

HÉLID RAQUEL LAUTENSCHLAEGER RODRIGUES DE
LUCCA

Epidemiologia e controle da leishmaniose visceral
americana no estado de São Paulo, Brasil. Análise
crítica, e diagnóstico diferencial na leishmaniose visceral
canina no município de Espírito Santo do Pinhal, 2010 -
2014.

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da
Coordenadoria de Controle de Doenças
da Secretaria de Estado da Saúde de
São Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo
Tolezano

SÃO PAULO

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Lucca, Héliid Raquel Lautenschlaeger Rodrigues de.

Epidemiologia e controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo, Brasil: análise crítica e diagnóstico diferencial na leishmaniose visceral canina no município de Espírito Santo do Pinhal, 2010-2014 / Héliid Raquel Lautenschlaeger Rodrigues de Lucca. – 2015.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2015.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dr. José Eduardo Tolezano.

Co-orientação: Prof. Dra. Rita Maria da Silva.

1. Leishmaniose Visceral/epidemiologia 2. Leishmaniose Visceral/prevenção&controle. 3. Leishmaniose Visceral/diagnóstico. 4. Saúde Pública

SES/CCD/CD-323/2015

DEDICATÓRIA

A Deus, Senhor da minha vida e Dono dos meus dias, sem quem não seria possível viver com plenitude cada momento da minha existência.

Aos meus pais Carlos Alberto e Edemarini Eliza por sempre me apoiarem e incentivarem, sendo peças fundamentais para a realização de mais esta etapa.

Aos meus irmãos, Leonardo Calebe e Guilherme Davi, companheiros de toda jornada e nesta etapa em especial.

Ao meu sobrinho Isaac que muito colaborou com momentos de descontração em meio aos momentos de tensão e seriedade.

A minha avó Neide Teixeira De Lucca, sempre amorosa e cuidadosa. Incentivadora e torcedora presente em todo momento.

A minha avó Eclair Lautenschlaeger (*in memoria*) grande amiga e companheira, cuja presença e incentivo esteve mais uma vez presente no início desta jornada.

A toda minha família paterna e materna, que sempre estão prontos a ajudar, incentivar e caminhar junto no que for preciso. Presentes nas batalhas e também nas conquistas.

Amo vocês...

AGRADECIMENTO

A Deus provedor de todas as coisas!

Aos meus pais e irmãos que não mediram esforços para me apoiar. Colaborando em todo momento para concretização desta etapa.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Eduardo Tolezano, obrigada por toda contribuição, por encaixar um tempo de sua rotina para me orientar e compartilhar comigo parte de seu conhecimento.

A minha co-orientadora Prof. Dra. Rita Maria da Silva, obrigada por toda contribuição, orientação e por sua amizade.

A Dra. Vânia Lucia Pessoa Fiorio, diretora do laboratório regional de Rio Claro do Instituto Adolfo Lutz, sempre solicita em colaborar no que estivesse ao seu alcance.

Aos funcionários do Instituto Adolfo Lutz regional de Rio Claro que apoiaram e se tornarão além de colegas de trabalho, amigos!

A bióloga Jennifer Fernanda Jacobucy, a pesquisadora Silvia Regina Baraldi, a biomédica Jane Ap. Batista Scopinho, a auxiliar de laboratório Fátima Tozini da seção de parasitologia do IAL Rio Claro pela colaboração.

A amiga e colega de pós-graduação Letícia Mariele Feliciano, pelo companheirismo e amizade em mais essa etapa.

Aos funcionários do Instituto Adolfo Lutz central de São Paulo que sempre me acolheram muito bem.

Ao Dr. Roberto Hiramotto, Dra. Helena Taniguchi, ao Veterinário José Eduardo Raeffray Barbosa, a Veterinária Juliana Guerra, ao Técnico José Carlos Elias, técnica Elaine Cunha, técnica Elaine Oliveira, técnica Cristina

Carvalho, da seção de parasitoses sistêmicas do IAL Central por toda colaboração em campo e laboratório.

As pesquisadoras Vera Lúcia Chioccola e Cristina Meira, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pela colaboração com as técnicas moleculares

A Rosana Cantini Tolezano e Eleane La Rosa Garcia pelas conversas e recepções, todas as vezes em que fui as reuniões com meu orientador no Instituto Adolfo Lutz Central.

A equipe do CCZ de Espírito Santo do Pinhal pela colaboração, em nome dos funcionários Hidalgo Souza e Veterinária Tatiane Silva.

A Ana Lucia Navarro diretora da XXVI GVE de São João da Boa Vista – SP e ao Veterinário Francisco Conrado Uchoa da SUCEN regional de Mogi-Guaçu – SP.

Ao Dr. Osias Rangel da SUCEN regional de Campinas – SP, pela colaboração estatística e discussões.

A Profa. Dra. Vania da Matta pela dedicação e discussões que tanto contribuíram para conclusão deste estudo, muito obrigada!

Ao laboratório CEDvet de Rio Claro por ceder os soros que formaram o grupo controle negativo.

A Profa. Dra. Solange Gennari e Dr. Herbert Soares Souza, aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação, ambos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZUSP); ao Prof.Dr. Marcelo Bahia Labruna e Jonas Moraes Filho, aluno de Pós-doutorado do Programa de Pós-Graduação, ambos da FMVZUSP; A Dra. Simone Baldini Lucheis, pesquisadora científica da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), por cederem soros de cães infectados por diferentes patógenos.

A amiga Maria Alice da Silva que muitas vezes cedeu um lugar em sua casa para minha estadia.

Não poderia deixar de agradecer também aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva, Prof. Dr. Osias Rangel e Profa. Dra. Rita Maria da Silva pelas colaborações.

Ao Programa de Pós-Graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo.

A agência de fomento CAPES que viabilizou esse estudo.

“Todo o progresso é precário, e a
solução para um problema coloca-
nos diante de outro problema”

(Martín Luther King)

Este estudo teve apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é um grave problema de saúde pública presente em 65 países acometendo cerca de meio milhão de pessoas. É uma doença que pode levar a morte. No Brasil é endêmica em 21 dos 27 estados com cerca de 3 mil novos casos/ano. Uma das medidas adotadas pelo programa de controle brasileiro é o diagnóstico e eutanásia dos cães soropositivos, por serem esses importantes reservatórios do parasito causador da LV. Para a OMS essa medida deve ser adaptada com a realidade de cada local. No Brasil, o diagnóstico canino tem por base a utilização de testes sorológicos, sendo importante o emprego de testes sensíveis, específicos, de custo acessível e fácil exequibilidade, considerando seu emprego em saúde pública e também as medidas adotadas em relação ao reservatório. Até 2011, o Ministério da Saúde preconizava o emprego do ELISA Bio-Manguinhos como triagem e a RIFI Bio-Manguinhos como teste confirmatório. Ao final desse mesmo ano o protocolo para o diagnóstico canino foi substituído pelo TR-DPP®/ELISA Bio-Manguinhos, para triagem e confirmação da infecção, respectivamente. Outra alteração ocorrida foi em relação à interpretação da combinação dos resultados para o diagnóstico. O diagnóstico inconclusivo que se dava às amostras reagentes no teste de triagem e não reagente no confirmatório foi excluído. Assim, hoje, uma amostra com essas mesmas características positivo no teste triagem (TR-DPP®) e negativo no confirmatório (ELISA) é negativa. Com o objetivo de verificar o desempenho dos novos testes e o possível impacto nos valores de soroprevalência da infecção canina no município de Espírito Santo do Pinhal (SP) em decorrência da mudança do protocolo diagnóstico da LVC, o presente trabalho analisou os resultados obtidos nos inquéritos de 2012 e 2014 e os comparou com aqueles obtidos em 2010 quando ainda se empregava o antigo protocolo. Os soros de 2010 foram avaliados pelas técnicas do novo protocolo para estimar a prevalência nas condições diagnósticas atuais. Além disso, os índices de positividade e o nível de concordância dos resultados entre os dois testes foram determinados. No estudo foram incluídos os soros obtidos nos diferentes inquéritos, soros de cães do município de Rio Claro (SP) sem transmissão de LV (grupo controle) e soros de cães infectados por outros patógenos diferentes de *Leishmania* sp para verificação de possíveis reações cruzadas, soros de animais com resultado sorológico e parasitológico positivo para *Leishmania* visando analisar a sensibilidade dos testes e eventual co-infecção por patógenos comumente encontrados na população canina através do uso do teste imunocromatográfico SNAP®4Dx®. Os resultados mostraram a ocorrência de redução nos valores de soroprevalência canina no município de Espírito Santo do Pinhal entre os anos de 2012 e 2014 e que esta redução não foi causada pela introdução do novo protocolo diagnóstico da LV canina. Quanto ao desempenho dos testes, o TR-DPP® foi mais específico que o ELISA Bio-Manguinhos que mostrou reação cruzada com *N. caninum*, *B. canis*, *E. canis* e *T. cruzi*.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral/Epidemiologia; Leishmaniose Visceral/ Prevenção & Controle; Leishmaniose Visceral/Diagnóstico e Saúde Pública.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a serious public health issue present in 65 countries, affecting about half million people in the whole world. It's a disease that can lead to death. In Brazil, it has become endemic in 21 out of the 27 states with about 3 thousand new cases every year. One of the measures adopted by the Brazilian program for LV control is based on the diagnosis and euthanasia of LV positive dogs, once these animals are reservoirs of the parasite that causes the disease. According to the World Health Organization (WHO), this measure should be adapted to the reality of each place. In Brazil, serological tests are the basis for diagnosing dogs with the disease, hence the importance of using sensitive, specific and low cost tests that are accessible and easy to be used and handled, considering its importance for the public health and also for the measures adopted in regards to the reservoir. Until 2011, the Ministry of Health would standardly use ELISA Bio-Manguinhos as a presumptive test and RIFI Bio-Manguinhos as a confirmatory test. By the end of the same year, the protocol for diagnosing dogs was replaced by TR-DPP[®]/ELISA Bio-Manguinhos, for presumptive testing and confirmatory testing respectively. Another change that has been made was in regards to interpreting the combination of results for diagnosis. The inconclusive diagnosis that was given to the reacting samples in the presumptive tests and to the non-reacting samples in the confirmatory test have been excluded. Therefore, samples containing the same characteristics, positive for presumptive tests (TR-DPP[®]) and negative for confirmatory tests (ELISA) are to be considered negative now. Aiming at verifying the performance of new tests and the possible impact in the seroprevalence of infected dogs in the city of Espírito Santo do Pinhal (SP) due to the change in the diagnosis protocol for Canine Visceral Leishmaniasis, this present study has analyzed the results obtained from the inquiries from the years of 2012 and 2014 and compared them to those obtained in 2010, when the former protocol was still in use. The samples from 2010 were reassessed by the techniques used in the new protocol, in order to estimate the prevalence in the actual diagnosing conditions. Besides that, the indexes of positiveness, specificity and agreement between both tests were determined. In this study, serum obtained in different inquiries, serum of dogs from the city of Rio Claro (SP) negative for VL (control group) and serum of dogs infected by other pathogens different than *Leishmania* sp were added in order to verify possible cross-reactions, as well as serum of animals with a positive parasitological and serological status for *Leishmania*, aiming at analysing the sensitiveness of the tests and eventual co-infections caused by pathogens usually found in dogs through the use of the immunochromatographic test SNAP[®]4Dx[®]. The results have shown a reduction in the seroprevalence of infected dogs in the city of Espírito Santo do Pinhal between 2012 and 2014, and that this reduction wasn't caused by the introduction of the new diagnosing protocol for canine VL. In regards to the performance of the tests, TR-DPP[®] was more specific than ELISA Bio-

Manguinhos, that showed cross-reactiveness with *Neospora caninum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Trypanosoma cruzi*. There was a low level of agreement between the results.

Key-words: Visceral leishmaniasis/Prevention&Control; Visceral leishmaniasis/ Diagnosis and Public Health.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTA	Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
BAB	Blood Agar Base
BHI	Brain Heart Infusion
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPP	Dual Path Platform
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESP	Estado de São Paulo
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GL	Grau de Liberdade
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IHQ	Imuno-histoquímica
IPEN	Instituto de Patologia Experimental do Norte
LC	Leishmaniose Cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVCLVA	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SMF	Sistema Fagocítico Mononuclear
TR	Teste Rápido

TR-DPP Teste Rápido Dual Path Platform
X² Chi-quadrado

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Formas amastigotas de *Leishmania* visualizadas em *imprint* de baço de cão infectado recolhido para eutanásia no inquérito de 2012 no setor 3 do município de Espírito Santo do Pinhal - SP. Coloração de Giemsa..... 24
- Figura 2:** Esquema representativo para classificação epidemiológica dos municípios para vigilância e controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo..... 39
- Figura 3:** Distribuição de municípios do Estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral americana em dezembro de 2012..... 44
- Figura 4:** Protocolo diagnóstico utilizado no inquérito de 2010 (Grupo I) de acordo com o PVCLVA. 50
- Figura 5:** Protocolo diagnóstico utilizado no inquérito de 2012 (Grupo II) de acordo com o PVCLVA. 51
- Figura 6:** Protocolo diagnóstico utilizado no inquérito de 2014 (Grupo III) de acordo com o PVCLVA. 52
- Figura 7:** Teste imunocromatográfico SNAP®4Dx®, as setas indicam as posições impregnadas com antígeno ou anticorpo na janela de resultados, para os respectivos antígenos. 53
- Figura 8:** Resultados dos protocolos diagnósticos para LVC realizados nos inquéritos de 2010 (Grupo I), 2012 (Grupo II) e 2014 (Grupo III). 60
- Figura 9:** Prevalência da LVC no setor 3 do município de Espírito Santo do Pinhal, nos anos de 2010 (Grupo I), 2012 (Grupo II) e 2014 (Grupo III). 61
- Figura 10:** Comparação entre as taxas de prevalência da LVC obtidas para as amostras de soro sanguíneo coletadas em 2010 com a utilização dos protocolos diagnósticos ELISA/RIFI e TR-DPP®/ELISA..... 63
- Figura 11:** Porcentagem de reagentes nos testes confirmatórios, RIFI (inquérito de 2010) e ELISA (inquéritos 2012 e 2014) de casos soropositivos na triagem. 64

Figura 12: Frequência de sinais clínicos presentes nos cães soropositivos para LVC entregues para eutanásia no inquérito de 2012 (Grupo II). 68

Figura 13: Sinais clínicos apresentados pelos cães soropositivos entregues para eutanásia no inquérito 2012 (Grupo II). (A e B) lesão de pele; (C) emagrecimento; (D) onicogribose; (E) alopecia; (F) ceratoconjuntivite; (G) hepatomegalia (bordo discretamente arredondado); (H) esplenomegalia e (I) linfadenomegalia. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência da LVC no setor 3 de Espírito Santo do Pinhal, nos anos de 2010 (Grupo I), 2012 (Grupo II) e 2014 (Grupo III).	59
Tabela 2: Comparação da prevalência para LVC obtida no ano de 2010 com base nos dois protocolos diagnósticos.....	62
Tabela 3: Resultados do TR-DPP® e ELISA para 992 soros do Grupo II.....	65
Tabela 4: Resultados do TR-DPP®, ELISA e RIFI para diagnósticos da LVC dos 73 soros do Grupo IV (controle negativo).....	66
Tabela 5: Número absoluto e porcentagem de reagentes no TR-DPP® e ELISA para os soros dos 22 cães do Grupo V infectados com outros patógenos.....	66
Tabela 6: Resultados das sorologias do inquérito de 2012 (Grupo II) para os cães soropositivos para LVC entregues para eutanásia e dos testes sorológicos, parasitológico direto, cultura e PCR das amostras obtidas na eutanásia (POS = positivo; NEG = negativo; INC = inconclusivo; NÃO REAL = Não Realizado).....	67
Tabela 7: Comparação entre os resultados, obtidos nos inquéritos de 2010 (Grupo I) e 2012 (Grupo II) para 59 cães presentes em ambos.....	70
Tabela 8: Comparação dos resultados obtidos nos inquéritos de 2012 (Grupo II) e 2014 (Grupo III) para 721 cães presentes em ambos.	71

INDICE

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Leishmanioses	20
1.2. Leishmaniose Visceral	21
1.3. Agente Etiológico.....	23
1.4. Vetor.....	25
1.5. Reservatórios	26
1.6. Ciclo Biológico.....	28
1.7. Sintomas em humanos.....	29
1.8. Leishmaniose Visceral Canina (LVC).....	29
1.9. Diagnóstico da LVA	31
1.10. Tratamento LV.....	35
1.11. Controle da doença	37
1.12. Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana (PVCLVA).....	37
1.13. Atividades de Vigilância Epidemiológica	39
1.13.1. Dirigidas à população humana	39
1.13.2. Dirigidas ao Vetor	40
1.13.3. Dirigidas à população canina.....	40
1.14. Leishmaniose Visceral no Brasil.....	41
1.15. Leishmaniose Visceral no Estado de São Paulo	43
1.16. LV no município de Espírito Santo do Pinhal - SP	44
2. OBJETIVOS.....	46
2.1. Objetivos Gerais	46
2.1. Objetivos Especificos	46
3. METODOLOGIA	47
3.1. Área de estudo	47

3.2. Animais incluídos no estudo	48
3.3. Diagnóstico Laboratorial.....	48
3.4. Diagnóstico sorológico para LVC.....	49
3.5. Diagnóstico sorológico para outros patógenos.....	52
3.6. Procedimentos realizados na eutanásia dos cães soropositivos no inquérito de 2012 (Grupo II) no município de Espírito Santo do Pinhal.....	54
3.6.1. Exame Parasitológico Direto	54
3.6.2. Isolamento do agente etiológico dos animais positivos para infecção por <i>Leishmania</i>	54
3.6.3. Reação pela Polimerase em Cadeia (PCR).....	55
3.7. Aspectos éticos.....	57
4. RESULTADOS.....	58
4.1. Prevalência para LVC no setor 3 de Espírito Santo do Pinhal, com base nos inquéritos realizados em 2010, 2012 e 2014.	58
4.2. Impacto do emprego do TR-DPP®/ELISA nos valores da soroprevalência canina do município de Espírito Santo do Pinhal no inquérito de 2010.	61
4.4. Avaliação do desempenho dos testes TR-DPP® e ELISA frente aos controles negativos e infectados por outros patógenos	65
4.5. Avaliação dos cães soropositivos para LVC recolhidos para eutanásia no inquérito de 2012 (Grupo II)	66
4.6. Seguimento dos cães presentes nos inquéritos 2010 (Grupo I), 2012 (Grupo II) e 2014 (Grupo III).....	69
4.7. Diagnóstico sorológico para outros patógenos.....	71
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

A leishmaniose é um conjunto de doenças infecciosas, causadas por protozoários da família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania* de diferentes espécies. A transmissão do parasito para o homem e outros mamíferos se dá pela picada de insetos fêmeas da família Psychodidae sub-família Phlebotominae, chamados de flebotomíneos. De acordo com a espécie de *Leishmania* sp infectante a forma clínica da doença diferencia-se em: leishmaniose visceral, cutânea, mucocutânea, disseminada ou difusa. A forma mais comum é a cutânea que provoca úlceras na pele; a visceral é uma doença sistêmica grave e pode levar a morte; a forma mucocutânea apesar de ser menos frequente, é grave afetando a mucosa nasal e oral; as formas difusa e disseminada são menos comuns (World Health Organization, 2013; Desjeux, 2004).

Considerada um problema de saúde pública, a leishmaniose é uma das doenças mais negligenciadas em todo o mundo sendo também subnotificada na maioria dos locais onde é endêmica. Está presente nos 5 continentes acometendo 98 países, dos quais 13 estão entre os menos desenvolvidos, atingindo principalmente a população mais pobre. Estima-se que a cada ano 2 milhões de novos casos ocorram, destes 0,5 milhão atribuído a casos de leishmaniose visceral (LV) e 1,5 milhões atribuídos a casos de leishmaniose cutânea (LC), existindo ainda, mais 350 milhões de pessoas em risco de contrair a doença (World Health Organization, 2013; Desjeux, 2004).

O aumento da incidência global da leishmaniose tem sido atribuído principalmente à expansão da doença no Brasil, Bolívia, Peru, Colômbia e Afeganistão. Esse fator pode ser atribuído ao controle inadequado de vetores e reservatórios nas áreas endêmicas; à maior detecção de LC associada ao Vírus

da Imunodeficiência Humana (HIV); ao aumento da resistência ao tratamento e ao impacto das mudanças climáticas, que afetam a distribuição e o comportamento dos vetores (Montoalvo et al, 2012).

A coinfeção com HIV foi notificada em 35 países até março de 2010. Essa ocorrência tem gerado a intensificação das leishmanioses, pois, leva a formas graves que são mais difíceis de tratar. Acredita-se que o número de casos dessa coinfeção seja subnotificado, pelo fato da LV acometer populações desatendidas e em partes pelo fato da mesma não fazer parte da lista de doenças oportunistas associadas ao HIV (World Health Organization, 2013; Montoalvo et al, 2012).

A incidência da doença, no decorrer do tempo, apresenta flutuações em muitas áreas endêmicas, fator que vem sendo explicado pelo deslocamento de populações, bem como, por alterações climáticas, socioeconômicas e ambientais (World Health Organization, 2013).

1.2. Leishmaniose Visceral

A LV é considerada a forma mais grave da doença tendo alta letalidade em indivíduos não tratados (95% de letalidade), infantes desnutridos e imunossuprimidos, sendo emergente em pessoas infectadas com HIV. Tem ampla distribuição geográfica acometendo países da Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas (Martins, 2006; Alves e Bevilaqua, 2004; São Paulo, 2006).

A LV está presente em 65 países, sendo responsável pela segunda maior causa de morte no que se refere a doenças parasitárias, ficando atrás apenas das mortes por malária, estima-se que cause aproximadamente 59.000 mortes por ano, sendo este valor subestimado, pois, a notificação da doença não é obrigatória em todo o mundo, além de muitas vezes a doença não ser diagnosticada, principalmente em locais com difícil acesso as drogas. Noventa por cento dos casos ocorrem em 6 países em desenvolvimento: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão. Dependendo da fonte de infecção a LV

pode ser dividida em zoonótica e antroponótica, na primeira os reservatórios são animais silvestres, comensais e domésticos, já na segunda o reservatório é o homem. A leishmaniose visceral é classificada também pela área de ocorrência em leishmaniose visceral do Velho Mundo e leishmaniose visceral do Novo Mundo, ambas causadas por *Leishmania* sp do complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* (Desjeux, 2004; Organización Mundial de la Salud, 2012).

Nas Américas e no Velho Mundo é causada por espécies que recebem diferentes denominações, sendo todas pertencentes ao complexo *L. donovani*. Na América Latina a espécie responsável *L. chagasi* foi assim denominada em homenagem ao Dr. Carlos Chagas. Semelhanças genéticas e imunológicas, contudo, apontam para mesma espécie, *L. infantum* (Organización Mundial de la Salud, 2012; Neves, 2003).

Existem controvérsias quanto à etiologia do parasito, se o mesmo seria originário das Américas ou se teria vindo com os imigrantes ibéricos e seus cães. Com relação à autoctonia do parasito e as semelhanças genéticas e imunológicas apresentadas pelas duas espécies, vem sendo discutido o emprego da nomenclatura *L. chagasi*, para a espécie causadora da LV no Novo Mundo. Alguns autores tem adotado o nome *L. infantum* como sinonímia de *L. chagasi*, por acreditarem se tratar da mesma espécie, no entanto, alguns estudos apresentam argumentos defendendo a classificação da espécie encontrada por Evandro Chagas, pois, se fundamentam nas diferentes características da doença no Novo Mundo e no Velho Mundo, na rápida dispersão do agente etiológico pelo continente, na especificidade entre o agente vetor e a *Leishmania*, pela ocorrência de infecção em animais silvestres e até mesmo por diferenças antigênicas. Tem-se proposto o uso de *L. infantum chagasi* e *L. infantum infantum* para diferir as duas subespécies (Dantas-Torres, 2006; Lainson, 2010).

Lutzomyia longipalpis é a principal espécie responsável pela transmissão da LV nas Américas e particularmente no Brasil. No entanto nas cidades de Corumbá e Lendário, Mato Grosso do Sul, *Lutzomyia cruzi* também é responsável pela transmissão (São Paulo, 2006).

A presença do vetor e a ocorrência de casos caninos de leishmaniose têm sido apontadas como fatores precursores para o aparecimento de casos

humanos autóctones. Em países da América do Sul *Lu. longipalpis* tem colonizado novas áreas impactando a distribuição da leishmaniose visceral canina (LVC). É observada uma dependência direta entre a ocorrência de casos humanos e caninos, a densidade populacional e o índice de desenvolvimento humano (Colla-Jacques et al, 2010; Dantas - Torres et al, 2012; Bavia, 2013).

A primeira descrição clínica da LV foi feita em 1822, no entanto, o agente etiológico da enfermidade foi identificado pela primeira vez por Cunningham somente no ano de 1885, porém o mesmo não o descreveu. Em 1898, na Rússia, Borovsky realizou uma descrição do parasito, sem designar-lhe nome. Foi na Índia que Leishman e Donovan em 1903 realizaram a descrição do protozoário que recebeu o nome de *Piroplasma donovani*, dado por Laveran e Mensil. Porém, o médico inglês Ronald Ross ao ver que não se tratava de um esporozoário cria o gênero *Leishmania* e designa a espécie *L. donovani*. A doença, conhecida há muito tempo na Índia e Oriente Médio, recebeu o nome popular de “Kala-jwar” (febre negra) ou “kala-azar” (doença mortífera) e também febre “Dum-Dum”, pois, os indivíduos acometidos por ela na Índia apresentam uma leve alteração na pigmentação da pele. No continente Americano foi denominada Leishmaniose Visceral Americana (LVA), nesta região esta alteração não é observada, no entanto, o termo calazar é utilizado indiscriminadamente sendo considerado sinônimo de LV (Neves, 2003; Lainson e Shaw, 1978; Cabrera, 1999).

1.3. Agente Etiológico

A leishmaniose tem como agente etiológico um protozoário intracelular obrigatório, da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, que se divide em dois subgêneros: *Leishmania*, presente no Velho e Novo Mundo e *Viannia*, presente apenas no Novo Mundo. A classificação em subgênero é dada com base em seu desenvolvimento no tubo digestivo do vetor (Fiocruz, 1997; Lainson e Shaw 1978).

Apresenta duas formas distintas: a promastigota (forma flagelada) que se encontra no tubo digestivo do flebotômico (vetor) e a amastigota encontrada nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) dos vertebrados (hospedeiros) (São Paulo, 2006; Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

A caracterização da ordem Kinetoplastida se dá pela presença do cinetoplasto, uma mitocôndria única rica em DNA (Ácido Desoxirribonucleico) mitocondrial, o kDNA. Esta organela localiza-se anteriormente ao cinetossoma do flagelo, em posição perpendicular ao eixo maior do organismo. As características morfológicas dos gêneros da família Trypanosomatidae são bem homogêneas, sendo todas as espécies parasitas. A promastigota, forma extracelular de flagelo livre, apresenta um corpo alongado, medindo de 14 a 20 μm . A amastigota, forma intracelular de flagelo interno, apresenta um corpo ovoide, medindo de 2,1 a 3,2 μm (Fiocruz, 1997).

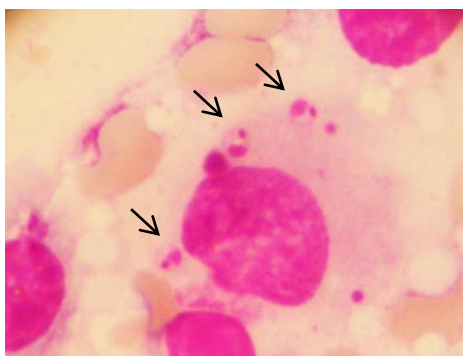


Figura 1: Formas amastigotas de *Leishmania* visualizadas em *imprint* de baço de cão infectado recolhido para eutanásia no inquérito de 2012 no setor 3 do município de Espírito Santo do Pinhal - SP. Coloração de Giemsa.

Das 30 espécies capazes de infectar mamíferos, 21 delas são passíveis de causar doença em humanos. Dentre as espécies que acometem o ser humano estão inclusos parasitos dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. O subgênero *Leishmania* é composto pelo complexo *L. donovani* (composto por duas espécies *L. donovani* e *L. infantum* chamada no Novo Mundo de *L. chagasi*) e pelo complexo *L. mexicana* (composto por três espécies principais *L.*

mexicana, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*) e pelas espécies *L. tropica*; *L. major* e *L. aethiopica*. O subgênero *Viannia* é composto por quatro espécies principais *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana* (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Através da morfologia, não é possível realizar a diferenciação entre as espécies, para tanto, se faz necessário à utilização de técnicas moleculares, análises de isoenzimas e de anticorpos monoclonais (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

É de suma importância o conhecimento das espécies infectantes em cada foco, pois, a compreensão da epidemiologia da doença tem como base esses dados, bem como, a tomada de decisões no que se refere ao controle e tratamento das diferentes formas da leishmaniose (Organización Mundial de la Salud, 2012).

1.4. Vetor

O agente transmissor das leishmanioses é representado pelo inseto da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. No mundo, foram descritas 900 espécies de flebotomíneos, destas 500 ocorrem na região neotropical e 69 já foram registradas no Estado de São Paulo (ESP). Existem cerca de 30 espécies capazes de transmitir a doença ao redor do mundo, sendo que os principais vetores da leishmaniose cutânea e visceral ocorrem no ESP. De acordo com a espécie de *Leishmania* e a região geográfica o vetor pode variar (Shimabukuru, Tolezano, Galati, 2011; Montoalvo, 2012; São Paulo, 2006; Cutolo, Camargo, Von Zuben, 2009).

No Novo Mundo a epidemiologia do vetor parece seguir alguns padrões básicos que são determinantes na relação entre ciclos humanos e enzooticos, esses padrões relacionam-se à sua área de ocupação, sua abundância, seu padrão de dispersão e seu comportamento alimentar (Colla-Jacques et al, 2010).

Mais de 229 espécies de flebotomíneos já foram documentadas no Brasil, das quais 19 têm sido consideradas como vetores ou prováveis vetores das leishmanioses. No ESP estão presentes sete espécies, consideradas de importância epidemiológica (Colla-Jacques et al, 2010).

Os flebotomíneos, devido suas características morfológicas e geográficas, são popularmente chamados de mosquito palha, asa-dura, cangalhinha ou birigui (São Paulo, 2006).

A população de *Lu. longipalpis* tem por habitat ambientes sombreados, úmidos, com material orgânico em decomposição. No ambiente domiciliar ou peridomiciliar os flebotomíneos instalam-se em galinheiros, pombais e chiqueiros (Neves, 2003).

Para que sejam adotadas medidas de controle efetivas contra o vetor e para que se conheça a importância das diferentes espécies no ciclo de transmissão é necessário que se conheça a comunidade dos flebotomíneos, sua dinâmica populacional e sua distribuição ambiental (Colla-Jacques et al, 2010).

1.5. Reservatórios

Uma variedade de animais domésticos e selvagens pode ser considerada como hospedeiros vertebrados da *Leishmania chagasi*. Embora cães, gatos e humanos possam servir como fonte de infecção para os flebotomíneos a classificação como hospedeiros primário ou secundário desses animais ainda não está bem clara e requer maiores estudos populacionais (Dantas-Torres et al, 2012).

De forma geral, cães também são afetados pela doença por todo o mundo, com exceção da Oceania. Entretanto, sua predominância é observada na América do Sul e no Mediterrâneo, onde a leishmaniose canina está ampliando a área de ocorrência, atingindo novos locais. Como exemplo deste fato, pode-se citar a confirmação de casos ao norte da Itália, nas províncias ao sul do Canadá

e no leste dos Estados Unidos (Dantas- Torres et al, 2012; Petersen e Barr, 2009).

A frequência e a propagação da infecção canina por *L. infantum* é influenciada por vários fatores, como: a duração do período de transmissão, os hábitos alimentares dos flebotomíneos, a densidade do vetor, a densidade e susceptibilidade da população canina, o estilo de vida dos cães (se vivem dentro ou fora de casa e/ou se são de área rural ou urbana), aos níveis de exposição aos vetores, à presença de outros reservatórios e as atitudes de prevenção adotadas pelos proprietários (Dantas-Torres, 2012).

Na Índia a LV, causada por *L. donovani* é considerada uma antroponose, tendo humanos como reservatórios, nesse caso é possível observar parasitos isolados do sangue periférico de pessoas infectadas. Estudos demonstraram a presença do parasito em 98% das amostras de sangue de humanos infectados, bem como o parasitismo da pele e a ocorrência de vetores antropofílicos. Já na África e no Mediterrâneo a doença é causada pela *L. infantum* e neste caso não é possível isolar o parasito do sangue periférico caracterizando o humano como hospedeiro final, nestas localidades o cão é considerado o principal reservatório doméstico. Estudo realizado no Brasil submetendo humanos, cães e raposas infectados ao xenodiagnóstico para avaliar a capacidade infectiva de cada um desses, demonstrou que o humano possui menor capacidade de infectar o vetor (Palatnik-de-Sousa et al, 2001).

L. infantum e *L. chagasi* são causadores respectivamente do calazar infantil (no Mediterrâneo), e da leishmaniose visceral americana (nas Américas). Afetam principalmente crianças com até cinco anos de idade na Europa, ou até dez anos de idade nas Américas, e estes dois tem o cão como principal reservatório do parasito (Dantas-Torres, 2006; Ministério da Saúde, 2006; Costa, 2011).

Existem animais que podem apresentar resistência à infecção e outros infecção latente, a diferença entre esses ainda não é conhecida. Essa característica torna ainda mais difícil o controle da transmissão, pois, esses cães com potencial infectante (animais resistentes ou latentes) somente são identificados por exames sorológicos sensíveis. Estudos demonstram que a

capacidade de infectar o vetor não está relacionada com a severidade dos sintomas (Palatnik-de-Sousa et al, 2001).

1.6. Ciclo Biológico

A manutenção da transmissão da leishmaniose visceral está relacionada a um complexo sistema biológico que envolve o hospedeiro humano, o parasito, o vetor (flebotomíneos) e os reservatórios animais. (Organización Mundial de la Salud, 2012).

A transmissão se dá pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. O inseto pica o vertebrado infectado ingerindo células do SFM parasitadas pela forma amastigota que no tubo digestivo dos flebotomíneos se transforma em promastigotas. Durante o repasto sanguíneo, fêmeas infectadas injetam a forma infectante (promastigotas) no vertebrado. As promastigotas são fagocitadas por células do SFM, principalmente macrófagos, onde se diferenciam em amastigotas que se dividem infectando novas células (Centers for Disease Control and Prevention, 2010).

Além da transmissão natural, pode ocorrer ainda a transmissão pessoa a pessoa através da transfusão sanguínea, compartilhamento de agulhas e congenitamente (sete casos conhecidos), no entanto essas formas de transmissão não possuem uma importância epidemiológica (Montoalvo, 2012; Neves, 2003).

Alguns autores relatam a hipótese de que entre a população canina a transmissão possa se dar através da ingestão de carrapatos infectados e até mesmo através da mordedura, cópula e ingestão de vísceras contaminadas, no entanto, não há evidências da importância epidemiológica desse mecanismo de transmissão para humanos nem mesmo da manutenção da enzootia (Ministério da Saúde, 2009).

1.7. Sintomas em humanos

A apresentação clínica da leishmaniose pode variar conforme a susceptibilidade genética do hospedeiro, o contexto imunológico em que ocorreu a infecção e a espécie de *Leishmania* infectante (Montoalvo, 2012).

A leishmaniose visceral pode apresentar três formas clínicas:

- a) Forma assintomática: o indivíduo infectado não apresenta nenhuma manifestação clínica, sendo diagnosticado apenas quando se realiza um inquérito sorológico.
- b) Forma oligossintomática: o indivíduo apresenta alguns sinais da doença, que podem ser: febre, diarreia, hepatomegalia e anemia discreta. Esses sinais podem permanecer no indivíduo aproximadamente de três a seis meses, podendo haver uma evolução para cura clínica espontânea ou para manifestação plena da doença em cerca de dois a quinze meses.
- c) Forma clássica: manifestação plena da doença. O indivíduo apresenta sintomas bastante exacerbados que se caracterizam por hepatoesplenomegalia volumosa, febre e comprometimento do estado geral, perda de peso progressiva, anorexia e astenia. Os achados laboratoriais são: anemia, leucopenia e/ou plaquetopenia e hipergamaglobulinemia.

1.8. Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

A LVC está presente em aproximadamente 50 países, acometendo principalmente a região mediterrânea e a América do Sul. Apesar de já se terem encontrado mais de 12 espécies de *Leishmania* infectando cães, o agente etiológico para LVC mais importante são as espécies *L. infantum* e a *L. chagasi* no Velho e Novo Mundo respectivamente (Dantas-Torres et al, 2012).

A LVC é uma doença crônica, mas também pode apresentar quadros agudos, a presença de infecção nem sempre vem acompanhada de sintomatologia clínica, isso se deve a fatores de interações complexas entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro. As lesões inflamativas não supurativas se dão pela ação do parasito e pela deposição de imunocloplexos circulante nos vários órgãos e tecidos. Dentre a população canina infectada 50 a 60% não apresentam sintomas evidentes. Esses cães assintomáticos representam risco considerando que possuem alta capacidade infectiva para o vetor (Costa-Val e Melo, 2012; Laurenti, 2013).

As alterações clínicas que podem ser observadas em animais com leishmaniose são alterações dermatológicas (alopecia e descamação), linfadenopatias, onicogribose, alterações oculares (blefarite, conjuntivite, ceratoconjuntivite e uveíte), bem como perda de peso, atrofia muscular, esplenopatia, hepatopatia e nefropatia. As alterações referentes aos achados na patologia clínica são do eritrograma e dos eritrócitos, alterações do leucograma, nas plaquetas, na função hepática, disproteinemia e na função renal (Costa-Val e Melo, 2012).

Existem poucos estudos associando fatores de risco à raça, sexo, idade, ocupação e outras características dos cães e os resultados nem sempre estão em acordo. Trabalhos avaliando a similaridade entre os fatores de risco no Velho e Novo Mundo para LVC não encontraram semelhanças, talvez devido às características locais da doença. Na Europa cães mais jovens (menores de três anos) e mais velhos (maiores de oito anos) são mais acometidos, enquanto na América do Sul não se observa diferença etária entre os cães acometidos, a explicação sugerida seria devido à presença de *Lu. longipalpis* o ano todo no continente sul-americano. Pouco se sabe sobre a susceptibilidade das raças nas Américas em diferentes condições nutricionais (Palatnik-de-Sousa 2001; Dantas-Torres et al, 2012).

1.9. Diagnóstico da LVA

O diagnóstico precoce e correto da LVA é de suma importância por se tratar de uma doença que pode levar à morte do ser humano além de requerer medidas severas com relação ao reservatório doméstico, pois, quando infectado o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLVA) recomenda a eutanásia. É importante que o diagnóstico adequado da população canina infectada, mesmo assintomática, seja realizado rapidamente tendo em vista que estes se tornam as principais fontes de infecção (Alves e Bevilaqua, 2004; Silva et al, 2005).

A partir da suspeita clínica ou epidemiológica da LVA, uma série de exames podem ser realizados. É necessário conhecer os diagnósticos diferenciais desta doença, contudo nas áreas endêmicas muitas vezes não se tem recursos para realizar a discriminação dessas. O diagnóstico clínico é dificultado, pois, seus sintomas são comuns a outras enfermidades. Outro agravante relacionado ao diagnóstico clínico refere-se às diferentes formas clínicas apresentadas que podem variar desde uma forma assintomática, podendo permanecer assim por longos períodos, até um estágio severo da doença. Existe ainda a dificuldade relacionada ao fato de não existirem testes 100% sensíveis e específicos (Montoalvo, 2012; Sundar e Rai 2002; São Paulo, 2006; Gontijo et al 2004; Ferrer, 1999).

O diagnóstico laboratorial da LVC tem como base os métodos parasitológicos e sorológicos. Os ensaios utilizados para tanto podem ser: 1) exame direto, pela demonstração do parasito através de biópsias ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea e linfonodos para confecção de esfregaços corados por Giemsa ou panótico rápido, isolamento em meio de cultura ou inoculação em animais; 2) a detecção do DNA; 3) imunodiagnóstico, pela detecção do antígeno do parasito ou anticorpos anti-*Leishmania* (Laurenti et al, 2009; Sundar e Rai, 2002).

O exame direto, método parasitológico, é 100% específico, o encontro de apenas uma amastigota determina a positividade do exame. A demonstração do parasito é o melhor método laboratorial, contudo apresenta baixa sensibilidade,

pois, a identificação do parasito depende da experiência do examinador, bem como, da qualidade do material examinado e da concentração de parasitismo. O emprego da imuno-histoquímica (IHQ) auxilia no que diz respeito à dificuldade de evidenciação da *Leishmania* sp, por empregar anticorpos específicos marcados, detectando com mais facilidade as formas amastigotas nos cortes histológicos. Ainda com relação aos métodos parasitológicos, a cultura aumenta a probabilidade do encontro do parasito, mas é um método demorado e não muito sensível o que inviabiliza seu uso para o diagnóstico de rotina (Ferrer, 1999).

Os métodos sorológicos eliminam o problema relacionado às dificuldades de visualização do parasito. Essas metodologias detectam a presença de anticorpos presentes no soro considerando a hipergamaglobulinemia apresentada pelos pacientes de LV. No diagnóstico da LVC a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é amplamente empregada sendo considerada uma técnica com alta sensibilidade mesmo quando não são empregados antígenos específicos, no entanto, sua especificidade pode ser comprometida pelo fato de poder apresentar reações cruzadas em cães que sofram de leishmaniose cutânea ou de doença de Chagas. O ensaio imunoenzimático ELISA apresenta uma sensibilidade maior que a RIFI e elimina a subjetividade existente nas reações fracamente positivas, pelo fato de sua leitura ser automatizada. Essa técnica também pode apresentar reações cruzadas com outros tripanossomatídeos ou até com espécies filogeneticamente distantes, afetando assim sua especificidade (Ferrer, 1999; Costa-Val e Melo, 2012).

As técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), apresentam alta especificidade e sensibilidade. A PCR permite a identificação do DNA e tem apresentado bons resultados tanto no diagnóstico como no acompanhamento de cães com LV durante e após o tratamento e na identificação de espécies. As desvantagens dos métodos moleculares é que elas exigem pessoal altamente capacitado e laboratórios muito bem equipados (Ferrer, 1999).

A realização de diagnósticos laboratoriais é de suma importância, pois, cães infectados com ou sem clínica aparente, são passíveis de infectar os flebotomíneos. Em se tratando de inquéritos epidemiológicos que buscam

detectar cães infectados, as técnicas sorológicas são as mais indicadas. Os testes diagnósticos empregados em saúde pública são avaliados quanto à sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo, valor preditivo positivo, reprodutibilidade, facilidade e exequibilidade, sendo que não há um teste diagnóstico com 100% de sensibilidade e especificidade para LVC (Laurenti et al, 2013; Ministério da Saúde, 2011).

A partir da década de 60 iniciou-se a utilização da RIFI. Para o diagnóstico da LVC a imunofluorescência indireta vem sendo utilizada desde 1982, realizada em eluato de sangue colhido em papel filtro. No Brasil, o diagnóstico canino era realizado, portanto, com base na sorologia por RIFI, sendo considerados positivos todos os cães soro reagentes a partir da diluição 1:40 (Alves, 2004; Braga, 1998; Machado et al, 2007).

No Brasil durante o período de 2006 a 2011, os métodos diagnósticos sorológicos recomendados pelo PVCLVA para órgãos de saúde pública eram o ELISA como método de triagem e a RIFI como confirmatório. Os *kits* diagnósticos empregados para a realização dos ensaios sorológicos possuem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e são produzidos pelo laboratório Bio-Manguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro. O ELISA identificava os casos negativos e a RIFI confirmava os casos soro reagentes no teste de triagem (Ministério da Saúde, 2006; Ministério da Saúde, 2011; São Paulo, 2006).

Com o intuito de validar os testes sorológicos empregados na rede pública de saúde para o diagnóstico da LVC e do teste rápido que Bio-Manguinhos pretendia produzir, o MS encomendou um estudo à Fiocruz do Rio de Janeiro com base na construção de um painel sorológico composto por 1600 cães de quatro municípios endêmicos de diferentes regiões. Em maio de 2011 um relatório baseado nos resultados obtidos nesse estudo foi elaborado com a participação de diversas instituições públicas (Fiocruz/RJ, Funed/MG, Instituto Aldofo Lutz/SP, Laboratório do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande/MS, Grupo Técnico das Leishmanioses/MS e Coordenação-Geral de Laboratórios - CGLAB/MS). Considerou-se então que o cenário que empregava ELISA e RIFI apresentava valores de sensibilidade e especificidade dentro do

esperado, no entanto, o cenário utilizando o Teste Rápido Dual Path Platform (TR-DPP®) como triagem e o ELISA como confirmatório obteve melhor desempenho. Observou-se ainda que na avaliação da reprodutibilidade dos testes entre laboratórios a melhor concordância foi do ELISA, o TR-DPP® obteve um valor moderado e a RIFI fraco. As considerações apontaram ainda para a operacionalização do teste e a oportunidade de resultados, indicando que o TR-DPP®, como triagem, apresenta vantagens e facilidades, tais como: rapidez, simplicidade, praticidade, realização a partir de uma pequena amostra de sangue total, soro ou plasma, além de não exigir equipamentos laboratoriais específicos, armazenamento sob refrigeração e especialização tecnológica. Foi apontando ainda que ELISA permite a realização de um número maior de amostras e fornece resultados automatizados, eliminando a subjetividade na leitura (Ministério da Saúde, 2011).

O ensaio TR-DPP® é um teste rápido cujo resultado se obtém em até 20 minutos. As vantagens oferecidas por essa tecnologia são um maior nível de sensibilidade, poder utilizar volumes mínimos de amostra de diferentes fluídos corporais. A exequibilidade do ensaio também é mais fácil além da possibilidade do desenvolvimento de multi-teste, podendo incluir até cinco diagnósticos de diferentes doenças em um mesmo teste. A Fiocruz em parceria com a empresa *Chembio Diagnostics* em 2008, desenvolveu o TR-DPP®, esse método permite um resultado com maior sensibilidade sem prejudicar a especificidade. Bio-Manguinhos fornece o TR-DPP® para o MS, visando melhoria nas ações de controle da doença. Esse teste permite o diagnóstico em campo ou ambulatório em poucos minutos, sendo uma ferramenta importante para a saúde pública (Fiocruz, 2008).

Com base nas considerações foram realizadas algumas recomendações, para o diagnóstico da LVC, dentre elas a substituição do cenário utilizado (triagem com ELISA e confirmação com RIFI) pelo cenário que emprega o TR-DPP® como teste de triagem e o ELISA como teste confirmatório. A mudança nos testes empregados pelo programa visa evitar o sacrifício de animais saudáveis, diminuir o número de amostras enviadas para o laboratório, através da triagem feita com o TR-DPP® reduzindo o trabalho e gerando tempo e economia para os municípios (Ministério da Saúde, 2011; Fiocruz, 2012).

O Programa de Controle da LVA realizou mudanças no que se refere aos métodos diagnósticos utilizados. O MS publicou a NOTA TÉCNICA N° 01/2011 – UVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS substituindo o teste de triagem que até então era o ELISA pelo TR-DPP®, desenvolvido por Bio-Manguinhos e o diagnóstico confirmatório que se fazia por RIFI substituído pelo ELISA, a mudança foi realizada gradativamente (Ministério da Saúde, 2011).

1.10. Tratamento LV

Apenas após a confirmação da doença humana é que se deve iniciar o tratamento, sendo que, em algumas regiões é necessário chegar à identificação em nível de espécie para eleição do regime terapêutico mais adequado. A escolha terapêutica deve seguir diretrizes nacionais e regionais. Países endêmicos deveriam embasar suas escolhas nos riscos e benefícios do medicamento, o tipo de serviço de saúde, a disponibilidade dos fármacos e em parâmetros de saúde pública como a resistência medicamentosa (Organización Muncial de la Salud, 2012).

O custo do tratamento da LV é uma grande limitação principalmente para acessibilidade em grande escala, mesmo após uma redução nos valores obtidos nos últimos 5 anos. Na Índia tem se observado a falha ao esquema terapêutico com antimoniais pentavalentes, devido à má qualidade e o não cumprimento dos esquemas terapêuticos (Desjeux, 2004).

O tratamento da LV humana utilizado atualmente no Brasil são o Antimonial Pentavalente e a Anfotericina B. Desde 1913 os antimoniais trivalentes eram empregados por Gaspar Vianna no tratamento da LC e dois anos depois foi empregado no tratamento da LV na Itália, somente na década de 40 é que os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) foram introduzidos e a partir de então essas têm sido consideradas como drogas de primeira escolha (Ministério da Saúde, 2006; Ministério da Saúde, 2010).

O MS recomenda o Antimoniato de N-metil Glucamina como droga de primeira escolha, no entanto, deve-se considerar o uso de Anfotericina B com

base na faixa etária, presença de gravidez e co-morbidades do paciente. A única opção terapêutica para gestantes, pacientes que tenham alguma contraindicação ao uso de antimoniais ou tenham apresentado toxicidade ou refratariedade ao mesmo é o uso de Anfotericina B. Para o tratamento de pacientes com insuficiência renal e, conforme protocolo de recomendações clínicas para a redução da letalidade por LV, para indivíduos com mais de 50 anos, transplantados renais, hepáticos e cardíacos recomenda-se a Anfotericina B lipossomal (Ministério da Saúde, 2010).

Durante o tratamento com Antimoniato de N-metil Glucamina o paciente deve ter acompanhamento clínico, com exames complementares para avaliar a presença de possíveis efeitos tóxicos e efeitos colaterais que devem ser notificados, sendo recomendado a suspensão do tratamento nesses casos e o tratamento com drogas alternativas (Ministério da Saúde, 2010; Ministério da Saúde, 2006).

Os critérios de cura têm por base parâmetros clínicos, sendo realizado o acompanhamento da pessoa tratada aos 3, 6 e 12 meses após o tratamento e se na última avaliação o mesmo apresentar-se estável, o paciente é considerado curado (Ministério da Saúde, 2006).

No Brasil é proibido o tratamento da LV canina com produtos de uso humano ou não registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), conforme Portaria Ministerial nº 1426, de 11 de julho de 2008, expedido pelo MAPA e MS. Para tal decisão considerou-se a não existência de fármacos que garantam a eficácia do tratamento canino e a redução do risco de transmissão, além do risco de cães em tratamento manterem-se como fontes de infecção para o vetor e a existência do risco de seleção de cepas resistentes aos medicamentos existentes para o tratamento humano (Ministério da Saúde, 2008).

Diversas evidências têm demonstrado que o tratamento de cães infectados, com as drogas utilizadas em humanos, não tem obtido sucesso causando exacerbação da doença. No entanto a possibilidade de um aumento na sobrevivência e uma possibilidade de cura tem estimulado a terapia canina (Palatnik-de-Sousa, 2001).

1.11. Controle da doença

Devido ao amplo sistema biológico que envolve a manutenção da transmissão da LV, o controle baseado em uma única intervenção é improvável, sendo necessárias combinações estratégicas entre tratamento dos casos humanos, controle do vetor e o controle do reservatório que deve adaptar-se a cada contexto (Organización Mundial de la Salud, 2012).

O controle da doença é dificultado devido à diversidade epidemiológica, a falta de total compreensão da biologia da *Leishmania* e ao aumento da resistência às drogas utilizadas no tratamento. A urbanização da LV e a coinfeção com HIV (que em 2010 representou 5,6% dos casos) tem sido mais um desafio. Outro fator agravante para o controle da doença leva em consideração os aspectos socioeconômicos, pois, globalmente a doença afeta “os mais pobres entre os pobres”, sendo assim, estratégias que não levem em consideração esse contexto dificilmente se manterá em longo prazo (Rafati et al, 2013; Organización Mundial de la Salud, 2012; Elkhoury et al, 2013).

Em países endêmicos que possuem programas nacionais de controle a Organização Pan-americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde (OPAS/OMS) dá suporte com o objetivo de reduzir a morbidade e a mortalidade. A leishmaniose é um desafio e seu controle depende de novas descobertas e inovações tecnológicas, investimento em pesquisa, suporte para integração de vigilância e controle, bem como facilitar o acesso das pessoas ao diagnóstico e tratamento (Elkhoury et al, 2013).

1.12. Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana (PVCLVA)

O Programa de Controle da LVA estabelecido pelo Ministério da Saúde (MS) por meio da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e das Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde está centrado no diagnóstico e tratamento

precoce dos casos humanos, controle populacional do vetor, identificação e eliminação dos cães infectados e atividades de educação em saúde (Ministério da Saúde, 2002; Ministério da Saúde, 2006).

O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana (PVCLVA) estabelece as diretrizes para as ações de vigilância e controle da doença no ESP (Rangel et al, 2013).

No ESP o PVCLVA tem por objetivo a redução da morbidade e mortalidade por LVA e para tanto utiliza como meta as seguintes medidas: Monitoramento da distribuição da *Lu. longipalpis*; Redução da densidade do vetor; Detecção precoce da transmissão da LVA; Monitoramento dos níveis de prevalência na população canina nos municípios com transmissão; Redução da prevalência canina; Detecção e tratamento precoce dos casos humanos; Redução da morbidade e da letalidade em seres humanos (São Paulo, 2006).

Os municípios do ESP são classificados de acordo com suas características epidemiológicas. Quanto à presença ou ausência de casos autóctones humanos ou caninos são classificados em com transmissão ou silencioso, respectivamente; quanto à presença ou ausência do vetor em receptivo ou não receptivo e quanto à distância de municípios com transmissão em vulnerável ou não vulnerável. A figura 2 traz o esquema para classificação epidemiológica dos municípios com base nessas características (Rangel et al, 2013).

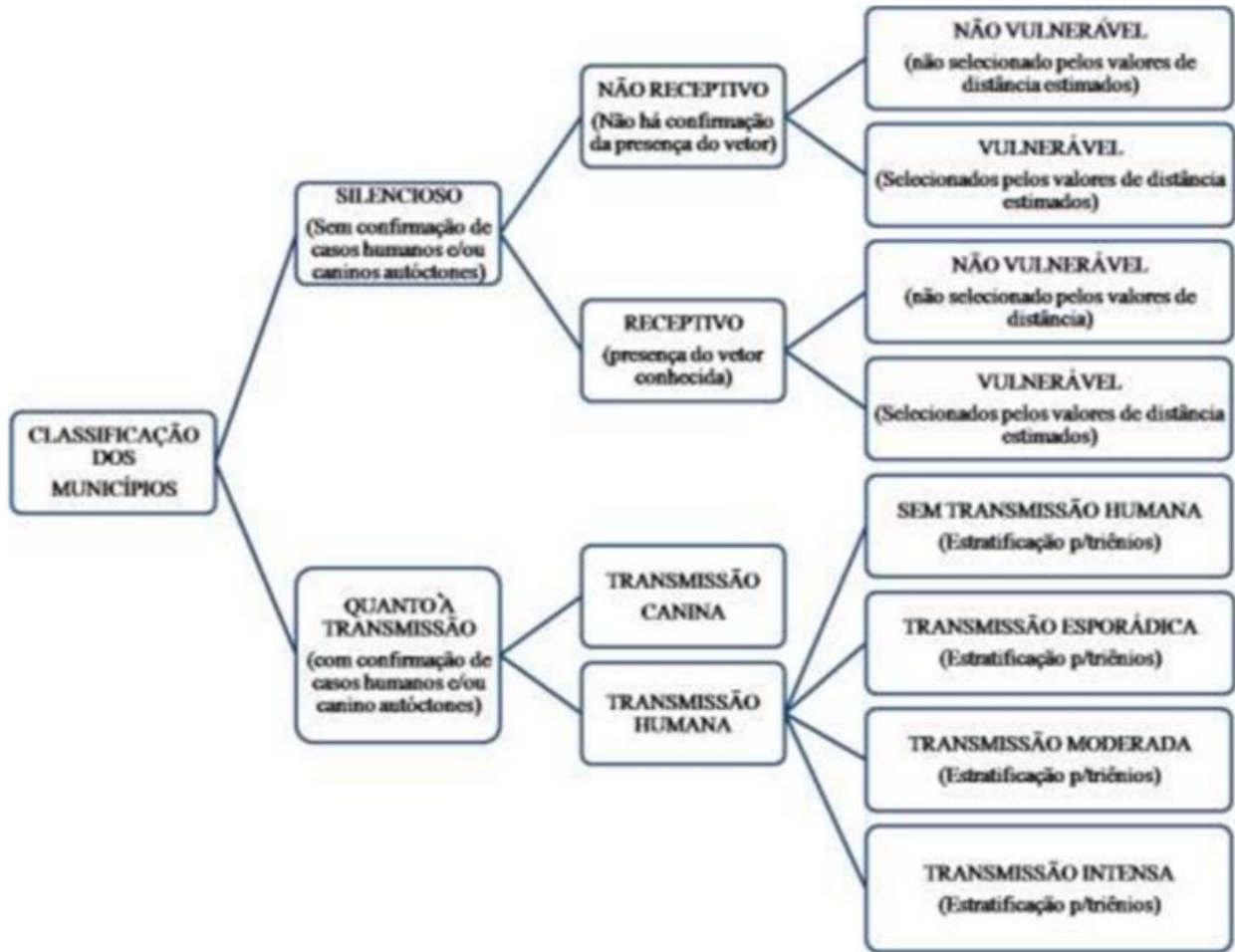


Figura 2: Esquema representativo para classificação epidemiológica dos municípios para vigilância e controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo.

Fonte: RANGEL et al, 2013.

1.13. Atividades de Vigilância Epidemiológica

1.13.1. Dirigidas à população humana

As atividades de vigilância epidemiológica dirigidas à população humana têm como meta a busca passiva de casos, ou seja, investigação quanto a aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes sintomáticos que procuram o serviço de saúde, seguindo para investigação laboratorial. Em municípios com transmissão e nos silenciosos, principalmente, os silenciosos receptivos vulneráveis, deve haver uma sensibilização dos profissionais da saúde para o diagnóstico e tratamento precoce e também orientação da população para a

procura do serviço de saúde mediante a presença de sintomas compatíveis (São Paulo, 2006).

Outra meta dirigida à população humana é a busca ativa de casos sintomáticos, que deve ser realizada em municípios com transmissão recente, num período de seis meses após a confirmação do primeiro caso humano autóctone, nas residências no raio de 200 metros deste caso, que deverá ser ampliada na detecção de outro caso humano e/ou se a prevalência canina for > ou igual a 2% (São Paulo, 2006).

1.13.2. Dirigidas ao Vetor

As atividades dirigidas ao vetor são de responsabilidade do Estado. As atividades realizadas pelo município devem ser coordenadas pelo Estado. O PVCLVA propõe o levantamento entomológico, a pesquisa entomológica em foco de LVA e as pesquisas entomológicas em unidades fixas, além de atividades voltadas à população para estimulação de notificação de insetos incômodos (São Paulo, 2006).

1.13.3. Dirigidas à população canina

É de suma importância a participação de estabelecimentos veterinários na vigilância de cães em municípios silenciosos. Quando da detecção de cães suspeitos os responsáveis técnicos deverão fazer a notificação ao serviço de vigilância epidemiológica municipal. Sendo assim, deverá ser realizada coleta de material para exame parasitológico que deve ser encaminhado ao laboratório de referência (São Paulo, 2006).

Dentre as medidas dirigidas à população canina está o inquérito sorológico, que pode ser amostral ou censitário. Inquérito canino amostral deve ser realizado anualmente ou no máximo a cada dois anos em área urbana de

municípios silenciosos receptivos, para verificar ausência de enzootia nos setores onde *Lu. longipalpis* já foi detectado e também deverá ser realizado anualmente em municípios com transmissão, para avaliar as taxas de prevalência nos setores não trabalhados no inquérito censitário no ano anterior ou naqueles que apresentaram taxas de prevalência sorológica canina $>1,0$ e $< 2,0\%$ na última avaliação amostral, a fim de avaliar as áreas prioritárias para se trabalhar. Nos inquéritos devem ser utilizadas amostragens estratificadas por conglomerados utilizando para isso o setor AEDES (setorização utilizada no Programa de Controle de Dengue). Inquérito canino censitário deve ser realizado anualmente na zona urbana de município silencioso receptivo vulnerável com população canina < 300 cães, devendo ser feita anualmente também em municípios com transmissão humana, quando a prevalência canina nos inquéritos censitário ou amostral foi $> 2\%$ (São Paulo, 2006).

Em áreas sem transmissão para LVC (municípios silenciosos) os profissionais veterinários devem estar atentos para a detecção de um possível primeiro caso da doença, visando contribuir para a não disseminação nessas áreas. Para tanto se faz necessário o conhecimento das manifestações clínicas apresentadas pelos animais, considerando que a primeira suspeita se dá com base nos sinais e sintomas apresentados pelo animal (exame clínico), a partir disso o médico veterinário partirá para outras medidas cabíveis, como conhecer o histórico de viagem do animal para saber se é um possível caso importado ou um caso autóctone, para o diagnóstico laboratorial através da sorologia, imunohistoquímica, exames bioquímicos, confirmação etiológica com base em teste “padrão ouro”, para a então notificação do caso (Campos et al, 2013).

1.14. Leishmaniose Visceral no Brasil

No Brasil o primeiro relato de LV ocorreu em 1934, o médico patologista Henrique Penna encontrou formas amastigotas do parasito em cortes histológicos de fígado de 41 indivíduos com suspeita de febre amarela. Foi criada então no ano de 1936, pelo Instituto Oswaldo Cruz, uma comissão para estudo da LVA chefiada pelo Doutor Evandro Chagas, nesse mesmo ano foi fundado

em Belém o “Instituto de Patologia Experimental do Norte” (IPEN), para o estudo da LVA e de outras endemias regionais, hoje “Instituto Oswaldo Cruz”. Porém, apenas 20 anos depois é que se registrou o primeiro surto da doença no estado do Ceará na cidade de Sobral. Em meados dos anos 80 houve uma transformação relacionada à distribuição geográfica da doença que antes era considerada esporádica e de ambiente silvestre ou rural, a mesma passou a atingir regiões indenes alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos. O Brasil é responsável pela ocorrência de 90% dos casos de LV da América Latina (Ministério da Saúde, 1986; Ministério da Saúde, 2009; Gontijo et al, 2004; Alves e Bevilaqua, 2004; São Paulo, 2006).

A LV é considerada endêmica em 21 dos 27 estados brasileiros, acometendo as cinco regiões. Em ordem de importância as principais regiões atingidas são Nordeste, Sudeste, Norte, Centro Oeste e Sul. Nas áreas endêmicas 80% das pessoas infectadas são crianças, apesar da doença poder acometer pessoas de todas as idades, principalmente em novos focos de transmissão. Dentre as pessoas infectadas no Brasil, a maior parte permanece assintomática ou apresenta uma forma leve da doença. O acompanhamento desses indivíduos demonstrou que alguns se mantêm assintomáticos, evoluindo para cura, enquanto outros evoluem para uma forma grave, essa evolução está associada à má nutrição, infecções concomitantes e características genéticas, sendo os dois primeiros fatores de grande importância no Brasil (Ministério da Saúde, 2010; Sá, 2006; OMS, 2012).

No Brasil é estimada uma média anual de mais de 3 mil novos casos de LVA e uma incidência de 1,9 por 100 mil habitantes. A notificação de 90% dos casos da doença na década de 90 era referente à região nordeste, com a expansão para outras regiões esse perfil mudou sendo o nordeste responsável hoje por 48% dos casos (Ministério da Saúde, 2010).

1.15. Leishmaniose Visceral no Estado de São Paulo

No ano de 1978, no Estado de São Paulo, foi relatado o primeiro caso suspeito de leishmaniose humana autóctone na Grande São Paulo, contudo mesmo após realização de inquérito sorológico na região não foi possível identificar a fonte de infecção e o seu mecanismo de transmissão (Iversson et al, 1979).

O primeiro caso de LVA humano autóctone confirmado no estado de São Paulo foi relatado no ano de 1999 no município de Araçatuba; os casos relatados anteriormente a esse registro revelavam-se como casos importados (São Paulo, 2006).

Em 1998 em Araçatuba foram detectados cães com suspeita de LVA, exames parasitológicos direto detectaram a presença de *Leishmania* sp. A presença do agente etiológico associada à presença do vetor, detectada no município em 1997, deu início à investigação epidemiológica que identificou, por meio de técnicas moleculares, a espécie *L. chagasi* (São Paulo, 2006; Costa et al, 1997).

No ESP desde 1999, quando foi relatado o primeiro caso humano autóctone, a doença tem se expandido de acordo com a adaptação do vetor ao meio urbano e o fluxo migratório de cães infectados (São Paulo, 2006).

A classificação epidemiológica dos 645 municípios do ESP até dezembro de 2012, conforme preconizado no Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo (PVCLVAESP), revelou a transmissão de LV em 105 municípios, desses 70 apresentam casos humanos e caninos autóctones, 5 apenas com casos humanos autóctones e 30 apenas com autoctonia canina. O vetor *Lu. longipalpis* foi encontrado em 148 municípios dos quais 100 apresentam a transmissão canina ou humana e 48 não apresentam transmissão. Em seis municípios com transmissão autóctone não foi detectada a presença do vetor.

A figura 3 apresenta a distribuição da classificação epidemiológica para LVC dos municípios paulistas (Rangel et al, 2013).

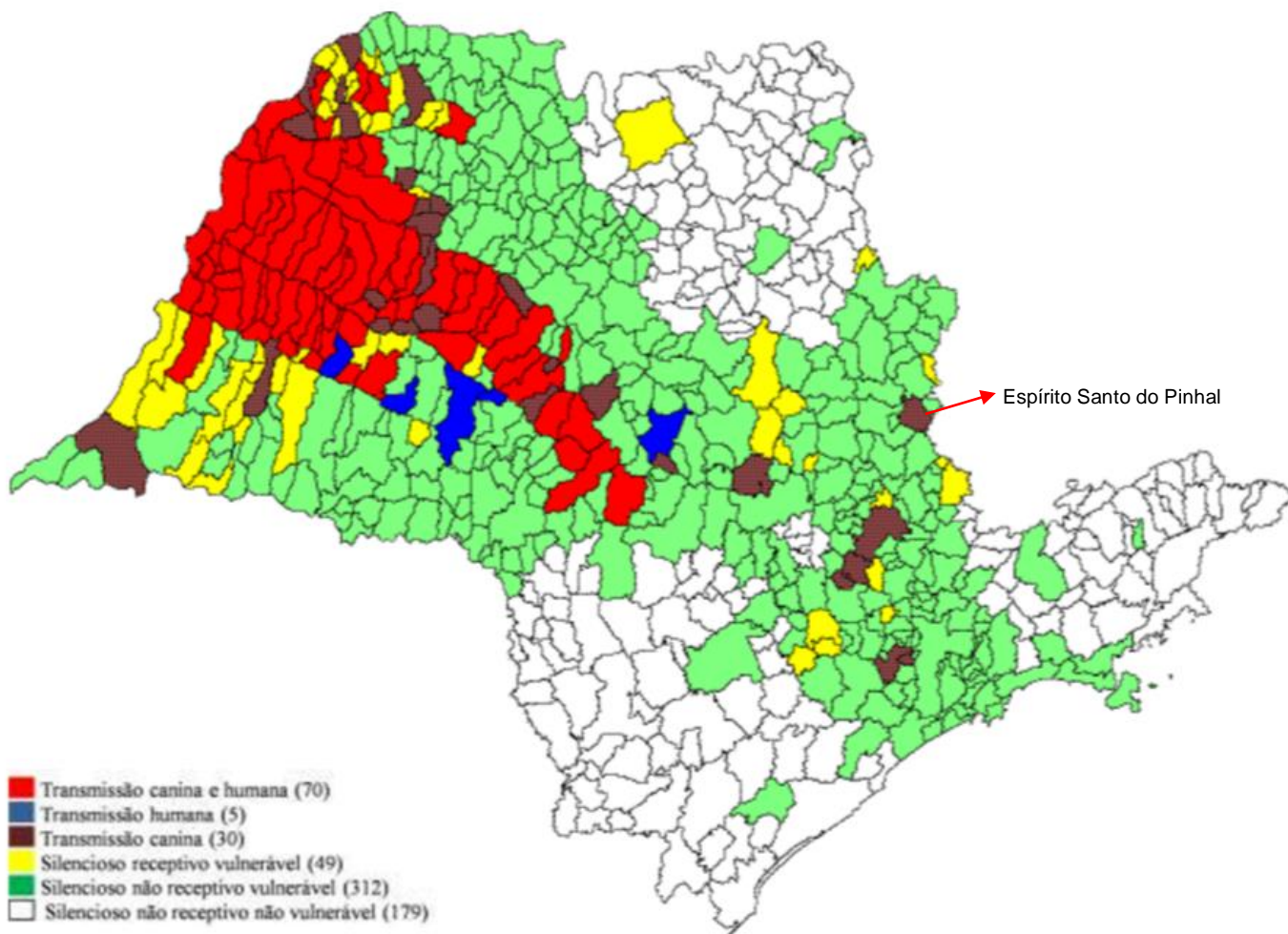


Figura 3: Distribuição de municípios do Estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral americana em dezembro de 2012.

Fonte: Rangel et al, 2013.

1.16. LV no município de Espírito Santo do Pinhal - SP

A detecção da presença do vetor da LVA no município de Espírito Santo do Pinhal – SP se deu através de uma pesquisa entomológica realizada no ano de 1993 com o intuito de identificar o agente transmissor da leishmaniose cutânea. Nessa ocasião, diversos flebotomíneos foram encontrados, dentre eles *Lu. longipalpis* na área rural. Em 2000 foi constatada a presença do vetor da LVA também na área urbana (Casanova, 2006).

Um estudo realizado por Colla-Jacques et al, 2010 identificou 17 espécies de flebotomíneos no município de Espírito Santo do Pinhal, sendo que a maioria

dessas espécies foi detectada nas áreas rural e periurbana. A área urbana apresentou predomínio de *Lu. longipalpis*, cuja população se mostrou numericamente mais estável durante todo o período do estudo, em relação as demais espécies, fator que se explicou pela maior estabilidade no que se refere as variações ambientais da área urbana quando comparada à área rural.

Em agosto de 2004 foi diagnosticado o primeiro caso canino autóctone, passando o município a ser classificado como município com transmissão para LVA em agosto de 2005. Nesse mesmo ano foi realizado o primeiro inquérito sorológico canino amostral em todo o município que obteve a soroprevalência de 34,8%. A partir de então, iniciaram-se medidas para controle da doença através de ações educativas, manejo ambiental, identificação e eutanásia dos cães soropositivos, que nesse caso atingiu 55% dos casos.

Seguindo as recomendações do Programa de Controle, os inquéritos utilizaram amostragem por conglomerados tendo como referência a setoriação AEDES, de acordo com essa classificação o município é dividido em quatro setores.

Em 2010 foi realizado inquérito amostral nos quatro setores do município para avaliar as taxas de prevalência, uma vez que as ações de controle do reservatório canino estavam interrompidas. A análise dos resultados obtidos nesse inquérito indicou prevalência global de 7,06% (67/949). O setor 3 foi o de maior prevalência, 9,68% (18/186), entre os quatro setores municipais em 2010. Assim, em 2012, priorizou-se realizar o inquérito sorológico canino no setor 3, já empregando o novo protocolo diagnóstico (TR-DPP® e ELISA) recomendado pelo PVCLVA.

Entre agosto de 2013 e fevereiro de 2014 foi realizado o último inquérito, até o momento, que foi do tipo censitário, incluindo os quatro setores do município.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Analisar o desempenho do novo protocolo, TR-DPP® e ELISA BioManguinhos, assim como o possível impacto na soroprevalência do município de Espírito Santo do Pinhal (SP) em decorrência da mudança do protocolo diagnóstico da LVC.

2.2. Objetivos Específicos

- Comparar os resultados obtidos nos inquéritos de 2012 e 2014 com os de 2010 quando ainda se empregava o antigo protocolo.
- Analisar o desempenho dos testes TR-DPP®/ELISA frente ao soro de cães infectados por outros patógenos: *Toxoplasma gondii*; *Neospora caninum*; *Babesia canis*; *Ehrlichia canis* e *Trypanosoma cruzi*.
- Realizar diagnósticos sorológicos para infecção por outros patógenos em grupos de animais sororeagentes para LVC em uma ou mais técnicas e em grupo de cães soronegativos nos testes ELISA, RIFI e TR-DPP®.
- Avaliar o emprego das técnicas laboratoriais ELISA, RIFI e TR-DPP® nos diferentes protocolos diagnósticos empregados pelo PVCLV.
- Realizar a identificação espécie específico por PCR do agente causal da LVC nos animais soropositivos recolhidos para eutanásia no inquérito de 2012 (n=12).

3. METODOLOGIA

O estudo teve por base os inquéritos soroepidemiológicos para o diagnóstico da LVC nos anos de 2010 (antigo protocolo), 2012 e 2014 (novo protocolo) realizados como parte das ações de vigilância e controle da LVC no município de Espírito Santo do Pinhal, segundo os protocolos diagnósticos preconizados para cada ano. O termo prevalência foi adotado tendo como referência a terminologia empregada no PVCLVA no Estado de São Paulo e também considerando que os inquéritos de 2012 e 2014 foram censitários no setor 3 (São Paulo, 2006).

3.1. Área de estudo

O município de Espírito Santo do Pinhal (SP) está localizado a 200 Km da capital, na latitude 22°11'27" sul e longitude 46°44'27" oeste, a média de altitude é de 870 metros acima do nível do mar, o clima é subtropical com inverno seco. O município faz divisa ao norte com São João da Boa Vista (SP), a noroeste com Santo Antônio do Jardim (SP), a leste com Albertina (MG), a sudoeste com Jacutinga (MG), ao sul com Itapira (SP) e Mogi-Guaçu (SP) e a sudoeste com Mogi-Guaçu (SP). Possui área total de 390,40 Km², o censo em 2005 foi de 42.630 habitantes, sendo a densidade demográfica de 108,20 habitantes/Km².

Espírito Santo do Pinhal é um município com transmissão de leishmaniose visceral canina. Também tem registro de casos de leishmaniose tegumentar americana desde 1998 (Rangel 2013; São Paulo, 2015).

O município está dividido em 4 setores e a análise dos inquéritos com o novo e antigo protocolo diagnóstico levou em conta apenas os dados do setor 3.

3.2. Animais incluídos no estudo

Grupo I, constituído por 186 cães pertencentes ao setor 3 do município de Espírito Santo do Pinhal que participaram do inquérito sorológico amostral realizado em 2010 que utilizou os testes ELISA (triagem) e RIFI (confirmatório); **Grupo II**, constituído por 1.909 cães pertencentes ao setor 3 do município de Espírito Santo do Pinhal, avaliados no inquérito sorológico censitário de 2012 que utilizou os testes TR-DPP® (triagem) e ELISA (confirmatório); **Grupo III**, constituído por 2.059 cães do setor 3 do município de Espírito Santo do Pinhal, examinados no inquérito sorológico censitário de 2014 que empregou os testes TR-DPP® (triagem) e ELISA (confirmatório); **Grupo IV**, grupo controle negativo, constituído por 73 soros de cães gentilmente cedidos pelo laboratório veterinário CEDIVET do município de Rio Claro - SP, área silenciosa para LVC, porém com transmissão para leishmaniose tegumentar; **Grupo V**, constituído por 22 cães infectados com outros patógenos: *Toxoplasma gondii* (n=6), *Neospora caninum* (n=6), *Babesia canis* (n=6), gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Solange Gennari e por Herbert Soares Souza, aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação, ambos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZUSP); *Ehrlichia canis* (n=2), gentilmente cedidos pelo Prof.Dr. Marcelo Bahia Labruna e Jonas Moraes Filho, aluno de Pós-doutorado do Programa de Pós-Graduação, ambos da FMVZUSP; e *Trypanosoma cruzi* (n=2), gentilmente cedidos pela Dra. Simone Baldini Lucheis, pesquisadora científica da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA). Os soros destes animais foram empregados na análise de reação cruzada dos testes TR-DPP e ELISA

3.3. Diagnóstico Laboratorial

As análises foram realizadas nos laboratórios do IAL Central/São Paulo, no IAL Regional/Rio Claro e também no laboratório do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Espírito Santo do Pinhal.

3.4. Diagnóstico sorológico para LVC

O diagnóstico da LVC nos inquéritos seguiu o protocolo estabelecido pelo PVCLVA, de acordo com o preconizado em cada ano. Até 2012 no Estado de São Paulo, soros reagentes no teste de triagem e não reagentes no confirmatório eram considerados inconclusivos sendo solicitada uma nova coleta após um mês, para novo diagnóstico pelos mesmos testes. De acordo com a orientação do Ministério da Saúde, no inquérito de 2014, (Grupo II) soros com essas características passaram a ser consideradas negativas.

Paralelamente aos protocolos específicos aos inquéritos foram realizadas outras análises para cada grupo.

A figura 4 apresenta o protocolo diagnóstico empregado para o Grupo I, de acordo com o programa. Foi realizado também o TR-DPP® de todas as amostras (n=186).

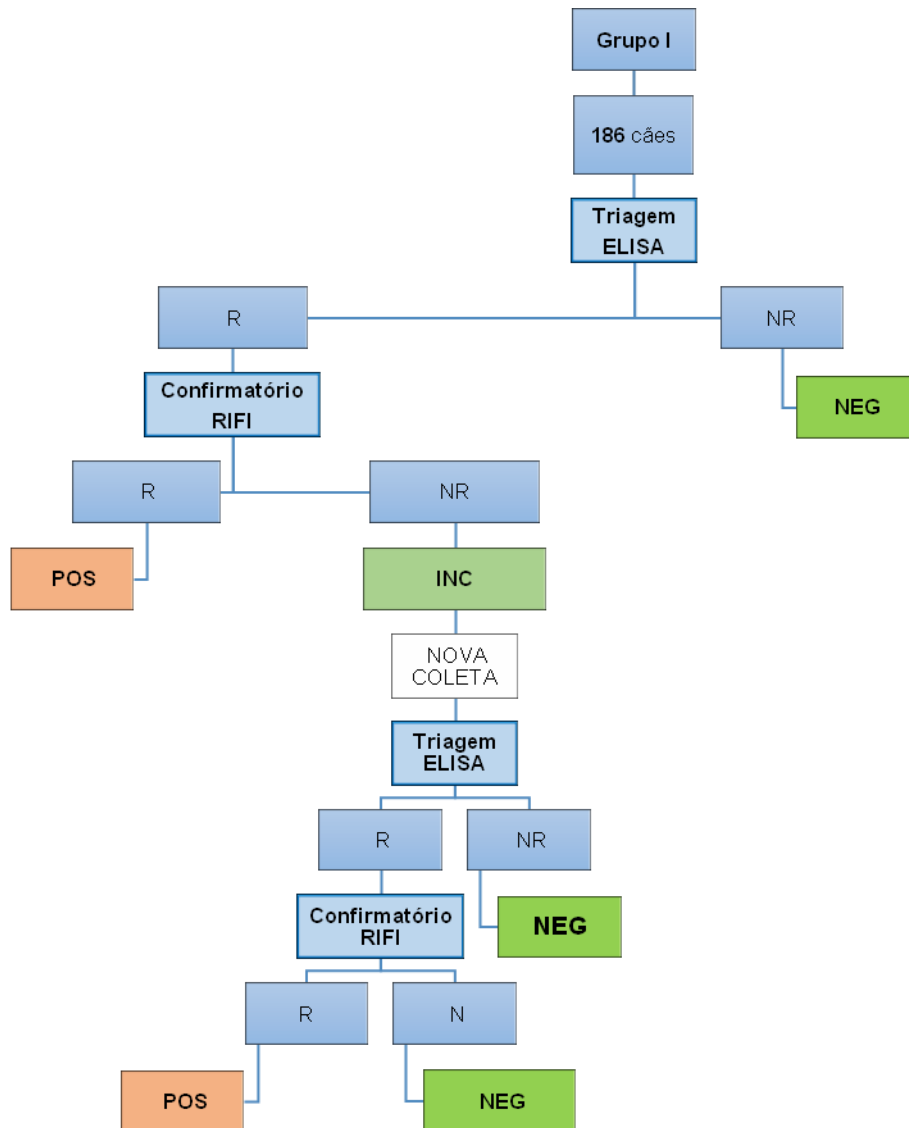


Figura 4: Protocolo diagnóstico utilizado no inquérito de 2010 (Grupo I) de acordo com o PVCLVA. (POS: positivo; NEG: negativo; INC: Inconclusivo; R: reagente e NR: Não Reagente).

A figura 5 apresenta o protocolo diagnóstico empregado para o Grupo II, de acordo com o programa. Foi realizado também o ELISA de soros não reagentes no TR-DPP® (n=808) e a RIFI de soros de cães presentes no inquérito de 2010 (n=59).

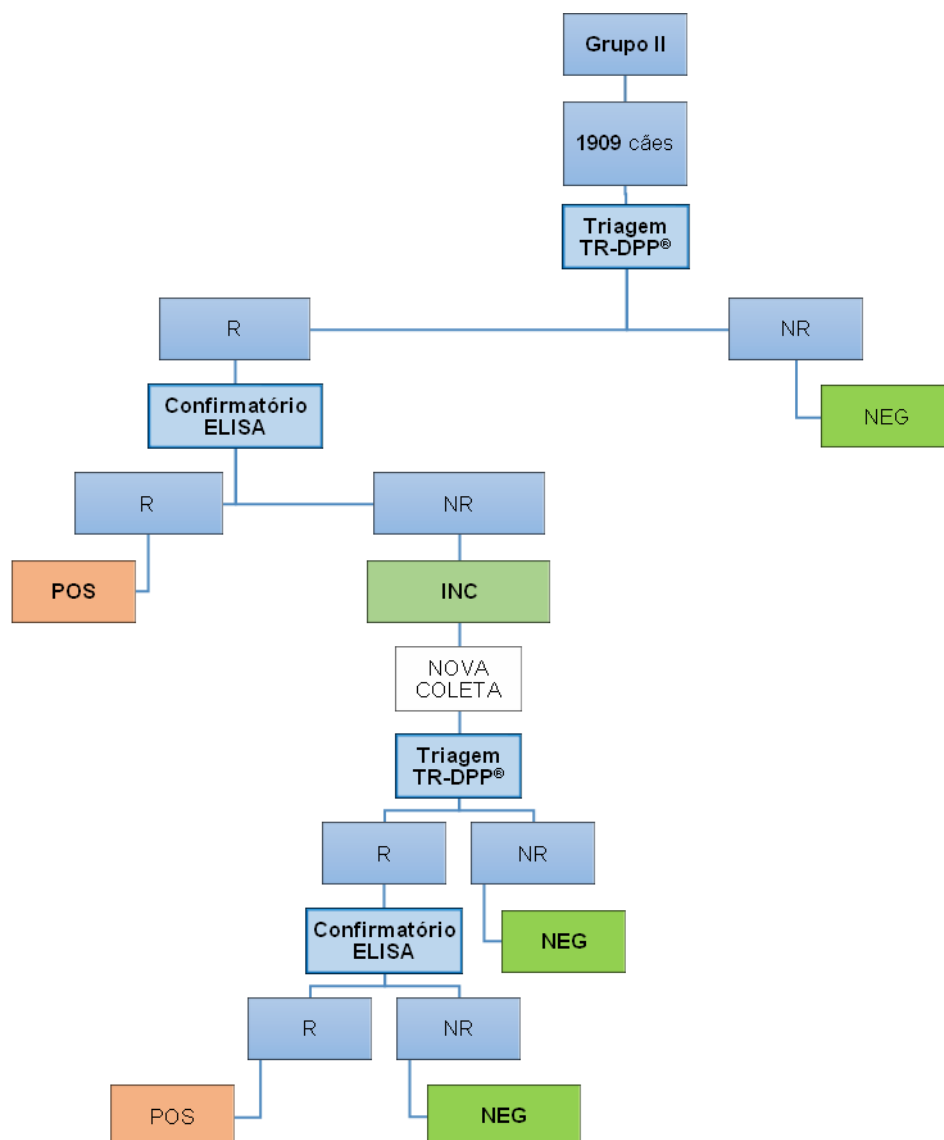


Figura 5: Protocolo diagnóstico utilizado no inquérito de 2012 (Grupo II) de acordo com o PVCLVA. (POS: positivo; NEG: negativo; INC: Inconclusivo; R: reagente e NR: Não Reagente).

A figura 6 apresenta o protocolo diagnóstico empregado para o Grupo III, de acordo com o programa.

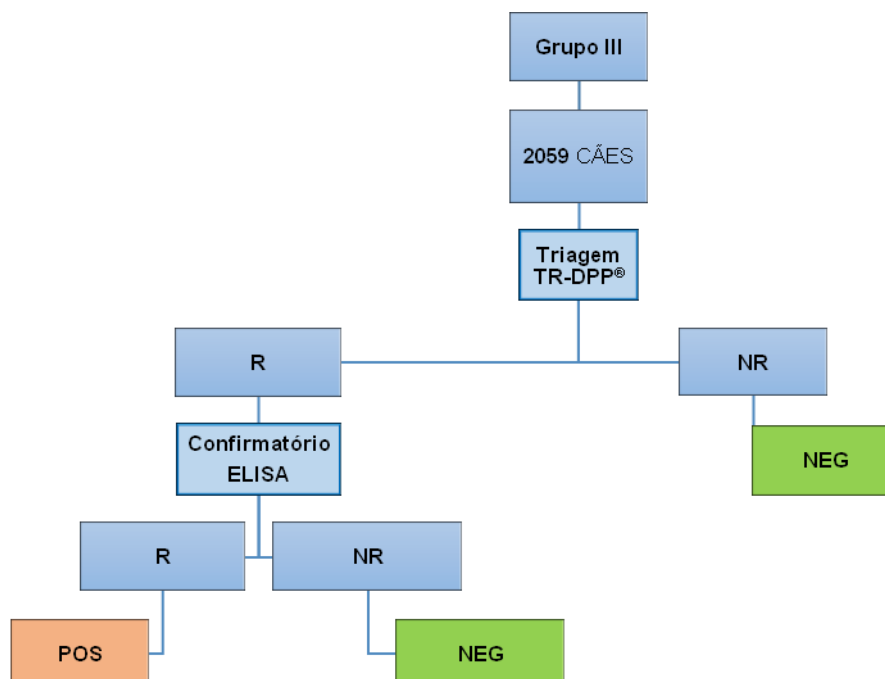


Figura 6: Protocolo diagnóstico utilizado no inquérito de 2014 (Grupo III) de acordo com o PVCLVA. (POS: positivo; NEG: negativo; R: reagente e NR: Não Reagente).

No Grupo IV, que corresponde ao grupo controle negativo, foram realizados os testes TR-DPP®, ELISA e RIFI de todas as amostras (n=73).

No Grupo V, que corresponde aos soros de cães infectados por outros patógenos, foram realizados os testes TR-DPP® e ELISA de todas as amostras (n=22).

3.5. Diagnóstico sorológico para outros patógenos

Foi realizado o teste imunocromatográfico SNAP®4Dx® Idexx laboratories, para a detecção de antígeno de *Dirofilaria immitis*, e dos anticorpos anti-*Anaplasma phagocytophilum*, anti-*Borrelia burgdorferi* e anti-*Ehrlichia canis* em

soro canino. Foram seguidas as instruções do fabricante para realização dos testes (anexo 1).

Foram submetidos ao teste todos os cães soropositivos para infecção por *L. i. chagasi* entregues para eutanásia do Grupo II (n=12). Soros selecionados aleatoriamente do Grupo II (n=40) e do Grupo IV (n=18) que obtiveram resultado reagente apenas no TR-DPP® ou no ELISA. Também foram avaliadas as amostras do grupo V de cães com *E. canis* (n=2) e *T. cruzi* (n=2). Foi considerado reagente qualquer surgimento de cor nos pontos correspondentes a *E. canis*, *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* e *D. immitis* e não reagentes quando visualizada cor apenas no ponto do controle positivo (figura 7).

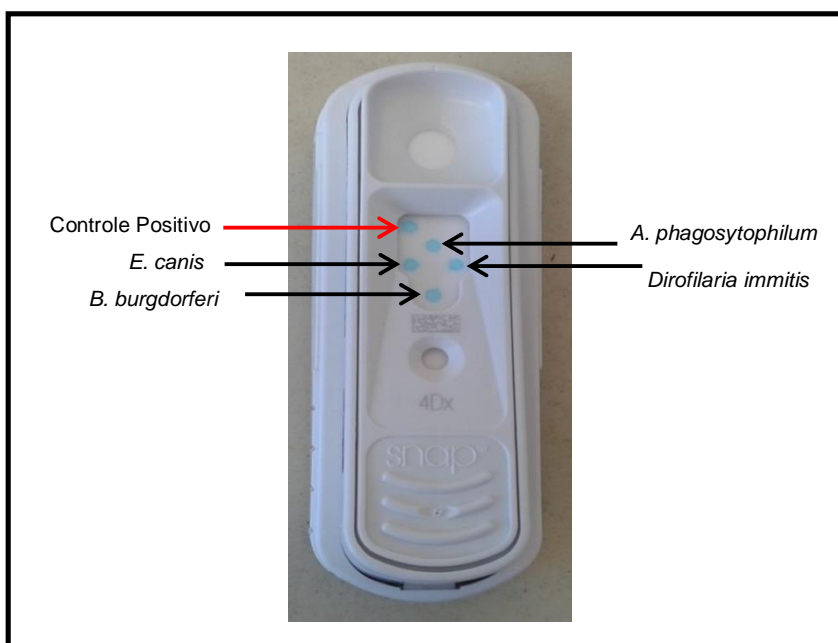


Figura 7: Teste imunocromatográfico SNAP®4Dx®, as setas indicam as posições impregnadas com antígeno ou anticorpo na janela de resultados, para os respectivos antígenos.

3.6. Procedimentos realizados na eutanásia dos cães soropositivos no inquérito de 2012 (Grupo II) no município de Espírito Santo do Pinhal.

Os cães soropositivos entregues pelos proprietários (n=12) tiveram uma nova amostra de sangue coletada antes da eutanásia, para nova realização do TR-DPP® e do ELISA. Foi realizado também o diagnóstico clínico e a necropsia, por médico veterinário do IAL. Foram coletados fragmentos de pele, linfonodo, baço, fígado, aspirado de medula óssea e aspirado de linfonodo. Um fragmento de cada órgão foi armazenado em tubo seco para realização da PCR e em tubo com glicerina e gentamicina para realização da cultura. A partir de um fragmento de cada órgão foram confeccionadas lâminas através de *imprint* para o exame direto, todas devidamente identificadas.

3.6.1. Exame Parasitológico Direto

O exame parasitológico direto, para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp, foi realizado através de *imprint* (impressão citológica do fragmento de tecido recém coletado) de baço, fígado, linfonodo, pele sã e com lesão e aspirado de medula óssea dos cães do Grupo II soropositivos entregues para eutanásia (n=12), conforme recomendado pelo PVCLVA. As lâminas foram coradas pela técnica de coloração de Giemsa. Essa etapa foi realizada no Centro de Laboratórios Regional de Rio Claro do IAL.

3.6.2. Isolamento do agente etiológico dos animais positivos para infecção por *Leishmania*

A técnica de isolamento foi realizada através de cultura em tubos de ensaio de 16 x 160 mm, a partir dos fragmentos de baço, fígado, linfonodo, pele

sã e com lesão e aspirado de medula óssea dos cães do Grupo II soropositivos entregues para eutanásia (n=12), conforme recomendado pelo PVCLVA. Os meios de cultura utilizados foram o meio sólido Blood Agar Base (BAB) e o caldo Brain Heart Infusion (BHI). A técnica de isolamento foi realizada no Centro de Parasitologia e Micologia – Laboratório de Parasitologias Sistêmicas do IAL Central de São Paulo.

3.6.3. Reação pela Polimerase em Cadeia (PCR)

Para a realização da PCR foi empregado o protocolo descrito por Gomes et al, 2007. O diagnóstico molecular foi realizado no Centro de Parasitologia e Micologia – Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos do Instituto Adolfo Lutz Central de São Paulo.

Para a identificação do agente etiológico, a PCR foi realizada em amostras de fragmentos de baço, fígado, pele sã e de linfonodo dos 12 animais soropositivos do Grupo II, entregues para a eutanásia. A extração de DNA foi realizada a partir da lise celular. Para isso, o material foi macerado e acondicionado em tubo cônico (Eppendorf) com capacidade para 1,5 mL no qual foi adicionado aproximadamente 400 µL de tampão de Lise com Proteinase K. Foi realizada a incubação de 30-40 minutos em banho-maria (Fanem) à 56°C.

Após a realização da lise celular, as amostras foram purificadas e foi realizada a extração do DNA, em tubo cônico contendo a amostra foi adicionado aproximadamente 200µL de Fenol equilibrado pH 8.0. O conteúdo foi homogeneizado e centrifugado por 10 min a 6720g. O sobrenadante (fase aquosa - DNA) foi transferido para um novo tubo e o tubo contendo o pellet foi descartado.

Foi adicionado ao tubo do sobrenadante 200µL de clorofórmio-isopropanol gelado (24:1 - clorofórmio 4,8ml + isopropanol 0,2mL), sendo o tubo homogeneizado e centrifugado por 10 min a 6720g. O sobrenadante (fase aquosa - DNA) foi novamente transferido para um novo tubo e o que continha o novo pellet foi descartado.

Após todo o processo de purificação e extração, o DNA foi precipitado, para isso, foi adicionado ao tubo contendo o DNA, três vezes o volume de isopropanol gelado. O tubo foi homogeneizado para ocorrer a precipitação do DNA e foi centrifugado por 10 min a 6720g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspendido com 200µL de Etanol 70% gelado. Foi realizada centrifugação por 10 min a 15300g. O tubo foi deixado em temperatura ambiente com a tampa aberta coberto com papel para a secagem da amostra. Finalmente foi adicionado 50µL de H₂O + RNase e o DNA foi estocado em freezer à temperatura de -20°C até o momento da realização da PCR.

Para a identificação de *L.(L.) chagasi* foram utilizados *primers* que amplificam um fragmento de 145 pb de uma região variável do minicírculo do kDNA (região LT1), específica para o complexo *L.(L.) donovani*:

RV1 (5'-CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G-3');

RV2 (5'- CCA CCT GGC CTA TTT TAC ACC A-3').

Em um tubo cônico específico para a PCR (com capacidade para 500µL ou 200µL), foi adicionado 12,5µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 0,5µL do “primer” x, 0,5µL do “primer” y, 6,5 µL de H₂O MilliQ autoclavada e 5µL de DNA (amostra), obtendo-se 25µL de volume final. O tubo foi homogeneizado pelo agitador de tubos (Quimis) e colocado no termociclador MYGENE Series Gradient Thermal Cycler model MG 96G Long (Gomes et al., 2007).

- *Primers* RV1 e RV2 – Para amplificação de regiões não conservadas do minicírculo de kDNA produzindo fragmentos de 145 pares de bases. A PCR está padronizada para um ciclo inicial à 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente à 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e, 72°C por 30 segundos; ao final um ciclo à 72°C por 5 minutos e resfriamento à 4°C (Gomes et al., 2007).

Após a realização da PCR, os produtos amplificados foram separados em sistema eletroforético horizontal em gel de agarose a 2% em TBE pH 8,0 (Tris-Borato 0,045M; EDTA 0,001M) com 0,5 µL/mL brometo de etídio juntamente com o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pb em uma velocidade de 6V/cm. Os géis contendo as amostras foram visualizados em um

transluminador com luz ultravioleta e as imagens captadas pelo GeneGenius - Programa GeneSnap, Syngene, versão 6.08.04 a uma longitude de onda de 302 nm (Sambrook et al., 1989).

3.7. Aspectos éticos

O presente projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-Instituto Adolfo Lutz/Instituto Pasteur. Foram respeitados os princípios estabelecidos na Resolução nº714 de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

3.8. Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados a partir da construção de tabelas de contingência 2 x 2 e 2 x 3. Foram calculados o percentual de concordância e o índice Kappa entre os diferentes testes. Na interpretação do índice Kappa, o valor 0 indica ausência de concordância e 1 concordância total. A relação entre as variáveis foi analisada pela utilização do teste qui-quadrado (χ^2). O teste de Fisher foi aplicado quando os valores esperados foram inferiores a 5 e a significância estatística determinada para “P” menor ou igual a 0,001; com intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS

A figura 8 apresenta o fluxograma dos inquéritos sorológicos caninos realizados nos anos 2010, 2012 e 2014 e os resultados obtidos de acordo com os protocolos diagnósticos empregados.

4.1. Prevalência para LVC no setor 3 de Espírito Santo do Pinhal, com base nos inquéritos realizados em 2010, 2012 e 2014.

A tabela 1 apresenta as prevalências para LVC, de acordo com os protocolos determinados pelo PVCLVA, obtidas nos inquéritos sorológicos no setor 3 de Espírito Santo do Pinhal nos anos de 2010, 2012 e 2014 que foram de 9,7%, 2,4 % e 0,8 %, respectivamente. Os valores do X^2 e dos IC revelaram que as prevalências encontradas são estatisticamente diferentes.

Em 2010, no restante do município as prevalências observadas no inquérito amostral foram de 6,70; 5,43 e 8,08%, respectivamente para os setores 1; 2 e 4. Em 2014, no inquérito censitário, foram de 1,37; 0,52 e 0,78%, respectivamente para os setores 1; 2 e 4 (Relatórios do Serviço Regional de Saúde – GVE/São João da Boa Vista, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo).

Tabela 1: Prevalência da LVC no setor 3 de Espírito Santo do Pinhal, nos anos de 2010 (Grupo I), 2012 (Grupo II) e 2014 (Grupo III).

	Ano do Inquérito		
	2010 Grupo I	2012 Grupo II	2014 Grupo III
Algoritmo empregado	ELISA/RIFI	TR-DPP/ELISA	TR-DPP/ELISA
Animais Positivos (%)	18 (9,7)	45 (2,4)	16 (0,8)
Animais Negativos (%)	168 (90,3)	1.864 (97,6)	2.043 (99,2)
Total	186	1.909	2.059
Prevalência/IC (%)*	9,7(5,9-15,1)	2,4(1,7-3,1)	0,80(0,5-1,3)

* $\chi^2 = 76.3623$, gl = 2, $p < 2.2 \text{ e } -16$

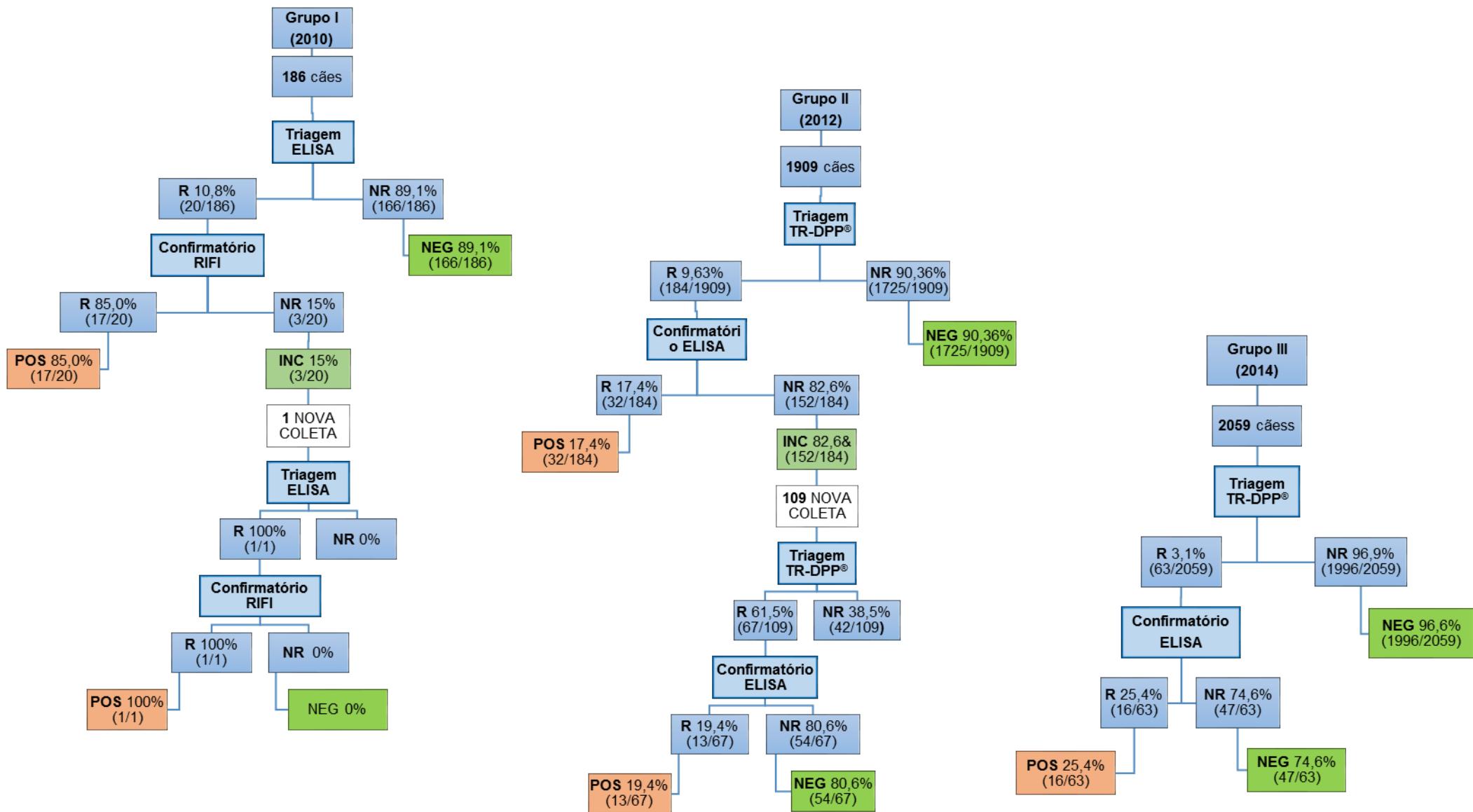


Figura 8: Resultados dos protocolos diagnósticos para LVC realizados nos inquéritos de 2010 (Grupo I), 2012 (Grupo II) e 2014 (Grupo III).

*POS: positivo; NEG: negativo; INC: inconclusivo; R: Reagente e NR: Não Reagente.

O inquérito de 2010 (Grupo I) foi amostral e avaliou 186 cães através do protocolo diagnóstico ELISA/RIFI. O inquérito de 2012 (Grupo II) avaliou 1.909 cães e o de 2014 (Grupo III) avaliou 2.059, ambos os inquéritos foram censitários e empregaram o novo protocolo TR-DPP®/ELISA.

Houve uma redução de 75,3% na prevalência da infecção canina entre os anos de 2010 (Grupo I) e 2012 (Grupo II), e de 66,6% entre 2012 e 2014 (Grupo III) quando considerado os protocolos diagnósticos recomendados pelo programa para cada ano (tabela 1).

A figura 9 é a representação gráfica dos valores apresentados na tabela 1.

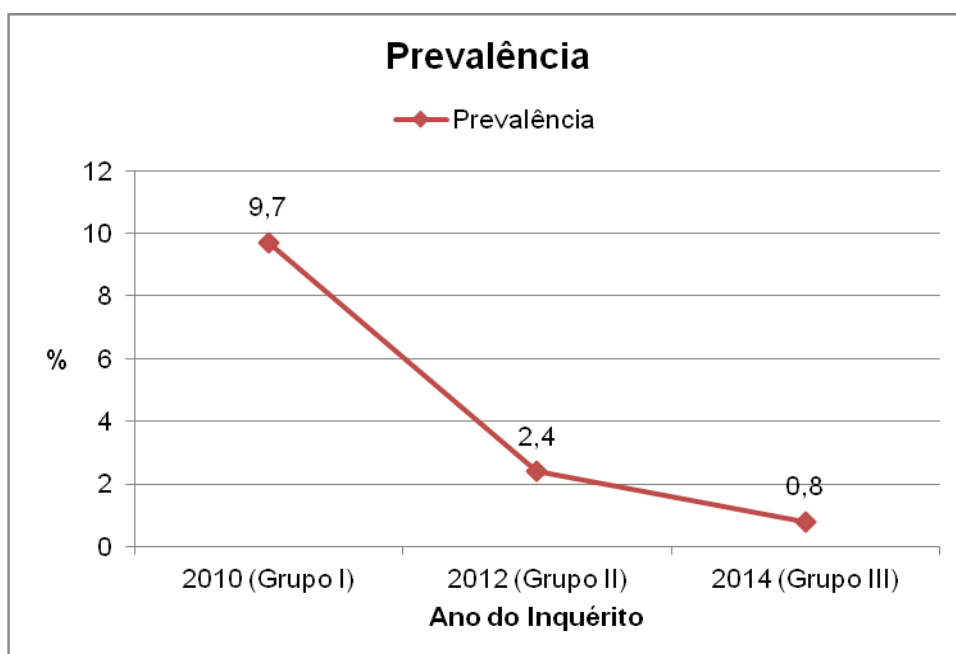


Figura 9: Prevalência da LVC no setor 3 do município de Espírito Santo do Pinhal, nos anos de 2010 (Grupo I), 2012 (Grupo II) e 2014 (Grupo III).

4.2. Impacto do emprego do TR-DPP®/ELISA nos valores da soroprevalência canina do município de Espírito Santo do Pinhal no inquérito de 2010.

No intuito de verificar se o emprego do TR-DPP®/ELISA resultaria em mudança nos valores de prevalência encontrados no inquérito de 2010 quando se utilizou ELISA/RIFI, todos os soros de 2010 foram testados com o novo protocolo. Os resultados apontaram uma redução de 9,7 % para 3,8 % (tabela 2). Embora os IC produzidos separadamente se sobreponham o valor de X^2 revela que as prevalências encontradas são estatisticamente diferentes.

Tabela 2: Comparação da prevalência para LVC obtida no ano de 2010 com base nos dois protocolos diagnósticos.

Algoritmo empregado	Grupo I	Grupo I
	2010	2010
	ELISA/RIFI	TR-DPP®/ELISA
Reagente (%)	18 (9,7)	7 (3,8)
Não reagente (%)	168 (90,3)	179 (96,2)
Total	186	186
Prevalência/IC (%)*	9,7 (5,9-15,1)	3,8 (1,7-7,9)

* $X^2 = 4.2882$, gl = 1, p = 0.03838

Quando considerado os resultados obtidos adotando-se o novo protocolo diagnóstico em 2010, nota-se uma redução de 34,8%, evidenciando os resultados obtidos em 2012 e 2014 (figura 10).

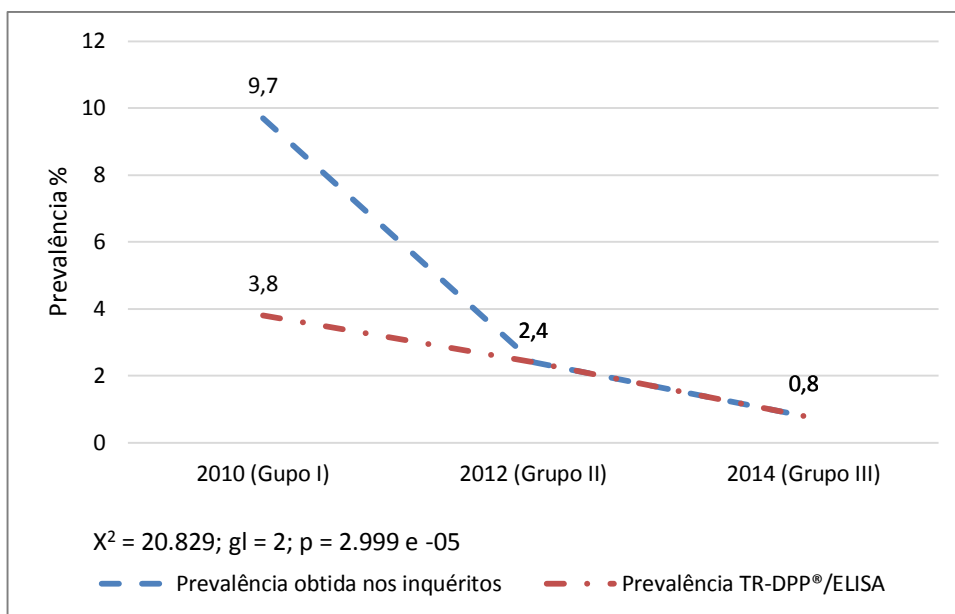


Figura 10: Comparação entre as taxas de prevalência da LVC obtidas para as amostras de soro sanguíneo coletadas em 2010 com a utilização dos protocolos diagnósticos ELISA/RIFI e TR-DPP®/ELISA.

4.3. Concordâncias entre os testes de triagem e confirmatórios

Todos os soros reagentes nos testes de triagem foram submetidos à confirmação pela RIFI ou ELISA, de acordo com o protocolo diagnóstico empregado. A RIFI confirmou o resultado positivo em mais de 80,0% dos soros (figura 11). Em contraposição, apenas cerca de 20% dos soros reagentes no TR-DPP® foram confirmados pelo ELISA (figura 11). Os resultados dos cães inconclusivos, nos inquéritos de 2010 e 2012, que tiveram uma nova amostra de soro analisada após um mês, corroboraram com os obtidos na análise das primeiras amostras, pois, dos soros reagentes na triagem 100% (1/1) em 2010 e 19,4% (13/109) em 2012 obtiveram o mesmo resultado no teste confirmatório.

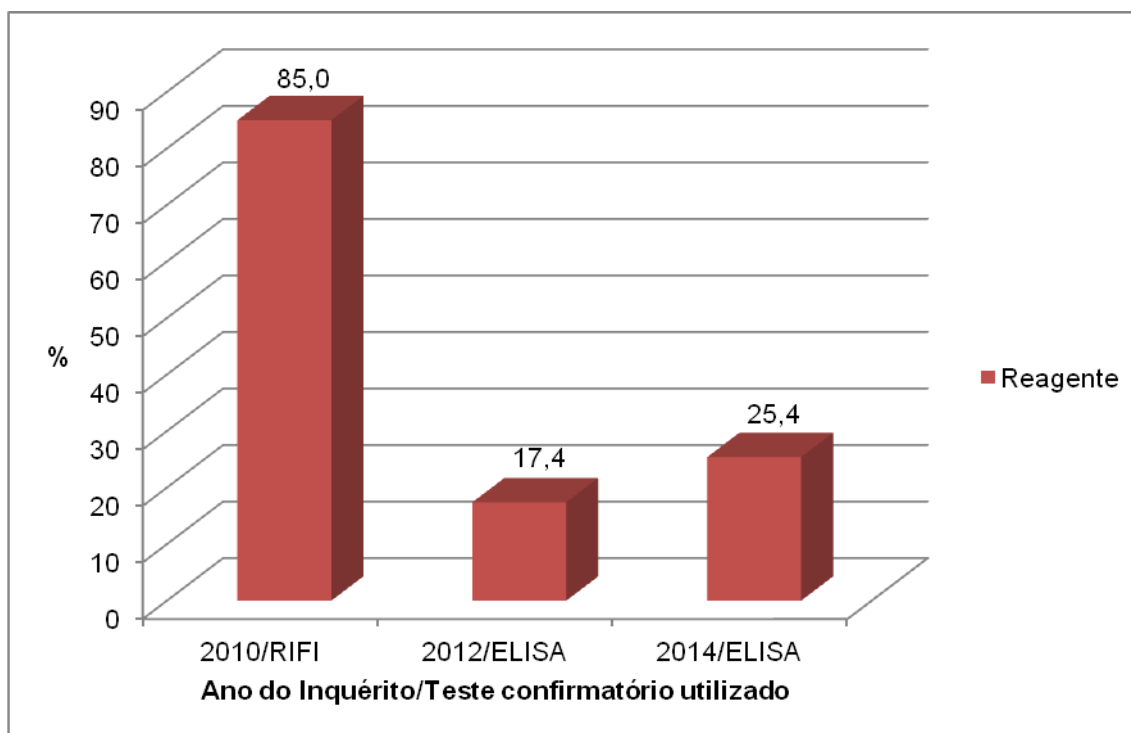


Figura 11: Porcentagem de reagentes nos testes confirmatórios, RIFI (inquérito de 2010) e ELISA (inquéritos 2012 e 2014) de casos soropositivos na triagem.

Ainda para verificar a concordância entre o TR-DPP® e o ELISA, foram testados 992 soros do Grupo II, composto pelos 184 soros reagentes no TR-DPP® e 808 soros selecionados aleatoriamente dentre os 1725 não reagentes nesse teste. Esses soros foram então analisados pelos dois testes (tabela 3).

Os soros foram negativos em 73,7% das amostras nos dois testes (731/992). Dos 109 positivos no ELISA (32+77 = 109), 29,4% (32/109) foram positivos pelo teste rápido e 70,6% (77/109) discordaram. As porcentagens de concordância (confirmação) foram semelhantes às encontradas nos inquéritos quando foi utilizado o TR-DPP® como triagem, seguido do ELISA como confirmatório (figura 11).

Dos testes negativos no ELISA (731 + 152 = 883), 17,2 % (152/883) foram positivos no teste rápido e 82,8% (731/883) foram concordantes mostrando que se o TR-DPP® for negativo ou ELISA for negativo, a chance de ser negativo por ambos os testes é alta.

A análise da concordância entre ELISA e TR-DPP[®], pelo índice KAPPA, pode ser considerado muito baixo. O teste foi estatisticamente significativo.

Tabela 3: Resultados do TR-DPP[®] e ELISA para 992 soros do Grupo II.

		TR-DPP [®]		TOTAL
		Reagente	Não reagente	
ELISA	Reagente	32	77	109
	Não reagente	152	731	883
TOTAL		184	808	992

Kappa de cohen ponderado 0.0933 IC: (0,025-0,16) $X^2 = 8.6838$, gl = 1, p = 0.00321

4.4. Avaliação do desempenho dos testes TR-DPP[®] e ELISA frente aos controles negativos e infectados por outros patógenos

Foram testados os 73 soros do Grupo IV (controle negativo) com o intuito de avaliar desempenho do TR-DPP[®], do ELISA e da RIFI. Para esse grupo nenhum soro apresentou resultado reagente no TR-DPP[®], 3 soros foram reagentes no ELISA e 27 na RIFI, revelando assim concordâncias de 100%, 96,0% 63,0%, respectivamente (tabela 4).

Em relação aos 22 soros de cães com outras patologias (Grupo V), não foi observada reatividade cruzada no TR-DPP[®]. No entanto 16,7% (1/6) dos soros dos cães com neosporose, 50,0% (3/6) dos cães com babesiose, 50,0% (1/2) dos cães com erliquiose e 100,0% (2/2) dos cães com doença de Chagas apresentaram resultado reagente no ELISA (tabela 5). Existe sobreposição dos intervalos de confiança dos testes de especificidade TR-DPP[®] e ELISA mostrando que são semelhantes e não sobreposição para RIFI revelando diferença.

Tabela 4: Resultados do TR-DPP®, ELISA e RIFI para diagnósticos da LVC dos 73 soros do Grupo IV (controle negativo).

	TR-DPP®	ELISA	RIFI
Reagente	0	3	27
Não Reagente	73	70	46
Especificidade/IC (%)	100,0 (95,0-100,0)	95,8 (88,6-98,6)	63,0 (51,5-73,2)
TOAL	73	73	73

Tabela 5: Número absoluto e porcentagem de reagentes no TR-DPP® e ELISA para os soros dos 22 cães do Grupo V infectados com outros patógenos.

	TR-DPP®	ELISA
	n (%)	n (%)
<i>Toxoplasma gondii</i> (n = 6)	0 (0)	0 (0)
<i>Neospora caninum</i> (n = 6)	0 (0)	1 (16,7)
<i>Babesia canis</i> (n = 6)	0 (0)	3 (50,0)
<i>Ehrlichia canis</i> (n = 2)	0 (0)	1 (50,0)
<i>Trypanosoma cruzi</i> (n = 2)	0 (0)	2 (100)

4.5. Avaliação dos cães soropositivos para LVC recolhidos para eutanásia no inquérito de 2012 (Grupo II)

O inquérito de 2012 (Grupo II) revelou 45 cães soropositivos para LVC. Destes, 12 foram entregues para eutanásia. Nesta população, foram realizados o teste parasitológico, PCR, exame clínico e repetido os testes sorológicos, buscando confirmar o diagnóstico realizado.

Dos cães entregues para eutanásia, 3 cães com diagnóstico inconclusivo na primeira amostra, mas positivos quando uma nova amostra foi analisada após um mês, confirmaram infecção pelo diagnóstico sorológico e parasitológico realizados com as amostras coletadas durante a eutanásia. Os 12 cães apresentaram resultado positivo pelo parasitológico direto e todos

os testados pela PCR (n=11) também o foram. A cultura foi o teste que obteve o menor número de positivos (n=3). Devido à inadequação do material biológico não possível realizar o teste em uma das amostras (tabela 6).

Tabela 6: Resultados das sorologias do inquérito de 2012 (Grupo II) para os cães soropositivos para LVC entregues para eutanásia e dos testes sorológicos, parasitológico direto, cultura e PCR das amostras obtidas na eutanásia (POS = positivo; NEG = negativo; INC = inconclusivo; NÃO REAL = Não Realizado).

TESTE REALIZADO						
	SOROLOGIA			PARASITOLÓGICO DIRETO	CULTURA	PCR
	Inquérito		Eutanásia			
	1ª Amostra	2ª Amostra	Amostra			
1	INC	POS	POS	POS	NÃO REAL	NÃO REAL
2	INC	POS	POS	POS	NEG	POS
3	INC	POS	POS	POS	NEG	POS
4	POS	NR	POS	POS	POS	POS
5	POS	NR	POS	POS	POS	POS
6	POS	NR	POS	POS	NEG	POS
7	POS	NR	POS	POS	POS	POS
8	POS	NR	POS	POS	NEG	POS
9	POS	NR	POS	POS	NEG	POS
10	POS	NR	POS	POS	NEG	POS
11	POS	NR	POS	POS	NEG	POS
12	POS	NR	POS	POS	NEG	POS

O sinal clínico mais frequente nos cães soropositivos para LVC no inquérito de 2012 (Grupo II) entregues para eutanásia foi a esplenomegalia presente em 10 dos 12 cães submetidos ao diagnóstico clínico seguido pela presença de lesões cutâneas presente em 8 dos 12 cães avaliados. Apenas um cão não apresentou sinais clínicos (figura 12).

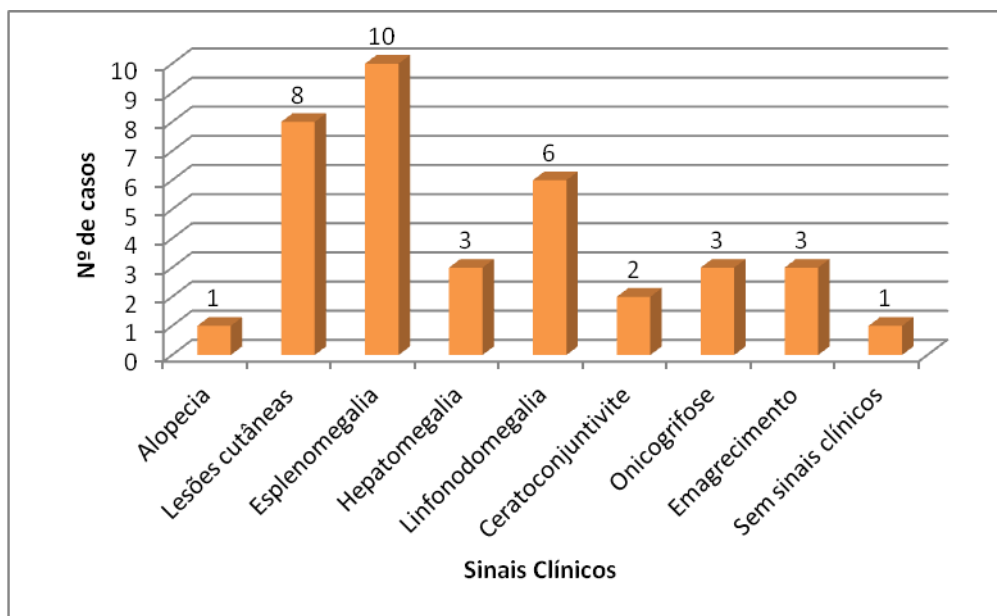


Figura 12: Frequência de sinais clínicos presentes nos cães soropositivos para LVC entregues para eutanásia no inquérito de 2012 (Grupo II).

A figura 13 mostra os principais sinais encontrados nos 12 cães soropositivos entregues para eutanásia no inquérito de 2012 (Grupo II).



Figura 13: Sinais clínicos apresentados pelos cães soropositivos entregues para eutanásia no inquérito 2012 (Grupo II). (A e B) lesão de pele; (C) emagrecimento; (D) onicogrifose; (E) alopecia; (F) ceratoconjuntivite; (G) hepatomegalia (bordo discretamente arredondado); (H) esplenomegalia e (I) linfadenomegalia.

4.6. Seguimento dos cães presentes nos inquéritos 2010 (Grupo I), 2012 (Grupo II) e 2014 (Grupo III).

Dentre os cães avaliados nos inquéritos de 2010 (antigo protocolo), 59 cães foram reavaliados em 2012 (novo protocolo). Destes, 3 cães positivos para LVC em 2010 foram negativos em 2012, no entanto, 53 cães negativos

em 2010 continuaram negativos em 2012 e 3 se tornaram inconclusivos em 2012 (tabela 7). Para verificar possível razão para a mudança de resultado positivo para negativo após dois anos, os soros dos cães com resultado reagente em 2010 (n=3) foram submetidos ao teste para outros patógenos. Apenas 1 apresentou reatividade no teste para *Ehrlichia*.

Tabela 7: Comparação entre os resultados, obtidos nos inquéritos de 2010 (Grupo I) e 2012 (Grupo II) para 59 cães presentes em ambos.

		INQUÉRITO 2012			TOTAL
		Positivos	Negativos	Inconclusivos	
INQUÉRITO 2010	Positivos	0	3	0	3
	Negativos	0	53	3	56
	Inconclusivos	0	0	0	0
	TOTAL	0	56	3	59

Dentre os cães avaliados nos inquéritos de 2012 e 2014 realizados com o mesmo protocolo diagnóstico (novo), 721 cães estiveram presentes em ambos os inquéritos. Dos 697 cães negativos para LVC em 2012, 5 foram positivos, 9 inconclusivos e 683 permaneceram negativos em 2014. Quando observados os casos inconclusivos de 2012 (n=24) verificou-se que 10 permaneceram inconclusivos e 14 foram negativos (tabela 8). O índice KAPPA ponderado pode ser considerado pouco concordante (de 20% a 60%). Teste de exato de Fisher revelou diferenças significativas nos grupos.

Tabela 8: Comparação dos resultados obtidos nos inquéritos de 2012 (Grupo II) e 2014 (Grupo III) para 721 cães presentes em ambos.

		INQUÉRITO 2014 (Grupo III)			TOTAL
		Positivos	Negativos	Inconclusivos	
INQUÉRITO	Positivos	0	0	0	0
2012	Negativos	5	683	9	697
(Grupo II)	Inconclusivos	0	14	10	24
TOTAL		5	697	19	721

Kappa de cohen ponderado 0,41 IC (0,23- 0,58). Teste exato de Fisher simulado para p (com base em 2000 repetições), p=0.0004998.

4.7. Diagnóstico sorológico para outros patógenos

Com o intuito de avaliar se soros reagentes em apenas um dos testes para LVC poderiam ser devido a uma possível reação cruzada com outros patógenos foi realizado o teste imunocromatográfico SNAP® 4Dx®. Foram analisados 52 soros do Grupo II com as seguintes características, soros reagentes apenas no TR-DPP® (n=20), soros reagentes apenas no ELISA (n=20) e soros reagentes no TR-DPP® e no ELISA (n=12) dos cães soropositivos para LVC recolhidos para eutanásia (tabela 9).

Das amostras reagentes apenas no TR-DPP® (n=20) testadas pelo SNAP® 4Dx®, 7 foram reagentes para *Ehrlichia canis* e 2 para *Anaplasma phagocytophilum*. Dentre as reagentes no ELISA (n=20), quando avaliadas pelo SNAP 4dX, 5 foram reagentes para *Ehrlichia canis* e 2 para *Anaplasma phagocytophilum*. Contudo quando os soros dos 12 animais soropositivos para LVC, recolhidos para eutanásia foram testados pelo SNAP® 4Dx®, 6 soros foram reagentes para *Ehrlichia canis* e 2 para *Anaplasma phagocytophilum*.

Tabela 9: Resultado do SNAP® 4Dx® para 52 cães do grupo II

	<i>Ehrlichia canis</i> n (%)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> n (%)	<i>Borrelia burgdorferi</i> n (%)	<i>Dirofilaria immitis</i> n (%)
TRDPP® + (n=20)	7 (35,0)	2 (10,0)*	0 (0)	0 (0)
ELISA + (n=20)	5 (25,0)	2 (10,0)	0 (0)	0 (0)
TRDPP® + / ELISA + (n=12)	6 (50,0)	2 (16,7)	0 (0)	0 (0)

(*) um dos soros reagentes para *Anaplasma phagocytophilum* também foi reagente para *Ehrlichia canis*.

Também foram testados 18 soros do Grupo IV, controle negativo, com as seguintes características, soros não reagentes no TR-DPP®, ELISA e RIFI (n=10) e soros reagentes em pelo menos um dos testes (n=8) (tabela 10).

Tabela 10: Resultado do SNAP® 4Dx® para 18 cães do grupo IV (controle negativo para LVC)

	<i>Ehrlichia canis</i> n (%)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> n (%)	<i>Borrelia burgdorferi</i> n (%)	<i>Dirofilaria immitis</i> n (%)
TRDPP® - / ELISA - / RIFI - (n=10)	3 (30,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ELISA + (n=2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
RIFI + (n=5)	2 (40,0)	1 (20)	0 (0)	0 (0)
ELISA+/RIFI+ (n=1)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

5. DISCUSSÃO

Com o objetivo de aprimorar o diagnóstico da LVC, o Ministério da Saúde estabeleceu a substituição do cenário que utilizava o ELISA como teste de triagem e a RIFI, como teste confirmatório, pelo cenário que utiliza o TR-DPP® como triagem e o ELISA como confirmatório. O TR-DPP® é composto por uma mistura de proteínas recombinantes k28 (k26, k39 e k9) representativas de regiões antigênicas de *L. i. chagasi* (Ministério da Saúde, 2011; Schubach 2011).

Este trabalho avaliou os efeitos dessa mudança na prática dos inquéritos tendo como referência o município com transmissão da LVC, Espírito Santo do Pinhal.

Esse município é classificado desde 2005 como município com transmissão da leishmaniose visceral canina. A presença do vetor *Lu. longipalpis* foi constatada pela primeira vez na área urbana em 2000 e o primeiro caso canino autóctone foi identificado em agosto de 2004 (Casanova, 2006). Contudo, até o momento, não houve registro de caso humano, demonstrando que nesse município o padrão de transmissão da doença parece ser diferente do apresentado em outros municípios, nos quais comumente o registro da doença canina precede o registro de caso humano, como aconteceu em Araçatuba, onde o primeiro caso canino foi detectado em 1998 e no ano seguinte foi constatado o primeiro caso humano (Casanova, 2006; Campos et al, 2013; São Paulo, 2006).

O inquérito de 2005 utilizou amostra de sangue coletado em papel filtro. Foram examinados 3.127 cães sendo a prevalência de 34,5% (1.088/3.127), através do protocolo que utilizava o teste ELISA para triagem e RIFI como confirmatório. Foram recolhidos e eutanasiados 55,1% (599) dos cães soropositivos. O município nunca realizou controle químico de *Lu. longipalpis*,

pois essa medida é adotada apenas para municípios com casos humanos; continuamente realiza programação de ação em saúde, principalmente entre escolares. Porém não há qualquer experiência na realização de avaliação da efetividade dessas ações para o controle da LVC.

A partir dos inquéritos caninos realizados em Espírito Santo do Pinhal, verificou-se que a soropositividade, em termos de número de cães com diagnóstico positivo, vem diminuindo ao longo dos anos. O inquérito de 2005 apontou uma soropositividade de 34,5% no setor 3 do município (Relatórios do Serviço Regional de Saúde – GVE/São João da Boa Vista, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo). No mesmo setor, o inquérito de 2010 revelou 9,7% de prevalência, 2,4% no realizado em 2012 e 0,8% em 2014. Os valores de X^2 e dos IC revelaram que a queda da prevalência nos diferentes inquéritos é estatisticamente significativa, indicando uma redução real.

Há que ser registrado que durante a realização do presente estudo, entre 2010 e 2012, ocorreram mudanças em relação às técnicas empregadas para o diagnóstico da LVC. Porém, entre 2012 e 2014 quando o protocolo diagnóstico incluiu as mesmas técnicas laboratoriais, TR-DPP® como triagem e ELISA confirmatório, observou-se uma redução da soroprevalência, o que reforça a hipótese de queda real na prevalência da leishmaniose canina e não apenas uma redução decorrente das alterações metodológicas empregadas.

Observou-se que se no inquérito de 2010 já tivesse sido adotado o protocolo TR-DPP®/ELISA, haveria uma redução de 61,0% na prevalência (de 9,7 % para 3,8 %), indicando que mais da metade dos cães soropositivos naquele inquérito, seriam soronegativos. A interpretação possível para essa situação incluiria duas possibilidades: a. Resultados falsos positivos e eutanásia de animais não infectados, com a utilização do protocolo diagnóstico anterior; b. Resultados falsos negativos e manutenção de cães infectados no ambiente endêmico, com a utilização do protocolo diagnóstico atual.

Estas diferenças poderiam ser explicadas pela baixa especificidade da RIFI, utilizado em 2010, que confirmou a grande maioria dos casos reagentes no ELISA. Sendo que o teste de ELISA é reconhecido como mais sensível que a RIFI (Laurenti et al, 2014).

Já, em relação aos inquéritos de 2012 e 2014 que empregaram TR-DPP[®]/ELISA, as concordâncias dos resultados, pelo ELISA, para os soros positivos na triagem estiveram em torno de 20%. No estudo realizado por Coura-Vital et al (2014), os resultados apontaram uma maior prevalência e incidência de infecção canina com o uso do novo protocolo em relação ao que empregava ELISA e RIFI. Os autores chegaram a afirmar que a prevalência nos municípios endêmicos deveria ser subestimada se considerado o antigo protocolo, o que diverge dos resultados encontrados no presente trabalho.

Esta mesma baixa concordância também foi observada quando 992 soros do Grupo II foram examinados pelos dois testes (TR-DPP[®]/ELISA). A discordância, em torno de 80%, fortalece a decisão de utilização de pelo menos dois testes diferentes para o diagnóstico positivo para LVC.

A grande discordância entre os testes é questionada quando considerada a maior especificidade do TR-DPP[®] e a característica do ELISA de ser um teste com alta sensibilidade (Laurenti et al, 2014).

Nessa direção, avaliamos a possibilidade de reações cruzadas dos testes TR-DPP[®], ELISA e RIFI utilizados no diagnóstico da LVC frente aos soros dos cães controles negativos (Grupo IV). Observamos o melhor desempenho do TR-DPP[®] que foi 100% negativo nessas amostras, seguido pelo ELISA com 96,0% e a RIFI com o pior desempenho, identificando apenas 63,0% dos negativos. As discordâncias observadas tanto para a RIFI quanto para o ELISA significam resultados falsos positivos. Laurenti et al 2014, realizaram estudo do desempenho desses testes em área com transmissão da LVC e também encontraram melhor especificidade para TR-DPP[®] (95,0%), seguido pelo ELISA (77,8%) e o pior desempenho pela RIFI (69,1%).

Também para os 22 cães do Grupo V, infectados por outros patógenos, o TR-DPP® foi 100% negativo para as amostras coletadas desses animais. No entanto, o ELISA apresentou reatividade cruzada frente aos soros dos cães com neosporose (26,7%), babesiose (50,0%), erliquiose (50,0%) e com doença de Chagas (100%). Em estudo realizado por Laurenti et al 2014, foi observado reação cruzada do TR-DPP® frente a soro de animais com babesiose e reação cruzada do ELISA frente a soro de animais com babesiose, doença de Chagas, com erliquiose e com neosporose.

O critério adotado para a escolha dos testes diagnósticos para triagem e confirmação da LVC no Brasil, dentro do PVCLVA, tem se mostrado insuficiente para eliminar dificuldades e fragilidades decorrentes dos níveis de sensibilidade e especificidade dos diferentes testes utilizados. A confirmação da infecção com base em testes sorológicos é um dos aspectos dessa fragilidade.

Schubach 2011, em seu trabalho de validação do TR-DPP® demonstrou um baixo valor preditivo positivo do teste mesmo em condições de alta prevalência da doença.

Dos 45 cães soropositivos para LVC em 2012 apenas 12 foram entregues por seus proprietários para eutanásia. Os 12 animais foram parasitologicamente positivos, o que fortaleceu o diagnóstico sorológico positivo desses animais. Apesar do número pequeno de cães (n=12), consideramos esse dado importante, ainda mais, por trabalharmos com a realidade dos inquéritos, onde se enfrenta grande resistência dos proprietários em aderir à entrega do cão soropositivo, tal como é recomendada pelo PVCLVA. Dentre esses animais, 50,0% (6/12) foram reagentes para *E. canis* e 16,7% (2/12) para *A. phagocytophilum*. Esses resultados apontariam uma coinfeção, considerando que todos os cães tiveram o diagnóstico parasitológico comprovado para LVC.

Considerando que 56 cães negativos no inquérito de 2010 permaneceram negativos no inquérito de 2012 e, que dos 721 negativos em

2012, apenas 0,7% (5/721) foram positivos em 2014, podemos apontar que, o setor 3 revelou-se área de baixa transmissão para LVC. É possível que essa mesma condição também esteja presente no restante do município, uma vez que os resultados observados no inquérito sorológico censitário de 2014 apontaram prevalências de 1,37; 0,52 e 0,78%, respectivamente para os setores 1, 2 e 4 de Espírito Santo do Pinhal, os resultados encontrados no setor 3 apontam uma real redução da prevalência no município.

Frente aos dados obtidos, realização de inquéritos sorológicos nos anos de 2010, 2012 e 2014; baixa taxa de recolhimento e eutanásia dos animais infectados, levantam-se questionamentos quanto aos fatores para uma possível redução na prevalência canina e como as ações de controle recomendadas e adotadas pelo programa estariam afetando essa redução. Com base no conhecimento atual sobre a efetividade das ações de controle, não é possível afirmar como estaria o cenário de transmissão da LV no município ou a situação se tais medidas não tivessem sendo adotadas.

As medidas de controle empregadas pelo PVCLVA têm sido questionadas, sobretudo a eutanásia de cães soropositivos. Uma das principais questões refere-se à qualidade e segurança do resultado diagnóstico obtido com os testes empregados atualmente. É comum o questionamento do emprego do teste ELISA como teste confirmatório, devido às próprias características desse teste, contudo entendemos que na realidade um dos fatores de equívoco seria o próprio emprego do termo “confirmatório”, já que o mesmo não cumpre tal papel.

Entendemos, com base nos resultados do presente estudo, que o TR-DPP® cumpre o papel de teste para identificação dos animais não infectados. No entanto, apenas na presença de dois testes sorológicos reagentes é que se obtém um resultado positivo e, assim, com essa interpretação, haverá concordância com o atual protocolo para diagnóstico da LVC.

A eutanásia dos cães soropositivos tem sido alvo de enfrentamentos entre segmentos organizados da sociedade e, os agentes públicos

responsáveis pela execução da política pública de vigilância e controle da LVA, sobretudo mediante o papel desses animais dentro da sociedade contemporânea. O principal conflito é representado pelo embate entre recolhimento e eutanásia dos animais infectados ou a possibilidade do tratamento canino. Sabe-se que tanto eutanásia quanto tratamento há questões peculiares e complexas, contudo para ambas as medidas se fazem necessários diagnósticos de qualidade.

Ainda que haja a crítica com relação ao Programa de Controle adotado no Brasil, o qual busca os cães soropositivos para eutanásia em suas residências, não podemos ignorar o fato de que essa busca encontra os cães assintomáticos que oferecem risco por serem fontes de infecção para os vetores (Laurenti et al., 2013).

Durante a realização deste estudo foi possível observar que as dificuldades para o controle da LVA vão além das encontradas nos testes diagnósticos, inúmeras limitações são encontradas para implantação das medidas de controle recomendadas pelos órgãos responsáveis. Tais limitações se iniciam desde a produção e distribuição dos testes diagnósticos até a falta de recursos humanos e infraestrutura básica para aplicação de todas as medidas de controle recomendadas. Ficando mais uma vez evidente a classificação da doença como negligenciada, também sob esses aspectos.

Muitas vezes somos desafiados a discutir o tratamento canino, mas quais as bases para definição de um posicionamento favorável ou contrário?

De um lado temos o olhar da Saúde Pública que segue a lógica do coletivo, da ação de prevenção, da diminuição ou interrupção dos riscos da instalação ou manutenção dos focos de transmissão. De outro, os olhares da assistência individual, de muitos proprietários, muitos médicos veterinários clínicos, de organizações de proteção animal. Em nosso entendimento, esses dois lados não esgotam esse cenário, pois, tem-se que considerar outros olhares ou interesses, inclusive de ordem econômica, comercial e até políticos.

O diagnóstico laboratorial suscita muitas controvérsias, demandas e “contraprovas”, sobretudo pelo fato dos diagnósticos serem realizados em larga escala, compatível, do ponto de vista teórico, com as necessidades de um programa de vigilância e controle de uma doença de interesse em Saúde Pública principalmente considerando o papel dos cães assintomáticos como fontes de infecção (Laurenti et al., 2013).

Em relação ao tratamento canino ainda há necessidade de um maior conhecimento ou rigor científico e, mesmo esclarecimentos à sociedade, tanto em relação à sua efetividade quanto em relação à cura parasitológica, extinção do risco de animais tratados continuarem atuando como fontes de infecção.

Em relação à sociedade, ao proprietário e a outros interessados, há a necessidade da compreensão de que todos compartilham responsabilidades independentemente da opção que venha a ser assumida.

Em relação à leishmaniose visceral humana (LVH), em muitas localidades o acesso às drogas para o tratamento é muito difícil, ainda ocorrem muitos óbitos pela falta de acesso ou demora no diagnóstico e no tratamento. Muitas vezes essas dificuldades estão associadas a localidades onde o próprio diagnóstico clínico e laboratorial é difícil ou precário (Desjeux, 2004; Organización Mundial de la Salud, 2012). Isso evidencia que para a LVH o diagnóstico, clínico e laboratorial, tem a mesma ou mais importância que o diagnóstico laboratorial canino.

Seja qual for “o lado”, seja qual for o “olhar” é inegável que o ponto de partida para tudo isso está na correta identificação da infecção natural no animal examinado. É o diagnóstico laboratorial fidedigno, realizado pela utilização de testes laboratoriais muito sensíveis e específicos, de elevados valores preditivos positivos e negativos, o referencial para a escolha ou decisão pela conduta a ser tomada.

A leishmaniose visceral é um desafio permanente e seu controle depende de novos conhecimentos e inovações tecnológicas, investimento em

pesquisa, suporte para integração da vigilância e controle, bem como facilitar o acesso das pessoas ao diagnóstico e tratamento (Elkhoury et al, 2013).

Este estudo avaliou a dinâmica do diagnóstico da LVC adotado pelo PVCLVA, que seria a base da pirâmide para o controle da doença, novamente, considerando o papel do reservatório canino. Fica evidente que para adoção de qualquer ação mais efetiva, para um melhor entendimento da epidemiologia da doença é de suma importância à utilização de testes diagnósticos que permitam a tomada de decisões com segurança para bem-estar da saúde pública e também a saúde animal.

Em senso mais amplo, em relação à leishmaniose visceral americana e a outras doenças de transmissão vetorial, o que se busca é a sanidade do meio ambiente, considerando todos os seus componentes biológicos, físicos e, as interações entre eles.

6. CONCLUSÃO

- Este estudo se reveste de importância, pois foi realizado nas condições da execução, ao longo de quatro anos, das ações do PVCLVA, acompanhando e analisando três inquéritos sorológicos caninos, considerando todas as estratégias e desafios para o desenvolvimento dos mesmos, contribuindo para um olhar mais crítico diante das medidas recomendadas.
- Redução na frequência de animais positivos e, conseqüente redução na prevalência da infecção canina no município de Espírito Santo do Pinhal no período compreendido entre os anos de 2010, 2012 e 2014.
- Se o protocolo ELISA/RIFI para o diagnóstico da LVC, utilizado no inquérito amostral de 2010 tivesse sido substituído pelo protocolo atual, TR-DPP®/ELISA, teria havido uma redução de 61% na frequência de animais soropositivos já naquele ano.
- O TR-DPP® mostrou-se adequado para a identificação dos cães não infectados.
- Pelas características intrínsecas às técnicas TR-DPP® e ELISA não poderiam ser identificadas como teste de triagem e teste confirmatório, respectivamente. Apenas caberia referir que o diagnóstico positivo para LVC é aquele em que os dois testes são positivos.
- Necessidade de constante revisão em relação à efetividade das técnicas laboratoriais para o fidedigno diagnóstico da LVC
- Frente à complexidade dos cenários onde a leishmaniose visceral ocorre, incluídas as desigualdades sociais, os interesses individuais, econômicos e políticos, a necessidade de maior base científica para tudo que a cerca, fica evidente a importância no aprofundamento dos

estudos na busca por esclarecer tantos paradoxos dessa doença que se mostra tão intrigante.

7. REFERÊNCIAS

Alves, W A, Bevilacqua, P D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993 - 1997. Caderno Saúde Pública. 2004; 20:259-265.

Bavia ME, Carneiro DDMT, Cardim LL, Martins MS, Nascimento-Silva M. Geotechnologies in the study of visceral leishmaniasis in the central east region of Bahia State, Brasil. In: Worldleish 5; 2013 mai 13-17; Porto de Galinhas. Pernambuco: Worldleish; 2013.O 039.

Braga MD, Côelho IC, Pompeu MM, Evans TG, Macauliffe IT, et al. 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. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1998; 31: 419-424.

Cabrera M A A. Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937) no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro-RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras [tese]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz; 1999.

Campos MP, Silva DA, Madeira MF, Velhor-Junior AAM, Figueiredo FB. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2013; 22(3): 424-426.

Casanova C, Hamilton JGC, Trigo JR, Costa AIP. Identification of sex pheromones of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) populations from the state of São Paulo, Brazil. Cláudio Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2006 Vol. 101(1): 113-115.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Parasites – Leishmaniasis. 2013c. [acesso 15 out 2013]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>

Colla-Jacques FE, Casanova C, Prado AP. Study of sand fly fauna in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis and canine visceral leishmaniasis in the municipality of Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, Brazil Mem. Inst. Oswaldo Cruz [serial on line]. 2010; 105(2): 208-215 [cited 2013 Nov 27]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762010000200017&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000200017>.

Costa AIP, Casanova C, Rodas LAC e Galati E. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. Rev. Saúde Pública. 1997; 31(6): 632-3.

Costa, CHN. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2011 44(2):232-242

Costa-Val AP & Melo MN. Clínica, diagnóstico e tratamento LVC: Avanços, limitações e perspectivas. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia (Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG) - Leishmaniose Visceral. 2012. Nº65: 74-103.

Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Leal GCA, et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. PLoS ONE 9. e91009

Cutolo AA, Camargo DA e Von Zuben. Novos registros de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) na região Centro-Leste do estado de São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 2009 19(1):62-65

Dantas-Torres F. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101(8): 929-930.

Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, et al. Canine leishmaniosis in the old and new worlds: unveiled similarities and differences. Trends in Parasitology. 2012, 28 531-538.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 2004; 27: 305-318.

Elkhoury ANSM. Overview of leishmaniasis control in the Americas (symposium leishmaniasis – WHO). In: Worldleish 5; 2013 mai 13-17; Porto de Galinhas. Pernambuco: Worldleish; 2013.O 221.

Ferrer LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: an update. Proceedings of a canine leishmaniasis. Forum, Barcelona (Sitges). 1999; 6-10.

Iversson LB, Camargo ME, Villanova A, Reichmann MLAB, Andrade EA e Tolezano JE. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana do município de São Paulo, Brasil (1979-1982). Rev. Inst. Med. Trop. 1983; 25 (6):110-117. São Paulo, 1983.

Fiocruz. Laboratório de Imunomodulação – Depto. de Protozoologia/IOC. As Leishmanioses: morfologia. [serial on line] 1997; [acesso em 06 dez 2013]. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm>

Fiocruz. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos. Fiocruz vai transferir tecnologia para novos testes rápidos para diagnóstico. Profissionais de Bio-Manguinhos capacitam técnicos em saúde. 2008 [acesso em 12 jan. 2012]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inoid=1541&sid=9>

Gomes AHS, Ferreira IMR, Lima MLRS, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MFL, et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2007;144:234-241.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. bras. epidemiol.* 2004; 4:338-349.

Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev pan-amaz saude.* 2010; 1(2):13-32.

Lainson R & Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. Reprinted from *Nature*. @MacmillanJournalsLtd. 1978; 273 (5664): 595-600. [acesso em 14 fev 2012]. Disponível em: <http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/pc/artigos/1978/nature1978v273n5664p595-600.pdf>

Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana. *BEPA.* 2009; 6(67): 13-23.

Laurenti MD, Rossi CN, Matta VLR, Tomokame TY, Corbett CEP, Secundino NFC, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet. Parasitol.* 2013; 196: 296-300.

Laurenti MD, MV Santana Leandro Jr, Tomokame TY, De Lucca HRL, Aschar M, et al. Comparative evaluation of the DPP CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 2014.

Machado, J G et al. Comparação dos resultados dos métodos de imunofluorescência indireta e ELISA indireto no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina realizado pelos laboratórios de Belo Horizonte, MG, Brasil. *Veterinária e Zootecnia, Botucatu*, v.14, n.1, jun., p.47-51, 2007.

Martins, D R A. Antígenos da forma amastigota de *Leishmania chagasi* identificados por dupla varredura da biblioteca de cDNA. 2006. 92 f.

Dissertação (Doutorado) - Curso de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Leishmaniose Visceral no Brasil: Situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos de medidas de controle. Boletim eletrônico epidemiológico. 2002; 6 2:11. [acesso em: 27 mai 2012]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_epi_ano02_n06.pdf

Ministério da Saúde. Fundação Serviços de Saúde Pública. Instituto Evandro Chagas. 50 anos de contribuição à ciência biológica e à medicina tropical. Belém (PA). 1986; 2.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília (DF); 2006.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília (DF); 2009.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso. Brasília (DF), 2010.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Subcoordenação de Zoonoses Vetoriais e Raiva. Nota técnica: Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde. Brasília (DF); 2011.

Montoalvo AM, Fraga J, Monzote L, García M, Fonseca L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección el ADN. Rev. cuba. med. trop. 2012; 64 (2): 108-131.

Neves, D P. Parasitologia Dinâmica. São Paulo: Atheneu, 2003

Organización Mundial de la Salud (OMS). Control de las leishmaniasis. Informe de una reunión del Comité de Experto de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010. Serie de Informes Técnicos. 2012.

Palatnik-de-Souza CB, Santos WR, França-Silva JC, Costar RT, Reis AB, Palatnik M, et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 65(5): 510–517.

Petersen CA; Barr SC. Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, Philadelphia. 2009; 39: 1065–1074.

Rangel O, Hiramoto RM, Henriques LF, Taniguchi HH, Ciaravolo RMC, Tolezano JE, França ACC, et al. Classificação epidemiológica do Estado de São Paulo segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, para 2013. *BEPA.* 2013; 10(111):3-14.

Sá, L E M. Profilaxia da leishmaniose visceral. 2006. 79 f. Monografia (Especialista) - UNIDERP/INBRAPE, Campo Grande Ms, 2006.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. V. 32nd edition. New York: Cold Spring Harbor; 1989.

São Paulo (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência do Controle de Endemias - SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria de Saúde, 2006. 144 p.

São Paulo (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica CVE. Agravos – Leishmaniose Tegumentar Americana. 2015. [acesso 15 mar 2015]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/cve_lta.html

Schubach EYP. Validação da técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso para diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro. Dissertação, Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, 2011. 58 p.

Shimabukuro PHF; Tolezano JE; Galati EAB. Chave de identificação dos *Phlebotominae* (diptera, psychodidae) do Estado de São Paulo. Pap. Avulsos Zool. 2011; 51(27):399-441.

Silva, V.M.S. et al. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, p.324-328, 2005.

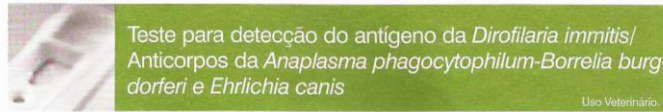
Sundar S & Rai M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2002; 9(5): 951–958.

World Health Organization. WHO Report on Global surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases – Leishmaniasis. 2013 [acesso em 15 abr 2013]. Disponível em:

http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/

ANEXOS

Anexo I



Teste para detecção do antígeno da *Dirofilaria immitis*/
Anticorpos da *Anaplasma phagocytophilum*-*Borrelia burgdorferi* e *Ehrlichia canis*

Uso Veterinário

Canine SNAP* 4Dx*

Versão Portuguesa



Diagnóstico in vitro para a detecção do antígeno de *Dirofilaria immitis* (DI) e dos anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum* (AP), *Borrelia burgdorferi* (LY) e *Ehrlichia canis* (EC) em soro, plasma ou sangue total caninos.

Precauções e advertências

- Todos os resíduos devem ser adequadamente descontaminados antes do descarte.
- Não misture componentes de kits com números de lote diferentes.
- Não use um dispositivo SNAP que tenha sido ativado antes do acréscimo da amostra.

Armazenamento

- Armazene entre 2-8°C.
- Os dispositivos e reagentes SNAP podem ser armazenados à temperatura ambiente (18-25°C) durante 90 dias ou até a data de validade impressa, o que ocorrer primeiro.
- Depois que os dispositivos e reagentes SNAP tiverem sido retirados, **por mais de 24 horas**, do local em que estavam à temperatura de 2-8°C, a data de validade é de 90 dias ou a data impressa, o que ocorrer primeiro. Se a data de validade de 90 dias ocorrer antes da data de validade impressa, registre a nova data no local fornecido no kit.

Componentes do kit

Item	Reagentes	Quantidade
1	1 frasco de conjugado anti-DI/AP/LY/EC:HRPO (Conservado com gentamicina e Kathon)	7,0 ml
2	Dispositivo SNAP	5, 15 ou 30

Cada dispositivo SNAP contém 0,4 ml de solução de lavagem e 0,6 ml de solução substrato.

Outros componentes: Pipetas de transferência, frascos de amostras e um suporte de reagentes

Informações sobre a amostra

- As amostras devem estar à temperatura ambiente (18-25°C) antes do início do procedimento de teste.
- Podem-se utilizar soro, plasma ou sangue total frescos ou armazenados entre 2-8°C durante uma semana.
- Para uma armazenagem mais longa, o soro ou o plasma podem ser congelados (-20°C ou abaixo) e recentrifugados antes da utilização.
- As amostras hemolisadas, ictericas ou lipemicas não afetarão os resultados do teste.

Procedimento de teste

1. Se armazenado em temperatura de refrigeração, deixe que todos os componentes se equilibrem à temperatura ambiente (18-25°C) durante 30 minutos. **Não aqueça.**
2. Usando a pipeta inclusa no kit, passe **3 gotas de amostra** para um tubo de amostra novo.
3. Mantendo o frasco na posição vertical, acrescente **4 gotas de conjugado** ao tubo de amostra.
4. Tampe o tubo de amostra e misture-o bem ao invertê-lo de 3 a 5 vezes.



A amostra fluirá pela janela de resultado, alcançando o círculo de ativação em aproximadamente 30 a 60 segundos. Pode ser que reste um pouco de amostra no orifício de amostra.

6. **ASSIM** que a cor aparecer no círculo de ativação, empurre firmemente o ativador até que esteja nivelado com o corpo do dispositivo.



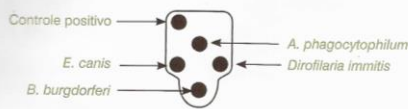
OBSERVAÇÃO: algumas amostras podem não fluir para o círculo de ativação dentro de 60 segundos e, portanto, o círculo pode não mudar de cor. Neste caso, aperte o ativador depois que a amostra tiver fluído pela janela de resultado.

7. Leia o resultado do teste em **oito minutos**.

Interpretação dos resultados

Resultado positivos

Qualquer surgimento de cor nos poços de amostra indica a presença do antígeno da *Dirofilaria immitis*, do anticorpo da *A. phagocytophilum*, do anticorpo da *B. burgdorferi* e do anticorpo da *E. canis* na amostra.



OBSERVAÇÃO: Dados iniciais de pesquisa sugerem que o poço da *Anaplasma phagocytophilum* no Snap 4Dx pode sofrer uma reação cruzada com a *Anaplasma platys*. Em estudos envolvendo cães infectados com uma cepa laboratorial da *A. platys*, o Snap 4Dx mostrou-se reagente com o soro de 10 entre 10 animais infectados.

Resultado negativo

A cor só surge no ponto de controle positivo.



Resultados inválidos

- **Fundo**—Se permitir que a amostra flua além do círculo de ativação, pode surgir cor no fundo. Um pouco de cor no fundo é normal. Porém, se o fundo colorido obscurecer o resultado do teste, repita o teste.
- **Não surge cor**—Se o controle positivo não acarretar no surgimento de cor, repita o teste.

Analizador IDEXX SNAPshot Dx*

Os resultados dos testes também podem ser lidos com o SNAPshot Dx. Existe uma descrição completa acerca do modo de introdução dos dados dos pacientes e de como ler os resultados com o SNAPshot Dx no guia do utilizador SNAPshot Dx.

Teste Comparativos	Tamanho de Amostra					Tipo de amostra	Sensibilidade relativa e especificidade 95% de Limite de confiança	Estatística Kappa
	+/+	-/+	+/-	-/-	Total			
HTWM ²	118	1	0	236	355	Soro	Sen., 99.2% (95% CL 94.8%-100%) Spec., 100% (95% CL 98%-100%)	0.99
<i>A. phagocytophilum</i> ³	217	2	0	236	455	Soro	Sen., 99.1% (95% CL 96.5%-100%) Spec., 100% (95% CL 98%-100%)	0.99
<i>B. burgdorferi</i> ³	166	2	0	236	404	Soro	Sen., 98.8% (95% CL 95.4%-99.8%) Spec., 100% (95% CL 98%-100%)	0.99
<i>E. canis</i> ⁴	100	4	0	236	340	Soro	Sen., 96.2% (95% CL 80.1%-98.8%) Spec., 100% (95% CL 98%-100%)	0.97

Referencia: Necropsy e PetChek ¹A. phagocytophilum IFA / Western Blot ²E. canis IFA / Western Blot ³B. burgdorferi IFA / Western Blot A sensibilidade e a especificidade baseiam-se na interpretação visual dos resultados SNAP

CL = Limite de confiança

Descrições do símbolo

	Data de Vencimento		Representante autorizado an a Comunidade Européia
	Número de Partida (Lote)		Consulte instruções para o uso
	Número de série		Diagnóstico in-vitro
	Limite de temperatura		Data de Fabricação
	Fabricante		
	Número de catálogo		

Suporte técnico IDEXX
EUA/Canadá 1 800 248 2483 • Europa 00800 1234 3399 • Austrália 1300 44 33 99
idexx.com

PRODUTO IMPORTADO.

Licenciado no Ministério da Agricultura sob o N° 9.263 em 16/11/07.
Proprietário e Fabricante: IDEXX Laboratories Inc., One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04090, USA
REPRESENTANTE, IMPORTADOR E DISTRIBUIDOR EXCLUSIVO NO BRASIL: REM INDUSTRIA E COMERCIO LTDA,
Rua Columbus, 282 - Vila Leopoldina - São Paulo - SP - CEP: 05304-010
CNPJ Nº: 47.338.710/0001-90
Responsável Técnico: Ana Carolina Parente Martins Ferreira CRMV/SP 27.502

*SNAP SNAPshot Dx, 4Dx, e PetChek são marcas ou marcas registradas de IDEXX Laboratories, Inc. ou seus afiliados no Estados Unidos e/ou em outros países.

Informações sobre patentes: idexx.com/patents.

© 2012 IDEXX Laboratories, Inc. Todos os direitos reservados.

IDEXX
LABORATORIES

IDEXX Europe B.V.
P.O. Box 1334
NL-2130 EK-Hoofddorp
idexx.com

Anexo II



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CEPIAL

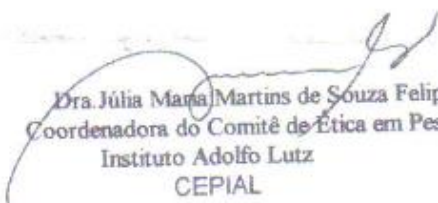
São Paulo, 15 de fevereiro de 2007.

Ilmo. (a) Sr. (a): **JEFFREY JON SHAW**
JOSÉ EDUARDO TOLEZANO

Coordenador (a) do Projeto de Pesquisa: **ESTUDOS ESTRATÉGICOS DAS LEISHMANIOSES E DA DOENÇA DE CHAGAS NAS REGIÕES NORDESTE, CENTRO-OESTE E SUDESTE DO BRASIL.**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL), em reunião ordinária do mês **FEVEREIRO**, apresentou o **PARECER**, enquadrando o referido projeto na categoria **APROVADO**, de acordo com a Resolução 196/96 sobre Pesquisas Envolvendo Seres Humanos / CNS / MS, Brasília, 1996.

Atenciosamente


Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Adolfo Lutz
CEPIAL



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE



**Programa de Pós Graduação
em Ciências**

Coordenadoria de Controle de Doenças-CCD
Secretaria de Estado da Saúde – São Paulo/SP

Infectologia em Saúde Pública – Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

São Paulo, 26 de novembro de 2015.

Ilma.

Profa. Dra. Maria de Fátima da Costa Pires
Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Ciências
Coordenadoria de Controle de Doenças
Secretaria de Estado da Saúde – São Paulo – SP

Prezada Profa. Fátima,

Anexo segue o exemplar da dissertação de Mestrado da aluna Helid Raquel Lauthenschlaeger Rodrigues de Lucca. Segue junto os Pareceres do Conselho Técnico Científico – CTC/IAL e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEPIAL. Tal registro se faz necessário uma vez que o presente estudo foi parte integrante de um Projeto maior “Estudos estratégicos das leishmanioses e da doença de Chagas nas regiões nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil”, iniciado em 2008, com importante suporte financeiro pelo CNPq - **Proc.410556/06-8**.

Deste grande projeto originaram-se 4 (quatro) sub-projetos que foram temas dos trabalhos de dissertação de Mestrado das alunas Alessandra Gutierrez, já concluído; Ana Paula Félix de Miranda Ribaldo, em fase de conclusão da redação da dissertação; Sabrina de Bastos Alves da Silva, em fase de conclusão da redação da dissertação e, este da aluna Héliid.

Em relação ao Parecer do CTC/IAL, obtivemos a versão atualizada do Parecer com o registro do título da presente dissertação. Entretanto não foi possível a atualização no Parecer do CEUA (ética animal). Por essa razão anexamos aquele emitido originalmente pelo CEPIAL, quando ainda não tinha sido instituído o CEUA-IAL.

Atenciosamente

Prof. Dr. José Eduardo Tolezano
Coordenador Geral dos Projetos
Orientador