

Ed. Dario: 73019
R 13840872105
27105105 - BCS

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA**

MARLOS DE MEDEIROS CHAVES

**INFECTIVIDADE PARA A *Lutzomyia longipalpis* EM CÃES
COM SOROLOGIA POSITIVA PARA A *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi*.**

616.9364
C439i
ex.1

**FORTALEZA
2003**

COD. ACERVO: 71019
R 13840872/05 27/05/05 Bcs

MARLOS DE MEDEIROS CHAVES

INFECTIVIDADE PARA A *Lutzomyia longipalpis* EM CÃES COM SOROLOGIA POSITIVA PARA A *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*.

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Patologia,
do Departamento de Patologia e Medicina
Legal da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Patologia.

**Orientador: Prof. Dr. José Wellington
de Oliveira Lima**

T 616.9364
e 439.i

**FORTALEZA
2003**



FICHA CATALOGRÁFICA

C4381 Chaves, Marlos de Medeiros

Infectividade para a *Lutzomyia longipalpis* em cães com sorologia positiva para a *Leishmania (Leishmania) chagasi*. / Marlos de Medeiros Chaves. – Fortaleza, 2003

74f.

Orientador: Prof. Dr. José Wellington de Oliveira Lima

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará.
Curso de Pós-graduação em Patologia

1. Leishmaniose Visceral – cão. 2. Leishmaniose Visceral – infectividade. 3. Leishmaniose Visceral – xenodiagnóstico I. Título.

CDD 616.9364

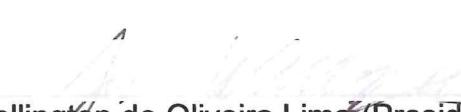
6.1908526
70 70 70
MARLOS DE MEDEIROS CHAVES

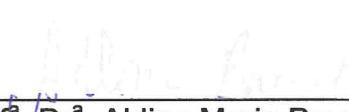
**INFECTIVIDADE PARA A *Lutzomyia longipalpis* EM CÃES
COM SOROLOGIA POSITIVA PARA A *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi*.**

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para a obtenção do grau
de Mestre em Patologia.

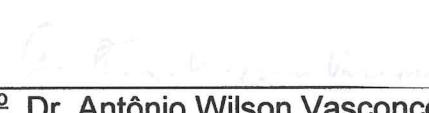
Aprovada em: 14/10/2003

BANCA EXAMINADORA


Profº Dr. José Wellington de Oliveira Lima (Presidente e Orientador)
Fundação Nacional de Saúde- Funasa


Profª Drª. Aldina Maria Prado Barral
Fundação Oswaldo Cruz- BA


Profº. Drª. Margarida Maria de Lima Pompeu
Universidade Federal do Ceará- UFC


Profº. Dr. Antônio Wilson Vasconcelos
Universidade Estadual do Ceará- UECE



*À Deus, pela força e coragem que tem
me dado ao longo da realização deste
trabalho.*

*À minha querida esposa Andréia, pelo
infinito amor, paciência, dedicação e
incentivo, sempre ao meu lado em
todos os momentos.*

*Ao meu adorado filho Victor, pela
amizade, carinho e estímulo
constantes.*



AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos dirigem-se a todos aqueles que, de algum modo, contribuíram para a consecução deste trabalho. Agradeço em particular:

Ao Dr. José Wellington de Oliveira Lima, meu orientador, pessoa de incomparável competência científica, exigência e compromisso com seus inúmeros orientandos.

À Dr^a. Margarida Maria de Lima Pompeu, que me abriu as portas para o mundo da pesquisa científica e das leishmanioses; sou eternamente grato e nunca esquecerei a sua dedicação, paciência e amizade.

Ao Dr. Antônio Wilson Vasconcelos, por ter me dado a grande oportunidade de ingressar no valoroso grupo de pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical Profº. Joaquim Alencar da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Ao Dr. Ivo Castelo Branco Coêlho, coordenador do Núcleo de Medicina Tropical Profº. Joaquim Alencar da UFC, que nos forneceu todo o suporte técnico para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral.

Aos professores do Curso de Mestrado em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da UFC, pelos valiosos momentos de transmissão de conhecimentos, especialmente aos Doutores: Izabel de Alencar Barros Vasconcelos, Talapala Govindaswamy Naidu e Cibele Barreto Mano de Carvalho.

À Dr^a. Maria Jânia Teixeira, pelas inestimáveis sugestões e decisiva colaboração no processamento e execução de material sorológico pela técnica de ELISA.

À Dr^a. Maria Excelsa Chaves Mendes Costa Lima pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho.

À Paula da Paz Palácio, dedicada secretária do Mestrado em Patologia, sempre eficiente e profissional no atendimento ao alunos do referido curso.

À Fundação Nacional de Saúde pelo apoio no fornecimento dos espécimes de *Lutzomyia longipalpis* necessários para a realização dos exames de xenodiagnóstico bem como também pelo suporte de transporte para os trabalhos de campo.

Aos técnicos da Fundação Nacional de Saúde envolvidos direta e indiretamente nos incansáveis trabalhos de campo e na manutenção da colônia de flebótomos.



Aos meus pais, Aracy Vieira de Medeiros Chaves e José Chaves e aos meus irmãos Maximiliano de Medeiros Chaves e Miriam de Medeiros Chaves pela incansável torcida e o amor compartilhado.

Aos meus padrinhos Manoel Dias da Fonseca Neto e Iracema Serra Azul da Fonseca pela amizade e incentivos manifestados.

Aos meus fiéis amigos Francisco Suetônio Ferreira Cavalcante, Maria Rani de Freitas Monteiro e Maíra Serra Azul da Fonseca pela amizade presente dia a dia e palavras de encorajamento.

Enfim, a todos os que me ajudaram na concretização deste projeto de formação pessoal e profissional, muito obrigado.

*“Não, não é fácil escrever. É duro como
quebrar rochas. Mas voam faíscas e
lascas como aços espelhados.”*

Clarice Lispector



RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil é uma doença infecciosa causada pelo protozoário parasita *Leishmania (Leishmania) chagasi*. O cão doméstico é considerado o reservatório mais importante do parasita. A principal estratégia de controle utilizada consiste na identificação dos cães soropositivos através de inquéritos sorológicos e posterior eliminação destes animais. Entretanto esta atual política adotada como medida de prevenção e controle da LV vem sendo questionada por não mostrar comprovação satisfatória na redução da prevalência da doença na população humana. Este estudo teve o objetivo de avaliar o potencial do cão como reservatório, bem como identificar os possíveis sinais clínicos mais freqüentes associados à infectividade e soropositividade. Cães com sorologia positiva ($n=38$) e negativa ($n=11$) para o teste de ELISA foram submetidos a experimentos de xenodiagnóstico a fim de se determinar a infectividade para o inseto vetor *Lutzomyia longipalpis*. Foi observado infectividade para o *Lu. longipalpis* em 36,84% (14) dos cães do grupo de soropositivos. Nenhum dos cães soronegativos apresentou infectividade aos flebótomos. Esta diferença foi estatisticamente significativa. Os sinais clínicos de emagrecimento e unhas grandes mostraram estar associadas com soropositividade e infectividade. Além disso, cães que exibiram estas condições infectaram um número significativamente maior de flebótomos. Por outro lado, não foi observada qualquer associação com sinais clínicos de alopecia, exulceração e adinamia. Cães mais jovens (< 3anos) infectaram flebótomos com uma freqüência mais elevada. Com relação à raça dos animais, os cães de raça mestiça foram os mais freqüentes entre os soropositivos. Estes resultados confirmam a importância do cão na epidemiologia da LV como fonte de infecção para o flebótomo e indicam que os sinais clínicos de emagrecimento, unhas grandes e idade são um forte indicativo do potencial de infectividade dos cães.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral; Cão; Infectividade; Reservatório; Sinais Clínicos; Controle da doença; Xenodiagnóstico.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) in Brazil is an infection caused by the protozoan parasite *Leishmania (Leishmania) chagasi*. The domestic dog is considered the most important reservoir of the parasite. The main strategy for the control seeks to identify the positive dogs through serological screenings, and subsequent elimination of these. However this current politics adopted as prevention measure and control of VL comes being questioned by not showing satisfactory confirmation in the reduction of the prevalence of VL in the human population. This study had the objective of evaluating the reservoir potential of the dog besides to identify the possible more frequent clinical signs associated to the infectiousness and seropositiveness. Dogs with positive (n=38) and negative (n=11) for the serological ELISA test were studied through xenodiagnosis experiments to determine the infectiousness to phlebotomine vector *Lutzomyia longipalpis*. Infectiousness for *Lu. longipalpis* was observed in 36,84% (14) of the dogs from seropositive group. None of the seronegative dogs presented infectiousness to the sand flies. This difference was statistically significant. The clinical signs loss of weight and big fingernails showed to be associated with seropositiveness and infectiousness. Besides, dogs that exhibited these conditions infected a significantly larger number of sand flies. On the other hand, was not observed association among the clinical signs of alopecia, ulceration and apathy. Younger dogs (<3 anos) infected sand flies with a higher frequency. With relationship to the breed of the animals, the cross-bred dogs race was the most frequent among the seropositives. These results confirm the importance of the dog in the epidemiology of VL as infection source for the sand fly and they indicate that the clinical signs loss of weight, big fingernails and age are a strong indicative of the dogs infectiousness potential.

Key words: Visceral Leishmaniasis; Dog; Infectiousness; Reservoir; Clinical signs; Control of the disease; Xenodiagnosis.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Número de casos e taxa de letalidade de Leishmaniose Visceral , segundo ano de ocorrência. Brasil, 1980-1997.

TABELA 2- Distribuição de casos confirmados de Leishmaniose Visceral, por região. Brasil, 1980-2000

TABELA 3- Distribuição de casos confirmados, por estados da região Nordeste. Brasil, 1980-2000

TABELA 4- Retrospectiva comparativa de alguns estudos publicados da incidência relativa (%) dos principais sinais clínicos da LVC em cães sintomáticos e com exame parasitológicos e/ou sorológico positivos.

TABELA 5- Infectividade para a *Lu. longipalpis* dos cães estudados, de acordo com o exame sorológico ELISA.

TABELA 6- Distribuição da amostra canina de acordo com a localidade

TABELA 7- Infectividade para a *Lu. longipalpis*, de cães portadores de anticorpos anti-*Leishmania*, de acordo com os sintomas clínicos e outras condições.

TABELA 8- Distribuição do número de *Lu. longipalpis* infectadas em cães (N=38) portadores de anticorpos anti-*Leishmania*, de acordo com os sintomas clínicos e outras condições.

TABELA 9- Soropositividade de cães (N=38), de acordo com os sintomas clínicos e outras condições.

TABELA 10- Associação bruta e ajustada entre sinais clínicos e outras condições e infectividade para a *Lu. longipalpis*, de cães (N=38) portadores de anticorpos anti-*Leishmania*

TABELA 11- Infectividade para a *Lu. longipalpis*, de acordo com a área do corpo exposta aos flebótomos.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Número de casos e taxa de letalidade de Leishmaniose Visceral segundo ano de ocorrência. Brasil, 1980-1997.

FIGURA 2- Distribuição de casos confirmados de Leishmaniose Visceral, por região, Brasil, 1980-2000

SUMÁRIO

| | |
|------------------------|----|
| Resumo | 7 |
| Abstract | 8 |
| Lista de Tabelas | 9 |
| Lista de Figuras | 10 |

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 Considerações Gerais | 13 |
| 1.2 Leishmaniose Visceral | 15 |
| 1.2.1 Aspectos Gerais | 15 |
| 1.2.3 Aspectos Epidemiológicos | 18 |
| 1.3 Leishmaniose Visceral Canina | 25 |
| 1.3.1 Diagnóstico | 27 |
| 1.4 O potencial reservatório do cão na leishmaniose visceral | 35 |
| 1.4.1 O Xenodiagnóstico como ferramenta na determinação de infectividade humana e canina | 37 |
| 1.5 Objetivos | 41 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 42 |
| 2.1 Seleção dos Cães | 42 |
| 2.2 Os flebótomos | 42 |
| 2.2.1 Captura das matrizes | 42 |
| 2.2.2 Colonização | 43 |
| 2.3 ELISA para detecção de anticorpos anti- Leishmania | 43 |
| 2.4 Diagnóstico Clínico | 44 |
| 2.5 Xenodiagnóstico | 45 |
| 2.4 Dissecção dos flebótomos | 45 |
| 2.5 Análise estatística dos dados | 45 |

| | |
|--|----|
| 3 RESULTADOS | 47 |
| 3.1. Infectividade para o <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 47 |
| 3.2. Dados clínicos e sua associação com infectividade em cães com sorologia positiva | 48 |
| 4 DISCUSSÃO | 53 |
| 5 CONCLUSÃO | 58 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

As leishmanioses são doenças parasitárias que afetam cerca de 12 milhões de pessoas e mais de 350 milhões correm o risco de adquiri-la em 88 países, 72 dos quais são países em desenvolvimento e 13 estão entre os menos desenvolvidos do mundo. (World Health Organization, [online] 2001). A sua distribuição compreende todos os continentes, com exceção da Antártica e Oceania. É endêmica nas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Mediterrâneo, sul da Europa (Velho Mundo) e América do Sul e Central (Novo Mundo). São causadas por diferentes espécies de um protozoário tripanossomatídeo pertencentes ao gênero *Leishmania* Ross, 1903, e é transmitido por insetos flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). A via de entrada do protozoário no organismo de humanos e outros hospedeiros vertebrados se dá através da regurgitação de formas promastigotas flageladas do parasita em virtude do repasto sanguíneo do flebótomo fêmea visando à maturação dos ovos. Quando penetram na pele, as leishmanias são fagocitadas por macrófagos e transformam-se em amastigotas aflageladas, onde se dividem até o rompimento destes, podendo agora infectar novas células, espalhando-se por todo o organismo do hospedeiro.

Podemos observar nas leishmanioses um largo espectro de manifestações clínicas, dependendo da espécie de leishmania infectante e da resposta imune do hospedeiro vertebrado. As espécies de leishmania produzem quatro tipos diferentes de lesões em humanos: cutânea, mucocutânea, difusa e visceral. A forma cutânea normalmente produz úlceras na pele. Estas lesões causam séria incapacidade física e cicatrizes permanentes. Na leishmaniose mucocutânea as lesões podem destruir parcial ou totalmente as membranas mucosas do nariz, boca e garganta, causando mutilações e levando o indivíduo a um estigma com grande prejuízo social. A forma cutânea difusa é rara e inicia-se como nódulo cutâneo único que se dissemina até que o corpo do indivíduo esteja recoberto por lesões papulosas e nodulares bizarras (Cotran et al., 1996). A

maioria dos casos de leishmaniose difusa tem se mostrado rebeldes ao tratamento (Pessoa & Martins, 1982). A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar (na Índia, como Kala-azar ou febre Dum-Dum), é uma doença sistêmica e grave, cujos sintomas típicos normalmente aparecem em média de 2 a 4 meses após a infecção e pode ser caracterizada por hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, pancitopenia, anemia, febre, perda de peso e estado de debilidade progressivo. Se não tratada pode levar o paciente ao óbito (Badaró et al. 1986a).

Por muitos anos as leishmanioses tem sido subestimada principalmente pela falta de conhecimento dos sérios problemas que podem provocar à saúde. Nos últimos 10 anos houve uma considerável expansão das áreas endêmicas e um aumento de casos da doença. Atualmente a notificação dos casos é obrigatória em apenas 33 países, e, portanto, um número substancial de casos ainda fica sem o devido registro. De fato, dados sobre a incidência anual das leishmanioses no mundo revelam uma estimativa de 1,5 a 2 milhões de casos para leishmaniose cutânea (LC) e cerca de 500.000 casos para LV, entretanto somente cerca de 600.000 mil são oficialmente computados (WHO, [online] 2001).

No Brasil, as leishmanioses vêm modificando seus padrões epidemiológicos, com nítida expansão geográfica, com tendência de crescimento do número de casos. Essa tendência é em grande parte atribuída ao processo de urbanização acelerada sem adequada infra-estrutura, alterações do meio ambiente (desmatamento), ampliação das fronteiras agrícolas, processos migratórios e grandes obras de infra-estrutura (rodovias e hidroelétricas) (Funasa/ Ministério da Saúde, [online] 1999).

A Região Nordeste do Brasil apresenta a maior incidência de casos de LV. Em 2000, esse número ficou em 8,14 (por 100 mil habitantes) contra 2,63 registrados na região Norte, a segunda maior (Funasa/ MS, [online] 2002). Atualmente, a LV é altamente endêmica no nordeste semi-árido dos Estados do Ceará, Bahia, Maranhão, Piauí, Pernambuco e Rio Grande do Norte, ocorrendo também esporadicamente nos Estados de Alagoas, Sergipe, Goiás, Mato Grosso,

Espírito Santo e Pará. Em todos estes Estados observa-se uma associação entre cães infectados e a abundância de *Lutzomyia longipalpis*, considerado o vetor da LV no Brasil (Killick-Kendrick, 1990).

O Brasil é o único país endêmico para LV que conduz regularmente programas de controle epidemiológico e profiláticos que envolvem o tratamento de casos humanos, o controle de insetos vetores e a eliminação de cães infectados (Furtado Vieira & Coelho, 1998). O cão tem sido considerado o reservatório animal mais relevante na LV, agindo como mantenedor do ciclo da doença, podendo os infectados manifestar ou não sinais clínicos. Entretanto, seu real potencial reservatório vem sendo questionado baseado em estudos epidemiológicos que demonstraram uma parcial eficácia nas estratégias atualmente empregadas (Killick-Kendrick et al., 1994; Dietze et al., 1997; Ashford et al., 1998).

1.2. Leishmaniose Visceral

1.2.1. Aspectos Gerais

A LV, foi descrita primeiramente em 1903 por William Leishman e Charles Donovan. Ambos demonstraram quase simultaneamente a presença de parasitas em esfregaços corados oriundos do baço de pacientes com diagnóstico equivocado de malária crônica. Neste mesmo ano, Ross criou o gênero *Leishmania*, denominando o referido parasita de *Leishmania donovani* (Badaró & Duarte, 1997). Entretanto, a primeira observação dos parasitos que causavam o calazar foi feita na Índia por Cunningham em 1885, em indivíduos acometidos pela doença. Em 1908, Nicolle e Comte relataram que alguns mamíferos, incluindo o cão, poderiam atuar como reservatório da doença. E somente em 1931 conseguiu-se incriminar os flebotomíneos como vetores da doença através de experimentos com hamsters (Genaro, 1995).

Trata-se de uma doença crônica, na qual as formas amastigotas do parasita são encontrados multiplicando-se no interior de fagócitos mononucleares no baço, fígado, linfonodos, medula óssea e intestino. O Sistema Fagocítico

Mononuclear (SFM) responde à invasão dos parasitas com intensa proliferação celular e diferenciação plasmocitária, resultando no aumento do volume dos órgãos ricos em células do SFM (hepatoesplenomegalia) e elevação da fração globulina no plasma. As imunoglobulinas não são todas específicas contra o parasita, podendo ser o resultado de uma ativação policlonal. A medula óssea sofre atrofia dos elementos hemoformadores, já que as células são desviadas para combater o parasitismo através de sua função macrofágica. Em consequência surge um quadro hematológico representado por pancitopenia, mais especificamente leucopenia, anemia e tendência hemorrágica devida à baixa das plaquetas. A destruição celular acarretada pelos parasitas provoca febre com comprometimento do estado geral do indivíduo infectado. O bloqueio progressivo do SFM diminui as defesas do indivíduo, tornando-o mais suscetível às infecções oportunistas, principalmente do trato respiratório e digestivo (Genaro, 1995, Cotran et al., 1996).

Clinicamente, a LV manifesta-se de acordo com o equilíbrio entre a multiplicação dos parasitos nas células do SFM, a resposta imunitária do indivíduo e as alterações degenerativas resultantes desse processo. Desse modo, podemos observar o calazar classificado da seguinte forma: Inaparente: sorologia positiva mas sem sintomas clínicos. Clássica: cursa com febre, astenia, adinamia, anorexia, perda de peso e caquexia. Observa-se também hepatoesplenomegalia, micropoliadenopatia e fenômenos hemorrágicos. Oligossintomática: febre baixa ou ausente, hepatomegalia presente, esplenomegalia quando detectada é discreta, ausência de hemorragias e caquexia, adinamia observada. Aguda: o início pode ser abrupto ou insidioso. Na maioria dos casos, a febre é o primeiro sintoma, podendo ser alta e contínua ou intermitente, com remissões de uma ou duas semanas. Observa-se hepatoesplenomegalia, adinamia, perda de peso e hemorragias. Ocorre anemia com hiperglobulinemia. Geralmente não se observa leucopenia ou plaquetopenia. Refratária: trata-se de uma forma evolutiva do calazar clássico que não respondeu ou respondeu parcialmente ao tratamento com antimoniais. É clinicamente mais grave, devido ao prolongamento da doença sem resposta terapêutica. O óbito tem como causa, quase sempre, as

hemorragias e as infecções associadas em virtude da debilidade física e imunológica (Brasil, 2002).

Os agentes etiológicos da LV pertencem ao complexo donovani. No Velho Mundo, as espécies envolvidas são *Leishmania (Leishmania) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) archibaldi* enquanto no Novo Mundo temos *L. (L.) chagasi*.

Enquanto que nas Américas a transmissão da LV ocorre principalmente através de uma espécie vetora, *Lu. longipalpis*, no Velho Mundo temos várias espécies pertencentes ao gênero *Phlebotomus*. Estes insetos tem a capacidade de se deslocar dentro do ambiente peri-doméstico; com condições climáticas apropriadas e a disponibilidade de hospedeiros mamíferos ou aves, a população de flebotomíneos em torno de habitações humanas pode ser elevado, particularmente em áreas rurais (Deane & Deane, 1962; Lainson et al., 1983, 1985).

São considerados mantenedores do ciclo da LV o cão (*Canis familiaris*), como reservatório doméstico (Deane & Deane, 1962; Lainson et al., 1983, 1985; Corredor, 1989a), e a raposa (*Dusycion vetulus* e *Cerdocyon thous*), como reservatório silvestre (Deane & Deane, 1954, 1954b; Alencar, 1959; Lainson & Shaw, 1969; Brasil, 2002). Outros animais silvestres também já foram encontrados infectados com o parasita, como roedores (*Rattus rattus*) (Gradoni et al., 1983) e marsupiais (*Didelphis marsupialis* e *D. albiventris*) (Sherlock et al., 1984; Corredor et al., 1989a, 1989b; Travi et al., 1994), podendo representar um papel importante no ciclo da doença. O homem também pode ser fonte de infecção, principalmente quando a LV incide sob a forma de epidemia, como ocorre com o calazar indiano (OMS, 1984). Apesar dos inúmeros trabalhos publicados implicarem o cão e outros animais silvestres como reservatórios da LV, um experimento de preferência alimentar (“host-preference”) realizado por Morrison et al. (1993) na área endêmica de El Callejon na Colômbia, concluiu que o homem e o cão são hospedeiros pouco atrativos para o *Lu. longipalpis*, indicando vacas e porcos como preferenciais. Seus resultados sugerem que o *Lu. longipalpis* possui um hábito alimentar oportunista.

Cães infectados podem ou não desenvolver quadro clínico da doença, podendo evoluir para morte nos casos mais graves. O reconhecimento das manifestações clínicas destes reservatórios é importante para adoção de medidas de controle da doença. Os canídeos apresentam intenso parasitismo cutâneo, o que permite uma fácil infecção do flebótomo, e, por este fato, são os mais importantes elos na manutenção da cadeia epidemiológica (Brasil, 2002).

1.2.2. Aspectos epidemiológicos

A distribuição geográfica da LV ocorre principalmente nos países de clima tropical e subtropical. Mais de 90% dos casos ocorrem no Brasil, Bangladesh, Índia e Sudão. Na China, podem ser observadas também áreas hiperendêmicas. Na Europa aparece muito disseminada no sul da Rússia e em todo o litoral do Mediterrâneo, com focos endêmicos importantes na Grécia, sul da Itália, França, Portugal e Espanha. Na África a moléstia ocorre ao norte, na região do Mediterrâneo (Marrocos, Argélia, etc.) e também no sul em países como Sudão e Quênia. Nas Américas, a *L. (L.) chagasi* é encontrada desde os Estados Unidos da América do Norte até o norte da Argentina. Casos humanos ocorrem desde o México até a Argentina. O Brasil concentra 90% dos casos verificados no continente americano (WHO, 1990, 1999)

O comportamento epidemiológico da LV é cíclico, com elevação dos casos em períodos médios de cada cinco anos, além de uma tendência crescente, se considerarmos o período de 1980 até o presente ano (Funasa/ MS, [online] 2002b). Recentemente, evidenciou-se que esta sazonalidade está associada às variações climáticas caracterizadas pelo fenômeno El Niño (Franke et. al, 2002). Por outro lado, o aumento do número de casos registrados, nos anos recentes, acompanha-se de uma tendência de modificação do padrão de ocorrência geográfica, com o registro de casos em grandes centros urbanos, caracterizando uma expansão da área tradicional de ocorrência (Funasa/ MS, [online] 2002b).

No Brasil, é uma doença endêmica, mas ocorrem surtos com alguma freqüência (Brasil, 2002). A LV atinge 19 dos 27 estados da federação,

especialmente da região Nordeste. O total de casos acumulados de 1980 a 2000 no Brasil chega a 44.677. Na região Nordeste, onde a doença já se apresentava, há muitos anos, sob a forma endêmica, concentra-se 90% das notificações (40.028 casos). As incidências anuais são muito irregulares, observando-se, nos anos de 1994 (7,2 por 100 mil habitantes) e 1995 (7,8 por 100 mil habitantes), o registro das suas maiores taxas. O risco de adoecer nas diversas unidades federadas da região Nordeste, também mostra grandes variações. Tomando, como exemplo, o estado do Piauí, que, em geral, apresenta as maiores taxas de incidência do país, nota-se que, no período compreendido entre 1981 e 1985, elas atingem valores próximos a 18 por 100 mil habitantes, reduzindo-se nos anos subsequentes e voltando a se elevar em 1993 e 1994, quando alcança 26,2 e 28,9 por 100 mil habitantes, respectivamente. Os estados de Sergipe e Bahia também apresentaram incidências elevadas no período de 1994 a 1996 (Funasa/ MS, [online] 1999). Na região Norte, até 1988, só havia registro da doença no estado do Pará. Em 1989, foram diagnosticados os primeiros casos em Roraima, que foram seguidos por expressivo surto na capital do estado, com a incidência alcançando níveis próximos a 27,9 por 100 mil habitantes. A partir de então, essa região também passa a influenciar a tendência nacional do período (Funasa/ MS, [online] 1999). Na região Centro-Oeste, as taxas de incidência situam-se abaixo de 1 por 100 mil habitantes, com casos provenientes apenas dos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul, esse último registrando sempre as maiores taxas. O Mato Grosso notificou somente um caso importado em 1988 e cinco autóctones no ano de 1998, enquanto o Distrito Federal registrou os primeiros casos da doença em 2000. A região Sul do país, que era considerada área indene, registrou em 2000 o seu primeiro caso (Funasa/ MS, [online] 2002). Observa-se também uma ampliação da área limite de ocorrência no Sudeste do país, destacando-se a ocorrência da doença no Estado de São Paulo desde 1999 (Funasa/ MS, [online] 2002b).

Pode-se observar uma grande variabilidade nas notificações da LV refletidas tanto nas estimativas de letalidade (**Tabela 1, Figura 1**) como na distribuição de casos confirmados (**Tabela 2, Figura 2**). A partir de 1982, o incremento do número de casos notificados corresponde ao período de

implantação do Programa Especial de Controle da doença. Observa-se que, de modo geral, quanto maior é o número de casos notificados, menor é a taxa de letalidade, evidenciando que muitos casos não foram conhecidos pelo sistema de notificação (Funasa/ MS, [online] 1999 e 2002).

TABELA 1- Número de casos e taxa de letalidade de Leishmaniose Visceral, segundo ano de ocorrência. Brasil, 1980-1997.

| Ano | Casos | Letalidade |
|------------|--------------|-------------------|
| 1980 | 164 | 28,4 |
| 1981 | 359 | 15 |
| 1982 | 1120 | 6,9 |
| 1983 | 1124 | 9,5 |
| 1984 | 2115 | 7 |
| 1985 | 2585 | 4 |
| 1986 | 1794 | 6 |
| 1987 | 1035 | 7,5 |
| 1988 | 816 | 8 |
| 1989 | 1869 | 6,2 |
| 1990 | 1944 | 6,3 |
| 1991 | 1510 | 6,5 |
| 1992 | 1870 | 5,4 |
| 1993 | 2281 | 6,1 |
| 1994 | 3426 | 3,9 |
| 1995 | 3885 | 4,1 |
| 1996 | 3255 | 3,9 |
| 1997 | 2572 | 3,6 |

Fonte: MS/FUNASA/DEOPE, 1999

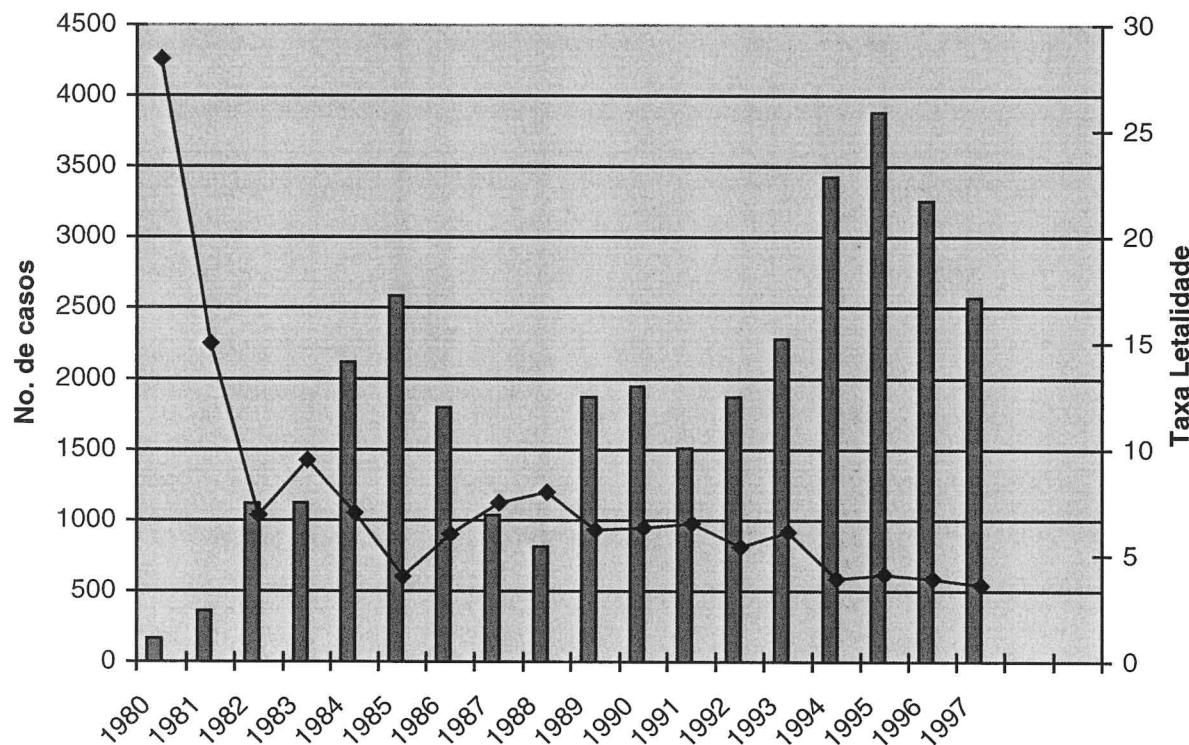


FIGURA 1- Número de casos e taxa de letalidade de Leishmaniose Visceral Humana segundo ano de ocorrência. Brasil, 1980-1997.

Fonte: MS/FUNASA/DEOPE

As epidemias ocorridas em importantes centros urbanos da região Norte (Boa Vista e Santarém), Nordeste (Teresina, São Luís, Natal, Aracaju), Sudeste (Montes Claros e Belo Horizonte) e Centro-Oeste (Cuiabá) são evidências de como o processo migratório do campo para a periferia das grandes cidades influenciou na mudança do perfil epidemiológico da doença. No processo de urbanização, onde os migrantes foram marginalizados na periferia das cidades, em áreas sem condições de moradia adequada, a presença dos flebótomos e a circulação de cães infectados, oriundos das áreas endêmicas, propiciaram a adaptação das leishmanias ao novo nicho ecológico (Funasa/ MS, [online] 1999). A LV afeta comumente as crianças pobres e malnutridas abaixo de 15 anos (Arias et al, 1996).

TABELA 2- Distribuição de casos confirmados de Leishmaniose Visceral, por região. Brasil, 1980-2000

| Ano | Regiões | | | | |
|------|---------|----------|---------|-----|--------------|
| | Norte | Nordeste | Sudeste | Sul | Centro-Oeste |
| 1980 | 0 | 152 | 9 | 0 | 3 |
| 1981 | 0 | 337 | 16 | 0 | 6 |
| 1982 | 0 | 1095 | 12 | 0 | 13 |
| 1983 | 0 | 1095 | 5 | 0 | 24 |
| 1984 | 99 | 2090 | 24 | 0 | 11 |
| 1985 | 49 | 2381 | 27 | 0 | 32 |
| 1986 | 12 | 1729 | 36 | 0 | 17 |
| 1987 | 8 | 959 | 40 | 0 | 28 |
| 1988 | 23 | 716 | 67 | 0 | 10 |
| 1989 | 29 | 1699 | 125 | 0 | 16 |
| 1990 | 35 | 1650 | 243 | 0 | 16 |
| 1991 | 53 | 1380 | 76 | 0 | 1 |
| 1992 | 99 | 1657 | 96 | 0 | 18 |
| 1993 | 84 | 2118 | 59 | 0 | 20 |
| 1994 | 118 | 3183 | 90 | 0 | 35 |
| 1995 | 117 | 3519 | 171 | 0 | 78 |
| 1996 | 133 | 2932 | 166 | 0 | 15 |
| 1997 | 152 | 2257 | 140 | 0 | 21 |
| 1998 | 139 | 1840 | 107 | 0 | 68 |
| 1999 | 383 | 3225 | 202 | 0 | 107 |
| 2000 | 284 | 4014 | 319 | 1 | 227 |

Fonte: MS/FNS-CENEPI, SES e SINAN (a partir de 1998), 2002

Dois grandes exemplos recentes do ressurgimento da LV no Brasil ocorreu na cidades de Teresina e São Luiz. Em Teresina, uma epidemia de LV ocorreu de 1981 a 1985. Esta foi inicialmente limitada a zona rural mas depois se espalhou para áreas periféricas da cidade (Costa et al., 1990). Em São Luís, capital do estado do Maranhão, a doença reapareceu em 1993-1994 (Silva et al., 1997), 10 anos após uma epidemia anterior (1982 a 1986). A cidade tem recebido um grande contingente de imigrantes em busca de trabalho, principalmente dos estados nordestinos (Mendes et al., 2000, 2002). Tanto em Teresina como em São Luís, as epidemias surgiram precedidas por uma prolongada e severa estiagem. A doença foi encontrada predominantemente entre indivíduos jovens que saíram das áreas rurais para viver em habitações precárias com animais (cães, gatos, galinhas, etc.). Os dois estados foram responsáveis por aproximadamente 40 a 50% do número de casos reportados no país durante 1993 a 1994 (Arias et al. 1996).

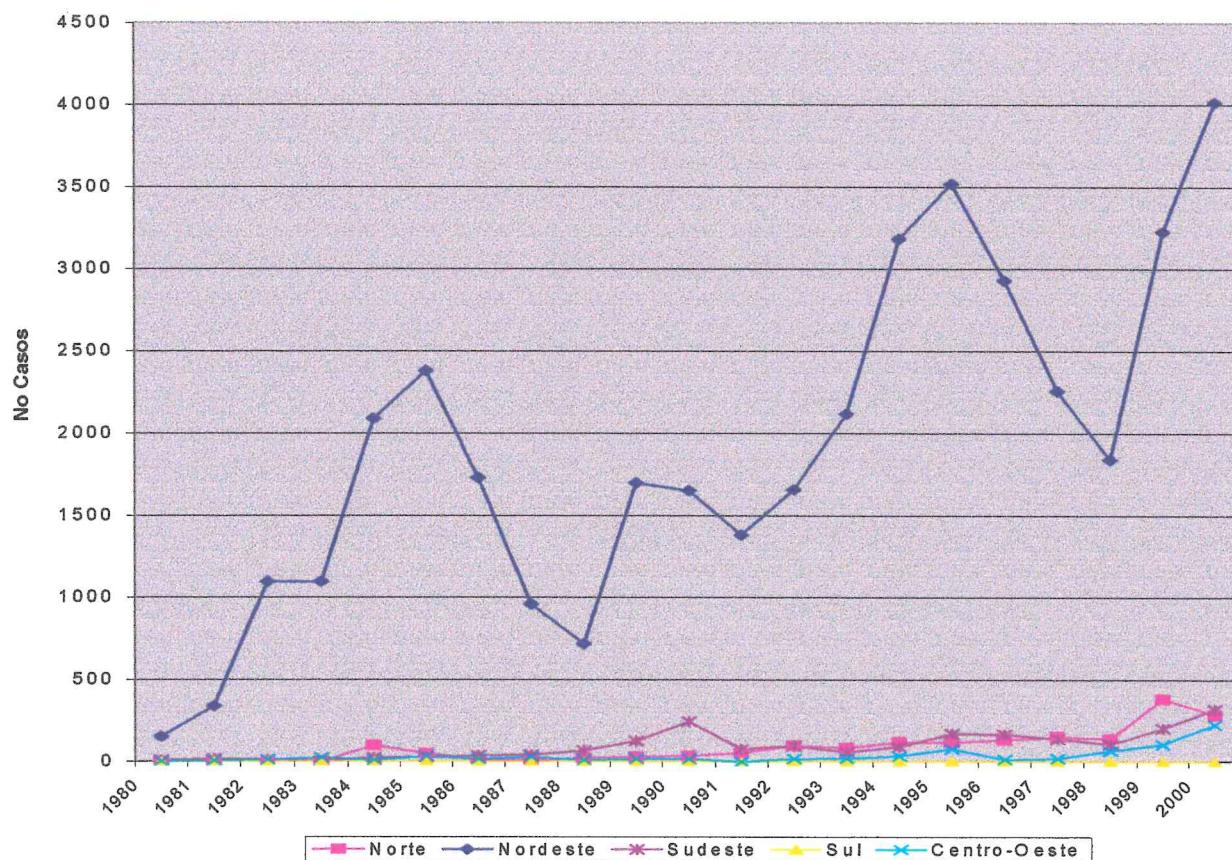


FIGURA 2- Distribuição de casos confirmados de Leishmaniose Visceral, por região, Brasil, 1980-2000

Fonte: MS/FNS-CENEPI, SES e SINAN (a partir de 1998), 2002

Na cidade de Natal, capital do Rio Grande do Norte, um surto com 316 casos de LV foi observado entre os anos de 1989 e 1992, ilustrando também um padrão relacionado com o rápido crescimento populacional, migração e a expansão das cidades (Jeronimo et al., 1994).

O Ceará tem grande destaque como um dos Estados da região Nordeste com um dos maiores números de casos da doença. Durante os anos de 1980 a 2000 foram notificados 5557 casos de LV (Tabela 3), ficando atrás apenas do estado da Bahia e Maranhão (Funasa/ MS, [online] 2002).

TABELA 3- Distribuição de casos confirmados, por estados da região Nordeste. Brasil, 1980-2000

| Estados | Nº de Casos |
|---------------------|--------------|
| Bahia | 13.839 |
| Maranhão | 5.627 |
| Ceará | 5.557 |
| Piauí | 5.308 |
| Pernambuco | 2.478 |
| Sergipe | 2.194 |
| Rio Grande do Norte | 2.021 |
| Alagoas | 1.506 |
| Paraíba | 1.498 |
| TOTAL | 40028 |

Fonte: MS/FNS-CENEPI, SES e SINAN a partir de 1998 (2002).

As principais estratégias para o controle da LV no Brasil e América Latina permanecem ainda essencialmente as mesmas desde os estudos pioneiros de Deane, Alencar e colaboradores (Deane, 1956; Alencar, 1961; Deane & Deane, 1962). As medidas são: I) inquérito sorológico visando identificar e eliminar cães positivos. Esta é a principal medida adotada atualmente pelo Ministério da Saúde. Anualmente são examinados milhares de cães nas áreas endêmicas de LV. Este tipo de controle tem demonstrado muitas vezes ocasionar problemas junto às populações que não aceitam a eliminação dos cães positivos. Apesar do grande esforço, este método não tem se mostrado completamente efetivo, haja visto o crescente número de casos de LV. II) tratamento dos casos humanos através da administração de antimoníato pentavalente. III) borrifação com inseticidas. O único programa conhecido a ter sucesso no controle da LV, que foi desenvolvido na China logo após a revolução comunista, foi em grande parte dependente da borrifação de inseticidas (Chung, 1953). No Brasil, áreas borrifadas objetivando o controle da malária, doença de Chagas e dengue tem as menores incidências de LV devido a um declínio dramático da incidência de *Lu. logipalpis* (Costa, 1990).

Outro fato que vem chamado a atenção das autoridades de saúde é que até bem recentemente a LV era considerada como uma endemia focal de áreas rurais e pobres, comuns no Nordeste brasileiro. Entretanto sua distribuição

geográfica vem se modificando consideravelmente desde meados dos anos 80, quando se observou claramente sua expansão para outras regiões rurais indenes e para a periferia de alguns centros urbanos (Funasa/ MS, [online] 1999). A doença parece estar se espalhando no país e aparecendo onde era anteriormente desconhecida. É particularmente alarmante o reaparecimento de epidemias de LV em grandes cidades do nordeste, como Teresina, São Luís e Fortaleza (Momen, 1995). Estes surtos urbanos e, predominantemente peri-urbanos entre residências da classe pobre, parece estar aumentando (Miles et al., 1999).

1.3. Leishmaniose Visceral Canina

Maruashvili (1967), estabeleceu 4 tipos epidemiológicos para a LV: enzóotico-silvestre-rural, rural-endêmico, urbano endêmico e endemo-epidêmico. No primeiro os canídeos silvestres são reservatórios únicos; no segundo o canídeo doméstico entra na cadeia epidemiológica e transmite ao homem; no terceiro o cão funciona como reservatório e transmite ao homem; no quarto o homem é o único reservatório. O calazar no Brasil é considerado uma zoonose de canídeos silvestres que se transmitiu ao canídeo doméstico e deste afeta o homem em menor escala que o cão (Alencar et al., 1974/75).

No processo de urbanização da LV, as populações migram para o meio-urbano e continuam a manter vínculo com o seu passado rural mantendo, principalmente, seus cães e pequenos animais de produção (Desjeux, 2002). Do ponto de vista epidemiológico, a doença canina é considerada mais importante que a doença humana, pois, além de ser mais prevalente, apresenta grande contingente de animais assintomáticos albergando parasitos no derma. Estes, assim como os cães doentes, representam melhor fonte de infecção para o inseto vetor, que o homem doente (Deane & Deane, 1955). No entanto, esse mesmo fato possibilitaria a infecção intercanina, sem a participação do flebótomo, através de mordedura, durante brigas, do coito e, provavelmente também, pela ingestão de carapatos que sugaram cães doentes (Alencar, 1959).

As campanhas públicas no Brasil destinadas a reduzir a incidência de LV tem como alvo principal os cães (Alencar, 1961; Lacerda, 1994; Momen,

1995). Exceto possivelmente na Europa (Gradoni et al., 1988), o tratamento em cães é considerada uma intervenção não realista na maioria dos países endêmicos devido aos elevados custos e pela fraca efetividade contra a doença. Desse modo, a principal diretriz no controle da LV é sacrificar os cães infectados (Tesh, 1995). Milhares deles são eliminados anualmente no país com o propósito de controlar a LV (Lacerda, 1994; Momen, 1995; Dye, 1996; Vieira & Coelho, 1998; Palatinik-de-Sousa et al., 2001). A seleção destes é determinada por meio de testes de diagnóstico visando detectar anticorpos específicos anti-*Leishmania* no sangue. A prática desta medida de controle ao longo de várias décadas tornou-a impopular pela maioria dos proprietários de cães, e existe pouca evidência de sua real efetividade (Dye, 1996; Alencar, 1961; Ashford et al., 1998; Dietze et al., 1997). Particularmente a este respeito, devemos considerar que uma proporção significativa de cães infectados não serão identificados devido a falta de um teste de diagnóstico com 100% de sensibilidade ou mesmo pela não colaboração de seus donos. Outro fator que colabora para tornar pouco eficaz o controle é que os cães positivos são geralmente detectados depois de um longo período do momento da infecção. E os cães que finalmente são eliminados, são substituídos por outros, igualmente susceptíveis, pelos seus donos (Reithinger & Davies, 1999). Estratégias de controle alternativas, tais como a vacinação canina (Mayrink et al., 1996), ou o uso de inseticidas em coleiras (Killick Kendrick et al., 1997; David et al., 2001), vem demonstrando resultados promissores.

Os aspectos clínicos para a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) variam muito. Isto é devido aos numerosos mecanismos patogênicos da doença e da diversidade de resposta imune pelo hospedeiro (Ferrer, 1999). Os cães infectados podem apresentar um bem conhecido espectro de características clínicas que podem variar de aparente estado sadio ao severo estágio final. De modo geral, o quadro clínico se assemelha muito ao humano, com febre irregular de longo curso, palidez de mucosas e um emagrecimento progressivo, até o estado de caquexia intensa, na fase terminal. A hipertrofia do SFM, levando a esplenomegalia e adenopatia generalizada é bastante freqüente, porém pouco referida (Marzochi et al., 1985). O período de incubação na LVC varia entre 3 a vários meses, possivelmente até 2 anos. Ocorre a formação de leishmanoma no

local do inóculo, que desaparece posteriormente. Em seguida ocorre a visceralização das formas amastigotas que passam a ser detectadas no fígado e órgãos linfóides, resultando em intenso parasitismo destes (Genaro, 1995). Invariavelmente, observamos o desenvolvimento da doença para os estados latente ou patente que, por sua vez, em períodos variáveis de semanas, meses ou anos, pode evoluir para a forma aguda, subaguda, crônica ou regressiva (Cunha, 1938; Alencar, 1959; Lanotte et al., 1979).

1.3.1. Diagnóstico

Tendo em vista o cão ser considerado o principal reservatório da LVC humana, é extremamente necessário o diagnóstico correto da LVC (Gradoni, 2002). Os métodos para o diagnóstico da LVC podem ser classificados em quatro categorias: clínico (observação dos sintomas da doença), parasitológicos (detectam o parasita), sorológicos (detectam anticorpos anti-leishmania) e moleculares (detectam o DNA do parasita). A existência de sinais clínicos nos cães examinados, que caracterizam o indício do calazar, tem contribuído bastante para a identificação da doença. Em uma pesquisa realizada no período de 1956 a 1961, no Estado do Ceará, Alencar e Cunha (1963) identificaram 670 cães infectados de um total de 35.272 cães examinados com sinais clínicos, ou seja, 1,9%. Enquanto que de um total de 285.592 cães examinados sem sinais clínicos, essa porcentagem foi de apenas 1,5%. A proporção de cães encontrada com infecções inaparentes neste estudo foi de 89%. Outros autores relatam uma proporção bem menor em seus inquéritos caninos com relação aos animais assintomáticos: 60% por Adler & Theodor (1935), 50% por Malamos (1947) e por Pozio et al. (1981), 63,2% por Marzochi et al. (1985) e 68% por Silva et al. (2001).

Geralmente, os casos avançados de LVC permitem um diagnóstico fácil da moléstia mas é falho nos casos latentes e nos casos iniciais (Giraud & Cabassu, 1933). Lanotte et al. (1979), em um estudo realizado em cães com infecção natural, no sudeste da França, sugeriram a existência de dois grupos de formas clínicas, patentes e latentes, estando esta última subdividida em formas pré-clínicas (cerca de 90%) e resolutivas (cerca de 10%). Diversos autores

relatam a dificuldade do estabelecimento do diagnóstico clínico, tendo em vista não somente a ausência de sintomas, quaisquer que eles sejam, mas também com relação à presença de sintomas comuns a outras moléstias (Alencar, 1959).

Cães com LVC apresentam usualmente pelo menos um dos principais sintomas: linfadenopatia geral ou localizada, lesões de pele, alopecia, emagrecimento, anemia, esplenomegalia, e crescimento anormal das unhas (Adler & Theodor, 1935; Malamos, 1947; Deane, 1956; Alencar, 1959; Alencar & Cunha, 1963; Millin et al., 1975; Abranches et al., 1991; Marzochi et al., 1985, 1994; Silva et al., 2001). Em alguns trabalhos publicados com ênfase na sintomatologia do cão com LVC (**Tabela 4**), podemos observar a freqüência de ocorrência desses sinais e uma análise mais detalhada destas características (Alencar, 1959; Lanotte, 1979; Marzochi, 1985; Abranches, 1991; Ciaramella, 1997).

TABELA 4- Retrospectiva comparativa de alguns estudos publicados da incidência relativa (%) dos principais sinais clínicos da LVC em cães sintomáticos e com exame parasitológico e/ou sorológico positivos.

| Sinais Clínicos e outras Condições | Alencar, 1959 | Lanotte, 1979 | Marzochi, 1985 | Abranches, 1991 | Ciaramella, 1997 |
|------------------------------------|---------------|---------------|----------------|-----------------|------------------|
| Linfadenopatia | no* | 45% | 85,7% | 65% | 88,7% |
| Emagrecimento | 35,9% | no | 100% | no | 32% |
| Unhas longas | 30,8% | 33% | 42,9% | 60,7% | 24% |
| Alopecia | 30,8% | 38% | 85,7% | 80% | 32% |
| Ulcerações | 51,2% | 22% | 42,9% | 34,4% | 40% |

*no= não observado.

Outro achado relativamente comum na LVC é a glomerulonefrite causada por imuno complexos. A progressiva insuficiência renal freqüentemente provoca a morte dos animais (Ferrer, 1999).

Outros sinais como lesão ocular, epistaxe, apatia e diarréia podem também ser observados mas com menor freqüência (Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999). Os sinais mostram invariavelmente uma lenta e progressiva com pouca ou nenhuma resposta a antibióticos ou glicocorticoides (Ferrer, 1999). Entretanto, com a difusão de métodos de diagnóstico mais específicos, formas

atípicas de LVC tem sido relatados, como dermatites localizadas, colites crônicas e desordens dos sistemas cardiovascular, respiratórios e músculo-esqueléticos (Blavier et al., 2001; Lamothe, 2002), tornando o diagnóstico clínico um grande desafio (Gradoni, 2002). Uma atrofia dos músculos facias pode também ocorrer em alguns casos (Ferrer, 1999).

Em cães com LVC, é comum a observação de anormalidades cutâneas. Diversos tipos de lesões tem sido descritas (Ferrer et al., 1988). O sinal mais freqüente é a alopecia com intensa descamação, usualmente tendo início na cabeça e se estendendo pelo resto do corpo. Essa perda de pelos tem sido explicada pela ação direta do parasito sobre o folículo piloso ou por um distúrbio do metabolismo do ácido pantotênico, decorrente de lesões hepáticas, ou ainda por deposição de imunocomplexos na pele, induzindo a um processo auto-imune que desencadearia a alopecia (Hommel, 1978).

Outros animais desenvolvem ulceração crônica localizada na cabeça e extremidades. Essas lesões podem estacionar por longo tempo (Leitão, 1953) e depois generalizar-se com rapidez (Alencar, 1959). As lesões, segundo Donatien & Letosquard (1936), se apresentam sob a forma de botões crostosos que proeminam e se estendem lateralmente. Muito menos freqüente, os animais apresentam dermatoses ou múltiplos nódulos cutâneos. Em um estudo de Koutinas et al. (1999), dos 158 cães estudados, 128 (81%) deles apresentavam envolvimento generalizado de pele (dermatite exfoliativa e ulcerações).

Outro sintoma clínico observado na maioria dos casos é a perda de peso e a falta de apetite (Laveran, 1917; Donatien & Lestoquard, 1935; Alencar, 1959; Marzoqui et al., 1985; Ferrer, 1999). Ocorre anemia do tipo normocrômico, que varia em grau de acordo com o estado geral do animal (Genaro, 1995). O emagrecimento é atribuído à infiltração parasitária que comprometeria toda a mucosa do aparelho digestivo (Catarsini, 1981), mas segundo Adler (1964), poderia ser explicado por um desequilíbrio protéico que levaria a importante albuminúria, podendo ser revertido pela ingestão de carne fresca. A perda de peso pode ser observada mesmo quando o apetite se conserva e, em certos

casos, esse apetite pode até aumentar podendo, inclusive, ser notado a bulimia (Alencar, 1959).

O alongamento anormal das unhas, é uma característica das mais marcantes nos cães infectados. Esse crescimento se faz muitas vezes de maneira tão exagerada que se tornam recurvas. Em alguns casos as unhas podem assumir forma de espiral, conhecida como “unha de faquir” (Leitão, 1953). A explicação para este crescimento anormal tem sido atribuído ao estímulo da matriz ungueal pelo próprio parasita (Donatien & Lestoquard, 1938; Genaro, 1995), embora já tenha sido observado leishmanias na matriz das unhas de cães em que não se notava hipertrofia destas (Donatien & Lestoquard, 1936). Existe também a possibilidade que a diminuição de movimentos resultante da apatia do animal doente, seja a principal responsável pelo não desgaste natural das unhas (Marzochi et al, 1985; Genaro, 1995). Em um estudo de Alencar (1959) com 39 cães, 12 deles (30,8%) apresentavam unhas longas. Segundo o autor, os cães sempre apresentam um certo crescimento desses fâneros, mas não tão exagerado como no calazar. Destaca ainda que a avaliação deste sinal, assim como dos outros relacionados à LVC, tem um componente pessoal do pesquisador muito grande.

Os exames parasitológicos através de microscopia, cultura ou inoculação em hamster de material biopsiado, proporcionam uma maneira inequívoca de detectar infecção, representando o tradicional teste padrão ouro (“gold standard”) para o diagnóstico da LV (Schnur & Jacobson, 1987; Reithinger & Davies, 1999; Gradoni, 2002). Entretanto, de acordo com vários estudos, a sensibilidade do exame microscópico é usualmente baixa (cerca de 60%), devido à baixa densidade de parasitas nas amostras (Ciaramella et al., 1997). Por outro lado, a sensibilidade da cultura é extremamente dependente de vários fatores: I) Tipo de meio de cultura; II) Proporção da quantidade de material semeado em relação ao número de recipientes de cultura utilizados; III) Número de amostras coletadas por cão (Gradoni, 2002).

Outro método de diagnóstico parasitológico com resultados satisfatórios em estudos epidemiológicos é o xenodiagnóstico. Consiste em um procedimento, desenvolvido por Brumpt (1914), que utiliza o vetor atuando como um meio de cultura biológico para a detecção de infecções parasitárias no homem ou em outros mamíferos (Schenone, 1999). Este método tem a grande vantagem de simular uma relação entre as espécies envolvidas em uma cadeia epidemiológica na natureza e verificar a real possibilidade de infecção parasitária. Na LVC, o xenodiagnóstico poderia ser utilizado para verificar o potencial reservatório no homem ou no cão. Embora o xenodiagnóstico não possa ser proposto como uma técnica de rotina no diagnóstico da LVC, ela tem sido utilizada para resolver importantes questões epidemiológicas sobre a clínica e tratamento (Gradoni et al., 1987; Molina et al., 1994; Alvar et al., 1994). O xenodiagnóstico direto requer que flebótomos alimentem-se de cães sedados. Recentemente, em uma tentativa de tornar este diagnóstico mais factível, uma técnica indireta usando flebótomos alimentando-se artificialmente em amostras de sangue periférico foi desenvolvida mas os resultados não foram animadores (Guarga et al., 2000). Ainda que o número de cães testados seja pequena, um aspecto comum relatado nestes estudos é a forte correlação positiva entre infectividade aos flebótomos e a resposta sorológica. Recentemente, este achado foi confirmado em um estudo longitudinal onde 40 cães expostos a transmissão natural na Amazônia e submetidos a xenodiagnóstico usando *Lu. longipalpis* (Courtenay et al., 2001). Nenhum cão foi infectivo antes da soroconversão, e os títulos de anticorpos provaram ser o melhor prognóstico de infectividade. Em outro estudo usando o xenodiagnóstico, uma avaliação foi feita da concordância entre a prevalência clínica, parasitológica e sorológica, *versus* a prevalência de infectividade em grupos de cães (Molina et al., 1994; Alvar et al., 1994). Foi observado uma concordância muito elevada quando comparado com os resultados da sorologia e da cultura, contudo, foi considerado baixa quando comparado com a prevalência clínica. A habilidade de infectar flebótomos foi similar nos cães assintomáticos e naqueles com diferentes graus da doença, embora tenha sido constatado que o número de flebótomos infectados aumenta com o aparecimento e severidade dos sintomas (Molina, 1997).

Devido à freqüente ausência de sinais clínicos em cães, e da dificuldade de detecção direta do parasita, tem se tornado essencial um diagnóstico rápido e preciso da infecção canina como parte do programa de controle (Mancianti et al., 1986). A detecção de anticorpos anti-Leishmania é o mais simples e mais utilizado método para determinar a prevalência da doença na população canina. Animais doentes desenvolvem principalmente uma resposta imune humoral produzindo altos níveis de anticorpos anti-Leishmania (Ferrer, 1999). Muitos testes sorológicos tem sido desenvolvidos ao longo do tempo. Dentre os métodos mais utilizados atualmente no diagnóstico do calazar canino estão a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA), empregados em larga escala em estudos epidemiológicos (Mancianti et al., 1995; Evans et al., 1990). Outros testes, como o teste de aglutinação direta (TAD), reação de fixação do complemento (RFC), Western Blot e as variações do ELISA (dot-ELISA, FAST-ELISA e rK39-ELISA), são também utilizados, porém, com menor freqüência (Gradoni, 1999).

Ao avaliar os resultados de testes sorológicos devemos ter em mente: I) A presença de anticorpos não significa ter a doença; II) Testes sorológicos não são 100% sensíveis. Alguns cães, especialmente em estágios iniciais, são soronegativos; III) Títulos anti-leishmania permanecem positivos por um longo período de tempo (meses), mesmo depois da cura clínica; IV) Métodos sorológicos (com exceção do Western Blot) não são adequados para medir a cura e para acompanhar cães tratados (Ferrer et al., 1995).

A sensibilidade e/ou especificidade de um teste sorológico com respeito à infecção pode variar consideravelmente, subestimando a prevalência e a incidência da infecção (Dye, 1996). Além disso, os testes sorológicos podem ser menos específicos devido à reações cruzadas com outras infecções, e com relação à escolha de um limite de detecção adequado (Dye et al., 1992). Diversos métodos sorológicos freqüentemente usados nos programas de controle tem sido descritos com sensibilidade variando de 78-100% e a especificidade variando de 80 a 98% (Harith et al., 1986; Reed et al., 1990; Neogy et al., 1992).

Ao utilizar um exame sorológico supõe-se que a maioria dos animais infectados desenvolvem uma resposta imunológica específica que pode ser detectada e que a soropositividade está correlacionada com a infectividade. Entretanto, a proporção de soroconversão entre animais com infecções clínicas e subclínicas é incerto (Ashford et al., 1995).

A RIFI é reconhecida como uma técnica de grande preferência no diagnóstico da LVC por ser de fácil execução e apresentar bons índices de sensibilidade e especificidade. A quantidade de trabalhos publicados no período de 1988-1999 revelam esta característica, que fizeram a RIFI ser classificada como “gold standard” em relação a outras técnicas sorológicas (Gradoni, 1999). Segundo o “Office International des Epizooties” (OIE, 2000) seus índices de sensibilidade e especificidade chegam a 96% e 98% respectivamente, superando o teste de ELISA. Contudo, resultados insatisfatórios também já foram observados. Em uma investigação de Slappendel (1988), 20% dos cães com parasitas confirmados foram soronegativos para a RIFI. Em um estudo com cães de guarda, Dye et al. (1993) sugerem que a sensibilidade máxima para a RIFI é de 80% e dura por um período curto de 2-3 meses após um longo período de incubação. Abranches et al. (1991) confirmaram infecção em somente 48,2% com títulos significativos e somente 16,7% em cães com títulos moderados. Lanotte et al. (1979) e Abranches et al. (1991) não encontraram correlação entre os títulos de anticorpos e a gravidade da doença. Juntos, esses achados sugerem que a sorologia pode não ser um bom indicador de infectividade (Ashford et al., 1995).

A RIFI pode ser considerada ineqüível se o estudo exigir o exame de um grande número de soros. Além disso, não existe consenso na diluição em que o soro pode ser considerado positivo, podendo acarretar sérios problemas no diagnóstico (Gradoni, 1999). Em títulos baixos, a reatividade cruzada é bastante elevada com outros tripanossomatídeos, o que dificulta sua utilização na rotina, já que no Brasil são comuns as áreas de superposição de endemias causadas por diferentes tripanossomatídeos (Genaro, 1995). A eficiência e praticidade da RIFI são outros pontos que vem sendo questionados ao longo dos anos, devido à sua impossibilidade de realização no campo e pelo grande espaço de tempo que há

da coleta até a obtenção dos resultados e eliminação dos cães infectados. Em um estudo realizado por Braga et al. (1998), duas áreas foram submetidas a dois tipos de controles. O diagnóstico em uma delas foi pela RIFI e na outra localidade, pelo ELISA. Constatou-se, após 10 meses, um decréscimo significativamente maior na prevalência da LV na área submetida ao controle pelo ELISA, justificado pela rapidez da execução do método até a eliminação do cão infectado.

A técnica de ELISA é considerada a mais adequada em inquéritos sorológicos de massa. Trata-se de uma técnica simples, rápida e tem sido adaptada para o diagnóstico de inúmeras doenças infecciosas, incluindo a LV (Jahn & Diesfeld, 1983). O ELISA pode ser usado no diagnóstico da LVC em substituição a RIFI com a mesma qualidade e com a vantagem do processamento simultâneo de várias amostras ao mesmo tempo (Rachamim et al., 1991). Em estudos de Harith et al. (1987) e Manciatini et al. (1995, 1996) tanto o ELISA como o dot-ELISA demonstraram uma sensibilidade e especificidade similar à RIFI. Manciatini et al. (1995) observou uma sensibilidade aumentada de 99,5% para o ELISA e uma especificidade semelhante ao RIFI, de 97%.

Ashford et al. (1993) compararam a sensibilidade e especificidade para a RIFI, ELISA e FAST-ELISA. Obteve, respectivamente, sensibilidade de 75%, 90% e 88% e especificidade de 93%, 85% e 90%.

O TAD para a detecção de anticorpo anti-Leishmania em cães é considerado ser altamente conveniente para utilização em larga escala e para o trabalho de campo. Harith et al. (1989) observaram uma sensibilidade de 100% e especificidade de 98,9%.

Técnicas mais sensíveis e sofisticadas, porém muito mais onerosas como a PCR ("polimerase chain reaction"), podem ser utilizadas para detectar positividade em cães infectados com excelentes resultados (Berrahal et al., 1996, Ashford et al., 1995).

1.4. O potencial reservatório do cão na leishmaniose visceral.

No Brasil, desde os estudos de Ferreira e Chagas (Ferreira et al., 1938; Chagas, 1940) ficou demonstrado o papel do cão como reservatório da LV. No Ceará, os primeiros achados de cães infectados foram feitos por Deane (Deane & Deane, 1954) na Região Norte do estado. Em seguida estes achados foram confirmados em outras áreas do Brasil, tais como: Pará (Senra et al., 1980) e Rio de Janeiro (Coutinho et al., 1985). O cão preenche todos os pré-requisitos de um perfeito reservatório (Bray, 1982): I) O cão e o homem vivem no mesmo ambiente e o vetor tem fácil acesso a ambos durante o ano inteiro. (Deane & Deane, 1954; Sherlock, 1969); II) As fêmeas de *Lu. longipalpis* tem no cão uma de suas fontes preferenciais de alimentação (Deane, 1956); III) Uma proporção grande de uma população de cães infectados nunca curam a infecção progredindo para morte até quatro anos depois (Alencar, 1959; Lannote et al., 1979); IV) Os cães que cronificam a infecção apresentam parasitas praticamente em todo tegumento e estes parasitas são facilmente captados pelo vetor durante o repasto sanguíneo (Deane & Deane, 1954; Vexenat et al., 1994).

Diversos trabalhos tem sido publicados com o objetivo de testar a importância do cão como reservatório através da principal medida de controle utilizada: a eliminação dos espécimes infectados. Segundo Lacerda (1994), o aumento do número de casos humanos de LV em um estudo realizado nos Estados do Ceará, Bahia, Maranhão e Piauí no ano de 1992, está relacionado com a diminuição da eliminação de cães pelo programa de controle. Seus resultados ressaltam a importância do controle canino na epidemiologia da doença humana. Braga et al. (1998) observaram um decréscimo significativo na soroprevalência canina quando os cães soropositivos são rapidamente diagnosticados (pelo ELISA) e eliminados da área de controle. Considera que a falha do programa de rotina da Fundação Nacional de Saúde (FNS) pode estar relacionada a longa permanência do cão infectado na área e a baixa sensibilidade do teste de rotina utilizado (RIFI). Magalhães et al. (1980) relataram o controle e erradicação da LV em área endêmica de Minas Gerais. Além da eliminação dos cães infectados foram adotados também como medida profilática o tratamento

dos casos humanos e a utilização de inseticida DDT ao redor das residências. Em um trabalho que revisou 60 estudos com dados sobre a eficácia dos métodos de controle aplicados no Brasil, Palatnik de Sousa et al. (2001) concluíram que, apesar da dificuldade e do alto custo, o monitoramento da saúde da população canina e a remoção dos infectados, reduziram a incidência da LV no Brasil e poderia ser mantido uma vez que o tratamento dos cães infectados é uma intervenção não realista, devido ao altíssimo custo e relativa ineficácia. Segundo Miles (1999), estudos com cães naturalmente ou experimentalmente infectados, demonstraram a eficiência do cão como potencial reservatório da infecção.

Observamos também na literatura, a existência de trabalhos que questionam, através de estudos experimentais, a real eficácia de eliminar cães infectados no controle da LV. Em um estudo realizado por Ashford et al. (1998), foi analisado o impacto do controle canino em duas localidades com características sócio-econômicas similares. Seus achados sugerem que a tentativa de remover cães soropositivos é insuficiente como medida de erradicação em cães. Contudo, a força de transmissão entre cão pode ser reduzida com programas deste tipo. Além disso, quando o número de casos humanos antes e depois do início da intervenção foi calculado, uma redução significante na incidência da doença foi observada entre crianças com menos de 15 anos. Os resultados desta intervenção sugerem que a eliminação da maioria dos cães soropositivos pode afetar temporariamente a incidência cumulativa de soroconversão em cães e pode também diminuir a incidência de casos humanos de LV. Cunha et al. (1995) em um inquérito sorológico realizado em humanos e em cães próximos a Salvador-BA, identificaram uma possível associação entre a infecção humana e a presença de cães dentro ou próximo às residências. Deane e Deane (1962) consideraram a abundância de *Lu. longipalpis* ser o fator mais importante na aquisição da doença humana. Em 1961, Alencar estudou a importância do controle do vetor com inseticidas em 2 comunidades. E concordando com os estudos de Deane & Deane sobre o papel da abundância do vetor, verificou que somente ocorria diminuição na incidência de casos de LV na comunidade onde o inseticida tinha sido empregado. Utilizando modelos matemáticos para comparar a efetividade dos vários métodos de controle da LV,

Dye (1996), concluiu que os inseticidas são os métodos de controle mais efetivos quando comparados com programas de eliminação de cães positivos e doentes. Tesh (1995), fez uma revisão dos métodos de controle recomendados para a LV e concluiu que eles são somente parcialmente efetivos. Segundo o autor, a endemicidade contínua da LV, seu aparecimento recente em áreas urbanas da América Latina e sua importância crescente como uma infecção oportunista entre pessoas infectadas com o HIV indicam que os métodos de controle atuais para a doença são ineficientes e novas estratégias de controle são necessárias. A prevenção da doença em cães parece ser o melhor caminho para interromper o ciclo doméstico da LV. O melhor caminho possível poderia ser uma vacina canina que protegeria os cães de desenvolver a parasitemia e de tornarem-se reservatórios peridoméstico do parasita.

Uma outra linha de investigação propõe qualificar o homem como hospedeiro significativo para a LV e está baseado no fato de que, apesar da eliminação dos cães infectados em áreas endêmicas, a incidência da doença humana continua a aumentar. Em uma investigação realizada por Dietze et al. (1997) objetivando avaliar o papel de cães infectados na aquisição de LV por humanos, três áreas isoladas foram estudadas. Em duas delas, os cães infectados foram eliminados enquanto na terceira (controle) os cães soropositivos foram mantidos vivos. Durante um período de 12 meses de estudo, as taxas de soropositividade aumentaram de 15 para 54% nas áreas onde houve a intervenção e de 14 para 54% na área controlada. Esses resultados mostraram não haver significância entre as taxas de soropositividade e a incidência de conversão sorológica em humanos e cães nas áreas estudadas.

1.4.1 O Xenodiagnóstico como ferramenta na determinação de infectividade humana e canina.

O xenodiagnóstico é uma técnica para a detecção e isolamento de um patógeno usando o seu vetor natural. Apesar de que os cães assintomáticos foram considerados de pouca importância epidemiológica (Dye, 1992) e possuírem pouca ou nenhuma capacidade de infectar vetores (Lanotte et al.,

1979; Travi et al., 2001), Molina et al. (1994) e Guarga et al. (2000) demonstraram que as taxas de infecção dos flebótomos não estão correlacionadas com as condições clínicas dos animais, ou seja, cães assintomáticos teriam a mesma capacidade infectiva que os cães oligossintomáticos e polissintomáticos. Estes dados reforçam a importância epidemiológica do período subclínico, durante o qual os animais infectados não exibem qualquer sintoma. Contudo, estes cães são capazes de infectar os vetores e estima-se que mais de 50% dos soropositivos identificados em inquéritos de campo são assintomáticos (Gradoni et al., 1980; Abranches et al., 1991; Campino et al., 1995; Sideris et al., 1999). Em cães infectados experimentalmente com leishmania, Oliveira et al. (1993) detectaram a ocorrência de anticorpos e parasitas em animais assintomáticos. Pinelli et al. (1994) e Campino et al. (2000) observaram que cães infectados experimentalmente podem não só serem assintomáticos mas também não possuir anticorpos contra o parasita. Isto reforça o fato da existência de cães sem anticorpos mensuráveis e, portanto, indetectáveis nos inquéritos soroepidemiológicos (Cabral et al., 1998).

Em um trabalho de infecção experimental utilizando fêmeas de *Lu. longipalpis* em xenodiagnóstico em cães, Deane & Deane (1955) observaram que 16 cães com exame parasitológico positivo para LV, 12 (75%) infectaram flebótomos e de um total de 238 flebótomos que se alimentaram nesses animais, 59 (24,8%) apresentaram leishmania. De um modo geral, o percentual de infecção de flebótomos foram mais elevados naqueles cães cuja pele estava mais intensamente parasitada; mas por outro lado, de 3 cães em cuja pele não foi encontrado leishmania, 2 infectaram flebótomos.

Tendo em vista que o programa de controle da LV no Brasil depende da eliminação de cães infectados, Costa et al. (2000) sugerem que a falha está relacionada à participação de outros hospedeiros reservatórios no ciclo de transmissão. Visando determinar se o homem infectado com *L. (L.) chagasi* poderiam infectar o inseto vetor, selecionou *Lu. longipalpis* obtidos em laboratório para alimentar-se em indivíduos com LV ativa, curados, assintomáticos (teste dérmico positivo) e em comunicantes de residências de indivíduos com LV ativa.

flebotomíneos. Esta informação poderia nos dar o melhor valor da carga infectiva de uma população canina em uma área endêmica (Gradoni, 1999).



1.5. Objetivos

Geral:

- * Investigar a capacidade de cães sorologicamente positivos para *L. (L.) chagasi* infectar flebotomíneos *Lu. Longipalpis*.

Específicos:

- * Medir a freqüência com que a *Lu. longipalpis* se infecta em cães com sorologia ELISA positiva para *L. (L.) chagasi*.
- * Identificar os sinais e sintomas que estão associados à infectividade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção dos cães:

Os cães incluídos neste estudo foram oriundos das localidades Telha (povoado), Telha (sítio), Santa Maria e Caramá, pertencentes ao município de Aquiraz (25km de distância da cidade de Fortaleza) e da localidade Gereraú, município de Itaitinga (45km de Fortaleza). Essas regiões são caracterizadas por apresentarem a ocorrência de focos de LVC em inquéritos epidemiológicos preliminares realizados pelo trabalho de rotina do Programa de Controle da Leishmaniose da Funasa (dados não publicados). Um total de 49 animais foram utilizados.

2.2 Os flebótomos

2.2.1. Captura das matrizes

As matrizes foram coletadas no sítio Raposa, localidade situada no pé da serra de Baturité-CE. No deslocamento da equipe de campo e transporte de material foi utilizada viatura pertencente à Funasa. O objetivo era a captura de espécimes de *Lutzomyia longipalpis*, vetor da *L. (L.) chagasi*.

Os flebótomos foram capturados através de iscas animais (burro, cavalo e jumento), sendo utilizado capturadores de Castro para a coleta manual destes insetos. Estas capturas foram realizadas no período noturno.

Após a captura, os flebótomos foram separados dos outros insetos em gaiolas de armação metálica (30x30x30cm) com tela em tecido. Em seguida foi oferecido um hamster anestesiado para repasto sangüíneo. As fêmeas ingurgitadas de sangue foram então separadas 24 horas depois para outra gaiola. Durante a permanência no campo, as gaiolas com flebótomos eram mantidas em caixas de isopor (80x60x40cm), sendo adicionado dentro da caixa bolsas com gel congelado, para se manter a temperatura mais baixa que a do ambiente, já que estes insetos não resistem à temperaturas mais altas (Forattini, 1973).

2.2.2. Colonização

Os flebótomos foram colonizados segundo o método Killick-Kendrick *et al.*, 1977 e Killick-Kendrick e Killick-Kendrick, 1991. Após as capturas e retorno para Fortaleza as fêmeas eram mantidas em gaiolas da forma já descrita em estufa incubadora tipo B.O.D (Fanem®) em temperatura de 23°C.

A temperatura de criação das larvas era de 25° C, para estimular o crescimento das mesmas, e os adultos à 23°C, para retardar o metabolismo e aumentar a sobrevida destes insetos. As larvas eram alimentadas com uma ração maturada, à base de ração de coelho e de fezes de coelho.

Somente a geração de flebotomíneos seguinte das capturadas no campo, com idade registrada, foram utilizada nos testes. Estas fêmeas de *Lu. longipalpis* deveriam ainda se encontrar no quarto dia após a emergência e não ter feito repasto sangüíneo em qualquer animal.

2.3. ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*

Objetivando determinar os cães que poderiam fazer parte do estudo, vários deles eram submetidos semanalmente a uma triagem pelo teste de ELISA para o imunodiagnóstico de calazar (Mohammed *et al.*, 1985, Badaró *et al.*, 1986b). Os testes foram realizados no laboratório de Parasitologia do Núcleo de Medicina Tropical Prof. Joaquim Alencar da Universidade Federal do Ceará, seguindo a técnica proposta por Evans *et al.* (1990). Os soros para utilização no teste foram obtidos através de centrifugação de 5 ml de sangue endovenoso retirado da pata anterior de cada cão.

As placas foram sensibilizadas com promastigotas de *L. (L.) chagasi*, 50 µl/poco, na concentração de 10⁶/ml, diluídas em tampão carbonato 0,05M, pH 9,6 por 12 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas por 2 horas com solução salina tamponada com fosfato/soro bovino fetal a 1,5% (PBS/SBF), lavadas três vezes com PBS/SBF e incubadas com 50 µl dos soros testes,

diluídos a 1:400 em PBS/SBF. Após uma hora de incubação a 37°C, as placas foram novamente lavadas três vezes com PBS/0,05% de Tween 20.

O anticorpo IgG anti-cão conjugado à peroxidase (Sigma Chemical Company) foi adicionado e as placas incubadas a 37°C por uma hora e lavadas posteriormente três vezes com PBS/0,05% de Tween 20.

Foi usado como substrato o 2,2 azino-di-3-etyl sulfonato de bentiazoline (ABTS) em tampão citrato-bicarbonato-peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada em leitor automático de ELISA a 405 nm (Emax, Molecular Devices). Controles positivos e negativos foram usados em cada ensaio. Os valores positivos foram aqueles maiores a 3 desvios padrões acima da média dos controles negativos.

2.4. Diagnóstico clínico

O exame clínico dos cães, realizado momentos antes do início do experimento de xenodiagnóstico, consideraram os seguintes aspectos: idade, sexo, raça, lesões externas, alopecia, adinamia, perda de peso e unhas de tamanho anormal.

2.5. Xenodiagnóstico

Foram constituídos dois grupos de estudo: um grupo constituído de 38 cães com ELISA positivo e um grupo com 11 cães, ELISA negativo. Ao longo do experimento, o grupo ELISA positivo sofreu algumas variações com relação a área do corpo exposta e ao número de flebótomos. Essas variações foram caracterizadas em 3 subgrupos ELISA positivo: 18 cães, onde foram utilizados 50 flebótomos fêmeas por cão e com exposição restrita somente à região da cabeça; 10 cães, utilização de 50 flebótomos fêmea e exposição de todo o corpo do animal; 10 cães, utilização de 100 flebótomos fêmea e exposição de todo o corpo do animal. Nos 11 cães ELISA negativo, utilizou-se 50 flebótomos fêmea e exposição restrita somente à região da cabeça. Flebótomos machos foram também utilizados para estimular o repasto (Peters & Killick-Kendrick, 1987). Os

cães do grupo ELISA negativo tinham a característica de pertencer à mesma casa ou no máximo à mesma quadra dos cães positivos.

As gaiolas para a exposição da cabeça do cão eram de armação metálica (40x40x40cm) com tela em tecido e para a exposição do corpo todo, foram utilizadas tendas armadas (1,80m de altura e 1,20m de largura e comprimento) com tela em tecido. A captura dos flebótomos no interior da tenda era feita utilizando capturador de Castro.

Os cães foram anestesiados via intramuscular através da utilização do anestésico Ketalar® (10mg/kg) associado a Rompum® (2mg/kg), sendo administrado 10 minutos antes, sulfato de atropina (0,05mg/kg). A dosagem dos anestésicos era administrada novamente após 50 minutos da primeira dose, a fim de prevenir que os cães despertassem durante o experimento. A duração de cada experimento de xenodiagnóstico foi de 1 hora e meia e tinha início às 18:00h.

2.6. Dissecção dos flebótomos

Ao término do experimento de xenodiagnóstico, os flebótomos foram acondicionados em gaiolas de armação metálica (30x30x30cm) com tela em tecido e mantidos em estufa B.O.D., com umidade (90%) e temperatura (23°C) controlados, sendo diariamente observado o número de flebótomos mortos.

Após o período de sete dias, os flebótomos fêmeas de *Lu. longipalpis* eram imobilizados e dissecados em uma gota de solução salina. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, o trato digestivo foi isolado utilizando agulhas de seringas de insulina. Em seguida uma lâmina foi montada e examinada em microscópio ótico com aumentos de 10X e 40X objetivando a observação de promastigotas de *L.(L.) chagasi*.

2.7. Análise estatística dos dados

Proporções foram comparadas através do Teste Exato de Fisher, porque praticamente todas as tabelas de contingências apresentavam células com

valor esperado menor que 5. A distribuição do número de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* infectadas segundo a presença/ausência de sinais ou sintomas, foram comparadas através do Teste não Paramétrico de Mann-Whitney. As proporções ou distribuições cujas comparações produziram probabilidades da hipótese nula ser verdadeira (Valor-p) iguais ou inferiores a 0,05 foram consideradas significativamente diferentes.

3 RESULTADOS

3.1. Infectividade para o *Lutzomyia longipalpis*

Inicialmente, avaliamos a infectividade dos cães segundo o resultado do exame sorológico (**Tabela 5**). De um total de 38 cães com sorologia positiva, 14 (36,84%) infectaram as fêmeas de *Lu. longipalpis*. Por outro lado, nenhum cão com sorologia negativa infectou os flebótomos. Esta diferença foi estatisticamente significativa.

TABELA 5- Infectividade para a *Lu. longipalpis* dos cães estudados, de acordo com o exame sorológico ELISA.

| Resultado do Exame Sorológico | Total | Cães Infectantes | | Valor- p |
|-------------------------------|-------|------------------|--------|----------|
| | | N | % | |
| Soropositivo | 38 | 14 | 36,84% | |
| Soronegativo | 11 | 0 | 0,00 | 0,021 |
| Total | 49 | 14 | 28,57 | — |

De um total de 713 cães examinados, 157 (22,02%) apresentaram positividade para a ELISA. Destes, 38 foram utilizados aleatoriamente para o exame de xenodiagnóstico e 14 foram infectivos a *Lu. longipalpis* (**Tabela 6**).

TABELA 6- Distribuição da amostra canina de acordo com a localidade

| Localidade | Cães Examinados | Cães ELISA positivo | Cães ELISA positivo utilizados no Xenodiagnóstico | Cães positivos no Xenodiagnóstico |
|----------------------|--------------------|------------------------|---|--------------------------------------|
| Gereraú | 84 | 28 | 25 | 7 |
| Telha Povoado | 164 | 45 | 6 | 2 |
| Telha Sítio | 97 | 18 | 3 | 3 |
| Camará | 170 | 25 | 2 | 0 |
| Sta. Maria | 198 | 41 | 2 | 2 |
| Total | 713 | 157 | 38 | 14 |

3.2. Dados clínicos e sua associação com infectividade em cães com sorologia positiva

Com o objetivo de identificar marcadores clínicos de infectividade do cão, medimos a associação entre sinais clínicos e a capacidade do cão com sorologia positiva de infectar ou não fêmeas de *Lu. longipalpis* (Tabela 7). Os cães que apresentavam emagrecimento, unhas grandes e idade inferior a 3 anos de idade, infectaram os flebótomos com uma freqüência significativamente mais elevada do que aqueles que não apresentavam estas características. No entanto, a presença de exulceração, alopecia, a ocorrência de adinamia e raça do cão, não estavam significativamente associados à capacidade do cão de infectar o vetor.

TABELA 7- Infectividade para a *Lu. longipalpis*, de cães portadores de anticorpos anti-*Leishmania*, de acordo com os sintomas clínicos e outras condições.

| Sinais Clínicos e outras Condições | | Total | Cães Infectantes | Valor- p |
|------------------------------------|--------------------|-------|------------------|--------------------|
| | | N | % | |
| Emagrecimento | Não | 17 | 3 | 17,65 |
| | Sim | 21 | 11 | 52,38 0,043 |
| Unhas Grandes | Não | 24 | 4 | 16,67 |
| | Sim | 14 | 10 | 71,43 0,001 |
| Exulceração | Não | 21 | 8 | 38,10 |
| | Sim | 17 | 6 | 35,29 1,000 |
| Adinamia | Não | 28 | 9 | 32,14 |
| | Sim | 10 | 5 | 50,00 0,449 |
| Alopecia | Não | 19 | 5 | 26,32 |
| | Sim | 19 | 9 | 47,37 0,313 |
| Idade | ≥ 3 anos | 11 | 1 | 9,09 |
| | < 3 anos | 27 | 13 | 48,15 0,030 |
| Mestiço | | 25 | 12 | 48,00 |
| Vira-lata | | 13 | 2 | 15,38 0,077 |

Novamente, com o objetivo de identificar marcadores clínicos de infectividade do cão, medimos a intensidade de infecção de fêmeas de *Lu. longipalpis*, segundo a ocorrência de sinais e sintomas de cães com sorologia positiva (**Tabela 8**). Os cães que apresentavam emagrecimento e unhas grandes infectaram um número significativamente maior de flebótomos que aqueles que não apresentavam os referidos sintomas. Da mesma forma, os cães mais velhos (idade ≥ 3 anos) e mestiços, também infectaram um maior número de flebótomos, embora estas diferenças não sejam significativas. Entretanto a ocorrência de exulceração, alopecia e adinamia não estavam associados a um maior número de flebótomos infectados.

TABELA 8- Distribuição do número de *Lu. longipalpis* infectadas em cães (N=38) portadores de anticorpos anti-*Leishmania*, de acordo com os sintomas clínicos e outras condições.

| Sinais Clínicos e Outras Condições | | Média | D.P. | Mediana | Valor- p |
|------------------------------------|---------------------------------|-------|-------|---------|--------------|
| Emagrecimento | Não | 2,29 | 6,01 | 0,00 | |
| | Sim | 12,19 | 15,40 | 5,71 | 0,020 |
| Unhas Grandes | Não | 4,18 | 10,79 | 0,00 | |
| | Sim | 13,91 | 14,49 | 10,04 | 0,002 |
| Exulceração | Não | 8,49 | 13,74 | 0,00 | |
| | Sim | 6,86 | 12,34 | 0,00 | 0,734 |
| Adinamia | Não | 6,27 | 11,22 | 0,00 | |
| | Sim | 11,93 | 17,01 | 2,94 | 0,292 |
| Alopecia | Não | 5,02 | 9,71 | 0,00 | |
| | Sim | 10,50 | 15,38 | 0,00 | 0,182 |
| Idade | ≥ 3 anos | 4,06 | 13,48 | 0,00 | |
| | < 3 anos | 9,27 | 12,73 | 0,00 | 0,055 |
| Mestiço | | 9,97 | 13,56 | 0,00 | |
| Vira-lata | | 3,51 | 11,07 | 0,00 | 0,054 |

Com o objetivo de identificar marcadores clínicos de positividade sorológica, medimos a associação entre sinais clínicos e o resultado da sorologia (**Tabela 9**). Observamos um percentual significativamente maior de cães soropositivos entre aqueles que apresentavam emagrecimento, unhas grandes e de raça mestiça. Por sua vez, a presença de exulceração e alopecia e a idade do cão não estavam associados à uma maior freqüência de soropositividade.

TABELA 9- Soropositividade de cães (N=38), de acordo com os sintomas clínicos e outras condições.

| Sinais Clínicos e outras Condições | | Total | Cães Soropositivos | | Valor- p |
|------------------------------------|--------------------|-------|--------------------|--------|--------------|
| | | | N | % | |
| Emagrecimento | Não | 27 | 17 | 62,96 | |
| | Sim | 22 | 21 | 95,45 | 0,013 |
| Unhas Grandes | Não | 35 | 24 | 68,57 | |
| | Sim | 14 | 14 | 100,00 | 0,021 |
| Exulceração | Não | 30 | 21 | 70,00 | |
| | Sim | 19 | 17 | 89,47 | 0,165 |
| Adinamia | Não | 38 | 28 | 73,68 | |
| | Sim | 11 | 10 | 90,91 | 0,415 |
| Alopecia | Não | 28 | 19 | 67,86 | |
| | Sim | 21 | 19 | 90,48 | 0,087 |
| Idade | ≥ 3 anos | 15 | 11 | 73,33 | |
| | < 3 anos | 34 | 27 | 79,41 | 0,716 |
| Mestiço | | 28 | 25 | 89,29 | |
| Vira-lata | | 21 | 13 | 61,90 | 0,037 |

Com o objetivo de identificar possíveis confundidores da relação entre sinais e sintomas clínicos e a capacidade infectiva do cão, calculamos a associação bruta e ajustada entre sinais/sintomas e a ocorrência de infecção de fêmeas de *Lu. longipalpis* (**Tabela 10**). Nesta análise, incluímos apenas os sinais/sintomas que apresentaram um valor $p > 0,25$ (ao teste de Wald) na análise univariada (não ajustada). Observamos que depois do ajustamento, todos os odds ratio, em proporções diferentes, sofreram uma redução e as variáveis emagrecimento, unhas grandes e idade continuam fortemente associados à ocorrência de infecção de flebótomos, embora nenhuma tenha apresentado significância estatística. É provável que o tamanho da amostra seja a causa de termos obtido uma significância estatística com odds ratio tão elevados (variando de 3,42 a 7,99). Estes resultados sugerem que emagrecimento, unhas grandes e idade são importantes determinantes da capacidade infectante ao *Lu. longipalpis*.

TABELA 10- Associação bruta e ajustada entre sinais clínicos e outras condições e infectividade para a *Lu. longipalpis*, de cães (N=38) portadores de anticorpos anti-*Leishmania*.

| Sinais Clínicos e Outras Condições | Odds Ratio Bruto | | Odds Ratio Ajustado | |
|---------------------------------------|------------------|------------|---------------------|------------|
| | Pontual | I.C. 95% | Pontual | I.C. 95% |
| Emagrecimento | 5,13 | 1,13-23,29 | 3,42 | 0,46-25,43 |
| Unhas Grandes | 12,5 | 2,57-60,69 | 7,99 | 0,97-65,37 |
| Alopecia | 2,52 | 0,64-9,83 | 0,92 | 0,11-7,60 |
| Idade \geq 3 anos | 9,28 | 1,03-82,95 | 6,90 | 0,57-82,84 |
| Raça | 0,19 | 0,03-1,07 | 0,47 | 0,04-4,85 |

Tecnicamente é mais fácil realizar um xenodiagnóstico expondo somente a cabeça do cão em vez do corpo todo, mas precisamos ter certeza que ambas as técnicas fornecem resultados semelhantes no que diz respeito à ocorrência de infecção dos flebótomos (**Tabela 11**). Quando expomos apenas a cabeça dos cães, obtivemos um percentual mais elevado de experimentos nos

De um total de 3747 insetos que se alimentaram, somente 26 adquiriram infecção de um total de 11 de 44 pessoas do grupo com LV ativa. Em um estudo mais recente, Costa et al. (2002) investigaram a capacidade de pessoas assintomáticas e com sorologia positiva infectarem o vetor. Neste estudo, a utilização da reação de PCR foi positiva para *L. (L.) chagasi* em 8 de um total de 108 pessoas que viviam com pacientes recém diagnosticados para a LV. Essas 8 pessoas apresentaram níveis baixos ou indetectáveis de anticorpos IgG para leishmania, o que, aparentemente, demonstra uma falta de sensibilidade da sorologia para infecções subclínicas. A possibilidade destas pessoas assintomáticas serem infectivas aos flebótomos representaria um reservatório importante na epidemiologia do calazar em áreas endêmicas.

Estudos anteriores indicam que cães com parasitismo cutâneo tornam-se infectantes ao inseto vetor na fase tardia da doença. Recentemente, estudos utilizando o xenodiagnóstico tem mostrado que essa transmissão pode ocorrer mais cedo. O animal infectado reage com uma grande produção de anticorpos e depressão de imunidade celular. Os anticorpos não são protetores e a resistência está relacionada com imunidade celular ativa. A presença de resposta Th1 em animais assintomáticos, às vezes sem resposta humoral, significa que a prevalência do calazar canino, encontrado em pesquisas epidemiológicas em busca de anticorpos, pode ser subestimado (Abranches et al., 1998)

Considerando que a condição para a manutenção do ciclo da doença o hospedeiro demonstre habilidade de transmissão para o vetor, cães considerados negativos em testes sorológicos, porém, com capacidade infectiva para flebótomos, estariam contribuindo para a continuidade do ciclo da doença. Por outro lado, cães sorologicamente positivos poderiam não apresentar essa capacidade, não representando risco, sendo, portanto, eliminados desnecessariamente.

A questão epidemiológica decisiva é saber se cães positivos para LVC pelas técnicas de diagnóstico tradicionais são também infectivos para

quais pelo menos uma fêmea de *Lu. longipalpis* havia se infectado, embora esta diferença não seja significativa (valor = 0,104).

TABELA 11- Infectividade para a *Lu. longipalpis*, de acordo com a área do corpo exposta aos flebótomos.

| Área do corpo exposta aos flebótomos | Total | Cães Infectantes | | Valor- p |
|--------------------------------------|-------|------------------|----|----------|
| | | N | % | |
| Somente a Cabeça | 18 | 9 | 50 | |
| Todo o Corpo | 20 | 5 | 25 | 0,104* |

* Teste exato de Fisher: Valor-p=0,104

4 DISCUSSÃO

A identificação dos elos da cadeia epidemiológica das doenças transmitidas por vetores é essencial para desenhar estratégias efetivas de controle. Mais do que isso, necessitamos conhecer a importância relativa de cada elo e de seu grau de susceptibilidade à possíveis intervenções. A respeito da LV, sabemos que existem dois padrões epidemiológicos básicos, uma antroponose e uma zoonose, de acordo com a presença ou ausência de reservatório animal. Na Índia o homem constitui o único reservatório, enquanto que na região do mar Mediterrâneo, Europa, África, China e América Latina, esse papel é, em geral, atribuído, principalmente ou unicamente, ao cão (Deane, 1956; Genaro, 1995).

No Brasil, o cão tem um papel importante como reservatório. Inúmeros estudos relatam o envolvimento destes animais em importantes áreas endêmicas através de inquéritos sorológicos de massa com o intuito de medir a prevalência da doença canina e posteriormente o impacto da eliminação daqueles soropositivos (Alencar, 1961; Magalhães et al., 1980; Nunes et al., 1991; Ashford et al., 1998). No entanto, alguns estudos não observaram uma relação entre cães infectados e a ocorrência de calazar entre humanos. No Espírito Santo, num estudo prospectivo a eliminação de cães infectados não preveniu a ocorrência da doença entre humanos (Dietze et al., 1997). Por outro lado, em Teresina, não foi observada uma proximidade geográfica entre a presença de cães infectados e a ocorrência de casos humanos de calazar (Costa et al., 1999). Outra corrente de opinião argumenta que o Programa de Controle do Calazar do Ministério da Saúde vem há anos seguidos eliminando cães infectados sem que se tenha conseguido um controle sustentável da antroponose (Costa et al., 1990).

A competência reservatória do cão na LV está diretamente relacionada com a acessibilidade dos flebótomos vetores às leishmanias no organismo do animal. Portanto, um resultado significativo de cães infectantes aos vetores revela um elevado parasitismo cutâneo. É reconhecido o intenso parasitismo da pele na LVC. Segundo Deane & Deane (1954), no início da infecção canina as leishmanias são numerosas nas vísceras do animal e raros na pele e que, com o

evoluir da doença estas vão invadindo a pele e podem ir escasseando nas vísceras a ponto de não serem mais encontradas em exames de esfregaços destas, ficando quase restritos à pele em alguns casos mais adiantados. Em um exame de esfregaços de pele, Deane & Deane (1956) observaram positividade em 38 de 49 cães examinados (77,6%), 5 de 27 doentes humanos (18,5%), e 3 de 4 raposas (75%). Este dado revela um parasitismo de pele da raposa praticamente igual ao da pele do cão. A pele do homem é pouco ou nada infectada. Mayrink et al. (1971) obtiveram resultado negativo em 23 pacientes. Estes resultados evidenciam o papel secundário do homem na transmissão da LV.

Em nosso estudo inicialmente documentamos um número significativo de cães com sorologia positiva com a capacidade de infectar flebótomos (36,84%), o que reforça o papel importante deste animal como hospedeiro reservatório da LV no Brasil. Esta proporção poderia ser ainda maior pois devemos considerar que os cães deste estudo não se encontravam na mesma fase da doença, caracterizando assim, uma amostra heterogênea com relação ao parasitismo cutâneo no animal. Outro fator que devemos observar é que o xenodiagnóstico, apesar de ser uma técnica de reconhecida especificidade, possui baixa sensibilidade por depender de fatores que vão do transporte até a dissecção dos insetos. É muito importante também ter em mente é que cão com sorologia positiva não representa cão doente e que o teste utilizado em nosso inquérito sorológico, assim como qualquer outro desta natureza, não possui sensibilidade absoluta. Portanto não podemos descartar a possibilidade de que possa existir eventualmente cães falso-positivo neste grupo teste.

Em um estudo para determinação da possível contribuição de cada reservatório na LV, Deane & Deane (1955) submeteram pacientes, cães infectados e uma raposa a um experimento de xenodiagnóstico com fêmeas de *Lu. longipalpis*. Quatro (28,5%) de 14 pacientes, 12 (75%) de 16 cães e a raposa, foram infectivos aos flebotomíneos. No que diz respeito a reservatórios, pode-se caracterizar o cão como o principal reservatório da LV. Entretanto, como demonstrou Deane & Deane (1955), é a raposa a que infecta mais os flebótomos.

Enquanto o cão infecta 24,8%, e o homem apenas 14,8%, a raposa infecta 100%. Podemos observar que a proporção de indivíduos infectantes foi muito maior entre os cães do que entre os pacientes humanos. Ao comparar estes dados de infectividade canina com os nossos, verificamos um número maior de cães infectantes. Esse número elevado pode ser explicado pelo fato de que todos os indivíduos infectados apresentavam positividade através de confirmação parasitológica pela observação do parasita em esfregaços de pele.

Nenhum cão com sorologia negativa para a ELISA conseguiu infectar flebótomos. Todos os 11 animais moravam no mesmo ambiente que aqueles com sorologia positiva. Este resultado pode estar relacionado à boa especificidade do teste sorológico ELISA. Entretanto devemos ter em mente que uma grande parcela de cães infectados também podem apresentar ausência de sinais clínicos (Alencar & Cunha, 1963).

Atualmente, a política adotada como medida de prevenção da LV pelos órgãos de saúde do governo do Brasil é a eliminação dos cães errantes e domésticos infectados. A população canina têm sido eliminada após o diagnóstico em larga escala, nas áreas endêmicas, através da técnica sorológica de Imunofluorescência. Entretanto, a partir da segunda metade da década de 1990 começaram a surgir questionamentos sobre a efetividade das medidas historicamente preconizadas pelo Ministério da Saúde, em particular a recomendação de sacrificar os cães soropositivos (Funasa/MS, [online] 2002b). Os estudos epidemiológicos que estão relacionados em medir o impacto do cão no ciclo da LV concluem, em sua maioria, que este animal é um elemento fundamental como reservatório da infecção por *L. (L.) chagasi*. Porém, deve-se ter em mente que a manutenção da dinâmica de transmissão da LV é complexa e possui outros elementos. A proporção de cães infectantes observadas em nosso estudo nos permite afirmar que este animal é um elemento importante na epidemiologia da LV.

O acesso do flebótomo ao cão e o posterior repasto sanguíneo, parece-nos estar relacionado com a concentração destes insetos por m³ na gaiola

(exposição cabeça) e na tenda (exposição corpo todo). O volume da tenda ($2,592\text{m}^3$) é 40,5 vezes maior que o volume da gaiola ($0,064\text{m}^3$). Apesar de não ter sido medido o número de flebótomos fêmeas ingurgitadas, a facilidade de acesso à fonte de alimentação pode ter influenciado a eficiência do repasto. Chama atenção também o fato de que foi na região da cabeça (orelhas), o local onde encontramos um maior número de exulcerações. As primeiras experiências de infecção com flebótomos em cães levaram a pensar que somente os animais com lesões cutâneas aparentes poderiam infectar os insetos (Parrot et al., 1930). Posteriormente, Adler & Theodor (1931) constataram que lesões ulcerosas, contaminadas por bactérias, constituem péssima fonte de infecção para os flebótomos e que estes se infectam em grande proporção, sugando a pele aparentemente sã ou as lesões não ulceradas. O intenso parasitismo da pele, mesmo em trechos aparentemente normais do cão é fato hoje comprovado na literatura.

Estudos sobre os fatores que contribuem para uma maior infectividade dos cães são poucos. Observamos em nosso estudo que cães com idade inferior a 3 anos de idade infectaram flebótomos com uma freqüência estatisticamente significativa. Dos 14 cães infectantes para a *Lu. longipalpis*, 13 eram cães com idade menor que 3 anos. Por outro lado, o cão infectante com idade superior a 3 anos conseguiu infectar um maior número de flebótomos, embora esta diferença não seja considerada estatisticamente significativa. França-Silva et al. (2003) verificaram em um estudo em Montes Claros, Minas Gerais, através de uma inquérito sorológico, que a prevalência de cães infectados pela *L. (L.) chagasi* é maior em cães mais velhos, apesar do maior número de animais jovens (< 3 anos) que fazia parte da população canina (75,4%). Uma possível interpretação para esta aparente discordância é que um exame sorológico positivo num hospedeiro mais idoso seja um marcador de uma infecção crônica e/ou de reinfecções, e que a probabilidade de um hospedeiro ter uma infecção crônica e/ou reinfecções é diretamente proporcional ao tempo de exposição na área endêmica(idade). Neste caso, se um cão portador de uma infecção crônica e/ou vítima de reinfecções é menos infectante para os flebótomos, somos

levados a concluir que uma infecção crônica e/ou reinfecções conferem aos cães uma menor competência como reservatório.

As características clínicas unhas grandes e emagrecimento mostraram ser as mais marcantes entre os cães deste estudo. Todos os 14 cães que apresentaram o sinal clínico unhas grandes eram soropositivos e de 22 que apresentaram emagrecimento, 21 eram soropositivos. Além disso, observamos que estes sinais também estão associados à infectividade e a um número maior de flebótomos infectados. A observação de sinais clínicos em cães associados à infecção sempre chamaram a atenção dos pesquisadores a fim de determinar um marcador. Por outro lado, outros sinais clássicos também descritos na literatura como exulceração, adinamia e alopecia não mostraram ser significativos neste estudo.

Raros foram os cães com sorologia negativa que apresentaram algum dos sinais clínicos já descritos anteriormente. Este dado consolida a importância dos sinais clínicos na determinação dos animais soropositivos.

Na prática, cães com sorologia positiva associada aos sinais clínicos unhas grandes e emagrecimento podem ser considerados as principais fontes de infecção aos flebótomos e devem receber uma atenção especial do programa de controle. Assim, podemos caracterizá-las como um excelente marcador, colaborando para a importância dessas características no diagnóstico clínico da LVC.

Os cães incluídos neste estudo representam uma amostra aleatória que podem ser generalizados para populações similares. Esta amostra é oriunda de uma população onde sistematicamente são realizados exames sorológicos visando a eliminação de cães soropositivos. Nesta área de estudo, esta sistemática de controle tinha sido realizada por 3 anos consecutivos.

5 CONCLUSÃO

* Existem evidências que um cão com uma sorologia positiva associada à emagrecimento, unhas grandes e idade igual ou inferior a 3 anos é o que apresenta a maior probabilidade de ser infectante para os flebótomos vetores.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, P.; CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G.M. Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. **Acta Med. Port.**, v. 11, n. 10, p. 871-875, 1998.
- ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.M.; SANTOS-GOMES, G.M.; JANZ, J.G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J. Parasitol.**, v. 77, p. 557-561, 1991.
- ADLER, S. Leishmania. In: **Advances in Parasitology**. New York: Academic Press, 1964. v. 2.
- ADLER, S. & THEODOR, O. Skin infection in canine visceral leishmaniasis. **Brit. Med. Journal**, v. 2, p. 1179, 1931
- ADLER, S. & THEODOR, O. Investigations on Mediterranean Kala-Azar. IX Feeding Experiments with *Phebotomus perniciosus* and other species on animals infected with *Leishmania infantum*. **Proc. R. Soc.**, v. 116, p. 516-542, 1935.
- ALENCAR, J.E. **Calazar canino: Contribuição para o estudo da epidemiologia do Calazar no Ceará**. 1959. 342 f. Tese de Livre Docência- Universidade Federal do Ceará-UFC, Fortaleza.
- ALENCAR, J.E. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 3, p. 175-180, 1961.
- ALENCAR, J.E.; ALMEIDA, Y.M.; SILVA Z.F.; FONSECA, M.F. Aspectos atuais do calazar no Ceará. **Rev. Bras. Malaria. Doenças Trop.**, v. 26/27, p. 27-53, 1974/75.
- ALENCAR, J.E.; CUNHA, R.V. Inquéritos sobre calazar canino no Ceará- novos resultados. **Rev. Bras. Malaria. Doenças Trop.**, v. 15, n. 3, p. 391-403, 1963.
- ALVAR, J.; MOLLINA, R.; SAN-ANDRÉS, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZÁLES, S.; SAN-ANDRÉS, M.D.; BOGGIO, J.;

RODRÍGUEZ, F.; SÁINZ, A.; ESCACENA, C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 88, p.371-378, 1994.

ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The Reemergence of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, p. 145-146, 1996.

ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK, I.; EULALIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER, R.H. JR, et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 3, p. 251-255, 1995.

ASHFORD, D.A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M.C.; SAMPAIO, D.P; BADARO, R. Studies on the control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 53-57, 1998.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M. New perspectives on a sub-clinical form of visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 154, p. 1003-11, 1986a.

BADARÓ, R.; REED, S.G.; BARRAL, A.; ORGE, G., JONES, T.C., Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in american visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. **Am. J. Med. Hyg.**, v. 35, n. 1, p. 72-8, 1986b.

BADARÓ, R. & DUARTE, M.I.S.. Leishmaniose Visceral (calazar) In: VERONESI, R., FOCCACIA, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 1234-1259.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUROUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 3, p. 273-277, 1996.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLLOT, I.; CHABANNE, L; CADORÉ, J.L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniasis. **Vet. Journal**, n.162. p. 108-120, 2001.

BRAGA, M.D.; COELHO, I.C.B.; POMPEU, M.M.L.; EVANS, T.G.; MACAULLIFE, I.T.; TEIXEIRA, M.J.; LIMA, J.W. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, n. 5, p. 419-424, 1998.

BRASIL, Fundação Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 5ed. Brasília, 2002.

BRAY, R.S. The zoonotic potential of reservoirs of leishmaniasis in the Old World. **Ecology of Disease**, v. 1, n. 4, p. 257-267, 1982.

BRUMPT, E. Le xenodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la trypanosomose de Chagas. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 7, p. 706-710, 1914.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.E.; GOMES, S.; SOUSA, J.C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 79, p. 213-220, 1998.

CAMPINO, L.; RIÇA-CAPELA, M.J.; MAURÍCIO, I.; OZENSOY, S.; ABRANCHES, P. O Kala-azar em Portugal. IX. A região do Algarve: inquérito epidemiológico sobre o reservatório canino no concelho de Loulé. **Rev. Port. Doenças Infec.**, v. 18, p. 189-194, 1995.

CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G.; RIÇA-CAPELA, M.J.; CORTES, S.; ABRANCHES, P. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 92, p. 269-275, 2000.

CATARSINI, O. Epidemiologia e manifestazione cliniche della leishmaniosi del cane. **R. Parasitol.**, n. 44, p. 83-87, 1981.

CHAGAS, AW. Criação de flebótomos e transmissão da leishmaniose visceral americana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 35, p. 327-333, 1940.

CHANCE, M.L. New developments in the chemotherapy of leishmaniasis **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 89, n. 1, p. 37-43, 1995

CHUNG, H. A resume of kala-azar work in China. **Chin. Med. Journal**, v. 71, p. 421-464, 1953.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Record**, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

CORREDOR, A.; GALLEGOS, J.F.; TESH, R.B.; MORALES, A.; FERRO DE CARRASQUILLA, C.; YOUNG, D.G.; KREUTZER, R.D.; BOSHELL, J. PALAU, M.T.; CACERES, E.; PELAEZ, D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 40, p. 480-486, 1989a.

CORREDOR, A.; GALLEGOS, J.F.; TESH, R.B.; PELAZ, D.; DIAZ, A.; MONTILLA, M.; PALAU, M.T. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, p. 195, 1989b.

COSTA, C.H.N.; PEREIRA, H.F.; ARAUJO, M.V. Epidemia de calazar no Estado do Piauí, Brasil. **Rev. Saúde Pub. S. Paulo**, v. 24, p. 361-372, 1990.

COSTA, C.H.N.; PEREIRA, H.F.; PEREIRA, F.C.; TAVARES, J.P.; ARAÚJO, M.V.; GONÇALVES, M.J. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 93, n. 5, p. 464, 1999.

COSTA, C.H.; GOMES, R.B.; SILVA, M.R.; GARCEZ, L.M.; RAMOS, P.K.; SANTOS, R.S.; SHAW, J.J.; DAVID, J.R. Competence of the Human Host as a Reservoir for *Leishmania chagasi*. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 3, p. 997-1000, 2000.

COSTA, C.H.; STEWART, J.M.; GOMES, R.B.; GARCEZ, L.M.; RAMOS, P.K.; BOZZA, M.; SATOSKAR, A.; DISSANAYAKE, S.; SANTOS, R.S.; SILVA, M.R.; SHAW, J.J.; DAVID, J.R.; MAGUIRE, J.H. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 4, p. 334-337, 2002.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1277p.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; DYE, C. Infection and infectiousness in a cohort of sentinel dogs naturally exposed to *Leishmania infantum*: implications

for control. In: PROCEEDINGS OF SECOND WORLD CONGRESS ON LEISHMANIOSIS, 2001, Hersonissos, Crete, Greece, 2001, p.39

COUTINHO, S.G.; NUNES, M.P.; MARZOCHI, M.C.A.; TRAMONTANO, N. A survey for american cutaneous and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human disease occur. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 1, p.17-22, 1985.

CUNHA, A.M. Infecções experimentais na leishmaniose visceral americana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n.33, p. 382-598, 1938.

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

DAVID, J.R.; STAMM, L.M.; BEZERRA, H.S.; SOUSA, R.N.; KILICK-KENDRICK, R.; LIMA J.W. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 839-847, 2001.

DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani* no Ceará. **O Hospital**, v. 45, p. 703-707, 1954.

DEANE, M.P. & DEANE, L.M. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em caso humano de Leishmania visceral. **O Hospital**, v. 46, n. 5, p. 113-115, 1954a

DEANE, M.P. & DEANE, L.M. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente parasitada pela *Leishmania donovani*. **O Hospital**, v. 46, p. 651-653, 1954b.

DEANE, L.M.. **Leishmaniose visceral no Brasil: Estudo sobre reservatório e transmissores realizados no estado do Ceará.** 1956. 162 f. Tese de Livre Docência- Fac. Med. Univ. São Paulo, Rio de Janeiro.

DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório de *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. **O Hospital**, v. 48, v. 1, p. 61-70, 1955.

DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 4, p. 198-212, 1962.

DE QUEIROZ, R.G. **Phlebotomine sand flies of a leishmaniasis focus in Baturité, Brazil.** 1995. Docttoral thesis- Imperial College of Science, Technology and Medicine. London.

DESJEUX, P. Urbanisation of the leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE SECOND INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2002, Sevilla, Spain. **Canine Leishmaniasis: moving towards a solution.** Intervet International , 2002. p. 49-55.

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 1240-1242, 1997.

DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F. Notes sur la leishmaniose viscerale canine. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 28, p.426-431, 1935.

DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F. Leismanoses animales. Pathogenie. Pathologie. Traitment. **Extr. Revue Path. Comparée et d'Hygiène Générale**, n. 472, 1936.

DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F. Evolution of general leishmaniasis in dog. **Arch. Inst. Pasteur d'Algérie**, v. 16, p. 191-192, 1938.

DYE, C. Leishmaniasis epidemiology: the theory catthes up. **Parasitology**, v. 104, p. s7-s18, 1992

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control.. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 2, 125-130, 1996.

DYE, C.; KILLICK-KENDRICK, R.; VITUTIA, M.M.; WALTON, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; HARITH, A.E.; GUY, M.W.; CANAVATE, M.C.; HASIBEDER, G. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. **Parasitology**, v. 105, p. 35-41, 1992.

DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: detecting infection as well as disease. **Epidemiol. Infect.**, v. 110, p. 647-656, 1993.

EVANS, T.G.; VASCONCELOS, I.A.; LIMA, J.W.; TEIXEIRA, J.M.; MCAULLIFE, I.T.; LOPES, U.G.; PEARSON, R.D.; VASCONCELOS, A.W. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 42, n. 2, p. 118-123, 1990.

FERREIRA, L.C.; DEANE, L.; MANGABEIRA FILHO, O. Infecção do *Phlebotomus longipalpis* pela *Leishmania chagasi*. **O Hospital**, v. 14, p. 2, 1938.

FERRER, L.M.; RABANAL, R.; FONDEVILLA, D.; RAMOS, J.A.; DOMINGO, M. Skin lesions in canine leishmaniasis. **J. of Small Animal Practice**, v. 29, p. 381-388, 1988.

FERRER, L.; AISA, M.J.; ROURA, X.; PORTUS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Vet. Record**, v. 136, p. 514-516, 1995.

FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Spain. **Canine Leishmaniasis: an update**. Hoechst Roussel Vet., 1999. p. 06-10.

FORATTINI, O.P. **Entomologia médica**. São Paulo: Edgard Blucher, 1973. v. 4, p. 1-658

FRANÇA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO-COELHO, G.L.; DA COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 111, n. 2-3, p. 161-173, 2003.

FRANKE, C.R.; ZILLER, M.; STAUBACH, C. Impact of the El Niño/ Southern oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v. 8, n. 9, p. 914-917, 2002.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE/ MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**, ed. especial, ano III, 1999. Disponível na Internet via [WWW.URL:\[http://www.funasa.gov.br/pub/pdfs/boletim_epi_edicao_especial.pdf\]\(http://www.funasa.gov.br/pub/pdfs/boletim_epi_edicao_especial.pdf\)](http://www.funasa.gov.br/pub/pdfs/boletim_epi_edicao_especial.pdf). Acesso em 20 de março de 2003.

FUNDACÃO NACIONAL DE SAÚDE/ MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, nº 2, ano II, 2002a. Disponível na Internet via WWW.URL:http://www.funasa.gov.br/pub/boletim_eletronico_epi/boletim_eletronico_epi_0202.pdf . Acesso em 20 de março de 2003.

FUNDACÃO NACIONAL DE SAÚDE/ MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, nº 6, ano II, 2002b. Disponível na Internet via WWW.URL:http://www.funasa.gov.br/pub/boletim_eletronico_epi/boletim_eletronico_epi_0602.pdf . Acesso em 20 de março de 2003.

GENARO, O. Leishmaniose Visceral. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 9^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1995. p. 64-81.

GIRAUD, P. & CABASSU, H. Sur la valeur des procedés du laboratoire pour le diagnostic de la leishmaniose canine naturelle. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 50, n. 4, p. 539-549, 1933.

GRADONI, L. Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Spain. **Canine Leishmaniasis: an update**. Hoechst Roussel Vet., 1999. p. 32-39.

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE SECOND INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2002, Sevilla, Spain. **Canine Leishmaniasis: moving towards a solution**. Intervet International , 2002. p. 7-14.

GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis on the island of Elba, Italy. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 568-571, 1988.

GRADONI, L.; MAROLI, M.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. **Med. & Vet. Entomol.**, v. 1, p. 339-342, 1987.

GRADONI, L.; POZIO, E.; BETTINI, S.; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). III. The prevalence of canine Leishmaniasis in two foci of Grosseto Province. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, p. 421-422, 1980.

GUARGA, J.L.; LUCIENTES, J.; PERIBÁÑEZ, M.A.; MOLINA, R.; GRACIA, M.J.; CASTILLO, J.A. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. **Acta Tropica**, v. 77, p. 203-207, 2000.

HARITH, A.E.; KOLK, A.H.; KAGER, P.A.; LEEUWENBURG, J.; FABER, F.J.; MUIGAI, R.; KIUGU, S.; LAARMAN, J.J. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniosis: comparasion with IFA and ELISA. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 4, p. 601-603, 1987.

HARITH, A.E.; KOLK, A.H.; KAGER, P.A.; LEEUWENBURG, J.; MUIGAI, R.; KIUGU, S.; LAARMAN, J.J. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 4, p. 583-587, 1986.

HARITH, A.E.; SLAPPENDEL, R.J.; REITER, I.; VAN KNAOPEN, F.; KORTE, P.D.; HUIGEN, E.; KOLK, A.H.J. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, n. 10, p. 2252-2257, 1989.

JAHN, A. & DIESFELD. H.J. Evaluation of a visually read ELISA for serodiagnosis and seroepidemiological studies of kala-azar in the Baringo District, Kenya. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p. 451-454, 1983.

JERONIMO, S.M.B.; OLIVEIRA, R.M.; MACKAY, S.; COSTA, R.M.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E.T.; LUZ, K.G.; FERNANDEZ, M.Z.; JERNIGAN, J.; PEARSON, R.D. An outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, p. 386-388, 1994.

HOMMEL, M. The genus leishmania. Biology of the parasite and clinical aspects. **Bull. Inst. Pasteur, Paris**, n. 75, p. 5-102, 1978

KILLICK-KENDRICK, R., *et al.* The establishment, manentance, and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **J. Med. Entomol.**, v. 13, p. 429-440, 1977.

KILLICK-KENDRICK, R. Phebotomine vectors of the leishmaniasis: A review. **Med. & Vet. Entomol.**, v.4, p.1-24, 1990.

KILICK-KENDRICK, R. & KILICK-KENDRICK, M. The initial establishment of sandfly colonies. **Parasitologia**, v. 33, n. 1, p. 315-320, 1991.

KILICK-KENDRICK, R.; KILICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M.P.; CADIERGUES, M.C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethin collars for control of canine leishmaniasis. **Med. & Vet. Entomol.**, v. 11, p. 105-11, 1997.

KILICK-KENDRICK, R.; KILICK-KENDRICK, M.; PINELLI, E.; DEL REAL G.; MOLINA, R.; VITUTIA, M.M.; CANAVATE, M.C.; NIETO, J.A. laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies **Parasite**, v. 1, n. 4, p. 311-318, 1994.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K.G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniosis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **J. Am. Animal Hosp. Assoc.**, v. 35, n.5, p. 376-383, 1999.

LACERDA, M.M. The Brazilian leishmaniasis control program. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 489-495, 1994.

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

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; RYAN, L.; RIBEIRO, R.S.M.; SILVEIRA, F.T. Leismaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon region and further observations on the role of *Lu. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 223-226.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; FRAIHA, H. Leishmaniasis in Brazil. XIX: Visceral leishmaniasis in the Amazon region, and the presence of *Lu. longipalpis* on the island of Marajó, Pará State. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p. 323-330,

LAMOTHE, J. La leishmaniose canine: limites diagnostiques de la sérologie à partir de deux cas cliniques. **Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, n. 37, p. 55-59, 2002.

LANOTTE, G.; RIOUX, J.Á.; PERIERES, J.; VOLLMARDT, Y. Ecologie des leishmanioses das le sud de la France, 10. Le formes evolutives de la leishmaniasis viscerale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidemiologique. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** v. 54, n. 3, p. 277-295. 1979.

LAVERAN, A. **Leishmaniosis.** Kala-azar, Bouton d'Orient, leishmaniose Américane. Paris: Masson et Cie. 521p.

LEITÃO, J.L.S. Leishmaniose canina em Lisboa e arredores. **Arq. Patolog.** v. 25, 1953.

LESTOQUARD, F. & DONATIEN, A. Parasitisme de la matrice unguéale dans la leishmaniose générale du chien. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, n. 31, p. 483-487, 1938.

MAGALHAES P.A.; MAYRINK W.; DA COSTA C.A.; MELO M.N.; DIAS M.; BATISTA S.M.; MICHALICK M.S.; WILLIAMS P. Kala-azar in the Rio Doce, Minas Gerais area. Results of prophylactic measures. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 22, n. 4, p. 197-202, 1980.

MALAMOS, B. Leishmaniasis in Greece. **Trop. Dis. Bull.**, v. 44, p. 1-7, 1947.

MANCIANTI, F.; FALCONE, M.L.; GIANNELLI, C.; POLI, A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescent for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 59, n. 1, p. 13-21, 1995.

MANCIANTI, F.; GRADONI, L.; GRAMIERI, S.; MARCONCINI, A. Canine leishmaniasis in the Isle of Elba. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 37, n. 2, p. 110-112, 1986.

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot-enzyme-linked immusorbent assay (Dot-ELISA) for the diagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Vet. Parasitol.**, v. 65, p. 1-9, 1996.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SABROZA, P.C.; SOUSA, M.A.; SOUSA, P.P.; TOLEDO, L.M.; RANGEL FILHO, F.B. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro- Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, v. 1, n. 4, p. 432-446, 1985.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; CARVALHO, R.W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, v. 10, n. 1, p. 37-40, 1994.

MAYRINK, W.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; TAFURI, W.L.; PEIXOTO, V.P.C.; SILVA, A.R.; REIS, A.B.; WILLIAMS, P.; COSTA, C.A. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against Leishmania chagasi infection in dogs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 695-697, 1996.

MAYRINK, W.; MAGALHAES, P.A.; BATISTA, S.M.; DA COSTA, C.A. Diagnosis of kala-azar. II. Study of Montenegro's test and detection of Leishmania in skin material from patients with kala-azar, before and after antimony treatment. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 13, n. 4, p. 268-271, 1971

MENDES, W.S.; TROVÃO J.R.; SILVA, A.A. The dynamics of territorial occupation and visceral leismaniasis in the city of São Luis, Maranhão state, Brazil. **Cad. Saúde Públ.**, v. 16, n. 3, p. 872, 2000.

MENDES, W.S.; SILVA, A.A.; TROVÃO, J.R.; SILVA, A.R.; COSTA, J.M.L. Space expansion of the American visceral leishmaniasis in São Luís, Maranhão, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 3, p. 227-231, 2002.

MILES, M.A.; VEXENAT, J.A.; FURTADO CAMPOS, J. H.; FONSECA DE CASTRO, J.A. Canine Leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Spain. **Canine Leishmaniasis: an update**. Hoechst Roussel Vet., 1999. p. 46-53.

MILLIN, J.; FINE, J.M.; GRONLADE, J.; GRONLADE, P. Leishmaniose et dysglobulinémie chez un chien. **Rev. Med. Veterinary.**, v. 126, p. 1655-1664, 1975.

MOHAMMED, EI A. EI R.; WRIGHT, E.P.; KAGER, P.A.; LAARMAN, J.J.; PONDMAN, K.W. ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of kala-azar. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 344-50, 1985.

MOLINA, R. Dogs infectivity and control. In: IZSS/MZCC/WHO WORKSHOP ON NEW TRENDS IN LEISHMANIASIS EPIDEMIOLOGY AND CONTROL IN THE MEDITERRANEAN AREA, 1997, Palermo, Italy. 1997, p. 11-13.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRÉS, M.; GONZÁLES, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, p. 491-493, 1994.

MOMEM, H. II National Meeting on Strategic Research in Leishmaniasis: Belo Horizonte, MG, Brazil, September 18-22 **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 775-776, 1995.

MORRISON, A.C.; FERRO, C.; TESH, R.B. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of american visceral leishmaniasis in Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 49, n. 1, p. 68-75, 1993.

NEOGY, A.B.; VOULDOCHES, I.; SILVA, O.A.; TSELENTS, Y.; LASCOMBE, J.C.; SEGALEN, T.; RZEPKA, D.; MONJOUR, L. Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, p. 772-777, 1992.

NUNES, M.P.; JACKSON, J.M.; CARVALHO, R.W.; FURTADO, N.J.; COUTINHO, S.G. Serological survey for canine cutaneous and visceral leishmaniasis in areas at risk of transmission in Rio de Janeiro where prophylactic measures had been adopted. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 4, p. 411-417, 1991.

OIE. Leishmaniosis. **Manual of Standards for Diagnostics Tests and Vaccines**, 4th edition, Paris: Office International des Epizooties, 2000, p. 803-812.

OLIVEIRA, G.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 243-248, 1993.

OMS- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comite de Expertos en las Leishmaniasis. Série de Informe técnicos, 701. Geneva, 1984.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; dos SANTOS, W.R.; FRANCA-SILVA, J.C.; da COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.

PARROT, L.; DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Sur le development du parasite de la leishmaniose canine viscérale chez *Phlebotomus major* var. *perniciosus* Newstead. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 23, p. 724-726, 1930.

PESSOA, S.B. & MARTINS, A V. **Parasitologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

PETERS, W. & KILICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**, vol I e II, New York: Academic Press, Inc., 1987

PINELLI, E.; KILICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNARDINA, W.; REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infec. Immun.**, v. 62, p. 229-235, 1994.

POZIO, E.; GRADONI, L.; BETTINI, S.; GRAMICIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). **Acta Tropica**, v. 38, p. 383-393, 1981.

RACHAMIM, N.; JAFFE, C.L.; ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.; SCHUR, L.F.; JACOBSON, R.L. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 85, n. 5, p. 503-508, 1991.

REED, S.G.; SCHRAFFLER, W.G.; BURNS, J.M.; Jr. SCOTT, J.M.; ORGE, M.G.; GHALIB, H.W.; SIDDIG, M.; BADARÓ, R. An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 43, p. 632-639, 1990.

REITHINGER, R. & DAVIES, C.R. 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.**, v. 61, n. 4, p. 530-541, 1999.

SCHENONE, H. Xenodiagnosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 289-294, 1999.

SCHNUR, L.F.; JACOBSON, R.L. Appendix III. Parasitological techniques. In PETERS, W. & KILICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. New York: Academic Press, 1987. Vol. 1, p. 499-542.

SENRA, M.S.; PIMENTEL, P.S.R; SOUZA, P.E.F.P. Leishmaniose visceral em Santarém/PA: aspectos gerais de controle, inquérito sorológico em cães e tratamento de casos humanos. **Rev. Bras. Malariol.**, v. 17, p. 47-59, 1985.

SHERLOCK, I.A. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. II: Observações sobre leishmaniose canina. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, v. 21, n. 3, p. 535-39, 1969.

SIDERIS, V.; PAPADOPOULOU, G.; DOTSIKA, E.; KARAGOUNI, E. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 15, n. 3, p. 271-276, 1999.

SILVA, A.R.; VIANA, G.M.; VARONIL, C.; PIRES, B.; NASCIMENTO, M.D.S.; COSTA, J.M.L. Visceral leishmaniasis on the island of São Luís, Maranhão, Brazil: evolution and perspectives. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, n. 5, p. 359-368, 1997.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis: A review based on 95 cases in the Netherlands. **Vet. Quarterly**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 1988.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, n. 3, p. 287-292, 1995.

TRAVI, B.L.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONÇALVES, A.; VELEZ, I.D. *Didelphis marsupialis*, na important reservoir host of *Trypanossoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, n. 5, p. 557-565, 1994.

TRAVI, B.L.; TABARES, C.J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 64, n. 3-4, p. 119-124, 2001.

VEXENAT, J.B.; FONSECA DE CASTRO, J.A.; CAVALCANTE R.; TAVARES J.P.; SILVA M.R.B.; BATISTA W.H.; CAMPOS J.H.F.; HOWARD M.K.; FRAME I.; MCNERNEY R.; WILSON S.; MILES M.A. Visceral leishmaniasis in Terezina, State of Piaui, Brazil: Preliminary observations on the detection and

transmissibility of canine and sandfly infections. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.89 n. 2, p. 131-135, 1994.

VIEIRA, J.B.; COELHO, E.G. Visceral leishmaniasis or kala-azar: the epidemiological and control aspects. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, n. 2, p. 85-92, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee. **Technical Report Series** 793. Geneva, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. 14th Programme Report. UNDP/World Bank/Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). **Tropical Disease Research Progress 1997-1998**. Geneva, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization. Division of Control of Tropical Diseases [online]. Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisdis1.html>. Acesso em 23 de outubro de 2001.

YOUNG, D.G. & DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in México, the west Indies, Central and south America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**. Gainesville: Associated Publishers, , n. 54, 1994.