNTP em uma solução tampão com 100mM Tris-HCl (pH 9,0), 15mM de $MgCl_2$ e 500mM de KCl; 10pmoles de cada primer e 0,4 μ l de Taq DNA polimerase (5U/ μ l) foi completada com 2,0 μ l de DNA, de forma a obter um volume final de 20,0 μ l.

Um equipamento termociclador automático (Perkin-Elmer-GeneampPCRSistem 2400) foi utilizado para a amplificação. O programa utilizado foi o seguinte: 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 45°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 45 segundos para extensão. Segue a 72°C por 5 min para a extensão final.

3.4.11-4 – Análise dos produtos da PCR

A amplificação do DNA foi observada a partir de eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado em tampão tris-EDTA (TE), em que 10 a 20µl do produto amplificado foram aplicados ao gel em uma cuba eletrolítica em presença de tampão TBE (89mM de Tris-borato, 2mM de EDTA, pH 8,2). Após a migração, o gel foi corado em solução de brometo de etídio e observado em luz ultravioleta para a identificação dos fragmentos de DNA amplificados. O peso do fragmento amplificado foi comparado a um marcador de peso molecular padrão, ØX174, digerido por Hae III, com 11 fragmentos variando de 72 a 1357pb, que determinou o resultado da reação. Entretanto, todas as reações corridas em gel de agarose foram também analisadas através da eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata 0,2%. O marcador de peso molecular utilizado foi o ØX174, digerido por Hae III, com 11 fragmentos variando de 72 a 1357bp. Aplicou-se no gel 5µl de tampão de amostra (bromofenol blue). Os resultados obtidos no gel de agarose foram posteriormente comparados com os resultados obtidos no gel de poliacrilamida.

3.5 – Mielocultura para isolamento de parasitos e caracterização de amostras

Após 24 horas em solução salina com antibiótico (Penicilina 100U/ml, Estreptomicina 100µg/ml, Garamicina 40 µg/ml) na concentração de 2ml por litro de meio, uma pequena amostra da medula óssea foi colocada em meio de cultura NNN (Novy Mc Neal e Nicolle) enriquecido com LIT (Liver Infusion Tryptose) e mantido à 26° C. O exame da cultura foi feito semanalmente e considerado positivo quando observada a presença de formas promastigotas de *Leishmania sp.* Se no prazo máximo de quatro semanas a cultura não positivou o resultado foi considerado negativo. As amostras isoladas foram criopreservadas e depositadas no banco de cepas do Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou.

Para a caracterização foram utilizadas amostras positivas na PCR genérica, além das amostras positivas na mielocultura. Estas amostras foram caracterizadas através de técnicas moleculares (descritas acima).

3.6 – Processamento e análises dos dados

As informações do exame clínico dos cães, e dos resultados dos diversos testes realizados foram codificadas e digitadas, utilizando-se um programa dedicado à entrada de dados (Epidata 2.1). A verificação da digitação foi feita durante a reentrada dos dados, sendo corrigidas todas as divergências detectadas. Após as reentradas foi verificada a consistência interna dos dados, com revisão da digitação e codificação dos dados sempre que necessário. Além disto, foi criado um banco de dados no Microsoft Office Excel, com todos os resultados referentes à pesquisa canina e às coletas de flebotomíneos, sistematizadas e não sistematizadas.

A comparação da proporção de cães positivos nos testes sorológicos e parasitológicos (molecular e mielocultura) foi realizada utilizando o Teste Qui-quadrado através do programa MINITAB 13, as comparações múltiplas foram realizadas utilizando a metodologia de Bonferroni. O índice de *Kappa* foi utilizado para avaliar a concordância entre todos os testes realizados, comparando-os dois a dois, utilizando o programa SPSS 12. O coeficiente de correlação de Spearman foi realizado para testar a associação entre os dados climatológicos e a densidade total de flebotomíneos coletados durante o período de estudo e utilizou-se o programa SPSS 12. Cabe ressaltar que todos os testes estatísticos foram realizados com 95% de confiança.

Resultados

4 – Resultados

4.1 – Estudo da fauna e infecção natural dos flebotomíneos

O estudo da fauna e infecção natural dos flebotomíneos foi realizado através de coletas sistematizadas e não sistematizadas. Os resultados serão apresentados a seguir, segundo os métodos de captura utilizados neste trabalho.

4.1.1 – Coletas sistematizadas

As coletas sistematizadas foram realizadas mensalmente com armadilhas luminosas de Falcão, durante o período de um ano consecutivo, sendo a primeira coleta datada de novembro de 2004 e a última coleta datada de outubro de 2005.

Todos os exemplares coletados foram identificados de acordo com a classificação de Young & Duncan (1994).

Após 12 meses de captura, foram coletados um total de 1277 espécimes de flebotomíneos, sendo 307 fêmeas (24%) e 970 machos (76%). A distribuição de espécies capturadas por mês e sexo é mostrada na Tabela 1. As seguintes espécies foram capturadas: *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva 1912), *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva 1912), *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho 1939), *Lutzomyia (Pyntomyia) pessoai* (Coutinho & Barreto 1940), *Lutzomyia cortelezii* (Brethes 1923), *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Pinto 1926) e *Lutzomyia (Micropygomyia) oliveirai* Martins, Silva & Falcão 1970.

Tabela 1 - Flebotomíneos coletados no período de Nov/04 a Out/05 por mês e sexo, no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG

Espécies	nov/04		dez/04		jan/05		fev/05		mar/05		abr/05		maio/05		jun/05		jul/05		ago/05		set/05		out/05		Total		
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
<i>L. longipalpis</i>	14	30	3	11	0	5	3	3	16	6	10	2	23	7	21	8	24	0	4	5	13	6	18	6	11	60	186
<i>L. whitmani</i>	13	39	5	20	4	24	37	66	28	64	14	38	10	34	9	6	12	27	45	82	14	64	25	278	216	742	
<i>L. pessoal</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	0	2	1	1	2	:	0	1	5	2	3	5	12	15	
<i>L. intermedia</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2	0	2	0	3	1	0	0	0	1	1	4	2	2	1	10	11	
<i>L. cortalezzii</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	3	0	3	0	9	3	
<i>L. oliveirai</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
<i>L. nishai</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0	:	0	0	0	0	0	0	0	0	8
<i>Lutzomyia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	4	
Total	27	69	8	34	4	31	40	83	35	80	20	64	17	65	20	31	14	33	51	98	32	86	39	296	307	970	

A espécie *L. whitmani* foi representando 75% do total de exemplares de flebotomínios capturados na área de estudo, seguida de *L. longipalpis*, com 19% do total (Fig. 6). A tabela 2 mostra a distribuição das espécies de flebotomíneos capturadas.

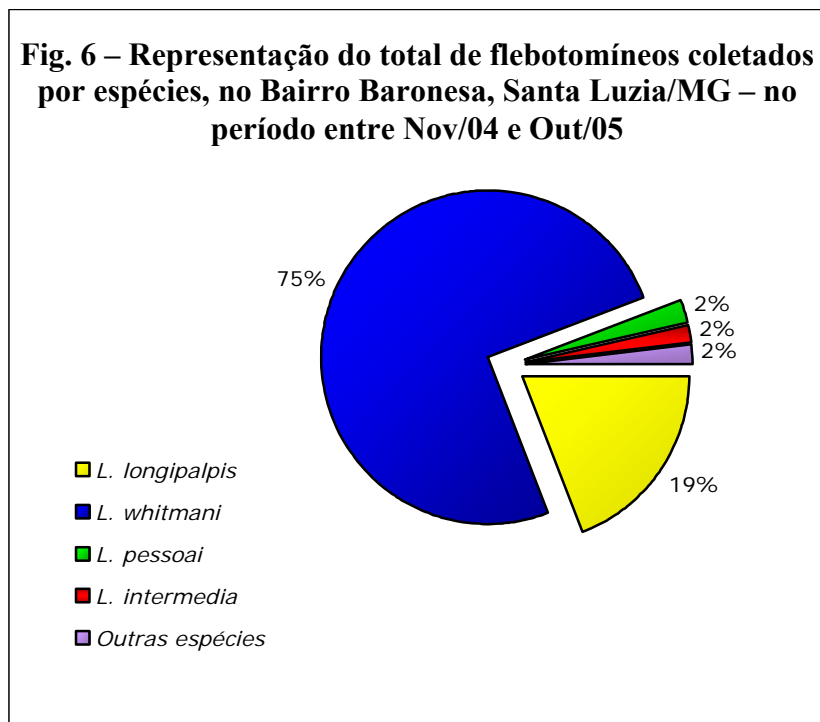


Tabela 2 – Distribuição total das espécies de flebotomíneos capturadas com armadilhas luminosas nas coletas sistematizadas no período entre Nov/04 e Out/05, no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG

Espécies	Total	%
<i>L. longipalpis</i>	246	19,3
<i>L. whitmani</i>	958	75,0
<i>L. pessoai</i>	27	2,1
<i>L. intermedia</i>	21	1,6
<i>L. cortelezzii</i>	12	0,9
<i>L. oliveirai</i>	1	0,1
<i>L. neivai</i>	8	0,6
<i>Lutzomyia</i> sp.	4	0,3
Total	1277	100

A tabela 3 mostra a distribuição das espécies coletadas de acordo com sexo e os pontos de coleta.

Tabela 3 – Flebotomíneos coletados mensalmente no período de Nov/04 a Out/05 por sexo e pontos de exposição das armadilhas no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG

Espécies	A		B		C		D		E		F		G		H		I		J		K		L		M		N		O		Total	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂		
<i>L. longipalpis</i>	18	58	0	0	12	36	1	14	1	3	0	1	0	0	0	0	11	22	9	23	2	4	0	0	6	25	0	0	0	0	60	186
<i>L. whitnani</i>	189	664	0	0	1	9	0	2	0	0	1	0	0	0	0	10	17	8	27	1	5	0	0	6	18	0	0	0	0	216	742	
<i>L. psittaci</i>	12	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	16		
<i>L. fuscicornis</i>	10	7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	10	11		
<i>L. ornithioides</i>	9	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	3		
<i>L. obliqueps</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
<i>L. nothof</i>	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>L. umuypala sp.</i>	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	
Total	238	786	0	0	13	67	1	16	1	3	1	1	0	0	0	21	43	17	63	3	9	0	0	12	46	0	0	0	0	387	978	

A - Área Verde

B-O - Área urbana

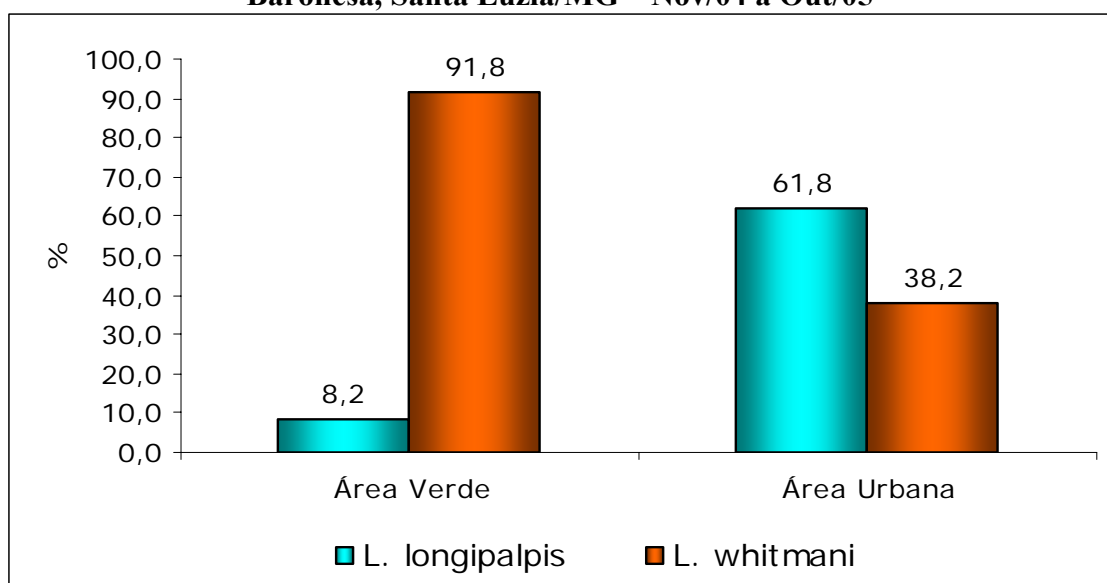
As coletas referentes à área verde representaram 77,8% do total de exemplares coletados, sendo o restante, 22,2% capturados na zona urbana. Como dito anteriormente, *L. whitmani* foi a espécie mais abundante com 75% do total capturado, seguida de *L. longipalpis* com 19%. Entretanto, quando comparadas as duas espécies em relação às áreas onde foram expostas as armadilhas, foi verificada uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) (Tabela 4), com a predominância de *L. whitmani* na área verde e de *L. longipalpis* na área urbana (Fig.7).

Tabela 4 – Comparação da proporção de *L. longipalpis* e *L. whitmani* segundo a área de captura – Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – Nov/04 a Out/05

	Verde	Urbana	Total
<i>L. longipalpis</i>	76	170	246
<i>L. whitmani</i>	853	105	958
Total	929	275	1204

$P < 0,05$

Fig.7 – Ocorrência de *L. longipalpis* e *L. whitmani* segundo a área de captura no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – Nov/04 a Out/05



4.1.2 – Coletas não sistematizadas

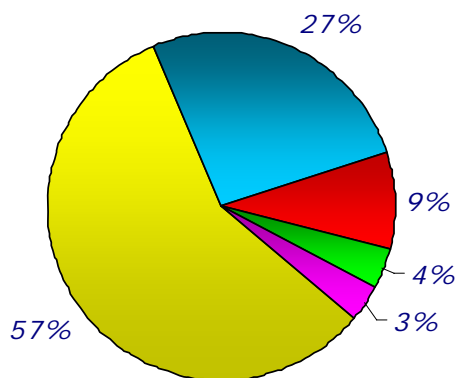
As coletas não sistematizadas foram introduzidas no estudo com o objetivo principal de aumentar o número de fêmeas destinadas à verificação de infecção natural, uma vez que este número estava muito baixo utilizando-se apenas as coletas mensais com armadilhas luminosas de Falcão. Assim foram realizadas cinco coletas não sistematizadas, entre maio de 2005 e setembro de 2005. As capturas foram realizadas manualmente utilizando o capturador de Castro diretamente no local onde estavam presentes os flebotomíneos.

Nas coletas não sistematizadas foram capturados um total de 275 exemplares pertencentes a cinco espécies: *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*, *Lutzomyia (Pyntomyia) pessoai* e *Lutzomyia cortelezzii*. Deste total 91 (33%) eram fêmeas e 184 (67%) foram representados por exemplares machos. A tabela 5 mostra a distribuição dos exemplares coletados nestas capturas por mês e sexo.

Tabela 5 – Coletas não sistematizadas realizadas entre Mai/05 e Set/05 – Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG												
Espécies	Mai/05		Jun/05		Jul/05		Ago/05		Set/05		Total	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
<i>L. longipalpis</i>	5	42	2	15	3	10	7	22	12	40	29	129
<i>L. whitmani</i>	19	4	2	3	5	6	3	11	4	16	33	40
<i>L. pessoai</i>	5	5	2	1	1	1	1	2	4	2	13	11
<i>L. intermedia</i>	2	0	0	0	0	1	4	0	3	1	9	2
<i>L. cortelezzii</i>	4	1	0	0	0	0	2	0	1	1	7	2
Total	35	52	6	19	9	18	17	35	24	60	91	184

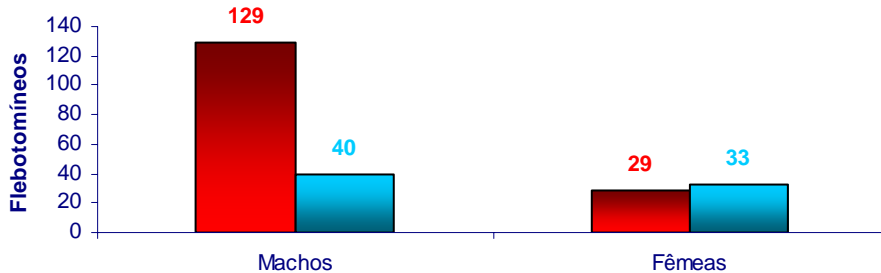
Diferente do que foi observado nas coletas sistematizadas, a espécie mais predominante neste tipo de captura foi *L. longipalpis* com 158 (57,5%) do total seguida por *L. whitmani* com 73 (26,5%) (Fig.8). Entretanto, esta predominância foi válida apenas para os machos, já que o número de fêmeas capturadas de *L. whitmani* (33) foi ligeiramente superior ao de *L. longipalpis* (29) (Fig.9). As outras espécies coletadas já haviam sido capturadas anteriormente nas coletas sistematizadas, entretanto, neste tipo de coleta elas apareceram mais freqüentemente: *L. pessoai* com 24 (8,7%) exemplares, *L. intermedia* com 11 (4%) exemplares e *L. cortelezii* com 9 (3,3%) exemplares.

Fig. 8 - Distribuição por espécies das coletas não sistematizadas realizadas no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG, entre Mai/05 e Set/05



■ *L. longipalpis* ■ *L. whitmani* ■ *L. pessoai* ■ *L. intermedia* ■ *L. cortelezii*

Fig. 9 - Números de machos e fêmeas de *L. longipalpis* e *L. whitmani* capturados nas coletas não sistematizadas, Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG - 2005



■ *L. longipalpis* ■ *L. whitmani*

4.1.3 – Verificação de infecção natural

Para a verificação de infecção natural das fêmeas capturadas foram utilizados dois métodos: a dissecação e a pesquisa de DNA do parasito através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.1.3-1 – Dissecação

A dissecação consistiu na retirada do trato digestivo das fêmeas, para procura do parasito e tentativa de isolamento do mesmo. Durante os seis primeiros meses (Novembro de 2004 a Abril de 2005) foram capturadas 134 fêmeas pertencentes a cinco espécies: *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*, *Lutzomyia (Pyntomyia) pessoai* e *Lutzomyia cortelezzii* (Tabela 6).

Tabela 6 - Total de Fêmeas coletadas mensalmente no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG, entre Nov/04 e Abr/05							
Espécies	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05	Total
<i>L. longipalpis</i>	14	3	0	3	6	2	28
<i>L. whitmani</i>	13	5	4	37	28	14	101
<i>L. pessoai</i>	0	0	0	0	1	0	1
<i>L. intermedia</i>	0	0	0	0	0	2	2
<i>L. cortelezzii</i>	0	0	0	0	0	2	2
Total	27	8	4	40	35	20	134

Deste total de 134 fêmeas foram dissecadas 102, sendo 73 (71,6%) pertencentes à espécie *L. whitmani*, 24 (23,5%) *L. longipalpis*, uma fêmea de *L. pessoai*, duas de *L. intermedia* e duas de *L. cortelezzii*, correspondendo estas últimas a 4,9% do total de fêmeas dissecadas.

Utilizando este método para a verificação de infecção natural, ou seja, a dissecação do trato digestivo dos flebotomíneos, não foi encontrada nenhuma forma flagelada em todas as fêmeas dissecadas.

4.1.3-2 – PCR das fêmeas capturadas

Nos últimos seis meses de coleta com armadilhas luminosas (Maio de 2005 a Outubro de 2005) as fêmeas capturadas foram destinadas à verificação de infecção natural através da técnica da PCR. As fêmeas mantidas vivas eram identificadas e separadas em “pools” específicos. Neste período foram coletadas 173 fêmeas pertencentes a cinco espécies: *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*, *Lutzomyia (Pyntomyia) pessoai* e *Lutzomyia cortelezzii*, sendo a espécie mais abundante *L. whitmani* seguida por *L. longipalpis* (Tabela 7).

Tabela 7 - Total de fêmeas coletadas mensalmente no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG, no período de Mai/05 a Out/05							
Espécies	mai/05	jun/05	jul/05	ago/05	set/05	out/05	Total
<i>L. longipalpis</i>	7	8	0	5	6	6	32
<i>L. whitmani</i>	10	9	12	45	14	25	115
<i>L. pessoai</i>	0	1	2	0	5	3	11
<i>L. intermedia</i>	0	1	0	1	4	2	8
<i>L. cortelezzii</i>	0	1	0	0	3	3	7
Total	17	20	14	51	32	39	173

As fêmeas capturadas nas coletas não sistematizadas também foram destinadas à verificação de infecção natural. Neste tipo de captura foi coletado um total de 91 fêmeas pertencentes às mesmas espécies capturadas nas armadilhas luminosas (Tabela 8).

Tabela 8 - Coletas não sistematizadas - fêmeas capturadas entre Mai/05 e Set/05 - Bairro Baronesa - Santa Luzia MG						
Espécies	mai/05	jun/05	jul/05	ago/05	set/05	Total
<i>L. longipalpis</i>	5	2	3	7	12	29
<i>L. whitmani</i>	19	2	5	3	4	33
<i>L. pessoai</i>	5	2	1	1	4	13
<i>L. intermedia</i>	2	0	0	4	3	9
<i>L. cortelezzii</i>	4	0	0	2	1	7
Total	35	6	9	17	24	91

Desta forma foram capturadas 264 fêmeas nos últimos seis meses de coletas e constituídos 11 “pools” para a pesquisa do DNA do parasito a partir de 211 fêmeas vivas. Foram seis “pools” com 20 exemplares cada de *L. whitmani*, dois “pools” com 20 exemplares cada de *L. longipalpis*, um “pool” com 20 exemplares de *L. pessoai*, um “pool” com 17 exemplares de *L. intermedia* e um “pool” com 14 exemplares de *L. cortelezzii*.

O sistema de detecção baseado na PCR foi capaz de amplificar o fragmento de 120pb do gênero *Leishmania* em dois “pools”, sendo um “pool” de *L. whitmani* e um “pool” de *L. cortelezzii*. Os controles, positivo e negativo, funcionaram e demonstraram a eficácia tanto da extração dos “pools” quanto da reação. A foto do gel abaixo (Fig.10) mostra a detecção destes fragmentos.

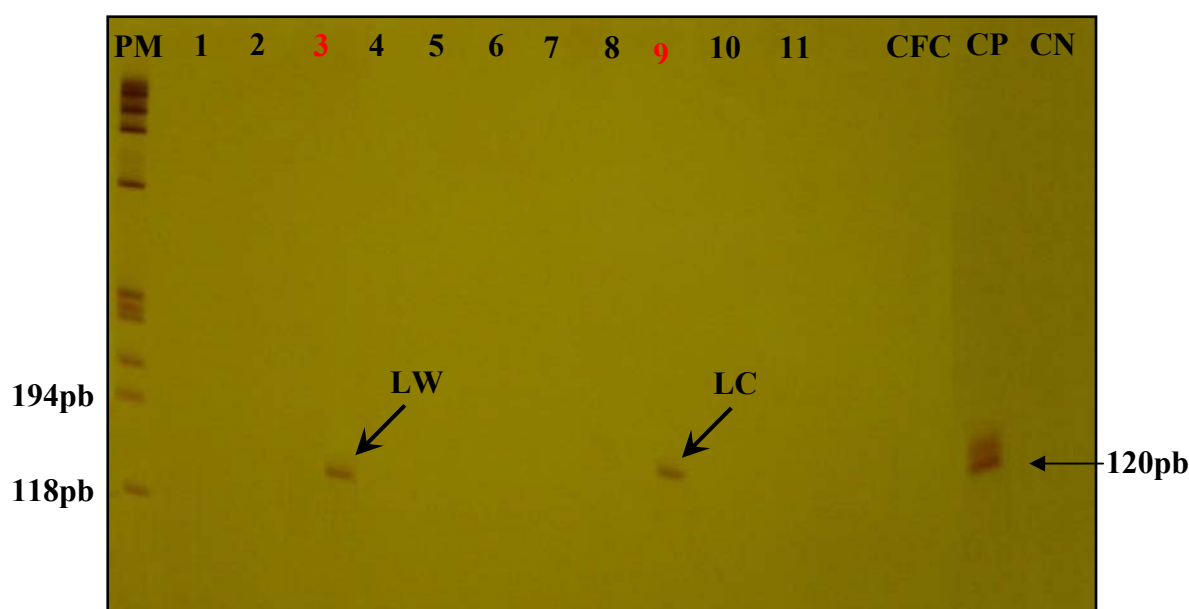


Figura 10 – Gel de Poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata a 0,2%, mostrando produtos amplificados na PCR genérica (Primers A/B, Degraeve et al. 1994) de “pools” de fêmeas capturadas no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG. Canaletas: **PM** – Marcador de peso molecular ØX174; **1 a 6** – “pools” de *L. whitmani*; **7** – “pool” de *L. intermedia*; **8** – “pool” de *L. pessoai*; **9** – “pool” de *L. cortelezzii*; **10 e 11** – “pool” de *L. longipalpis*; **CFC** – Controle de flebotomíneos (não infectados); **CP** – Controle positivo: fêmeas de *L. longipalpis* e DNA extraído de culturas de *Leishmania braziliensis*; **CN** – Controle negativo: mistura dos reagentes sem DNA.

Para o diagnóstico específico das amostras consideradas positivas foi realizada a PCR segundo a metodologia descrita por Cortes *et al.* (2004) utilizando o par de iniciadores MC1/MC2 específico para *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*) e o par de iniciadores B1/B2 específico para espécies do complexo *L. braziliensis* (De Bruijn & Barker 1992). Desta forma, o “pool” de *L. whitmani* foi positivo somente para *L. braziliensis* apresentando a banda diagnóstica de 750pb e o “pool” contendo os exemplares de *L. cortelezzii* apresentou produto

amplificado de 447pb correspondente a espécie *L. infantum* (= *L. chagasi*) conforme visualizado nas figuras 11 e 12 respectivamente.

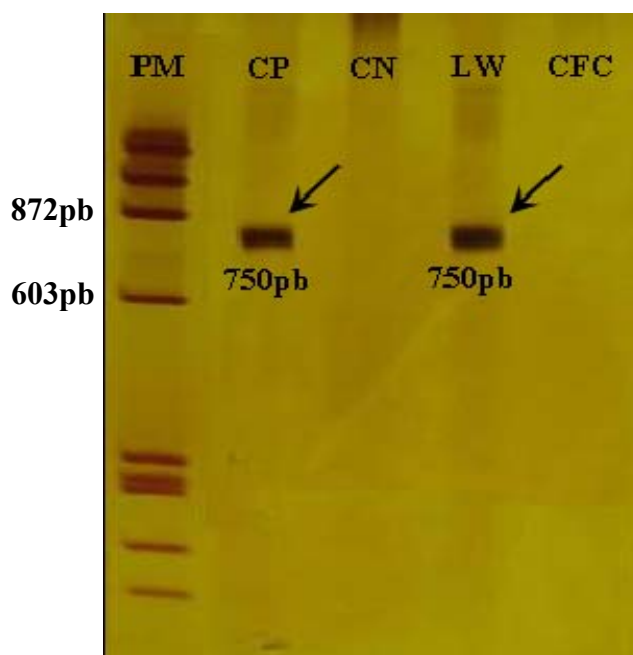


Figura 11 – Gel de Poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata a 0,2%, mostrando o diagnóstico específico (Primers: B1/B2, De Bruijn & Barker 1992) do “pool” infectado de *L. whitmani*. Canaletas: **PM** – Marcador de peso molecular ØX174; **CP** – Controle Positivo: fêmeas de *L. longipalpis* e DNA extraído de culturas de *Leishmania braziliensis*; **CN** – Controle Negativo: mistura dos reagentes sem DNA; **LW** – “Pool” de *L. whitmani* **CFC** – Controle Flebotomíneos da Colônia (não infectados).

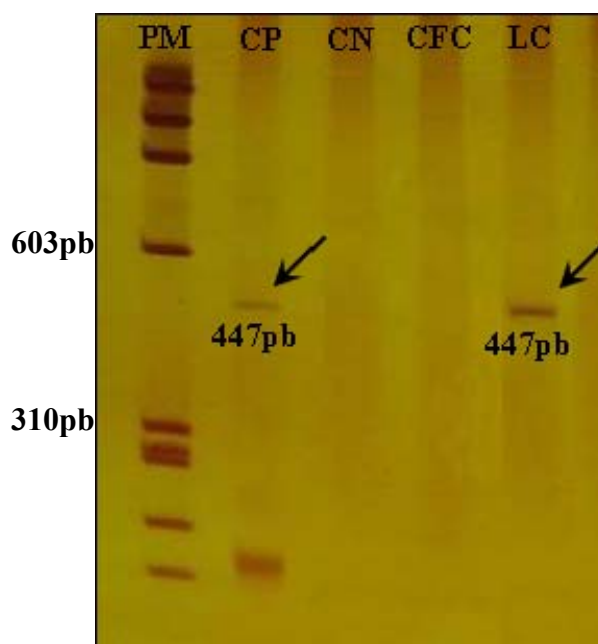


Figura 12 – Gel de Poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata a 0,2%, mostrando o diagnóstico específico (Primers: MC1/MC2, Cortes et al. 2004) do “pool” infectado de *L. cortelezzii*. Canaletas: **PM** – Marcador de peso molecular ØX174; **CP** – Controle Positivo: fêmeas de *L. longipalpis* e DNA extraído de culturas de *Leishmania chagasi*; **CN** – Controle Negativo: mistura dos reagentes sem DNA; **CFC** – Controle Flebotomíneos da Colônia (não infectados); **LC** – “Pool” de *L. cortelezzii*.

A avaliação da extração do DNA das amostras realizada utilizando o par de iniciadores capaz de amplificar fragmentos do gene constitutivo do gênero *Lutzomyia* (gene da cacofonia) confirmou a eficiência do processo, já que todas as amostras geraram um produto de 220pb, referente à seqüência da região IVS6 (Fig.13). Assim, foi possível demonstrar a viabilidade deste método em detectar o DNA de *Leishmania* em “pools” contendo fêmeas de flebotomíneos naturalmente infectadas.

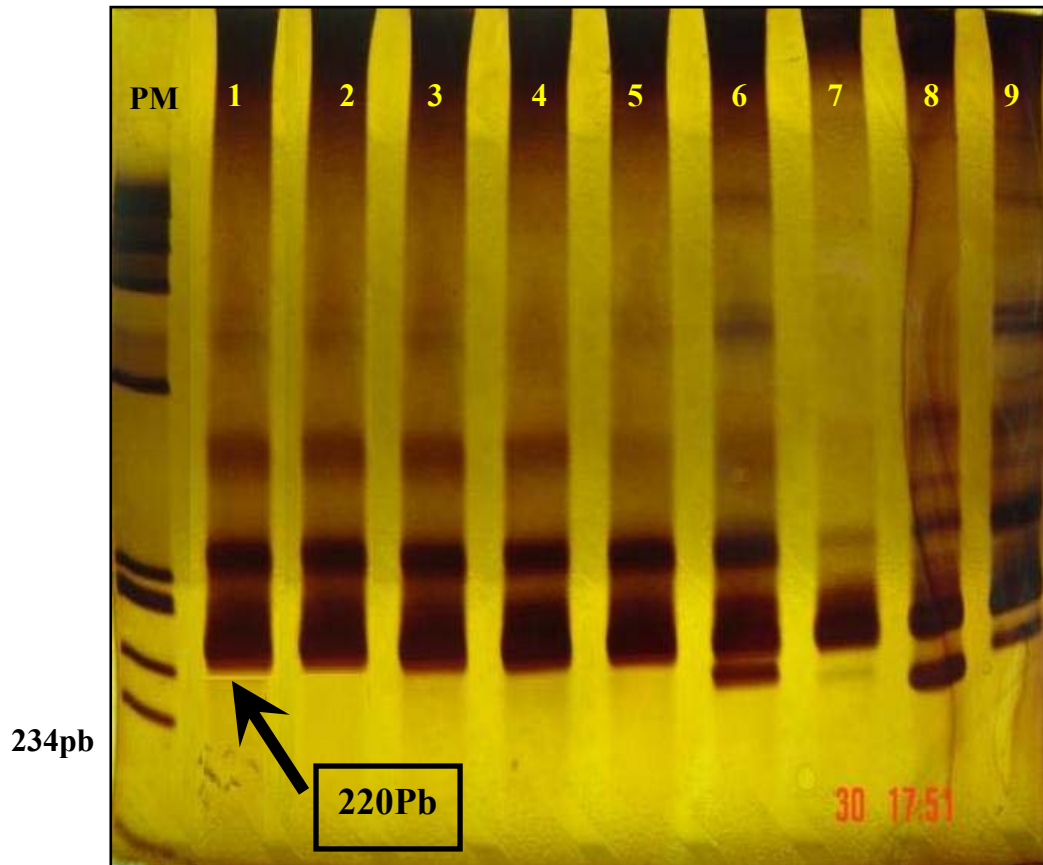


Figura 13 – Gel de Poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata a 0,2%, mostrando produtos amplificados na PCR do gene constitutivo do gênero *Lutzomyia* (gene da cacofonia) (Primers: 5Llca/3Llca). Canaletas: **PM** – Marcador de peso molecular ØX174; **1-4** – “pools” de *L. whitmani*; **5** - “pool” de *L. intermedia*; **6** - “pool” de *L. pessoai*; **7** - “pool” de *L. cortelezzii*; **8, 9** - “pools” de *L. longipalpis*;

4.2 – Correlação com dados climatológicos

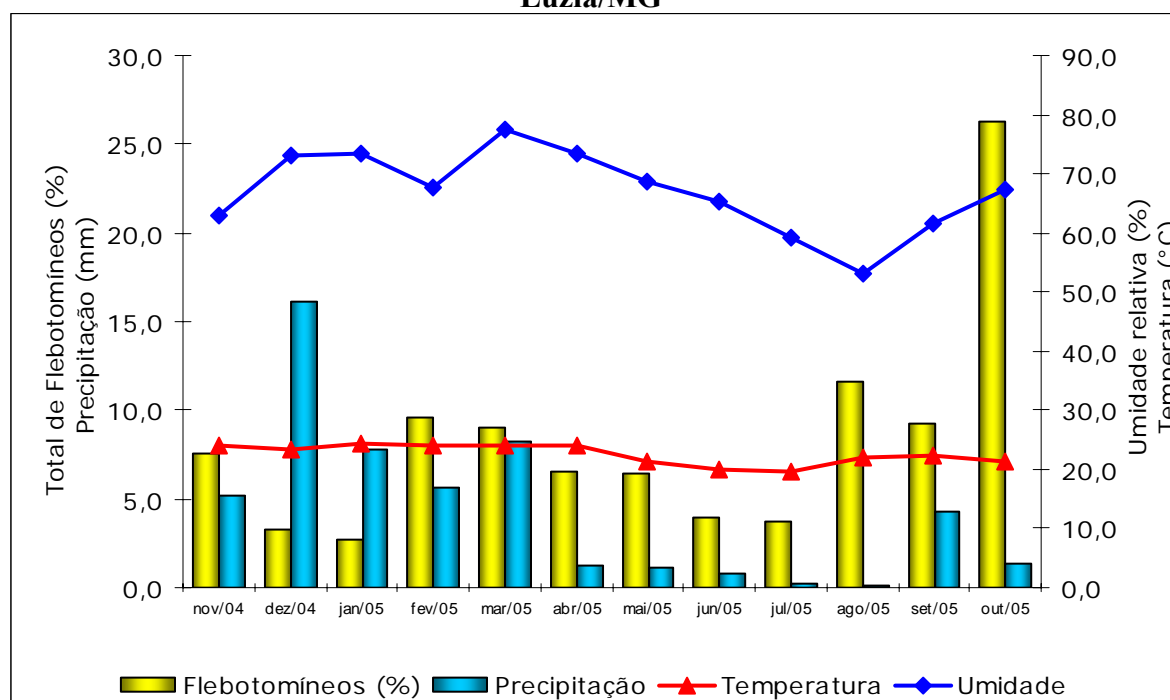
Não foi encontrada nenhuma correlação estatisticamente significativa, utilizando coeficiente de correlação de Spearman, entre a densidade total de flebotomíneos e as variáveis climáticas utilizadas, dentro do período estudado (Tabela 9). A figura 14 mostra esta correlação mensal, dentro do período de realização do estudo.

Tabela 9 – Correlação entre a densidade total de flebotomíneos coletados no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG e as variáveis climáticas – Nov/04 a Out/05

	Temperatura	Umidade	Precipitação	
Densidade total de flebotomíneos	-,035(*)	-,336(*)	-,175(*)	Coefficiente de correlação
	,914	,286	,587	Valor de P

* Correlação não significativa no nível 0,05 (P-Valor)

Figura 14 – Densidade mensal de flebotomíneos segundo variáveis climáticas no período entre Novembro de 2004 e Outubro de 2005, Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG



4.3 – Estudo da infecção canina

4.3.1 – Diagnóstico sorológico e soroprevalência

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* nas amostras coletadas foi determinada através dos testes RIFI e ELISA. Para o teste da RIFI foram amostrados 209 cães, sendo que 85 (41%) foram reativos, considerados positivos e 124 (59%) não reativos, considerados negativos. No teste de ELISA foram amostrados 205 cães, com 99 (48%) deste total apresentando resultado positivo e 106 (52%) com resultado negativo (Tabela 10).

Tabela 10 – Resultados dos testes sorológicos realizados nos cães do Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005			
	RIFI	ELISA	RIFI e/ou ELISA
Positivos	85	99	117
Negativos	124	106	88
Total	209	205	205

A soroprevalência foi calculada com base nos resultados dos cães nos quais foram realizados os dois testes sorológicos. O total de cães utilizados para este cálculo foi de 205, e foram considerados positivos os cães com pelo menos um dos testes positivo. Desta forma, 117 cães apresentaram-se positivos na RIFI e/ou ELISA (tabela 10) e a soroprevalência encontrada para o Bairro Baronesa no momento do estudo foi de 57%.

4.3.2 – Diagnóstico molecular e prevalência da infecção

Para o diagnóstico molecular foi utilizada a técnica da PCR em um total de 202 amostras de sangue periférico total. Destas, 85 (42%) foram positivas e 117 (58%) negativas DNA (tabela 11).

O diagnóstico molecular envolvendo as outras amostras clínicas, fragmento de pele e medula óssea, utilizou 43 e 42 cães respectivamente, que apresentavam sorologia positiva e foram recolhidos pela Secretaria Municipal de Saúde do município para eutanásia. Destas 43 amostras de pele, 33 (77%) apresentaram fragmentos de 120pb, correspondente à região

conservada do kDNA de *Leishmania* sp., sendo consideradas amostras positivas na PCR genérica. Nas amostras de medula óssea, 30 (71%) foram consideradas positivas (Tabela 11).

Tabela 11 - Diagnóstico molecular em amostras clínicas de cães do Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005			
	PCR Genérica		
	Sangue	Pele	Medula
Positivos	85	33	30
Negativos	117	10	12
Total	202	43	42

A prevalência da infecção foi calculada levando-se em consideração os resultados do diagnóstico molecular, sendo considerado cães infectados aqueles com resultado da PCR positiva em pelo menos uma das amostras clínicas. Dos 201 cães analisados 108 foram positivos sendo a prevalência da infecção de 54%.

4.3.3 – Grupos clínicos e prevalência da doença

Os 201 cães foram classificados em sintomáticos (42) e assintomáticos (159) de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos característicos da LVC.

A prevalência da doença foi calculada considerando-se o grupo de cães sintomáticos com participação nos testes sorológicos (RIFI e ELISA) e molecular (PCR sangue). Dos 42 cães sintomáticos 33 (79%) foram positivos em pelo menos um dos testes realizado, resultando em 16% (33/201) a prevalência da doença canina na população estudada.

A tabela 12 mostra os resultados dos testes utilizados para o diagnóstico da Leishmaniose Canina (LC) segundo o status clínico dos cães (sintomáticos ou assintomáticos).

Tabela 12 - Resultados dos testes de diagnóstico para Leishmaniose Canina segundo sinais clínicos - Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG - 2005						
		Sorológico		Molecular		
		RIFI	ELISA	PCR Genérica		
				Pele	Medula	Sangue
CA	Positivos	59 (35%)	72 (44%)	23 (77%)	26 (87%)	64 (40%)
	Negativos	108 (65%)	91 (56%)	7 (23%)	4 (13%)	97 (60%)
Total CA		167	163	30	30	161
CS	Positivos	26 (62%)	27 (64%)	10 (77%)	8 (67%)	21 (51%)
	Negativos	16 (38%)	15 (36%)	3 (23%)	4 (33%)	20 (49%)
Total CS		42	42	13	12	41
TOTAL		209	205	43	42	202

CA – Cães assintomáticos ; CS – Cães sintomáticos

Quando analisados os resultados dos testes de diagnóstico segundo os grupos clínicos (CA e CS), foi possível verificar que nos dois testes sorológicos realizados a porcentagem de cães positivos foi superior no grupo dos cães sintomáticos e em ambos esta diferença foi significativa ($P < 0,05$) quando submetidos ao teste Qui-quadrado, sendo, portanto estes testes mais eficientes apenas quando os cães já apresentam sinais clínicos sugestivos da doença. Em contra partida, na PCR, só quando utilizadas amostras de medula foi encontrada diferença significativa ($P < 0,05$), com uma porcentagem maior de cães positivos no grupo dos assintomáticos. As amostras de pele e sangue não apresentaram esta diferença significativa nos resultados ($P > 0,05$) levando em consideração o status clínico dos cães, o que significa que a detecção de cães infectados foi independente da sintomatologia quando utilizadas estas amostras para o diagnóstico através da PCR.

4.3.3-1 – Sorologia x PCR

A tabela 13 mostra os resultados da sorologia (RIFI e/ou ELISA) e da PCR, analisados conjuntamente com o objetivo de verificar o número de cães Falso-Positivos (FP) e Falso-Negativos (FN), uma vez que foram considerados cães infectados neste trabalho, os cães positivos na PCR. Para esta análise foram considerados cães sorologicamente negativos, os cães não reativos na RIFI e na ELISA e cães sorologicamente positivos aqueles que apresentaram pelo menos um resultado reativo. Desta forma 201 cães foram analisados, sendo 30 cães considerados falso-negativos, com resultado positivo na PCR e negativo na sorologia, e 37 cães foram considerados falso-positivos, com resultado positivo na sorologia e negativo na PCR. Dos 30 cães falso-negativos apenas dois eram cães sintomáticos. No grupo dos falso-positivos oito cães eram sintomáticos e 29 assintomáticos.

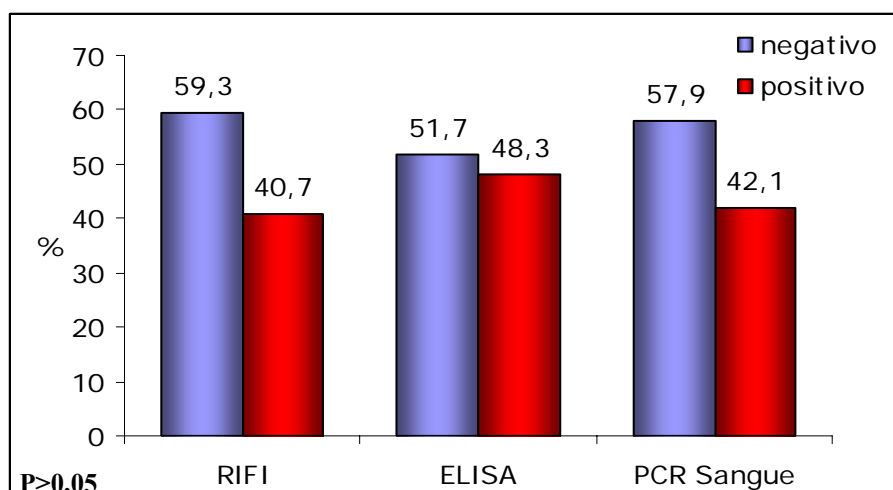
Tabela 13 - Resultados da Sorologia x PCR dos cães do Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG - 2005				
		PCR		Total
		Positivos	Negativos	
SOROLOGIA	Positivos	78 39%	37 (FP) 18%	115 57%
	Negativos	30 (FN) 15%	56 28%	86 43%
Total		108 54%	93 46%	201 100%

FN – Falso-Negativos; FP – Falso-Positivos

4.3.4 – Comparação da proporção de positivos nos testes RIFI, ELISA e PCR sangue

A comparação da proporção de positivos nos testes sorológicos (RIFI e ELISA) e PCR em amostras de sangue periférico não demonstrou diferença significativa com o valor de $P > 0,05$. Os testes RIFI, ELISA e PCR de sangue apresentaram 41%, 48% e 42% de amostras positivas respectivamente. O teste de ELISA foi o teste com a maior porcentagem de cães positivos. A figura 15 mostra a comparação dos resultados encontrados.

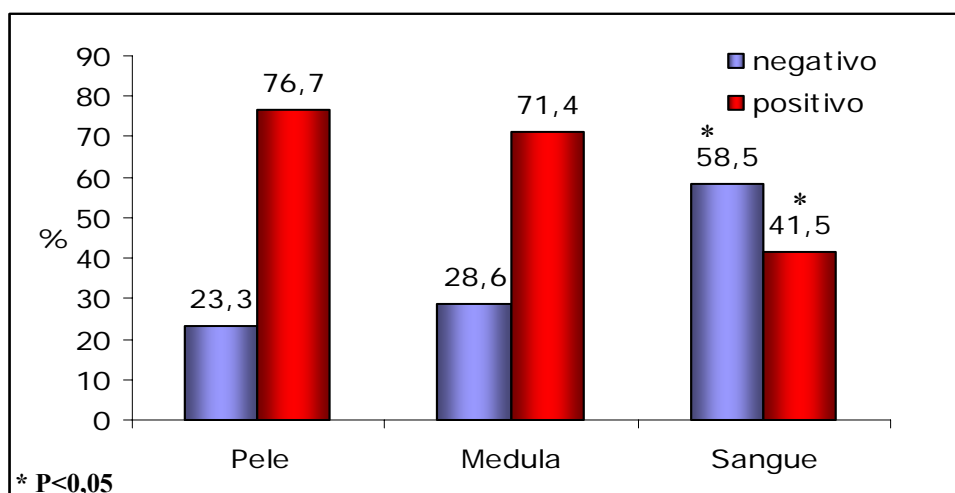
Fig.15 – Comparação da proporção de positivos nos testes: RIFI, ELISA e PCR em amostras de sangue periférico de Cães do Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG - 2005



4.3.5 – Comparação das amostras clínicas utilizadas na PCR

Este estudo comparou os resultados de acordo com as amostras clínicas utilizadas nas reações da PCR: fragmento de pele, medula óssea e sangue periférico no grupo dos 43 cães sorologicamente positivos. Foi verificado que existe diferença significativa ($P < 0,05$) entre os resultados das três amostras clínicas utilizadas. Na análise de comparações múltiplas não foi observada diferença significativa ($P > 0,017$) entre os resultados obtidos com amostras de pele e medula óssea. Para a amostra de sangue, foi observada diferença significativa ($P < 0,017$) em relação às outras duas amostras utilizadas, sendo, portanto esta amostra a responsável pela diferença encontrada na comparação. Desta forma, a amostra sangue foi considerada menos eficiente quando comparada com as amostras pele e medula no grupo avaliado (Fig.16).

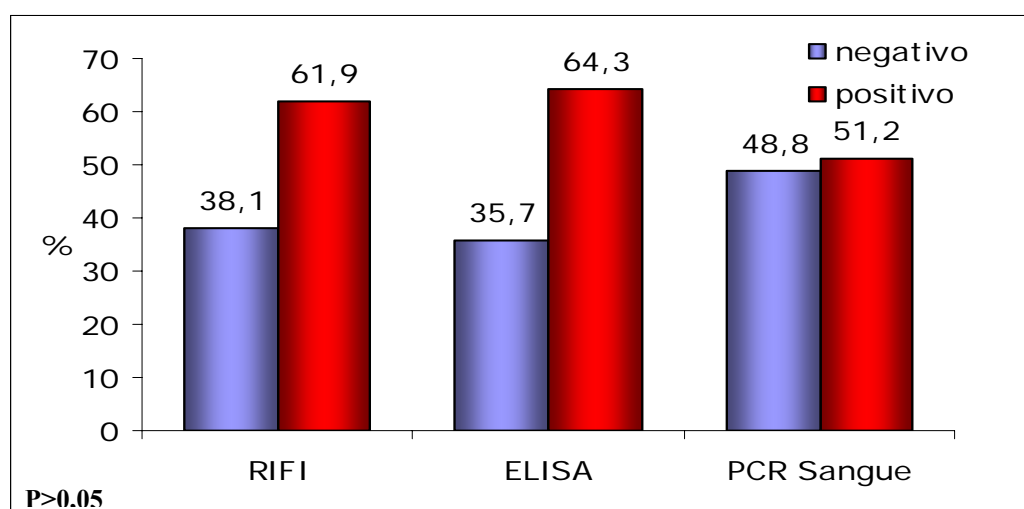
Figura 16 – Comparação entre as amostras clínicas utilizadas nas reações da PCR – Cães Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG - 2005



4.3.6 – Comparação da proporção de cães sintomáticos positivos nos testes RIFI, ELISA e PCR sangue

Apesar do teste de ELISA ter apresentado índice de positividade de 64% aparentemente superior aos da RIFI e PCR do sangue com 62% e 51% respectivamente, não foi verificada diferença significativa entre os testes ($P>0,05$) (Fig.17).

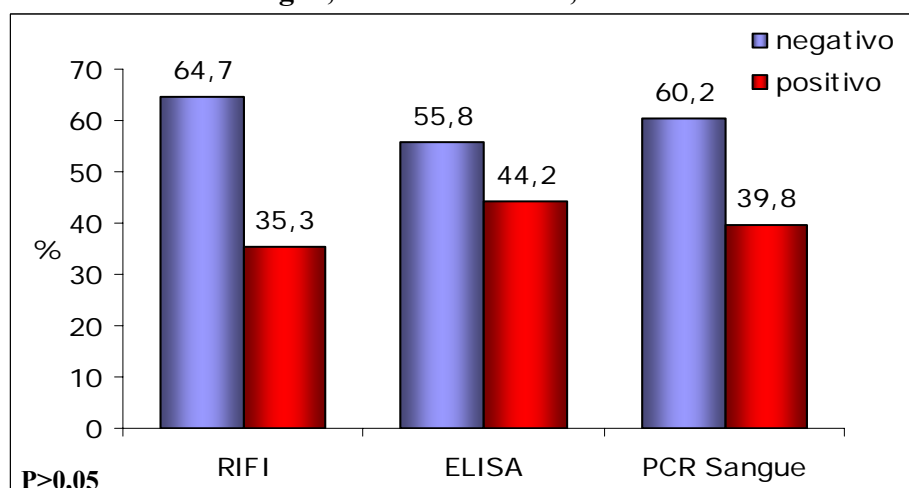
Figura 17 – Comparação da proporção de cães sintomáticos e positivos nos testes RIFI, ELISA e PCR sangue, Bairro Baronessa, Santa Luzia/MG - 2005



4.3.7 – Comparação da proporção de cães assintomáticos positivos nos testes RIFI, ELISA e PCR sangue

Quando comparada a proporção de cães positivos assintomáticos entre os testes realizados, encontrou-se resultados equivalentes à comparação dos positivos sintomáticos. O teste ELISA aparentemente apresentou a maior porcentagem com 44%, seguido pela PCR de sangue periférico com 40% das amostras positivas e a RIFI com 35%. Novamente, não foi encontrada uma diferença significativa ($P>0,05$) entre o índice de positividade dos testes comparados (Fig.18).

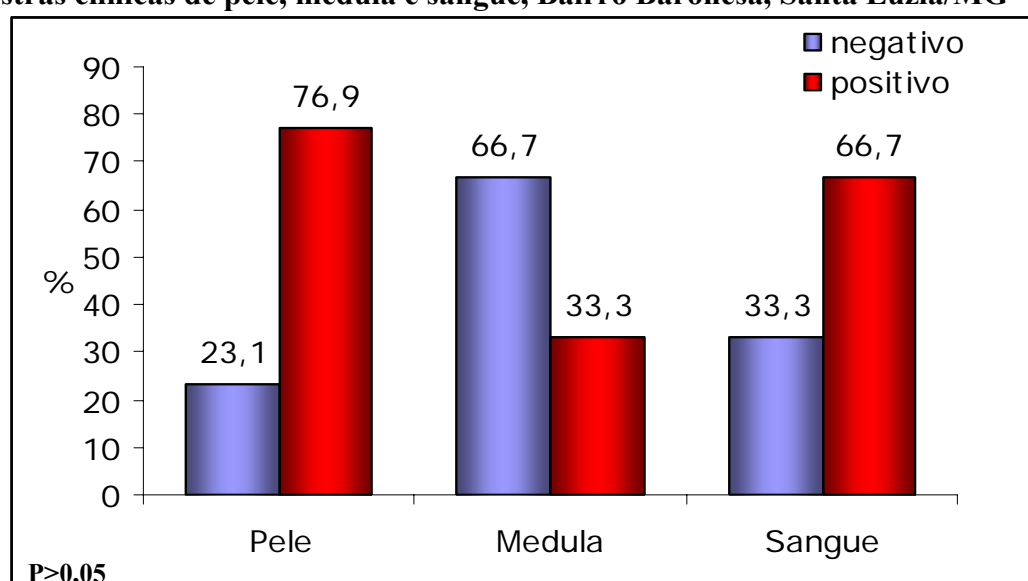
Figura 18 – Comparação da proporção de cães assintomáticos positivos nos testes RIFI, ELISA e PCR sangue, Bairro Baronessa, Santa Luzia/MG – 2005



4.3.8 – Comparação da proporção de cães sintomáticos positivos na PCR utilizando amostras de pele, medula e sangue

Para esta comparação foi utilizado o grupo dos 43 cães com sorologia positiva. Neste grupo apenas os cães sintomáticos com resultado positivo foram analisados e não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os resultados das amostras clínicas utilizadas (Fig.19). Entretanto, o tamanho da amostra pode ter influenciado no resultado da análise, já que o número de cães sintomáticos e com resultado positivo foi pequeno, podendo ter reduzido o poder do teste utilizado para a comparação.

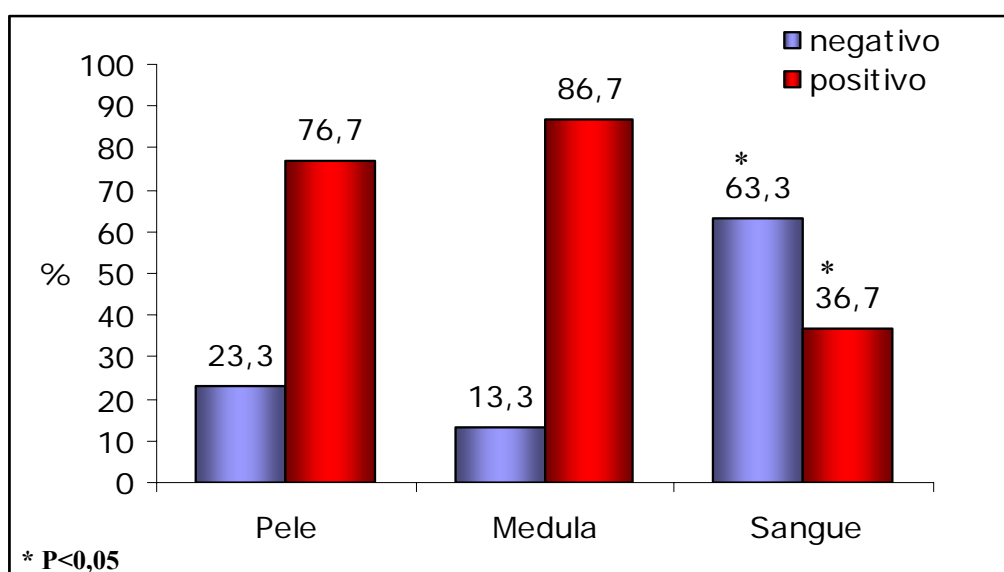
Figura 19 – Comparação da proporção de cães sintomáticos positivos na PCR utilizando amostras clínicas de pele, medula e sangue, Bairro Baronessa, Santa Luzia/MG – 2005



4.3.9 – Comparação da proporção de cães assintomáticos positivos na PCR utilizando amostras de pele, medula e sangue

Diferente do que foi visto anteriormente na comparação de cães positivos sintomáticos, esta comparação apresentou diferença significativa ($P < 0,05$). A amostra de sangue foi a menos eficiente (37%) na detecção de cães assintomáticos positivos e responsável pela diferença significativa nas comparações entre as três amostras. Nas comparações múltiplas ela apresentou diferença significativa ($P < 0,017$) tanto comparada com as amostras de pele quanto quando comparada com as amostras de medula. Já a comparação entre as amostras de pele e medula não apresentou diferença significativa (Fig.20).

Figura 20 – Comparação da proporção de cães assintomáticos positivos na PCR utilizando amostras de pele, medula e sangue, Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG – 2005



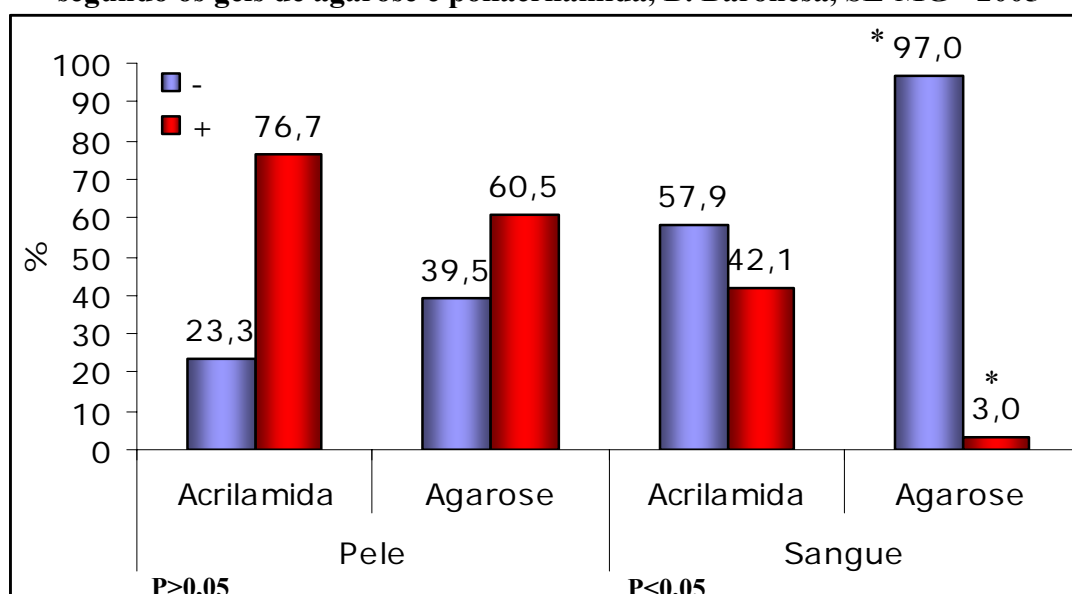
4.3.10 – Comparação da proporção de amostras positivas na PCR (pele e sangue) em géis de agarose e poliacrilamida

Foi verificado no decorrer do projeto que dependendo do tipo de amostra utilizada, a sensibilidade da PCR variava de acordo com o gel usado na visualização do produto amplificado. Foram então comparados os resultados das reações realizadas com amostras de pele e sangue em géis de poliacrilamida e agarose. Após análise estatística foi observada diferença significativa para as amostras de sangue ($P < 0,05$). Não houve diferença estatística

entre os resultados obtidos nos dois géis para as amostras de pele ($P>0,05$). As amostras de medula não foram comparadas uma vez que foram analisadas apenas no gel de poliacrilamida.

Portanto, em relação às amostras de sangue, o gel de poliacrilamida foi mais sensível apresentando um ganho de 39% comparado ao gel de agarose. Para as amostras de pele, apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa, 61% das amostras foram positivas no gel de agarose e 77% no gel de poliacrilamida (Fig.21).

Figura 21 – Comparação dos resultados obtidos na PCR das amostras de pele e sangue segundo os géis de agarose e poliacrilamida, B. Baronesa, SL-MG - 2005



4.3.11 – PCR para amplificação do gene codificador da proteína β globina

Todas as amostras negativas na PCR genérica foram avaliadas com um par de iniciadores que amplificam um fragmento de DNA presente no gene constitutivo de mamíferos, o qual codifica para a proteína β globina. Das 159 amostras negativas, (10 amostras de pele, 12 de medula e 137 de sangue) apenas 28 (18%) amostras não amplificaram o gene codificador da proteína β globina, sendo sete de medula (58%) 20 de sangue (15%) e uma (10%) de pele. Porém, estas amostras não foram excluídas das análises, pois foi verificada a presença de DNA na dosagem realizada no biofotômetro (Ependorff).

4.3.12 – Concordância entre os testes de diagnóstico da LVC

Para verificar a concordância entre os testes de diagnósticos foi utilizado o índice de concordância de *Kappa*, sempre comparando os resultados entre dois testes distintos. Desta forma todos os testes realizados foram comparados entre si.

Através dos valores dos coeficientes de concordância de *Kappa* e suas respectivas forças de concordância, foi verificado que existiu concordância apenas entre os testes RIFI e ELISA. Esta concordância foi considerada regular com o valor de *K* entre 0,41 e 0,60 ($K=0,499$) e estatisticamente significativa com $P<0,05$ (Tabela 15). A concordância entre os demais testes foi considerada ruim ou fraca segundo os valores de *K* e não significativa com valor de $P>0,05$.

Tabela 15 – Coeficientes de concordância *Kappa* entre os testes de diagnóstico realizados

	RIFI	ELISA	PCR Pele	PCR Medula	PCR Sangue
RIFI	-				
ELISA	0,499* (0,381 ; 0,617)	-			
PCR Pele	**	0,257 (-0,074 ; 0,588)	-		
PCR Medula	**	0,054 (-0,252 ; 0,359)	-0,105 (-0,381 ; 0,171)	-	
PCR Sangue	0,124 (-0,013 ; 0,261)	0,120 (-0,017 ; 0,257)	-0,134 (-0,381 ; 0,113)	-0,068 (-0,333 ; 0,197)	-

IC 95% * Concordância moderada e estatisticamente significativa ($P<0,05$)

Com as amostras de pele e medula não foi possível realizar o cálculo de concordância entre a PCR e a RIFI, pois só foram coletadas estas amostras nos cães com RIFI positiva.

4.3.13 – Mielocultura para isolamento de parasitos e caracterização das amostras

A cultura foi realizada com material coletado através de punção da medula óssea de 43 cães do grupo dos sorologicamente positivos. Deste total, 8 amostras (19%) foram positivas por apresentarem nas culturas formas promastigotas de *Leishmania*. Estas amostras estão depositadas no banco de cepas do Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR).

A caracterização específica das amostras foi realizada através da PCR utilizando iniciadores específicos para *L. infantum* (= *L. chagasi*) MC1 e MC2 e para os complexos *L. braziliensis* (B1/B2) e *L. mexicana* (M1/M2). Para as reações foi utilizado o DNA extraído de todas as amostras clínicas positivas na PCR genérica (33 amostras de pele, 30 amostras de medula e 19 de sangue) e das 8 amostras isoladas na cultura, todas pertencentes ao grupo dos 43 cães sorologicamente positivos.

Dos 43 cães cujas amostras foram submetidas à caracterização, 36 (84%) estavam infectadas pela *L. chagasi* (Fig.22). Os sete restantes foram negativos em todas as amostras clínicas com todos os iniciadores testados, apesar da positividade na PCR genérica.

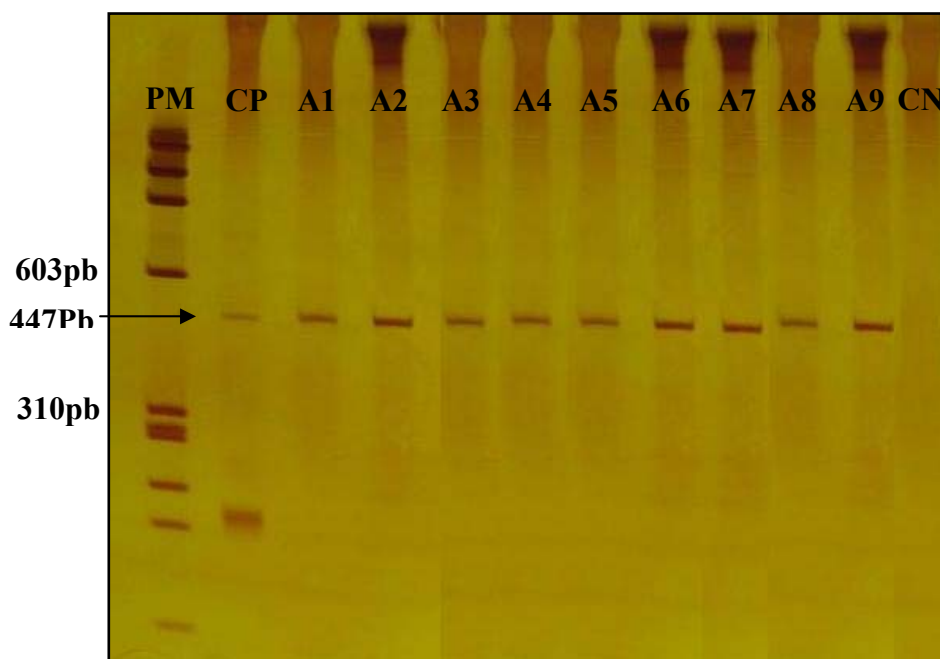


Figura 22 – Gel de Poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata a 0,2%, mostrando o diagnóstico específico de amostras positivas. **PM** – Marcador de peso molecular ØX174; **CP** – Controle positivo; **A1, A2** – Amostras de sangue; **A3-A5** – Amostras de medula; **A6, A7** – Amostras de cultura; **A8, A9** – Amostras de pele; **CN** – Controle negativo (sem DNA)

Discussão

5 – Discussão

5.1 – Fauna flebotômica e as leishmanioses no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG

O crescimento não planejado da área urbana do Município de Santa Luzia (MG), assim como ocorrido em diversas cidades do Brasil, inclusive nos demais municípios pertencentes à Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH), apresenta papel fundamental no desenvolvimento de agravos da saúde. Este crescimento desordenado implicou em uma série de transformações do meio ambiente e possibilitou a instalação e desenvolvimento das leishmanioses.

A maior ocorrência de surtos urbanos de leishmaniose, quando comparada a outras parasitoses, pode ser explicada por sua capacidade de expansão de forma muito rápida quando introduzida em áreas não endêmicas (Wijeyarantne *et al.* 1994). Esse fato associado às condições sócio-econômicas precárias das populações atingidas agrava o problema. Sherlock (1996) observou que na Bahia como em outras regiões do país, a pobreza, a desnutrição, o grande número de cães infectados, além da alta densidade de flebotômicos tanto no intradomicílio como no peridomicílio, estão associados com o grande número de animais domésticos, péssimas condições sanitárias e baixo nível sócio-econômico. Obrigatoriamente outros fatores devem estar envolvidos, em especial os fortes e decisivos componentes do potencial de transmissão advindos de fatores ligados ao vetor, tais como densidade vetorial e taxa de infecção parasitária, além da vulnerabilidade das pessoas suscetíveis ao desenvolvimento da doença.

Os amplos inquéritos sorológicos na população de cães e os levantamentos entomológicos flebotômicos nas áreas endêmicas, revelam em alguns locais taxas de prevalência canina muito altas e a presença predominante e abundante de espécies vetoras, o que redundava em elevado risco de transmissão para o homem (Vieira & Coelho 1998).

Condições ambientais mudando rapidamente em muitas regiões tropicais causadas pela destruição do habitat associadas aos processos de desmatamento e urbanização têm uma influência enorme na população de vetores e, por conseguinte na transmissão da doença. Enquanto algumas espécies desaparecem, outras se tornam abundantes (Bejarano *et al.* 2002).

A transmissão do agente causal das leishmanioses envolve diferentes espécies de flebotomíneos em associações estreitas com parasitos e reservatórios, compondo os elos de diversos ciclos de transmissão que ocorrem no território nacional (Rangel & Lainson 2003).

Os abrigos de animais domésticos construídos muito próximos das habitações humanas, a ausência de boas condições de higiene no peridomicílio e a localização deste ao lado de pequenos capões de mata são freqüentemente observados nas áreas rurais em diversas regiões do Brasil. O Bairro Baronesa, área de estudo deste trabalho, pode ilustrar claramente a existência destes fatores, que somados parece favorecer a concentração de flebotomíneos e de mamíferos reservatórios de *Leishmania* no peridomicílio (Teodoro 1995, Gomes & Neves 1998). São fortes as evidências de que a presença de animais domésticos e silvestres no peridomicílio atrai um grande número de flebotomíneos, conseqüentemente, algumas espécies que são vetoras de leishmanioses, contribuindo assim, para o aumento do risco de transmissão de *Leishmania* sp (Brazil *et al.* 1991; Forattini 1953; 1960; 1976).

Neste estudo foram capturados 1277 exemplares em coletas sistematizadas (Tabela 2) utilizando armadilhas luminosas de Falcão modificadas e 275 exemplares capturados em coletas não sistematizadas manuais utilizando o capturador de Castro (Tabela 5). Assim, um total de 1552 exemplares foi coletado no Bairro Baronesa, pertencentes a sete espécies: *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva 1912), *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva 1912), *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho 1939), *Lutzomyia (Pyntomyia) pessoai* (Coutinho & Barreto 1940), *Lutzomyia cortelezii* (Brethes 1923), *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Pinto 1926) e *Lutzomyia (Micropygomyia) oliveirai* Martins, Silva & Falcão 1970. Neste estudo uma grande quantidade de machos foi observada em ambos os métodos de coleta, com 74% do total de 1552 exemplares coletados e apenas 26% deste total representado por fêmeas. Este fenômeno pode estar associado às atividades normais destes insetos, aos hábitos de seus animais hospedeiros domésticos, às populações de insetos, entre outros fatores que precisam ser estudados com maior profundidade.

Nas coletas sistematizadas as espécies mais abundantes foram representadas por *L. whitmani* (75%) e *L. longipalpis* (19%). As demais espécies representaram apenas 6% do total capturado (Fig.6). Nas coletas não sistematizadas este quadro foi revertido com uma superioridade de *L. longipalpis* (57%) seguida por *L. whitmani* (27%). As demais espécies foram representadas neste método de captura com 16% do total capturado (Fig.8). A superioridade da espécie *L. longipalpis* neste tipo de coleta pode ser explicada pelo fato das

capturas terem sido realizadas apenas nos locais com a presença de animais domésticos (cães), diferente das coletas sistematizadas que contava com armadilhas luminosas. Com estes resultados podemos observar que *L. whitmani* foi de fato a espécie predominante no total de flebotomíneos capturados. Foi demonstrado através da comparação da proporção destas duas espécies, *L. whitmani* e *L. longipalpis*, que existe uma diferença significativa em relação à distribuição segundo a área de captura (Tabela 4). Na área verde *L. whitmani* representou 92% dos exemplares contra apenas 8% de *L. longipalpis* e já na área urbana esta última espécie foi superior com 62% do total capturado contra 38% de *L. whitmani* (Fig.7). Estes resultados são condizentes com alguns achados entomológicos descritos abaixo, sobre o comportamento destas espécies.

É conhecido que existe uma correlação entre a densidade de *L. longipalpis* e as condições observadas no peridomicílio e que esta espécie é freqüentemente associada à presença de animais domésticos (Foratini 1960, Sherlock & Guitton 1969). Esta característica comportamental principalmente de *L. longipalpis*, foi evidenciada neste estudo, já que nas habitações que não possuíam animais domésticos as capturas foram escassas ou mal sucedidas, sendo que em alguns locais não foi capturado se quer um exemplar durante o período de estudo. A presença de *L. longipalpis* no meio urbano se deve principalmente à sua alta adaptabilidade ao ambiente modificado pelo homem, o que lhe confere um papel importante na epidemiologia da leishmaniose visceral. Esta espécie tem ampla distribuição geográfica ao longo do país (Galati 2003, Santos *et al.* 2003), que em geral, coincide com a da LVA e esta associação é um dos critérios utilizados em pesquisas epidemiológicas para validação de casos autóctones (Deane & Deane 1965, Leon 1961). Segundo Barata *et al.* (2005) *L. longipalpis* apresenta um comportamento bastante eclético, uma vez que se alimenta do sangue de aves e mamíferos domésticos e sinantrópicos, incluindo ainda na sua dieta, o sangue humano. Este caráter oportunista já foi verificado por outros autores (Morrison *et al.* 1993, Quinnell *et al.* 1992) e constitui um aspecto ecológico de grande relevância na epidemiologia do calazar.

Apesar de não ter sido verificada infecção natural em fêmeas capturadas de *L. longipalpis* no Bairro Baronesa, a participação desta espécie na transmissão da leishmaniose visceral nesta área parece ter papel fundamental. Nas coletas realizadas na área urbana, onde a prevalência da leishmaniose visceral canina foi muito alta com ocorrência de casos humanos confirmados, houve o predomínio da *L. longipalpis*. A soma destes fatores associados aos

diversos estudos que incriminam esta espécie como transmissora da *L. chagasi*, aumentam as evidências da participação desta espécie no ciclo epidemiológico da LVA no Bairro Baronesa.

Com relação ainda às espécies mais abundantes deste estudo e da relação destas com o local de captura (área verde ou urbana), *L. whitmani* teve uma representação marcante na área verde. Forattini (1960) sugeriu que a espécie, em São Paulo, era dependente da mata primária, mas que poderia ser coletada, em vários meses do ano, dentro das residências, em áreas cuja mata ainda estava mais preservada. Todavia, o autor assinala criadouros desse flebotomíneo em chiqueiros e em plantações de banana situados no peridomicílio, o que é, sem dúvida, prova de que a espécie se cria em ambiente doméstico. Existem relatos sugerindo que em áreas recentemente invadidas pelo homem *L. whitmani* coexista com *L. intermedia*, predominando a segunda espécie à medida que progride a alteração do meio ambiente (Forattini 1960). Segundo o autor seriam necessárias informações mais detalhadas para confirmar esta hipótese. Em estudos realizados em áreas de transmissão de LTA, no Rio de Janeiro, *L. intermedia* e *L. whitmani* puderam ser coletadas sugando o homem no peridomicílio e na mata mais próxima. No peridomicílio predominou a primeira espécie, enquanto na mata prevaleceu a espécie *L. whitmani* (Souza *et al.* 2002). Estudos realizados em Minas Gerais evidenciaram a tendência dessa espécie à domiciliação (Mayrink *et al.* 1979, Passos *et al.* 1991), com incidência baixa na mata e predominância no peridomicílio, onde possivelmente, está criando e praticando a hematofagia no homem e em animais domésticos. Esses estudos estão de acordo com os nossos achados em relação a distribuição desta espécie no Bairro Baronesa com maior predominância na área de vegetação mais intensa, entretanto, mostrando-se já bem adaptada às habitações urbanas, assim como *L. longipalpis*.

5.2 – Infecção natural de flebotomíneos

Além das evidências epidemiológicas, o achado de infecções naturais por *L. (V.) braziliensis* tem indicado a participação de *L. whitmani* sensu stricto na transmissão da LTA. O primeiro relato sugerindo seu papel como vetor data de 1941 (Pessôa & Coutinho), em São Paulo, quando a espécie foi encontrada infectada por flagelados, possivelmente *Leishmania*. Nas décadas de 40 e 50, inquéritos entomológicos realizados em áreas de transmissão de LTA no estado de São Paulo, já indicavam *L. whitmani*, considerada como espécie silvestre, como sendo responsável pela transmissão de leishmaniose devido ao seu grau de antropofilia e por sua alta prevalência (Barreto 1943, Forattini 1954). Ainda no Sudeste brasileiro, dados da literatura sugerem a participação de *L. whitmani* no ciclo de transmissão de LTA em Minas

Gerais, no foco de Caratinga, e no Espírito Santo, na área montanhosa de Afonso Cláudio (Mayrink *et al.* 1979, Falqueto 1995). Na região Sul estaria, possivelmente, associada à transmissão de LTA no estado do Paraná. Recentemente, estudos realizados ao norte do estado apontaram *L. whitmani* como espécie predominante, além da demonstração de infecção natural da espécie por *Leishmania (V.) braziliensis* (0,38% de positividade) (Membrive *et al.* 1999). Em todas as áreas de transmissão de LTA no Nordeste, estudadas até o momento, essa espécie de flebotomíneo é sugerida como transmissora (Rangel & Lainson 2003). Margonari (2005) através de capturas realizadas no município de Belo Horizonte observou que *L. whitmani* além de ser predominante em matas e reservas florestais, está presente no peri e no intradomicílio.

Segundo Killick-Kendrick (1988), para se confirmar uma espécie de flebotomíneo como vetora de leishmaniose é preciso obedecer a cinco critérios: 1) a espécie deve ser abundante no foco de leishmaniose; 2) ser altamente antropofílica; 3) mostrar o desenvolvimento de parasitos na ausência de sangue no intestino; 4) mostrar a mais alta taxa de infecção natural dentre os flebotomíneos observados e 5) o parasito isolado do flebotomíneo deve ser indistinguível daqueles isolados de casos humanos.

Neste trabalho foi verificada a infecção da espécie *L. whitmani* por *L. (V.) braziliensis* pela primeira vez no município de Santa Luzia, através da detecção de DNA do parasito em um “pool” contendo 20 fêmeas desta espécie. Além desta espécie, *L. cortelezzii* teve seu primeiro relato de infecção natural com a detecção de DNA de *L. chagasi*, a partir de um “pool” com 14 fêmeas.

A amplificação de DNA via PCR constitui-se numa alternativa prática e vantajosa, por ser um método altamente sensível e específico na detecção, caracterização e identificação de *Leishmania* sp. em amostras clínicas, reservatórios e vetores infectados (Muller *et al.* 2003, Weigle *et al.* 2002, Minodier *et al.* 1997, Michalsky *et al.* 2002, Pita-Pereira *et al.* 2005). As principais vantagens deste método molecular são sua sensibilidade e especificidade, que são pouco dependentes do número, estágio e localização dos parasitos no trato digestivo do inseto (Perez *et al.* 1994). O método mais comumente utilizado é trabalhoso e consome muito tempo na pesquisa pelo parasito em loco, requerendo prática e avidez na detecção. Além disto, a confirmação dos casos positivos precisa ser feita através da cultura *in vitro* de *Leishmania*, freqüentemente suscetível à contaminação ou ainda através da inoculação em animais de laboratório, pois outros flagelados são freqüentemente encontrados no trato digestivo destes

insetos (Rodriguez *et al.* 1994, Tesh & Modi 1984). Neste estudo não foi encontrada nenhuma forma flagelada utilizando a dissecação como método de verificação de infecção natural das fêmeas capturadas. De fato o aumento na sensibilidade da detecção da infecção utilizando a PCR já tem sido descrito em várias regiões com casos recentes de leishmanioses: 1,3% no Sucre, Venezuela (Jorquera *et al.* 2005); 1,1% na Urua e Puerto Cabello, Venezuela (Feliciangeli *et al.* 1994); 1,1% em Chate, Peru (Perez *et al.* 1994); 0,4% no estado da Bahia, Brasil (Miranda *et al.* 2002); 2% na cidade do Rio de Janeiro (Pita-Pereira *et al.* 2005); 9,1% em Tucumán e Salta, Argentina (Córdoba-Lanús *et al.* 2006).

O achado de infecção natural de *L. whitmani* por *L. braziliensis* torna-se bastante importante uma vez que no município de Santa Luzia, apesar de apresentar maior incidência de casos de LVA, tem sido registrado um número considerável de casos de leishmaniose tegumentar, com 50 casos confirmados no período de 2001 a 2004. Assim, baseado no alto grau de antropofilia de *L. whitmani* relatado em diversos trabalhos, no registro de casos autóctones de LTA e na abundância e distribuição espacial desta espécie coincidente com a área de ocorrência da doença, podemos sugerir sua participação no ciclo de transmissão da LTA no Bairro Baronesa. Entretanto, não podemos afirmar a participação única desta espécie na transmissão, uma vez que outras espécies incriminadas como vetoras desta parasitose também foram capturadas no bairro.

Em relação a *L. cortelezzii*, não podemos inferir ainda uma participação desta espécie na transmissão da LVA na área, uma vez que não existem relatos que a incriminam como vetora em outras regiões. Este achado indica a presença do parasito sem, contudo determinar a capacidade de metaciclogênese da *L. chagasi* no tubo digestivo do inseto e sua capacidade vetorial. Entretanto, em foco de calazar no Estado de Minas Gerais, Martins *et al.* (1956) encontraram *L. cortelezzii* em número expressivo, junto com *L. longipalpis*, e comentaram sobre a necessidade de estudos mais aclaradores do significado epidemiológico desse evento, para o ciclo da doença (Galati *et al.* 1997). Dados sobre a distribuição e habitats desta espécie indicam sua ocorrência no Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, e o seu encontro em troncos de árvores e raízes tabulares, copa das árvores, anexos de animais domésticos (galinheiros, chiqueiros, currais e etc.) e paredes externas e internas do domicílio humano (Aguiar & Medeiros 2003). A competência de uma espécie de flebotomíneo, de ser infectada e de se transformar em vetor, depende de vários fatores intrínsecos que determinarão a sua capacidade de ser susceptível ou refratária ao desenvolvimento de determinadas espécies de *Leishmania*. Esses fatores sugerem a existência de um processo de co-evolução entre as

distintas espécies de *Leishmania* com os seus flebotomíneos vetores (Pimenta *et al.* 2003). Killick-Kendrick (1987), revisando vários estudos, nos quais descrevem infecções naturais ou experimentais em laboratório, sugere que as espécies do gênero *Lutzomyia*, os flebotomíneos do Novo Mundo, são mais susceptíveis a infecções por distintas espécies de *Leishmania* do que os do gênero *Phlebotomus*, os flebotomíneos existentes no Velho Mundo. Desta forma, a infecção natural de *L. cortelezzii* por *L. chagasi* não pode incriminá-la como vetora, uma vez que são necessários de maiores estudos sobre o seu comportamento, sua distribuição espacial em relação a doença e a capacidade de interação com esta espécie de *Leishmania*.

Dentre as espécies capturadas no Bairro Baronesa, embora em menor número ainda merecem destaque, *L. intermedia*, *L. neivai* e *L. pessoai*, por apresentarem relatos importantes sobre a participação na transmissão de LTA em diversas regiões do território nacional, principalmente *L. intermedia*.

Em algumas regiões do Brasil, a espécie *L. intermedia* ocorre em florestas e matas secundárias, sobretudo em área cujo desmatamento vem modificando gradativamente o perfil ecológico, observado claramente em áreas de colonização antiga. Já em 1943, Barreto sugeria que esse flebotomíneo tinha preferência por matas de segunda formação e capoeiras localizadas em regiões que vinham sofrendo com a ação do homem por algum tempo (Rangel & Lainson 2003). Embora altamente antropofílica, *L. intermedia* parece ser fortemente atraída por cães e cavalos, sugeridos como reservatórios secundários de *L. (V.) braziliensis* (Menezes *et al.* 1974, Araújo Filho 1978, Sabroza 1981, Coutinho *et al.* 1981, Rangel *et al.* 1986, 1990, 1998). Apesar da baixa densidade desta espécie no Bairro Baronesa e de não ter verificado a mesma com infecção natural, existem evidências epidemiológicas acumuladas ao longo dos anos que sugerem *L. intermedia* como transmissor do agente causal de LTA em áreas endêmicas no Sudeste do Brasil. Os estudos apontam-na como principal transmissor em São Paulo e Rio de Janeiro (Forattini *et al.* 1972, Rangel *et al.* 1984). Entretanto, nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo compartilha seu papel vetorial com *L. whitmani* (Falqueto 1995, Mayrink *et al.* 1979). Em estudo recente de infecção natural, *L. intermedia* foi identificada com *L. (V.) braziliensis* através da técnica da PCR, sugerindo a possibilidade de envolvimento desta espécie no ciclo de transmissão da LTA em áreas endêmicas do Rio de Janeiro e no município de Araçuaí, Minas Gerais (Pita-Pereira *et al.* 2005, Gontijo *et al.* 2005).

As espécies *L. neivai* e *L. intermedia* apresentam grande polimorfismo e variações interpopulacionais e interespecíficas (Andrade-Filho 2003). A primeira espécie foi considerada como sinônimo júnior de *L. intermedia* por Pinto (1930) e essa interpretação foi seguida pelos estudiosos de flebotomíneos, até que Marcondes (1996) a revalida baseado no holótipo e em uma fêmea de Fortim Campero, departamento de Tarija, Bolívia. Andrade-Filho (2003) em um estudo aprofundado destas duas espécies as definiu como táxons distintos e passíveis de separação, mesmo sendo altamente variáveis em sua morfologia. Ambas apresentam características que atendam aos critérios necessários para incriminação como vetoras de LTA com vários estudos demonstrando infecção natural nas duas espécies, apesar dos índices baixos de infecção que variam de 0,1% a 0,6% (Forattini *et al.* 1972, Rangel *et al.* 1984, Casanova *et al.* 1995). Em estudo recente de infecção natural de *L. neivai* no nordeste da Argentina foi encontrada uma taxa de infecção de 9,1%, por parasitos do subgênero *Viannia* (Córdoba-Lanús *et al.* 2006). A infecção experimental tem demonstrado que estas espécies são facilmente infectáveis com várias cepas e espécies de *Leishmania* (Chagas 1940, Coelho *et al.* 1967, Rangel *et al.* 1992, Rangel *et al.* 1993, Silva & Gomes 2001), o que demonstra serem estas espécies altamente susceptíveis à *Leishmania*. Dado o exposto, parece não haver dúvidas quanto à capacidade vetorial de *L. intermedia* e *L. neivai*, necessitando ainda do isolamento e caracterização comparativa dos parasitos destes flebotomíneos com aqueles oriundos dos pacientes humanos.

Em relação à espécie *L. pessoai*, pode-se dizer que é um flebotomíneo antropofílico, sendo também atraído por animais domésticos, particularmente cães e galinhas (Rangel & Lainson 2003). Estudos realizados em São Paulo (Barreto 1943) revelaram os hábitos silvestres desse flebotomíneo, sendo verificada sua maior incidência junto às áreas de derrubadas recentes, especialmente nas matas onde ocorrem habitações humanas ou naquelas onde se observa a visita freqüente de homem e de animais domésticos. Em São Paulo, a espécie foi coletada, inclusive, dentro de residências distantes cerca de 300 metros da mata (Forattini 1954). Embora com pouco conhecimento sobre os criadouros, algumas informações sugerem que as formas imaturas podem evoluir no solo de florestas (Forattini 1954). Algumas evidências têm sugerido que *L. pessoai* possa participar do ciclo de transmissão da LTA no Sudeste brasileiro: alta densidade, considerável antropofilia e invasão de domicílios em regiões endêmicas. Já no início da década de 40, foi coletada no interior de algumas residências localizadas em áreas consideradas de alta endemicidade no estado de São Paulo. Nesse mesmo estado esse flebotomíneo foi encontrado, com infecção natural, por flagelados ditos leptomonas, supostamente promastigotas de *Leishmania* (Pessoa & Coutinho, 1940,

1941). Entretanto, tais achados não tiveram confirmação posterior. Neste trabalho, quase todos os exemplares desta espécie foram coletados na área verde do bairro, na presença de animais domésticos, condizente com os relatos anteriores sobre o comportamento desta espécie.

Camargo-Neves *et al.* (2001) consideram a necessidade de analisar a densidade vetorial e correlacioná-la com os aspectos ambientais do peridomicílio, tais como presença de vegetação, raízes, troncos de árvores e matéria orgânica no solo, representando possíveis abrigos e criadouro para o vetor. Ficou claro neste trabalho a grande relação existente entre a densidade de flebotomíneos e a presença de animais domésticos no peridomicílio, além da proximidade ou existência de áreas de vegetação intensa que vem sofrendo ação constante do homem. O Bairro Baronesa pode ilustrar em alguns pontos a transição do ciclo das leishmanioses de um ambiente mais silvestre para o ambiente mais urbanizado. A presença de espécies tais como *L. whitmani*, *L. intermedia* e *L. pessoai*, confirma a tendência à domiciliação já relatada em diversas regiões do Brasil e a necessidade das ações de controle entomológico no bairro, uma vez que já foram relatados casos humanos de LTA na área, infecção natural de *L. whitmani* por *L. braziliensis* proveniente de capturas realizadas no bairro, além da captura das outras duas espécies também incriminadas como potenciais vetoras de LTA. *L. whitmani* demonstra uma grande plasticidade em colonizar ambientes diferentes e pode ser considerada totalmente adaptada às modificações antrópicas sendo capaz de viver e se reproduzir em ambientes urbanos. A presença predominante de *L. longipalpis* na região mais urbanizada do bairro, merece também grande atenção, uma vez que esta espécie já se encontra bastante adaptada às diversas modificações ambientais impostas pelo homem e sabendo-se da sua alta capacidade vetorial em relação à LVA. *L. cortelezzii*, relatada pela primeira vez com infecção natural por *L. chagasi*, precisa ser melhor estudada, atentando para o seu possível envolvimento no ciclo de transmissão em áreas endêmicas de LVA.

Sob o ponto de vista ambiental, fatores climáticos e ecológicos são importantes conexões na epidemiologia da LV (Sherlock 1996). Na literatura os fatores climáticos influenciam de modo variável na população flebotomínica, dependendo da região analisada. Comumente, os flebotomíneos são encontrados durante os meses quentes e úmidos (Aguiar & Soucasaux 1984, Gomes & Galati 1987, Salomón *et al.* 2002). Deane & Deane (1955) mostraram em seus estudos a nítida influência que as estações do ano exercem sobre a fauna de *L. longipalpis* e, observaram também que a estação chuvosa propicia um aumento da umidade e favorece diretamente, a proliferação e a sobrevivência dos flebotomíneos. Outro

fator é o renascimento da vegetação, que pode favorecer diretamente os vetores, propiciando-lhes mais abrigos e criadouros. Por outro lado, Condino *et al.* (1998) observaram a inexistência da relação entre esses fatores e a densidade flebotomínica. Há muitos anos o padrão de sazonalidade dos flebotomíneos vem sendo estudado. Nos estados do Ceará, Bahia, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais foram observadas maiores densidades populacionais de flebotomíneos na estação chuvosa (Deane 1956, Sherlock e Guitton 1969, Galati *et al.* 1997, Barata *et al.* 2004, Monteiro 2004).

Ao analisarmos a correlação entre a densidade total de flebotomíneos e os dados climatológicos durante o período de captura, não foi verificada nenhuma correlação estatisticamente significativa (Tabela 9). Ainda assim, é possível observar alguns picos da densidade de flebotomíneos relacionados a meses mais úmidos, principalmente com o início das chuvas, nas últimas capturas (Fig.14). Os meses de precipitação elevada comprometeram as capturas, principalmente em dezembro de 2004 e janeiro de 2005. Este aumento excessivo da precipitação pode comprometer não só as capturas, mas também a reprodução dos flebotomíneos, com a lavagem dos criadouros e morte das larvas destes insetos. Entretanto, deve-se levar em consideração a necessidade de um período e número maiores de capturas para verificar a real correlação entre as variáveis climáticas e a densidade total de flebotomíneos para esta área de estudo.

5.3 – Cão como reservatório de *Leishmania*

Um importante aspecto das doenças transmitidas por vetores, é a existência de uma população de hospedeiros, que é efetivamente responsável pela manutenção e dispersão da doença (Woolhouse *et al.* 1997). Portanto, o conhecimento dos reservatórios é importante para o efetivo controle das leishmanioses, embora, outros fatores de risco associados à epidemiologia da doença sejam mais complexos, como a urbanização do ciclo de transmissão e a manutenção de um ciclo enzoótico nos centros urbanos (Cabrera *et al.* 2003).

No Brasil, a infecção natural do cão doméstico com *L. (L.) chagasi* ou *L. (V.) braziliensis* tem sido documentada em regiões com a transmissão periurbana das leishmanioses visceral e tegumentar respectivamente (Marzochi *et al.* 1985, Falqueto *et al.* 1986). No caso da leishmaniose visceral (LV), o papel dos cães (revisto por Alvar *et al.* 2004) como fonte de infecção para flebotomíneos dentro do ciclo doméstico tem sido demonstrado a muito tempo (Deane & Deane 1955).

A importância da infecção canina no contexto das leishmanioses é conferida por várias razões, dentre as quais se destacam: o convívio do cão em estreita aproximação com o homem, vivendo no peridomicílio e em muitos casos, no próprio domicílio; o fato de servir de fonte de repasto para o vetor, atraindo-o para perto do homem; sua alta densidade populacional aliada à susceptibilidade que apresenta às espécies de *Leishmania*, além do grande número de cães assintomáticos com intenso parasitismo cutâneo (Killick-Kendrick *et al.* 1997).

Na leishmaniose tegumentar (LT) a importância do cão como possível reservatório de *L. braziliensis* tem sido discutida desde o primeiro relato de infecção natural (Brumpt & Pedroso 1913). A alta prevalência da infecção entre cães de zonas endêmicas, a íntima relação entre casos humanos e caninos e a identidade de parasitos infectando humanos e cães, sugerem que esta doença possivelmente envolva estes animais como reservatórios (Aguilar *et al.* 1989, Falqueto *et al.* 1986, 1991, Yoshida *et al.* 1990, Lainson *et al.* 1994). Entretanto, pouco se conhece sobre o curso natural da infecção e o potencial de infecção dos cães com a doença ativa para o inseto vetor (Reithinger & Davies 1999). A distribuição sistêmica dos parasitos observada em cães infectados com *L. chagasi* contrasta com a aparente restrição da *L. braziliensis* a lesões cutâneas (Marzochi *et al.* 1985). Segundo Madeira *et al.* (2005) o possível papel do cão na transmissão da LT parece ser pequeno, provavelmente devido à baixa probabilidade de infecção para os flebotomíneos quando estes não se alimentam em lesões cutâneas, local onde frequentemente são encontrados os parasitos. Alguns autores sugerem a disseminação destes parasitos no sangue como um fenômeno eventual ou intermitente (Bowdre *et al.* 1981, Silveira *et al.* 1989, Martinez *et al.* 1992, Sousa *et al.* 1995). Outros autores falharam em demonstrar a presença de *L. braziliensis* em cães fora das lesões cutâneas ativas (Herrer & Christensen 1976, Pirmez *et al.* 1988a, b). Entretanto, *L. braziliensis* foi isolada de uma única lesão cicatricial sugestiva de LT em um cão (Falqueto *et al.* 1986) e de cicatrizes humanas de LT (Mendonça *et al.* 2004, Schubach *et al.* 2001). Já Reithinger *et al.* (2003) utilizando método mais sensível baseado na PCR, detectou um índice de 8,4% de infecção canina por *Leishmania* (*Viannia*), testando como amostras clínicas sangue, pele e medula óssea, obtendo resultados positivos com todos os tipos de amostras. Neste estudo, os autores ainda compararam a sensibilidade da PCR (31%) com a técnica sorológica de ELISA (81%), indicando que a PCR não pode ser utilizada para pesquisas em massa de amostras provenientes de áreas endêmicas de LTA.

As evidências atuais de que cães domésticos atuem como hospedeiros reservatórios para a transmissão da LTA são circunstanciais, pois estão fundamentadas apenas no isolamento e identificação de amostras de *Leishmania* e na detecção de prevalências relativamente altas da LTA em cães proveniente de áreas endêmicas. Baseado apenas nestes fatores, a probabilidade de cães domésticos serem reservatórios da LTA não é maior que a probabilidade de humanos atuarem como tais (Reithinger & Davies 1999).

Neste estudo não foi encontrado nenhum cão infectado por *L. braziliensis* apesar da presença da LTA na área de estudo e do relato de infecção natural de *L. whitmani* com esta espécie de *Leishmania*. Este fato pode estar relacionado com uma série de fatores, dentre eles, a possível participação de outros reservatórios desta espécie de *Leishmania* no local estudado. Para a identificação da espécie de *Leishmania* foram utilizadas neste estudo amostras isoladas em cultura e amostras clínicas positivas na PCR genérica (33 de pele, 30 de medula óssea e 19 de sangue) de um grupo de 43 cães com sorologia positiva. Ainda restam 66 amostras de sangue com PCR positiva para serem caracterizadas, sendo algumas delas provenientes de cães com sorologia negativa. Este fato é importante, sabendo-se que alguns estudos relatam uma resposta humoral muito fraca na leishmaniose tegumentar americana (Ajadary *et al.* 2000, Uchôa *et al.* 2001) e que grandes quantidades de anticorpos específicos são produzidos: na leishmaniose visceral, em casos de leishmaniose tegumentar (com lesões múltiplas) em fases mais tardias da infecção e em lesões cutâneas simples com envolvimento da drenagem linfática (Bray 1985). Assim, a hipótese do encontro de *L. braziliensis* em cães desta área não está ainda descartada, principalmente nos cães com sorologia negativa e PCR genérica positiva, visto que é possível a detecção de *Leishmania (Viannia)* spp. através da PCR em amostras de sangue (Reithinger *et al.* 2003).

Desde a descoberta da leishmaniose visceral canina (LVC) em um inquérito canino na Tunísia, os cães têm sido implicados como importantes reservatórios na cadeia de transmissão da LV. De 145 cães examinados pelo método parasitológico utilizando material coletado através de punção na medula óssea, três animais mostraram-se positivos, ficando assim registrado o primeiro foco de calazar canino no mundo (Nicolle e Conte 1908).

As primeiras observações feitas no Brasil sobre a LVC foram realizadas por Chagas *et al.* (1937, 1938), na região Norte. Porém a doença só foi caracterizada quando estudada por Deane (1956) em uma área endêmica do Estado do Ceará. A LVC assim como a doença

humana está bastante difundida no país e algumas localidades endêmicas revelam altas taxas de prevalência de LVC com a presença abundante do vetor (Vieira & Coelho, 1998).

O calazar canino, do ponto de vista epidemiológico é considerado mais importante que a doença humana, pois além de ser mais prevalente, apresenta um grande contingente de animais infectados com parasitismo cutâneo, que servem como fonte de infecção para insetos vetores. Estas características tornam o cão doméstico o principal reservatório do parasito no ambiente urbano (Ashford 1996).

O cão tem sido apontado como o principal reservatório da LV em Belo Horizonte. Aparentemente, o papel do cão na introdução, dispersão e manutenção da LV tem valor relevante, uma vez que a epidemia canina precedeu à humana. Os distritos de Belo Horizonte com maiores incidências de calazar humano, sobrepuseram-se àqueles que apresentaram a doença canina no período de 1993 a 1997 (Belvilacqua *et al.* 2001). Utilizando a análise espacial Oliveira *et al.* (2001) observaram uma forte evidência de que os casos humanos de LV no município de BH no período de 1994-1997 ocorreram em áreas onde a taxa de prevalência em cães era alta.

5.4 – A leishmaniose canina no bairro Baronesa

Nosso estudo registrou uma soroprevalência de 57% (117/205), considerada muito alta e de grande importância epidemiológica, já que o programa de controle do município preconiza a eutanásia de cães com sorologia positiva. A prevalência da infecção, calculada levando-se em consideração os resultados positivos do diagnóstico molecular, também foi alta (54%) e todos os cães positivos com amostras caracterizadas (36/43) indicaram a *L. chagasi* como responsável pela infecção. Estes resultados demonstram a importância do cão como reservatório para *L. chagasi* no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG, sugerindo que medidas de controle do calazar canino devam ser implementadas, para que os níveis de prevalência canina não aumentem ainda mais, podendo assim agravar o aumento do número de casos humanos, já que tem sido observada uma correlação entre o número de casos caninos e a ocorrência de casos humanos (Evans 1990). Embora a soropositividade não esteja diretamente relacionada com a infecção dos cães, conforme será discutido adiante, a remoção dos soropositivos leva a uma redução significativa da incidência da doença canina e humana (Palatnik-de-Sousa *et al.* 2001).

Clinicamente, os cães infectados com *L. infantum* foram classificados por Mancianti *et al.* (1988) em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Os assintomáticos são cães com ausência de sinais clínicos característicos de infecção por *Leishmania*, nos oligossintomáticos ocorrem até três sinais clínicos característicos da infecção por *Leishmania*. Os cães sintomáticos são aqueles que apresentam mais de três sinais clínicos característicos da infecção, entre eles alopecia, dermatite furfurácea, úlceras, hiperqueratose, onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite, adenopatia linfóide, opacificação das córneas e do pelo. Uma característica importante é a permanência da doença clinicamente inaparente por longos períodos. Nosso estudo classificou os cães apenas em dois grupos: sintomáticos, com pelo menos três sinais clínicos sugestivos da LVC, e assintomáticos, com ausência de sinais clínicos.

Dos 201 cães, 42 foram classificados como sintomáticos e 159 como assintomáticos. A prevalência da doença foi calculada considerando-se o grupo de cães sintomáticos com participação nos testes sorológicos (RIFI e ELISA) e molecular (PCR sangue). Dos 42 cães sintomáticos 33 (79%) foram positivos em pelo menos um dos testes realizado, resultando em 16% (33/201) a prevalência da doença canina na população estudada. Estes resultados são bastante relevantes, uma vez que a porcentagem de cães infectados, independentemente da forma clínica, que vivem em área onde a leishmaniose canina é endêmica, tem importante implicação na saúde pública.

De acordo com Molina *et al.* (1994) o estado clínico do cão não tem relação com sua infectividade para o vetor e a variabilidade do número de flebotomíneos que se infectaram em grupos de cães com formas clínicas variadas foi grande. Já de acordo com Garcez *et al.* (2003) a relação entre infectividade e o estado clínico do cão pode variar entre os estudos. Um modelo matemático para LV estabelecido por Lanotte *et al.* 1979, Dye *et al.* (1992) e Hasibeder *et al.* (1992), propôs que cães assintomáticos não são infectivos para flebotomíneos e não possuem um papel importante na transmissão da LV, pois possuem baixa ou nenhuma capacidade de infectar os vetores.

Entretanto, Travi *et al.* (2001) mostraram que seus dados foram similares aos de Sherlock (1996) onde se observou que cães assintomáticos são fontes moderadas de *L. chagasi* para os vetores, e que cães em estágios adiantados da doença tornam-se mais infectivos para os flebotomíneos. Da mesma forma Guarga *et al.* (2000) estudando diferentes formas clínicas de LVC, demonstrou que a pele saudável de cães assintomáticos é atrativa

para os flebotomíneos, com uma taxa de infecção de 6%. Já com o progresso da doença foi observado que a pele em estado mais deteriorado, demonstrou ser mais atrativa para os vetores, que alimentados nesses cães, apresentaram uma taxa de infecção de 35% (Vexenat *et al.* 1994). Michalsky (2004) ao estudar a infecção de *L. longipalpis* alimentadas em cães infectados com *L. chagasi* observou diferença entre as taxas de infecção quando o xenodiagnóstico foi realizado em animais assintomáticos (5,4%) ou sintomáticos (28,35%).

Estes resultados suportam o ponto de vista de Molina *et al.* (1994) no qual apenas o sacrifício dos cães sintomáticos com sorologia positiva como estratégia para o controle da LV é insuficiente, devido à importância que os cães assintomáticos têm na epidemiologia da doença. E como estes últimos foram representados em maior número que os sintomáticos no nosso estudo, as medidas de controle devem ser direcionadas aos cães infectados, isto é, portadores de *Leishmania*, independentemente dos sinais clínicos que manifestem.

Portanto, fica clara a importância do cão doméstico na cadeia de transmissão da LVA no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG. A alta prevalência da LVC neste Bairro pode ser um fator crucial para o aumento da incidência de casos caninos e possivelmente de casos humanos, devido a presença abundante do vetor, traduzindo-se em um grave problema de saúde pública. A hipótese de se encontrar cães portadores de *L. braziliensis* ainda não foi descartada, uma vez que ainda restam algumas amostras de sangue positivas na PCR genérica, para serem caracterizadas. Entretanto, caso esta hipótese seja confirmada, a mesma se tornará apenas uma evidência circunstancial na suspeita do papel do cão como hospedeiro reservatório da LTA. São necessários ainda maiores estudos para a verificação da participação do cão no ciclo de transmissão da LTA.

5.5 – Diagnóstico da leishmaniose canina

O diagnóstico da leishmaniose canina não difere substancialmente do humano; em ambos, os dados clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e bioquímicos precisam ser considerados juntos. Os métodos de diagnósticos mais utilizados estão divididos entre a detecção do parasito (direto e indireto) e técnicas de imunodiagnóstico para detectar resposta celular e humoral (Alvar *et al.* 2004)

O diagnóstico da leishmaniose canina através de sinais clínicos da doença e dados laboratoriais não específicos não é considerado confiável pelas seguintes razões: nos exames

clínicos mais de 50% dos cães com infecção estabelecida confirmada são aparentemente saudáveis (assintomáticos), sendo uma característica importante, a permanência por períodos prolongados da infecção inaparente; quando presentes, os sinais clínicos podem ser variáveis passíveis de confusão com aqueles causados por outras doenças (Ciaramella *et al.* 1997, Koutinas *et al.* 1999); com a difusão constante de ferramentas mais específicas de diagnóstico, formas atípicas da leishmaniose canina estão sendo amplamente relatadas, tais como dermatites localizadas, colites crônicas, e disfunções dos sistemas cardiovascular, respiratório e músculo-esquelético (Blavier *et al.* 2001, Lamothe 2002), as quais tornam o diagnóstico clínico um grande desafio.

O diagnóstico parasitológico para a leishmaniose visceral canina pode ser realizado por diversos métodos: isolamento em meios de cultura, inoculação em hamsters, pesquisa de formas amastigotas em esfregaços corados de órgãos, ou em cortes histológicos. A especificidade destes métodos é de 100% mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitos não é homogênea no mesmo tecido (Gontijo & Melo 2004). Embora os exames parasitológicos constituam o diagnóstico de certeza, não são métodos de escolha, pois não apresentam aplicabilidade nos programas de controle da doença, principalmente em trabalhos de campo. Os métodos parasitológicos são considerados procedimentos invasivos, exigem ambientes apropriados para a coleta, apresentam baixa sensibilidade além de serem trabalhosos, de liberação de resultados demorada (Brener 1957, Marsdem & Jones 1985, Mohammed *et al.* 1986, Genaro *et al.* 1988, Sundar & Raí 2002). A cultura “in vitro” é ligeiramente mais sensível que o exame microscópico de biópsias de lesão e amostras histológicas, apesar de mais laboriosa, cara e sujeita a contaminações microbiológicas (Manna *et al.* 2004), o que muitas vezes inviabiliza a obtenção do resultado.

A histopatologia dos diferentes órgãos envolvidos na LV tem sido descrita por muitos autores. A lesão básica em humanos e caninos envolve parasitismo e proliferação dos macrófagos, e as alterações mais importantes são observadas no baço, fígado, medula óssea, linfonodos, rins, pulmões e na pele (Adler & Teodor 1935, Tafuri *et al.* 2004).

Neste trabalho foi utilizada a cultura de aspirado de medula óssea de um grupo de 43 cães com sorologia positiva. Entretanto, esta técnica não foi utilizada como método de diagnóstico, ficando restrita ao intuito de isolamento de parasitos para posterior caracterização. Oito amostras (19%) foram positivas por apresentarem nas culturas formas promastigotas de *Leishmania*, posteriormente caracterizadas como *L. chagasi*.

É inquestionável a contribuição dada por metodologias sorológicas nos levantamentos epidemiológicos de doenças endêmicas, notadamente na LV. Entretanto, testes sorológicos apresentam limitações tanto de sensibilidade como de especificidade que podem interferir na confiabilidade dos resultados (Camargo 1994). Neste contexto, os métodos sorológicos utilizados no diagnóstico da LV são fundamentais para auxiliar tanto no diagnóstico clínico quanto nos estudos epidemiológicos. Quando os resultados da sorologia são utilizados como medidores da prevalência da doença, é preciso ter-se um bom estudo da sensibilidade e, principalmente, da especificidade do método empregado. Caso contrário pode-se estar manipulando taxas de positividade equivocadas, o que leva a um falso conhecimento da gravidade da endemia na região. Estes métodos apresentam como vantagens principais o fato de não serem invasivos, de possibilitarem trabalhar com amostras maiores e fornecerem um grande número de resultados em curto prazo (Rosário *et al.* 2005).

As diversas técnicas sorológicas existentes diferem em sua sensibilidade e especificidade, na sua aplicação prática nas condições de campo e na disponibilidade de reagentes. Os clínicos e os epidemiologistas sempre solicitam exames sorológicos para confirmar a suspeita clínica e esperam que os resultados sejam confiáveis, sendo a especificidade e sensibilidade dos testes características essenciais para isto (Gontijo & Melo 2004). Além disso, é também importante que um teste diagnóstico apresente acurácia e altos valores preditivos positivo e negativo para reduzir a probabilidade de resultados falsos. A acurácia de um método de diagnóstico é criticamente dependente da determinação do ponto de corte a ser adotado (Boelaert *et al.* 1999).

Atualmente são usados no diagnóstico da LVC os testes de aglutinação direta (DAT), reação de imunofluorescência (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Estas técnicas utilizam antígenos brutos e são limitadas em termos de especificidade e reprodutibilidade (Sundar e Rai 2002). No Brasil os testes mais utilizados no diagnóstico de LV humana e canina são a RIFI e ELISA, sendo considerados, sobretudo este último, testes de escolha para inquéritos populacionais (Gontijo & Melo 2004).

Durante muito tempo a RIFI foi a técnica mais utilizada para o diagnóstico da LV, embora não seja muito adequada para analisar um grande número de amostras. A RIFI apresenta baixa especificidade, exige na sua execução pessoal treinado, é uma reação dispendiosa e não está adaptada para estudos epidemiológicos em larga escala. Atualmente o teste de ELISA vem sendo mais utilizado para o diagnóstico da LV, uma vez que a leitura do

resultado é feita rapidamente e não sofre influência do observador, além de ser uma técnica altamente viável para analisar grande número de amostras em tempos menores (Nurit *et al.* 1988). O ELISA é um teste de fácil execução e leitura quando comparado com a RIFI, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, entretanto esta técnica é pouco precisa na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (Almeida *et al.* 2005).

Nossos resultados sorológicos demonstraram uma prevalência alta da leishmaniose canina na área de estudo, com 41% dos cães reativos na RIFI, 48% no ELISA totalizando uma soroprevalência de 57% quando considerados os dois testes (Tabela 10). Entretanto, foi possível observar que tanto a RIFI quanto o ELISA apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) quando analisados os resultados destes testes segundo o status clínico dos cães, detectando uma maior porcentagem de cães positivos quando estes já apresentavam sinais clínicos da doença (Tabela 12).

Outro fator importante em relação aos resultados encontrados no diagnóstico sorológico é que apesar de terem sido os únicos testes que apresentaram concordância estatisticamente significativa (Tabela 15), o valor de *Kappa* indicou uma concordância regular. Estes resultados demonstram uma deficiência de ambas as técnicas em detectar cães infectados por *Leishmania* e redundam na possível eliminação de cães falso-positivos, ou ainda, na manutenção de cães positivos (falso-negativos), que possivelmente contribuirão para o aumento tanto da incidência canina quanto da humana.

A sorologia detecta a maioria dos cães sintomáticos (Ciaramella *et al.* 1997, Koutinas *et al.* 1999) e uma proporção dos cães assintomáticos que representam em torno de 50% da população canina soropositiva (Lanotte *et al.* 1979, Gradoni *et al.* 1980, Pozio *et al.* 1981, Mancianti *et al.* 1986, 1994, Abranches *et al.* 1991, Fisa *et al.* 1999, Sideris *et al.* 1999). Silva e colaboradores (2001) em um estudo clínico epidemiológico em cães de BH/MG, observaram que entre os cães positivos na sorologia realizada pela RIFI, 26,5% apresentaram títulos iguais a 1:640, mostrando que altos títulos de anticorpos ocorrem em animais infectados, mesmo assintomáticos. Em avaliação multicêntrica de um kit para ELISA, realizada por pesquisadores italianos (Scalone *et al.* 2002), também foi observada correlação entre os valores da absorbância no ELISA e títulos na RIFI, com a severidade da doença nos cães. Entretanto, estes métodos falham em detectar cães infectados no período pré-patente da infecção e antes de sua soroconversão, aqueles que nunca vão soroconverter e os cães

soropositivos que convertem em soronegativos, mas ainda permanecem infectados (Dye *et al.* 1992, 1993, Pinelli *et al.* 1994, Quinell *et al.* 1997). Como abordado anteriormente este é um fator bastante relevante, já que a maioria dos cães do nosso estudo eram assintomáticos e que estes podem atuar como fonte de infecção para flebotomíneos vetores.

Segundo Ferreira (2005) como a prevalência da LC é comumente determinada pelos inquéritos soropidemiológicos, nos deparamos basicamente com duas situações problema, decorrentes das limitações dos métodos utilizados atualmente: 1^a – A sub estimativa da prevalência pode ocorrer devido à sensibilidade limitada das técnicas empregadas visto que de 5 a 10% dos cães não desenvolvem níveis de anticorpos detectáveis por estas técnicas ou porque os cães, mesmo infectados, ainda não apresentam a soroconversão; 2^a – A super estimativa da prevalência também é possível devido aos casos falso-positivos decorrentes da baixa especificidade das técnicas tradicionais como consequência de reações cruzadas com outras infecções transitórias que são eliminadas naturalmente pelos animais. Isto reforça a necessidade de se buscar métodos mais efetivos de diagnóstico sorológico e explica, pelo menos em parte, o porquê das ações de controle baseadas na eliminação dos cães soropositivos não ser suficiente, uma vez que é grande o número de cães infectados e não detectados pelas técnicas sorológicas empregadas.

O método para detecção de *Leishmania* baseado na PCR é considerado como “padrão-ouro” na determinação da presença e na identificação da infecção, não somente em casos agudos, mas também no monitoramento da cura parasitológica de pacientes após quimioterapia. Este método apresenta um alto potencial de sensibilidade, especificidade e facilidade e vem sendo muito usado no diagnóstico das leishmanioses (Cortes *et al.* 2004).

Rodrigues *et al.* (2002) obtiveram uma sensibilidade de 95,4% e especificidade de 100% da PCR em amostras de pacientes. A possível explicação para os resultados falso-negativos pode ser atribuída à baixa carga parasitária, instabilidade do DNA extraído ou a qualidade da amostra de DNA, que podem apresentar diferentes concentrações de inibidores da DNA polimerase. Lachaud *et al.* (2002) sugerem como estratégia mais adaptada para as pesquisas de prevalência uma combinação da sorologia com a alta sensibilidade encontrada na PCR utilizando amostras de sangue periférico.

Nos últimos anos, um grande número de estudos tem investigado o uso da PCR para detectar *Leishmania* em cães. Várias amostras clínicas, iniciadores e métodos têm sido

desenvolvidos e aplicados (Ashford *et al.* 1995, Mathis & Deplazes 1995, Berrahal *et al.* 1996, Reale *et al.* 1999, Roura *et al.* 1999, Campino *et al.* 2000, Quinell *et al.* 2001, Fisa *et al.* 2001, Martín-Sanchez *et al.* 2001, Solano-Gallego *et al.* 2001, Cortes *et al.* 2004, Michalsky 2004).

Recentemente alguns estudos em cães relataram o desempenho da PCR em amostras indicativas da disseminação de *Leishmania* (por exemplo, linfonodos e medula óssea) e compararam ainda com os resultados obtidos em técnicas padrões-ouro da sorologia (RIFI e ELISA) e técnicas parasitológicas com demonstração do parasito pela microscopia e/ou cultura de linfonodos e medula óssea (Roura *et al.* 1999, Martín-Sanchez *et al.* 2001, Fisa *et al.* 2001, Solano-Gallego *et al.* 2001, Ikonopoulou *et al.* 2003). Os grupos de cães incluíam os clinicamente saudáveis e os animais sintomáticos. A eficácia da PCR foi encontrada ser mais baixa ou similar à sorologia, mas sempre consistentemente mais alta que as técnicas parasitológicas. Entretanto, algumas amostras positivas na PCR foram detectadas em cães sorologicamente negativos.

No presente estudo os resultados da PCR foram utilizados como critério para a classificação dos cães em infectados e não infectados. Para isto foram utilizadas amostras clínicas de pele (43), medula óssea (42) e sangue periférico total (202). As amostras de pele e medula óssea foram coletadas de cães sorologicamente positivos na RIFI e apresentaram 77% e 71% de positividade na PCR, respectivamente. Com as amostras de sangue 42% dos cães foram positivos. A prevalência da infecção foi de 54%, mais baixa que a soroprevalência (57%) encontrada. Na comparação proporcional de cães positivos independente de sintomatologia nos testes de RIFI, ELISA e PCR do sangue periférico total, não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) (Fig.15), o mesmo foi verificado quando a comparação foi realizada de acordo com os grupos sintomático e assintomático (Figs.17 e 18). Entretanto, assim como encontrado nos estudos de outros autores relatados anteriormente, algumas amostras positivas na PCR foram detectadas em cães com sorologia negativa. Quando comparamos os resultados da sorologia com os resultados da PCR, 201 cães foram analisados, sendo que 30 foram considerados falso-negativos, ou seja, positivos na PCR e negativos na sorologia e 37 cães foram considerados falso-positivos, positivos na sorologia e negativos na PCR (Tabela 13). Dos 30 cães falso-negativos, apenas dois cães eram sintomáticos, demonstrando novamente a deficiência das técnicas sorológicas em demonstrar infecção em cães assintomáticos. Leontides *et al.* 2002, demonstrou através de um estudo realizado em área endêmica, utilizando apenas cães clinicamente saudáveis (assintomáticos), que a

prevalência na PCR foi de 63% contra uma prevalência de apenas 12% encontrada com a RIFI (utilizando “cut-off” de 1:50).

Um achado relevante deste estudo foi a presença de três cães assintomáticos, positivos em todos os testes realizados, no caso da PCR em todas as amostras clínicas, incluindo ainda a positividade na cultura. Isto demonstra as dificuldades encontradas no diagnóstico clínico da doença, além da necessidade da retirada destes cães de áreas endêmicas, já que estes podem assumir importante papel no ciclo de transmissão, apesar de aparentemente saudáveis.

Na análise dos resultados da PCR levando em consideração o tipo de amostra em relação à forma clínica, não foi encontrada diferença significativa ($P > 0,05$) quando utilizadas as amostras de sangue e pele, ao contrário do que foi encontrado para os resultados obtidos com as amostras de medula óssea. Com a utilização de amostras da medula óssea na PCR, foi verificada uma maior eficiência em detectar cães assintomáticos, uma vez que foi encontrado um número maior de cães positivos neste grupo (Tabela 12). Apesar de o número amostrado ter sido relativamente baixo, estes resultados sugerem uma maior infecção da medula óssea nos estágios mais iniciais da doença, com possível disseminação do parasito para os órgãos mais internos nos estágios onde já são apresentados sinais clínicos da doença. Os resultados obtidos com as amostras de pele e sangue sugerem uma independência da forma clínica para a detecção de cães infectados.

Com relação a comparação do tipo de amostra clínica dentro do grupo dos 43 cães sorologicamente positivos independente da forma clínica apresentada, nossos resultados mostram que a frequência de DNA do parasito foi diferente ($P < 0,05$). As amostras de sangue foram responsáveis por esta diferença, apresentando a menor positividade (Fig.16). Quando a comparação foi realizada levando-se em consideração a sintomatologia dos cães, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) apenas no grupo dos assintomáticos, novamente devido às amostras de sangue (Fig.20). Neste caso a medula e a pele apresentaram uma maior proporção de cães positivos. O fato de não ter sido verificada diferença significativa no grupo dos sintomáticos (Fig.19) pode ser devido ao tamanho da amostra utilizada, que foi considerada pequena e possivelmente influenciou no poder do teste estatístico utilizado para esta análise.

Os resultados obtidos com as amostras de sangue periférico demonstraram uma menor eficiência quando comparados com as amostras de pele e medula apenas no grupo dos 43 cães com sorologia positiva. Entretanto, quando analisada a amostra de 202 cães, os resultados

foram satisfatórios, com 42% de positividade e concordantes com outros achados (Hu *et al.* 2000, Ikonomopoulos *et al.* 2003) que sugerem que amostra de sangue é uma fonte confiável para a detecção de DNA de *Leishmania* através da PCR. Outros estudos atribuem esta confiabilidade nas amostras de sangue, devido à simplicidade de coleta desta amostra, a qual torna o procedimento menos propenso a erros. Além do mais, amostras de sangue permitem um exame de um volume consideravelmente maior que amostras de medula óssea, as quais são freqüentemente sugeridas como amostra clínica ideal para detecção de DNA de *Leishmania* pela PCR (Bettini *et al.* 1990). Outro aspecto que deve ser levado em consideração é que a coleta de amostras de sangue são menos invasivas que a coleta de amostras como, por exemplo, de medula óssea e linfonodo, sendo mais facilmente aceita pelos proprietários dos cães.

Segundo Solano-Gallego *et al.* 2001 a freqüência de DNA do parasito é variável em diferentes tecidos. A baixa porcentagem de amostras positivas na medula óssea (17%) sugere que a disseminação do parasito pela medula, não ocorra com freqüência nos animais. Conseqüentemente, a detecção de DNA de *Leishmania* na medula óssea através da técnica de PCR não é um método adequado para se verificar a infecção por este parasito em cães. No mesmo estudo, os autores mostram que metade dos cães estudados apresentou resultados positivos na detecção do DNA do parasito na pele, sugerindo que este é o maior tecido reservatório de parasitos em cães e que a PCR utilizando fragmento de pele é um método sensível para detectar a infecção por *Leishmania*. Os resultados do nosso estudo concordam em parte com o achado acima, já que no caso da medula foi encontrada uma alta porcentagem de cães infectados principalmente quando estes eram assintomáticos, diferente do que os autores acima mencionaram. Entretanto, Leontides *et al.* (2002) estudando na Grécia a infecção apenas em cães clinicamente saudáveis encontraram uma grande positividade na PCR utilizando como fonte de DNA a medula óssea (63%), corroborando com nossos resultados. Segundo estes mesmos autores um resultado positivo da PCR utilizando a medula óssea supõe a disseminação do parasito para órgãos internos depois da inoculação na pele. Além disto, o nosso achado pode ser explicado pela participação exclusiva de cães sorologicamente positivos, aumentando a probabilidade de detectar infecção nas amostras coletadas. Madeira *et al.* 2004 em um estudo com 20 cães sorologicamente positivos, isolou formas promastigotas em cultura de pele intacta de 18 cães sendo 14 deles identificados como *L. chagasi*.

Os resultados inerentes à amplificação do gene codificador da proteína β globina, indicam a eficiência da utilização desta técnica na avaliação da extração de DNA e apesar de 28 amostras terem sido negativas, as mesmas foram avaliadas através da dosagem de DNA, confirmando a eficiência da extração em todas elas, sugerindo assim, um possível problema na reação de amplificação com estas amostras.

Outro aspecto que deve ser levado em consideração e que já foi avaliado em outros trabalhos envolvendo a técnica da PCR é a maior sensibilidade apresentada pelo gel de poliacrilamida quando comparado com o gel de agarose, na visualização dos produtos amplificados. A figura 21 demonstra a maior sensibilidade encontrada para as amostras de sangue quando estas foram analisadas no gel de poliacrilamida ($P < 0,05$). Apesar de não ter sido verificada uma diferença significativa para as amostras de pele, ainda assim foi possível observar um aumento da sensibilidade quando estas amostras foram analisadas no gel de poliacrilamida. Por este motivo a eletroforese em gel de poliacrilamida foi a técnica de escolha para abordagem dos resultados.

Através desses resultados pode-se inferir que a utilização da PCR no diagnóstico da LVC parece superar em grande parte problemas como a baixa sensibilidade dos exames parasitológicos, a ocorrência de reações cruzadas, incluindo cães falso-positivos e falso-negativos e a ineficácia dos testes sorológicos em detectar a infecção em cães assintomáticos. Todas essas qualidades aliadas à confirmação parasitológica através da identificação e até mesmo da espécie do parasito exercem um papel fundamental em estudos epidemiológicos, permitindo um melhor conhecimento acerca das espécies de *Leishmania* e da relação entre o vetor e seus hospedeiros na transmissão da leishmaniose. Apesar de ser um método sensível para a detecção de *Leishmania* em uma variedade de materiais clínicos de humanos e cães, a PCR é mais usada em estudos epidemiológicos do que no diagnóstico de rotina (Solano-Gallego *et al.* 2001). Assim, para a utilização em larga escala, a PCR necessita de ajustes para se tornar mais simples e com custo operacional mais baixo.

5.6 – Urbanização e controle das leishmanioses

Nos últimos anos, as leishmanioses, assim como outras parasitoses, têm aumentado sua importância no contexto da Saúde Pública em vários países devido ao processo de urbanização das doenças. Esse processo é caracterizado não somente por sua expansão geográfica, invadindo áreas antes livres da doença, mas também por sua reemergência em focos endêmicos mais antigos.

Nas últimas décadas ocorreram profundas mudanças na estrutura agrária do Brasil, que resultaram na migração de grande contingente populacional para centros urbanos. Segundo dados do IBGE, 85% da população do país vive em área urbana, o que cria condições favoráveis para o aparecimento de doenças, dentre elas as leishmanioses. Associado a isto há ainda um complexo de fatores, como mudanças ambientais e climáticas, redução dos investimentos em saúde e educação, descontinuidade das ações de controle, adaptação do vetor aos ambientes modificados pelo homem, fatores pouco estudados ligados aos vetores (variantes genéticas), novos fatores imunossupressivos, como a infecção pelo HIV e dificuldades de controle da doença em grandes aglomerados urbanos, onde problemas de desnutrição, moradia e saneamento básico estão presentes (Gontijo & Melo 2004).

O município de Santa Luzia, Minas Gerais, pertencente à Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) parece ilustrar o processo de expansão e urbanização das leishmanioses com o surgimento recente da doença e até então com um número crescente de casos registrados. A carência de dados epidemiológicos enfatizando o vetor e sua possível relação com a prevalência canina nos mostrou a importância da implementação de pesquisas, visando uma melhor compreensão sobre a biologia dos flebotomíneos e elucidação do real papel do cão na transmissão das leishmanioses.

O início do programa de controle no Brasil remonta à década de 50 e tinha como objetivo quebrar os elos epidemiológicos da cadeia de transmissão da doença. Entretanto, diante da falta de evidências de que as medidas até então empregadas conduziam a um impacto positivo na redução da incidência da doença humana no país, o Ministério da Saúde/FUNASA convocou em 2000 um comitê de especialistas para, juntamente com a Gerência do Programa, reavaliar as estratégias de controle empregadas e redirecionar as ações de controle visando à racionalização da atuação (Costa & Vieira 2001).

Um programa de controle foi proposto para ser aplicado nas áreas consideradas de risco, aglomerados urbanos ou rurais, onde critérios epidemiológicos, ambientais, e sociais servirão de base para a delimitação da área a ser trabalhada, tendo como indicador a ocorrência de casos humanos. A vigilância epidemiológica é um dos componentes do Programa de Controle das Leishmanioses (PCL) que visa reduzir as taxas de letalidade e o grau de morbidade através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, bem como da diminuição dos riscos de transmissão mediante controle da população de reservatórios e vetores. O novo enfoque do PCL incorpora áreas sem ocorrência de casos humanos ou caninos da doença, nas ações de vigilância e controle, objetivando evitar ou minimizar a expansão da doença (Ministério da Saúde 2003).

O município de Santa Luzia (MG) teve seu primeiro caso autóctone de LV em 1997 e neste mesmo ano foi registrado o primeiro óbito por esta parasitose. Em 1998, o Departamento de Vigilância Sanitária e Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Santa Luzia deu início ao Programa de Controle de Leishmanioses com a realização de visitas domiciliares periódicas, coleta de amostras de sangue dos cães para o diagnóstico da leishmaniose canina e borrifação das casas. Os cães positivos são retirados e sacrificados. Entretanto, o que tem sido observado é que desde 1999 a prevalência de LV canina e humana tem aumentado significativamente, com 26 casos humanos confirmados em 2005.

Apesar de o presente estudo ter focado apenas um bairro, a alta prevalência da infecção canina e a presença predominante e abundante de espécies de flebotomíneos vetoras apresentadas nos nossos resultados podem clarear a escolha das medidas de controle mais adequadas à situação atual, pelos órgãos competentes do município. De fato há que se valorizar e incentivar novas investigações e pesquisas aplicadas como fontes importantes de informações para subsidiar o Programa de Controle das Leishmanioses no Brasil.

Conclusão

6 – Conclusão

- A fauna flebotomínica do Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG apresentou espécies de grande importância epidemiológica, sendo três incriminadas em estudos anteriores como vetoras de leishmanioses (*L. (L.) longipalpis*, *L. (N.) intermedia*, *L. (N.) whitmani*) e duas potenciais vetoras (*L. (P.) pessoai* e *L. (N.) neivai*).
- A espécie mais prevalente no estudo foi *L. whitmani* seguida de *L. longipalpis*, que são vetoras da LTA e LVA, respectivamente. *L. whitmani* foi mais abundante na área verde do bairro e *L. longipalpis* mais presente na área urbanizada.
- O achado de infecção natural de *L. whitmani* por *L. (V.) braziliensis*, somado à abundância de exemplares capturados, sugere a possível participação desta espécie no ciclo de transmissão da LTA na área de estudo.
- A infecção natural de *L. cortelezzii* por *L. (L.) chagasi* não é suficiente para incriminá-la como vetora, baseado na carência de pesquisas sobre os critérios necessários para avaliar a competência vetorial desta espécie.
- A verificação de infecção natural em “pools” específicos de flebotomíneos, utilizando a técnica da PCR, mostrou-se muito eficiente, com a possibilidade de processar e identificar a presença específica de *Leishmania* em um grande número de fêmeas, de forma mais rápida e fácil que a técnica de dissecação.
- Não houve correlação entre a densidade de flebotomíneos com as variáveis climáticas (temperatura, umidade e precipitação), mas ainda assim foi possível observar alguns picos na densidade de flebotomíneos relacionados a meses mais úmidos.
- A *Leishmania (Leishmania) chagasi* foi a espécie responsável pela LVC no Bairro Baronesa, Santa Luzia/MG.
- Considerando as altas soroprevalência (57%) e prevalência da infecção (54%), pode-se sugerir a participação do cão como reservatório doméstico da infecção na área estudada.
- A baixa prevalência da doença (16%) comparada a alta prevalência da infecção (54%) ilustram o grande problema no diagnóstico clínico e sorológico da LVC, com uma grande quantidade de cães falso-positivos e falso-negativos.
- Os resultados do presente estudo nos levam a crer que na LVC, onde aproximadamente 50% dos cães são aparentemente saudáveis, as técnicas sorológicas são ineficientes para o diagnóstico e conseqüentemente para o controle da transmissão.

- Para o diagnóstico da infecção canina em inquéritos epidemiológicos a amostra de sangue pode ser utilizada devido a facilidade de coleta, melhor aceitação por parte dos proprietários e sua alta taxa de positividade comparável à dos testes sorológicos.
- Considerando o grupo dos cães assintomáticos a pele parece ser a amostra mais indicada para o diagnóstico, pois sua taxa de positividade foi superior à do sangue e semelhante à de medula, mas com a vantagem de ser menos invasiva.
- Dentre os cães sintomáticos, os três tipos de amostras clínicas foram igualmente eficientes, apesar do menor número de cães amostrados.
- O uso da PCR no diagnóstico da LVC parece superar em grande parte problemas como a baixa sensibilidade dos exames parasitológicos, a ocorrência de reações cruzadas, incluindo cães falso-positivos e falso-negativos e a ineficácia dos testes sorológicos em detectar a infecção em cães assintomáticos.
- A alta prevalência da infecção canina e a presença predominante e abundante de espécies de flebotomíneos vetoras apresentadas nos nossos resultados podem contribuir na escolha das medidas de controle, pelos órgãos competentes do município.
- De fato há que se valorizar e incentivar novas investigações e pesquisas aplicadas como fontes importantes de informações para subsidiar o Programa de Controle das Leishmanioses no Brasil.

Referências Bibliográficas

7 – Referências bibliográficas

- Abranches P, Silva Pereira MC, Conceição-Silva FM, Santos Gomes GM, Janz JG 1991. Canine leishmaniosis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 77: 557-561.
- Adler S, Teodor O 1935. Investigations on Mediterranean Kalazar. VI Canine visceral leishmaniasis. *Proceedings of the Royal Society* 116: 516-541.
- Aguiar GM, Soucasaux T 1984. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro. I. Frequência mensal em isca humana (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 179-209.
- Aguiar GM, Medeiros WM 2003. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In EF Rangel, R Lainson R (eds), *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 207-255.
- Aguilar CM, Rangel EF, Garcia L, Fernandez E, Momen H, Grimaldi Filho G, De Vargas Z 1989. Zoonotic cutaneous leishmaniosis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 19-28.
- Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A 2000. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infection and Immunity* 68: 1760-1764.
- Alencar JE 1959. Calazar Canino. Contribuição para o Estudo da Epidemiologia do Calazar no Brasil. Tese, Imprensa Oficial, Fortaleza.
- Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM 2005. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol* 127: 227-232.
- Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J 2004. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57: 1- 87.
- Andrade-Filho JD 2003. Morfologia do complexo *Nyssomyia intermedia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Tese de Mestrado, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo. 152 pp.
- Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl Environ Microbiol* 66: 1933-1938.
- Araújo-Filho NA 1978. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Ilha Grande. Tese, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 148 pp.
- Ashford DA 1992. Características clínicas e demográficas da leishmaniose visceral canina em Jacobina - Bahia. *An Congre Bras Med Trop Belém*: 82.

- Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulálio C, Lopes U, Fernandes O, Degraive W, Barker-Jr RH, Badaró R, David JR 1995. Comparison of the polymerase and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 53(3): 251-255.
- Ashford RW 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology* 14: 523-532.
- Badaró R, Lourenço R, Carvalho EM, Teixeira R, Cerf B, Jones TC 1983. Estudo longitudinal soro epidemiológico de leishmaniose visceral americana (LVA) em área endêmica de Jacobina-BA. In: Reunião Anual sobre Doenças de Chagas, 10, Caxambu.
- Badaró R, Jones TC, Lorenco R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, Rocha H, Teixeira R, Jonhson-Jr WD 1986. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infec Dis* 154: 639-649.
- Badaró R, Nakatani M, Chun P, Reed GC 1994. Novo teste rápido (30') para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral. 30º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.
- Barata RA, França-Silva JC, Fortes-Dias CL, Costa RT, Silva JC, Vieira EP, Prata A, Michalsky EM, Dias ES 2004. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an endemic area of American visceral leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 481-487.
- Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, Fiúza JA, Gonçalves CM, Paula KM, Dias ES 2005. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotômíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(5): 421-425.
- Barker DC 1989. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology* 99: 125-146.
- Barretto MP 1943. Observações sobre a biologia em condições naturais, dos flebótomos do Estado de São Paulo (Diptera: Psychodidae). Tese de Doutorado, São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 162 pp.
- Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID 2002. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban Leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(5): 645-647.
- Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polimerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 55: 273-277.
- Bettini S, Gramiccia M, Gradoni L, Biggio P, Loi R, Cottoni F, Pau M, Atzeni MC 1990. Leishmaniasis in Sardinia. IV. Epidemiological appraisal of cotaneous leishmaniasis and biochemical characterization of isolates. *J Trop Med Hyg* 93(4): 262-269.
- Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, et al. 2001. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet Zootec* 53: 1-8.

- Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadore JL, Bourdoiseau G 2001. Atypical forms of canine leishmaniasis. *Veterinary Journal* 162: 108-120.
- Bowdre JH, Cambell JL, Walker DH, Tart DE 1981. American mucocutaneous Leishmaniasis. Culture of a *Leishmania* species from periferal blood leukocytes. *Am J Clin Pathol* 75: 435-438.
- Bray RS 1985. Immunodiagnosis of leishmaniasis. In: Chang KP, Bray RS (eds) *Leishmaniasis*. Elsevier Science Publishers B.V. Biomedicine Division. p. 177-182.
- Brazil RP, Almeida DC, Brazil BG, Mamede SMPO 1991. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitologia* 33: 113-117.
- Brazil RP, Brazil BG 2003. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In EF Rangel, R Lainson R (eds), *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 257-274.
- Brener Z 1957. Calazar canino em Minas Gerais. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Brumpt E, Pedroso A 1913. Pesquisa epidemiológica sobre a leishmaniose americana das florestas no Estado de São Paulo. *Ann Paul Med Cir* 1: 97-136.
- Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AV, et al. 2003. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Rev Inst Trop S Paulo* 45: 79-83.
- Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spinola RMF, Cruz OG 2001. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana. Araçatuba, São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Publ* 17(5): 1263-1267.
- Camargo ME 1994. Efeito da prevalência da doença sobre a acurácia dos exames sorológicos em levantamentos soro-epidemiológicos. *Rev Soc Bras Med Trop* 27.
- Campino L, Santos-Gomes G, Riça Capela MJ, Cortes S, Abranches P 2000. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. *Vet Parasitol* 92: 269-275.
- Cardoso L, Schalling HDFH, Neto F, Kroon Nel, Rodrigues M 2004. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Act Trop* 91: 95-100.
- Casanova C, Mayo RC, Rangel O, Mascarini LM, Pignatti MG, Galati EAB, Gomes AC 1995. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva) infection in the valley of the Mogi Guaçu River, State of São Paulo, Brazil. *Bol Dir Malariol San Amb* 35(Suppl. 1): 77-84 .
- Chagas AW 1940. Criação de flebotomos e criação experimental da leishmaniose visceral americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 35: 327-333.

- Chagas E, Cunha AM, Castro GO, Ferreira LC 1937. Leishmaniose visceral americana: relatório dos trabalhos da comissão encarregada dos estudos da leishmaniose visceral americana em 1936. Mem Inst Oswaldo Cruz 32: 321-390.
- Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane L, Deane G, Guimarães FN, Von Paumgarten MJ, Sá B 1938. Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos realizados pela Comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). Mem Inst Oswaldo Cruz 33: 89-229.
- Chance ML 1985. The biochemical and immunotaxonomy of *Leishmania*. In: Leishmaniasis. 1nd ed. Chang MP, Bray RS. Elsevier Science Publishing Company, Inc. USA.
- Ciramella P, Oliva G, De Luna R, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Vet Rec 141: 539-543.
- Coelho MV, Falcão AR, Falcão AL 1967. Desenvolvimento de espécies do gênero *Leishmania* em espécies brasileiras do gênero *Lutzomyia* França, 1924. I - Evolução de *L. braziliensis* em flebotomos. Rev Inst Med Trop S Paulo 9: 177-191.
- Condino MLF, Sampaio SMP, Henriques LF, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA 1998. Leishmaniose tegumentar americana: flebotômicos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 31: 355-360.
- Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. – specific Kinetoplastid primers. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 98: 12-17.
- Costa CHN, Pereira HF, Pereira FCA, Tavares JP, Araujo MV, Gonçalves MJO 1999. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? Trans R Soc Trop Med Hyg 93: 464.
- Costa CHN, Vieira JBF 2001. Mudanças no controle de leishmaniose visceral no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 34: 223-228.
- Coutinho SG, Marzochi MCA, Souza WJS, Amendoeira MRR 1981. Leishmaniose tegumentar americana. J Bras Med 41: 104-118.
- Córdoba-Lanús E, De Grosso ML, Valladares B, Salomón OD 2006. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern argentina. Act Trop 98: 1-5.
- De Bruijn MHL, Barker DC 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Trop 52: 45-58.
- Deane LM, Deane MP 1955. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. O Hospital Rio de Janeiro 48(1): 61- 76.

- Deane LM, Deane MP 1955. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital* 47: 75-87.
- Deane LM 1956. Leishmaniose Visceral no Brasil. Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro
- Deane LM, Deane MP 1965. Sobre a biologia do *Phlebotomus longipalpis*, transmissor da leishmaniose visceral, em uma zona endêmica do Estado do Ceará. I. Distribuição, predominância e variação estacional. *Rev Bras Biol* 15: 83-95.
- Deane MP, Deane LM 1954. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposas (*Lycalopex ventulus*) naturalmente infectadas pela *Leishmania donovani*. *O Hospital* 46: 651-653.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 463-469.
- Desjeux P 1999. Aspects de Santé publique et lutte. In: Dedet JP. *Les Leishmanioses*. Paris: AUPELF-UREFF-Ellipses. p. 219-238.
- Dye C, Killick-Kendrick R, Vitutia MM, Walton R, Killick-Kendrick M, Marith AE, Guy MW, Canavate MC, Hasibeder G 1992. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basis reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the Island of gozo. *Parasitology* 105: 35-41.
- Dye C, Vidor E, Dereure J 1993. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol Infect* 103: 647-656.
- Eresh S, McCallum SM, Barker DC 1994. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polimerase chain reaction. *Parasitology* 129: 423-433.
- Evans TG, Vasconcelos IAB, Ima JW 1990. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Assessment of serodiagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 42: 118-123.
- Falcão AR 1981. Um novo modelo de armadilha luminosa de sucção para pequenos insetos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76: 303-305.
- Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi G, Sessa PA, Carias VRD, Jesus AC, Alencar JTA 1986. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 155-163.
- Falqueto A, Sessa PA, Varejão JBM, Coutinho Barros, Momen H, Grimaldi G 1991. Leishmaniosis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo State, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 499-500.
- Falqueto A 1995. A especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no estado do Espírito Santo. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. 84 pp.

- Falqueto A, Sessa PA, Ferreira AL, Vierira VP, Santos CB, Varejão JBM, Cupolillo E, Porrzzi R, Carvalho-Paes LE, Grimaldi Jr G 2003. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 1003-1010.
- Faust EC, Russel PF, Jung RC 1974 *Parasitologia Clínica*. Craig & Faust (ed.) Ed. Salvat S.A. México, 888 pp.
- Feliciangeli MD, Rodriguez N, Bravo A, Arias F, Guzman B 1994. Vectors of cutaneous leishmaniasis in North-Central Venezuela. *Med Vet Entomol* 8: 317-324.
- Ferreira EC 2005. Comparação de técnicas sorológicas para a identificação da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) visando a otimização do diagnóstico em inquéritos epidemiológicos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais: 1-86.
- Fisa R, Gallego M, Castillejo MJ, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrio J, Gallego J, Portus M 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The exemple of pirat focus. *Vet Parasitol* 83: 87-97.
- Fisa R, Riera C, Gállego M, Manubens J, Portús M 2001. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol* 99: 105-111.
- Forattini OP 1953. Nota sobre criadouros naturais de flebótomos em dependências peridomiciliares, no Estado de São Paulo. *Arq Fac Hig S Pub Univ São Paulo* 7: 158-167.
- Forattini OP 1954. Nota sobre a biologia de *Phlebotomus* (Dipetera: Psychodidae) em região da Bacia do Rio Paraná (Brasil). *Arq Fac Hig S Pub Univ São Paulo* 8: 15-136.
- Forattini OP 1960. Sobre os reservatórios naturais da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2: 195-200.
- Forattini OP, Pattoli DBG, Rebello EX, Ferreira AO 1972. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzootico de leishmaniose no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 6: 431-433.
- Forattini OP 1976. Observações feitas sobre a transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 10: 31-43.
- França-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E 2003. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic área of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State. Brazil. *Vet Parasitol* 111: 161-173.
- Freire-Maia N 1988 *Teoria da Evolução: De Darwin à teoria sintética*. Belo Horizonte 2nd Ed. Itatiaia, 415 pp.
- Freitas E, Melo MN, Costa-Val AP, Michalick MSM 2006. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol* 137: 159-167.

- Fundação Nacional de Saúde 1998. Leishmaniose Visceral (LVA). In: Guia de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde 4 edição, Brasília:
- Furtado I, Aleixo J, Lopes CF 1966. Surto de Leishmaniose Tegumentar Americana em Minas Gerais. *O Hospital* 70: 259-266.
- Galati E, Nunes VLB, Rego-Jr FA, Oshiro ET, Chang MR 1997. Estudo de Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saúde Pública* 31: 378-390.
- Galati E 2003. Morfologia e Taxonomia dos Flebotomíneos. In EF Rangel, R Lainson R (eds), *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 23-206.
- Garcez LM, Shaw JJ, Courtenay O, Quinnel RJ, Dye C 2003. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral Leishmaniasis in areas of high transmission. University of Chicago Press.
- Genaro O, Mayrink W, Michalick MSM, Dias M, Costa CA, Melo MN 1988. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 43.
- Genaro O, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL, Mayrink W, Costa CA 1990. Ocorrência de calazar em área urbana da Grande Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop* 23: 121.
- Giger U, Oakley DA, Owens SD, Schantz P 2002. *Leishmania donovani* transmission by packed RBC transfusion to anemic dogs in the United States. *Transfusion* 42: 381-383.
- Gomes AC, Rabello EX, Santos JLF, Galati EAB 1983. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana. 3. Observações naturais sobre o ritmo diário de *Psychodopygus intermedius* em ambiente florestal e extra-florestal. *Rev Saúde Pública* 17: 23-30.
- Gomes AC, Galati EAB 1987. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 5. Estratificação da atividade espacial e estacional de phlebotominae (Diptera, Psychodidae) em áreas de cultura agrícola da região de Vale Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 82: 467-473.
- Gomes AC, Neves VLFC 1998. Estratégia e perspectiva de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 6: 553-558.
- Gomes RF, Macedo AM, Pena SDJ, Melo MN 1995. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: Genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Experimental Parasitology* 80: 681-687.
- Gontijo B, Carvalho MLR 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(1): 71-80.
- Gontijo CMF 1989. Caracterização Biológica de Amostras de *Leishmania*, ROSS 1903. Dissertação de Mestrado Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais 37-38.

- Gontijo CMF, Pratlong F, Passos VMA, Falcão AL, Dedet JP 1995. Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates from Minas Gerais State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 143.
- Gontijo CMF, Silva ES, De Fuccio MB, Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES, Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN 2002. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Act Trop* 81: 43-50.
- Gontijo CMF, Melo MN 2004. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 7: 338-349.
- Gontijo CMF, Silva ES, Pacheco RS, Dias ES, Oliveira FS, Michalsky EM, Margonari CS 2005. Epidemiologia molecular da leishmaniose tegumentar no Município de Araçuaí, Minas Gerais, Brasil. Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC), Argentina.
- Gradoni L, Pozio E, Bettini S, Gramiccia M 1980. Leishmaniosis in Tuscany (Italy). Part III. The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto province. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 421-422.
- Gradoni L 1999. Epizootiology of canine leishmaniosis in Southern Europe. In Killick-Kendrick R (eds) *Canine Leishmaniasis: an update*. Hoechst Roussel Vet. Wiesbaden. p. 339-342.
- Grimaldi-Jr G, Tesh RB, Pratt DM 1989. A review of geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 687-725.
- Grupo Cipa. Bermudes H, Dedet JP, Falcão AL, Feliciangeli D, Ferro C, Galati EAB, Gomes EL, Herrero MV, Hervas D, Lebbe J, Morales A, Oguzuku E, Perez E, Rangel EF, Sherlock IA, Torres M, Vignes R, Wolff M 1991. Proposition of a standart description for Phlebotomine sand flies. *Parasitologia* 33 (Suppl.): 127-135.
- Guarga JL, Lucientes J, Peribáñez MA, Molina R, Gracia MJ, Castillo JA 2000. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Act Trop* 77: 203-207.
- Guimarães MC, Celeste BJ, Franco EL 1990. Diagnóstico performance índices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. *Bull. World Health Organization* 68: 39-43.
- Harith AE, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Muga R, Kiugu S, Laarman JJ 1986. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 583-586.
- Hasibeder G, Dye C, Carpenter J 1992. Mathematical modelling and theory for estimating the basic reproduction number of canine leishmaniasis. *Parasitology* 105: 43-53.
- Hermeto MV, Dias DV, Genaro O, Rotondo-Silva A, Costa CADA, Toledo VPCP, Michalick MSM, Williams P, Mayrink W 1994. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Doce Valley, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 519-521.
- Herrer A, Christensen HA 1976. Natural cutaneous leishmaniasis among dogs in Panama. *Am J Trop Med Hyg* 25: 59-63.

- Hockmeyer WT, Wellde BT, Sabwa CL, Smith DH, Rees PH, Kager PA 1984. A complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen I. *Ann Trop Med Parasitol* London 78(6): 489-493.
- Hu XS, Yang WT, Lu HG, Yan HP, Cheng JP, Ma Y, Jin BQ, Zhang T 2000. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. *J Parasitol* 86(4): 822-826.
- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gordoulis VG 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol* 113: 99-113.
- Jorquera A, González R, Marchán-Marcano E, Oviedo M, Matos M 2005. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in State of Sucre, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 45-48.
- Killick-Kendrick R 1987. The microecology of *Leishmania* in the gut and proboscis of the sandfly, In: KP Chang, D Snary. *Host-Parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozoal Infections*. Nato Asi Series H11. Berlin: Springer-Verlag. p. 397-406.
- Killick-Kendrick R 1988. Studies and criteria for the incrimination of vector and reservoir hosts of the leishmaniasis. In: *Proceeding of the International Workshop on Control Strategies for the leishmaniasis*. Ottawa: International Development Reserch Center. p. 272-280.
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Foucheaux C, Delure J, Puech MP, Cadiegues MC 1997. Controle da Leishmaniose canina - proteção de cães contra picada de mosquitos do gênero flebótomos com coleiras de deltametrina. *Med Vet Entomol* 11: 105-111.
- Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG 1999. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 35: 376-383.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol. 1. London: Academic Press 1-120.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR 1987. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 517.
- Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O, Souza AA, et al. 1990. Amazonian visceral leishmaniasis - Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and 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.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AA, Braga RR, Ishikawa EA 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 435-443.

- Lainson R, Shaw JJ 1998. New World Leishmaniasis: The neotropical leishmania species. In: Cox Feg, Kreier JP, Wakelin D. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology 5: 241-266.
- Lamothe J 2002. La leishmaniose canine: limites diagnostiques de la sérologie à partir de deux cas cliniques. Pratique Médicale et Chirurgicale de l' Animal de Compagnie 37: 55-59.
- Lanotte G, Rioux JA, Perieres J, Vollhardt Y 1979. Ecologie des leishmaniasés dans le sud de la France¹⁰. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d' une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. Annales Parasitologie Humaine et Comparée 54: 277-279.
- Laveran A, Havet J 1917. Contribution a l'étude de la leishmaniose viscérale naturelle du chien. Bull Soc Path Exot 10: 386-392.
- Lemeshow S, Hosmer DW, Klar J, Lwanga SK 1995. Adequacy of sample size in health studies. World Health Organization 239 pp.
- Leon JR 1961. Encuesta final para la evaluacion preliminar del kala-azar Guatemalense. Rev Col Med Guatemala 266: 158-160.
- Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos Vasilios, Koutinas AF, Galatos AD, Mylonakis ME 2002. A cross-sectional study of Leishmania spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. Vet Parasitol 109: 19-27.
- Lins RM, Oliveira SG, Souza NA, de Queiroz RG, Justiniano SC, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA 2002. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sand flies. Insect Mol Biol 11: 117-122.
- Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Serra CMB, Pereira SA, Figueiredo FB, Confort EM, Quintella LP, Marzochi MCA 2005. Is Leishmania (Viannia) braziliensis preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs. Parasitology 97: 73-76.
- Mancianti F, Gradoni L, Gramiccia M, Pieri S, Marconcini A 1986. Canine leishmaniasis in the isle of Elba, Italy. Trop Med Parasitol 37: 110-112.
- Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A 1994. Comparasion between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble Leishmania infantum antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. Vet Parasitol 59: 13-21.
- Mancianti M, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S 1988. Studies on canine leishmaniosis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg 82: 566-567.
- Marcondes CB 1996. A redescription of Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia (Lutz & Neiva, 1912), and resurrection of L. neivai (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 91: 457-462.

- Margonari CS, 2005. As leishmanioses no Município de Belo Horizonte: Estudos entomológicos e biogeográficos visando a vigilância epidemiológica. Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 157 pp.
- Marsden PD, Jones TC 1985. Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. In: Chang KP, Bray RS Leishmaniasis. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. p. 183-198.
- Martinez JE, Arias AL, Escobar MA, Saraiva NG 1992. Haemoculture of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogeneous dissemination. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 392-394.
- Martins AV, Barreto MP, Brener Z, Pellegrino J 1956. Observações preliminares sobre um foco de leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. *Rev Bras Malariol D Trop* 8: 577-581.
- Martins AV, Brener Z, Mourão OT, Lima MM, Souza MA, Silva JE 1956. Calazar autóctone em Minas Gerais. *Rev Bras Malariol D Trop* 8: 555-563.
- Martín-Sánchez J, Lopez-Lopez MC, Acedo-Sánchez C, Castro-Fajardo JJ, Pineda JA, Morillas-Marquez F 2001. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. *Parasitology* 122: 607-615.
- Marzochi MC 1992. A Leishmaniose no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *J Bras Med* 63: 82-104.
- Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Amendoeira MR 1981. Leishmaniose Visceral (Calazar). *J Bras Med* 41: 61-84.
- Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Toledo LM, Grimaldi G, Momen H, Pacheco RS, Sabroza PC, Souza MA, Rangel FB, Tramontano NC 1985. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80: 349-357.
- Marzochi MCA, Marsden PP 1991. Ecologia e Controle de Vetores - Leishmanioses. In: Encontro Nacional sobre Saúde e Meio Ambiente (Fiocruz) Rio de Janeiro: 31-36.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF, Carvalho RW 1994. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitol Today* 10(1): 34-37.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF 1997. Leishmanioses em áreas urbanas. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 162-165.
- Mathis A, Deplazes P 1995. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J Clin Microbiol* 33: 1145-1149.
- Mauricio IL, Stohard JR, Miles MA 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16: 188-189.

- Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, da Costa CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL 1979. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 73: 123-137.
- Mello DA, Rego Junior Fde A, Oshozo E, Nunes VL 1988. *Cerdocyon thous* (L.) (Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas, 1973) in Corumba (Mato Grosso do Sul State, Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83(2): 259.
- Membrive N, et al. 1999. *Lutzomyia whitmani* true vector of *Leishmania braziliensis* in the north of Paraná State, Brazil. 3rd International Symposium on Phlebotomine Sand Flies p. 33.
- Mendonça MG, Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG 2004. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infec Dis* 189: 1018-1023.
- Menezes JA, Reis VLL, Vasconcellos JA 1974. Pequeno surto de leishmaniose tegumentar americana em Macuco (Cordeiro-RJ). *Rev Soc Bras Med Trop* 8: 113-151.
- Michalsky EM, Fortes-Dias C, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES 2002. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop S Paulo* 44: 255- 259.
- Michalsky EM 2004. Aspectos entomológicos associados à transmissão de leishmaniose visceral canina no município de Montes Claros, Minas Gerais. Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais.
- Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica., 2003. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, DF.
- Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia 2001. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. *Boletim Epidemiológico* 6: 1-11.
- Minodier P, Piarroux R, Gambarelli F, Joblet C, Dumon H 1997. Rapid identification of causative species in patients with old world leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 35: 2551-2555.
- Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, Fernandes O, Barral-Netto M, Barral A 2002. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 185-188.
- Mohammed AR, Wright EP, Abdel Rahman AM, Kolk A, Laarman JJ, Pondman KW 1986. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparasion of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 271-274.
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andres M, Gonzales F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 491-493.

- Morrison AC, Ferro C, Tesh RB 1993. Host preferences of the sandfly at an endemic focus of American Visceral Leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 49: 68-75.
- Muller N, Zimmermann V, Forster U, Bienz M, Gottstein B, Welle M 2003. PCR-based detection of canine Leishmania infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of protocol for quality assesment of the diagnostic amplification reaction. *Vet Parasitol* 114: 223-229.
- Nicolle C, Comte D 1908. Origine Canine Du Kalazar. *Bull Soc Path Exot* 1: 299-301.
- Nurit-Rachamin S, Jaffe CL 1988. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparasion of three methods. *Ann Trop Med Parasitol* 85: 503-508.
- Oliveira CL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA 2001. Spatial distribution of human and canine leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad Saúde Publ* 17: 1231-1239.
- Orsini O 1945. Leishmaniose em Minas Gerais. *Bras Méd* 54: 762-766.
- Oskam L, Slappendel RJ, Beijer EGM, Kroon NCM, Van Ingen CW, Ozensoy S, Özbal Y, Terpstra WJ 1996. Dog-DAT: direct agglutination test using stabilized, freeze-dried antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 235-239.
- Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P 2001. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc* 15: 1076-1083.
- Padilla AM, Marco JD, Diosque P, Segura MA, Mora MC, Fernández MM, Malchiodi EL, Basombrío MA 2002. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniosis in Salta, Argentina. *Vet Parasitol* 110: 1-10.
- Palatinik-de-Souza CB, Santos WR, França-Silva JC, Costa RT, Reis AB, Palatinik M, Mayrink W, Genaro O 2001. Palatinik-de-Souza CB. *Am J Trop Med Hyg* 65(5): 510-517.
- Passos VMA, Falcão AL, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, Barbosa-Santos EGO, Guerra HJ, Katz N 1993. Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in a periurban área of the metropolitam region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 103-110.
- Passos VMA, Andrade AC, Silva ES, Figueiredo EM, Falcão AL 1996. Inquérito canino em foco recente de leishmaniose tegumentar no município de Sabará, região metropolitana de Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop* 29: 323-329.
- Passos VNA, Silva RE, Falcão AL 1991. Fauna flebotomínica de municípios da região metropolitana de Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop* 24(suppl. 11): 107.
- Penna HA 1934. Leishmaniose visceral no Brasil. *Bras Méd* 48: 949-950.
- Perez JE, Ogusuku E, Inga R, Lopez M, Monje J, Paz L, Nieto E, Arevaldo J, Guerra H 1994. Natural Leishmania infection of Lutzomyia spp. in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 1614.

- Pessoa SB, Coutinho JO 1940. Infecção natural de *Phlebotomus pessoai* por formas em leptomonas, provavelmente da *Leishmania braziliensis*. Rev Biol Hig 10: 139-142.
- Pessoa SB, Coutinho J 1941. Infecção natural e experimental dos flebotomos pela *Leishmania braziliensis*, no estado de São Paulo. O Hospital 20: 49-63.
- Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Quilici M 1994. Comparasion of PCR with direct examination of boné marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. J Clin Microbiol 32: 746-749.
- Pimenta PFP, Secundino NFC, Blanco-Nieves EE 2003. Interação Vetor-Hospedeiro. In EF Rangel, R Lainson R (eds), Flebotomíneos do Brasil, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 275-290.
- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, Del Real G, Ruitenberg J 1994. Celullar and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infection and Immunity 62: 229-235.
- Pinto C 1930. Arthropodos parasitos e transmissores de doenças. Tomo II (Biblioteca Científica Brasileira); *Phlebotomos*. p. 491-538.
- Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. Trans R Soc Trop Med Hyg 99(12): 905-913.
- Pozio E, Gradoni S, Bettini M, Gramiccia M 1981. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). Act Trop 38: 383-393.
- Profeta da Luz ZM, Pimenta DN, Cabral AL, Fiuza VO, Rabello A 2001. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. Rev Soc Bras Med Trop 34: 249-254.
- Quinnel RJ, Dye C, Shaw JJ 1992. Host preferences of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. Med Vet Entomol 6: 195-200.
- Quinnel RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C 1997. The epidemiology of canine leishmaniosis: transmission rates estimed from a cohort study in Amazonian Brazil. Parasitology 115: 143-156.
- Quinnel RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, Shaw MA, Dye C 2001. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. Parasitology 122: 253-261.
- Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF 1984. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 em área endêmica de leishmaniose tegumentar no estado do Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz 79: 395-396.

- Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF, Andrade CA 1986. Flebótomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz 8: 347-349.
- Rangel EF, Azevedo ACR, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger ED 1990. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 85: 39-45.
- Rangel EF, Barbosa AF, Andrade CA, Souza NA 1992. Development of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Vianna, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) under experimental conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz 87: 235-238.
- Rangel EF, Travi BL, Barbosa AF, Montoya J 1993. Development of Colombian isolates of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*, *Le* (*V.*) *guyanensis* and *Le* (*V.*) *braziliensis* in the sandfly *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) under experimental conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz 88: 313-315.
- Rangel EF, Meneses CR, Azevedo AC, Franco A, Mayrink A, Grimaldi FG 1998. Leishmaniose cutânea no Estado do Rio de Janeiro, Brasil: ciclo silvestre e a ligação com peridomicílio. Rev Soc Bras Med Trop 31(suppl. I): 132.
- Rangel EF, Lainson R 2003. Ecologia das Leishmanioses. In EF Rangel, R Lainson R (eds), *Flebotômíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 291-336.
- Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesgo G 1999. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. J Clin Microbiol 37: 2931-2935.
- Reithinger R, Davies CR 1999. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. Am J Trop Med Hyg 61: 530-541.
- Reithinger R, Espinoza JC, Courtenay O, Davies CR 2003. Evaluation of PCR as a Diagnostic Mass-Screening Tool To Detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in Domestic Dogs (*Canis familiaris*). J Clin Microbiol 41: 1486-1493.
- Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J 1994. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. J Clin Microbiol 9: 2246-2252.
- Rosário EY, Genaro O, França-Silva JC, da Costa RT, Mayrink W, Reis AB, Carneiro M 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 100(2): 197-203.
- Roura X, Sánchez A, Ferrer L 1999. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. Vet Rec 144: 262-264.

- Sabroza PC 1981. O domicílio como fator de risco na leishmaniose tegumentar americana. Estudo epidemiológico em Jacarepaguá, Município do Rio de Janeiro. Tese, Escola Nacional de Saúde Pública-Fiocruz, Rio de Janeiro. 187 pp.
- Salomón OD, Rossi GC, Spinelli GR 2002. Ecological aspects of phlebotomine (Diptera, Psychodidae) in an endemic area of tegumentary leishmaniasis in the Northeastern Argentina, 1993-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 163-168.
- Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, Freitas RA, Malacco MAF 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 12: 315-317.
- Santos SO, Arias JR, de Paiva Hoffmann M, Furlan MB, Ferreira WF, Pereira C, Ferreira L 2003. The presence of *Lutzomyia* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(5): 633-634.
- Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C, Mondesire RR, Simpson D, Donoghue AR, Frank GR, Gradoni L 2002. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic maker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol* 104: 275-285.
- Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Araujo ML, Souza WJ, Hadda F, Perez MA, Pacheco RS, Momen H, Coutinho SG, Marzochi MCA, Marzochi KBF, Costa SC 2001. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 987-996.
- Schulz A, Mellenthin K, Schonian G, Fleischer B, Drosten C 2003. Detection, Differentiation and Quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence Resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 41: 1529-1535.
- Sherlock IA, Guitton H 1969. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia III. Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. *Rev Bras Malariol D Trop* 21: 541-548.
- Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr G 1984. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 511-
- Sherlock IA 1996. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91(6): 671-683.
- Sherlock IA 1997. Há especificidade dos flebotômíneos para as leishmânias? *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 359- 368.
- Sherlock IA 2003. Importância Médico Veterinária. In EF Rangel, R Lainson R (eds), *Flebotômíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 15-22.

- Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E 1999. Assymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur J Epidemiol* 15: 271-276.
- Silva AC, Gomes AC 2001. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 187-191.
- Silva ES, Pirmez C, Gontijo CMF, Fernandes O, Brazil RP 2000. Visceral leishmaniasis in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. *Vet Rec* 147: 421-422.
- Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP 2001. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 3: 285-291.
- Silva OS, Grunewald J 1999. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 579-582.
- Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Ishikawa EA, Souza AAA, Braga RR 1989. Sobre a sensibilidade da cultura de leucócitos circulantes na detecção da *Leishmania* no sangue periférico de paciente com leishmaniose tegumentar. *Rev Soc Bras Med Trop* 22: 143-146.
- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity Using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol* 39: 560-563.
- Souza AQ, Parise ME, Pompeu MM, Filho JMC, Vasconcelos IA, Lima JW, Oliveira EG, Vasconcelos AW, David JR, Maguire JH 1995. Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceará, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 53: 380-385.
- Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF 2002. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), Occurring Sympatrically in Area of Cutaneous Leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1-7.
- Strauss-Ayali D, Jaffe LC, Burshtain O, Gonen L, Baneth G 2004. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. *J Infect Dis* 189: 1729-1733.
- Sundar S, Rai M 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 951-958.
- Tafuri WL, Santos RL, Arantes RME, Gonçalves R, Melo MN, Michalick MSM, Tafuri WL 2004. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunological Methods* 292: 17-23.
- Teodoro U 1995. Características Ecológicas de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Habitats Antrópicos, Município de Jussara, Paraná, Brasil. Tese, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- Tesh RB, Modi GB 1984. A simple method for experimental infection of phlebotomine sand flies with *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 33: 41-46.
- Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jamarillo C, Llano R, Velez ID 1996. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Colombia. *J Med Entomol* 33: 278-285.
- Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osório Y 2001. Canine visceral leishmaniasis in Colombia. Relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg* 64: 119-124.
- Uchôa CMA, Serra CMB, Duarte R, Magalhães CM, Silva RM, Theophilo F, Figliuolo LP, Horta FT, Madeira MF 2001. Aspectos sorológicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana canina em Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 34(6): 563-568.
- Vexanat JA, de Castro JA, Cavalcante R, Tavares JP, da Silva MR, Batista WH, Campos JH, Howard MK, Frame I, McNerney R 1994. Visceral leishmaniasis in Teresina, State of Piauí, Brazil: preliminary observations on the detection and transmissibility of canine and sandfly infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89(2): 131 -135.
- Viannia G 1912. Sobre uma espécie de *Leishmania*. *Bras Méd* 25: 411.
- Vieira JBF, Coelho GE 1998. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 85-92.
- Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC 2002. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*). *J Clin Microbiol* 40: 601-606.
- WHO (World Health Organization) 2001. The world health report. Geneva; 2001.
- WHO (World Health Organization) 2003. Leishmaniasis. Dados obtidos no site <http://www.who.int/>
- Wijeyerantne PM, Arsenault LKJ, Murphy CJ 1994. Endemic disease and development: the leishmaniasis. *Act Trop* 56: 349-364.
- Williams P 1993. Relationships of phlebotomine sand flies (Diptera). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 177-183.
- Woolhouse MEJ, Dye C, Etard JF 1997. Heterogeneities in a transmission of infectious agents: implications for the design of control programs. *Proceedings Nature Academy Science (Wash)* 94: 338-342.
- Yoshida EL, Correa FM, Marques SA, Stolf HO, Dillon NL, Momen H, Grimaldi G 1990. Human, canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis braziliensis*) in the south-west region of Sao Paulo State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 133-134.
- Young DG, Lawyer RG 1987. New World vectors of the leishmaniasis. *Curr Top Vector Res* 4: 29-71.

Young DG, Duncan MA 1994. Guide to the Identification and Geographic Distribution of Lutzomyia Sand Flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Am Entomol Inst 54, Associated Publishers, 881 pp.

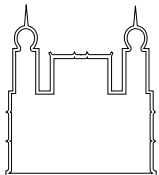
Zerpa O, Ulrich M, Borges R, Rodríguez V, Centeno M, Negrón E, Belizário D, Convit J 2003. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. Pan Am J Public Health 13: 239-245.

Anexos

8 – Anexos

8.1 – Anexo I – Ficha de identificação e clínica

No ___ Cod ___

	<p>Centro de Pesquisas "René Rachou" Ministério da Saúde - Fundação Oswaldo Cruz Av. Augusto de Lima, 1715 - Barro Preto - Belo Horizonte - M.G. CEP 30.190-002 - Cx. Postal 1743 – Brasil FAX Nº (55-31) 3295-3115 - TEL.: (55-31) 3295-3566 Laboratório de Leishmanioses</p>
---	--

FICHA CLÍNICA EPIDEMIOLÓGICA (CANINA)

DATA ___/___/___

NOME DO CÃO _____

RAÇA _____ SEXO _____ IDADE _____ COR _____

PROPRIETÁRIO _____

ENDEREÇO _____

TIPO DE RESIDÊNCIA _____

OUTRAS LOCALIDADES ONDE RESIDIU:

LOCAL _____ TEMPO _____

LOCAL _____ TEMPO _____

ASPECTOS CLÍNICOS _____

LESÕES _____ NÚMERO _____ REGIÃO DO CORPO _____

CÃO VIAJOU NOS ÚLTIMOS SEIS MESES (SÍTIO, ETC) _____

ORIGEM DO CÃO _____

EXAMES:

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO: MIELOGRAMA _____

MIELOCULTURA _____

DIAGNÓSTICO MOLECULAR: SANGUE _____

MEDULA ÓSSEA _____

PELE _____

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO:

RIFI _____

ELISA _____

OUTROS: _____

OBS: _____

8.2 – Anexo II – Certificado de licença do projeto (CEUA)



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o Programa nº **P.0243/05**, intitulado “**Flebotomíneos vetores e prevalência da leishmaniose visceral canina em área endêmica do Município de Santa Luzia, Minas Gerais**” sob a responsabilidade da **Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo - CPqRR - Fiocruz**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ) em 24/10/05. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade 24 de outubro de 2009.

Rio de Janeiro, 24 de outubro de 2005.



Dr. Hugo Caire Castro Faria Neto
Coordenador da CEUA-FIOCRUZ