

DENISE MARIA BUSSONI BERTOLLO

**Aspectos soroepidemiológicos da leishmaniose
visceral no Departamento Regional de Saúde (DRS)
XV região de São José do Rio Preto, estado de São
Paulo, Brasil, 2008 - 2012.**

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 de Saúde Pública
Orientador: Prof. Dr. José Eduardo
Tolezano**

**São Paulo
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Bertollo, Denise Maria Bussoni

Aspectos soroepidemiológicos da leishmaniose visceral no Departamento Regional de Saúde (DRS) XV região de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil, 2008 - 2012. - São Paulo, 2016.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2016.

Área de concentração: Pesquisa Laboratorial em Saúde Pública.

Orientador: Profº. Drº. José Eduardo Tolezano.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Epidemiologia. 3. Endemia. 4. Estudos Soroepidemiológicos/diagnóstico. 5. Canino/animal. 6. Prevalência. 7. Brasil/epidemiologia

SES/CCD/CD-307/16

DEDICATÓRIA

À Deus, fonte de fé.

Aos meus pais Edio e Terezinha, pelo amor e educação.

Ao meu esposo Luis, pelo apoio e compreensão.

Aos meus filhos Erick e Thais, meu agradecimento por terem aceitado se privar de minha companhia pelos estudos, concedendo a oportunidade de me realizar ainda mais.

Minha gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tolezano, pela orientação, apoio, compreensão e amizade, obrigada por transmitir sua experiência, exemplo e inspiração para os profissionais que ajuda a qualificar.

AGRADECIMENTOS

Aos Coordenadores do Programa de Pós-Graduação, Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Costa Pires e Prof. Dr. André Gustavo Tempone por acreditarem e aceitarem na minha qualificação pessoal.

As funcionárias Tirces e Carol do Programa de Pós – Graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, pela colaboração e auxílio.

Aos professores, cuja dedicação possibilitou a formação de profissionais mais completos, e estimulados a continuar buscando a elevação do seu espírito científico.

Aos membros da banca de qualificação, Profa. Dra. Adriana Pardini, Profa. Dra. Maria Rita da Silva e Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti, obrigada pelas sugestões que muito contribuíram com meu crescimento e pensar científico.

Aos membros da banca de defesa, Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti e Prof. Dr. Osias Rangel, agradeço pela enorme contribuição pertinente com apontamentos, sugestões e críticas que engrandeceram esse estudo.

Aos meus queridos irmãos Debora e Demerson, que sempre me acolheram em seus lares durante meus estudos, obrigada pelo carinho, afeto, companheirismo de união familiar.

Aos meus colegas do Mestrado, aqui representados por Marianni e Dulce, que são exemplo de perseverança e coragem...

Aos amigos e colegas de trabalho do Centro de Laboratórios Regional - IAL de São José do Rio Preto –X, Márcia, Juliana, Jaqueline Calça, Ivete,

Jacqueline Peresi, Margarida, Heloísa, Susi, Bete, Maria Elena, Osvaldo (*in memorian*), Nalva, Rosa, Norma, Fátima Domingues, Marcella e Denise Fusco, meu eterno agradecimento as palavras de apoio de cada um.

A Helena H. Taniguchi minha amiga e companheira de trabalho, obrigada pelas palavras de apoio e incentivo.

Ao meu amigo Roberto Mitsuyoshi Hiramoto, pela valiosa contribuição na realização desse estudo, pela dedicação, apoio e amizade.

Carlos (Tatu), Zé Eduardo, Elaine Barbosa e Rosana do IAL Central pelo companheirismo, amizade, apoio e estímulo em todos os momentos.

A Mônica do GVE São José do Rio Preto, a Sucen representada pelos meus amigos Nestor, Rubens e Adjunior, obrigada por estarem sempre por perto, prontos a ajudarem.

A pesquisadora do CLR-IAL de Bauru Virginia Brandão, pelas relevantes sugestões, que enriqueceram minhas reflexões.

Aos meus amigos veterinários, Élcio (Votuporanga), Mileno (Fernandópolis), Fabiana (Santa Fé do Sul), Leonardo (Jales), Luciana (Aparecida D'Oeste) e João (Urânia), muito obrigado por transmitirem informações de seus municípios e pela confiança e amizade.

A Adriana e Lúcia GVE Jales, por ajudar com informações importantes para desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo Ernesto Leoni Figueiredo pela enorme contribuição na análise dos resultados obrigada pelo seu empenho e dedicação.

A todos a minha eterna gratidão.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi descrever as características soropidemiológicas da leishmaniose visceral (LV) no DRS XV, região de São José do Rio Preto, São Paulo, entre 2008 e 2012. Foram analisados os dados secundários dos casos humanos, presença de vetores e resultados dos inquéritos sorológicos caninos. Desde os primeiros registros da LV na região em 2008, em Jales e Urânia, verificou-se crescente expansão atingindo outros 23 municípios até 2012. Foram notificados 251 casos suspeitos de LV humana (LVH), dos quais, 99 (39,4%) confirmados laboratorialmente, sendo 68 (68,7%) autóctones da região do DRS XV. Houve predomínio pelo sexo masculino, a faixa etária mais acometida foi para menores de 10 anos e maiores de 51anos de idade. A taxa de letalidade no período foi de 16,2%, superior à média para o estado, estimada em 8,3%. A relação entre número de casos confirmados e óbitos, disponíveis no SINAN/NET nos níveis municipal, estadual e nacional divergem quanto aos números de casos, foram 61 no SINAN nacional com 10 óbitos, enquanto que pelo SINAN estadual 68 com 11 óbitos. Em relação à LV canina (LVC) foram analisadas 45.343 amostras de sangue de cães. No período foram utilizados quatro diferentes algoritmos, sendo 12.871 (28,4%) examinadas apenas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI); 632 (1,4%) por ensaio imunoenzimático (EIE) e RIFI, ambos os grupos a partir de eluato de sangue coletado em papel de filtro; 22.387 (49,4%) por EIE e RIFI e 9.453 (20,8%) pelo *Dual Path Platform* (TR-DPP®) e EIE, estes dois grupos examinados com soro sanguíneo. Dos 25 municípios incluídos no estudo, 12 realizaram inquérito amostral, oito (8) inquérito censitário, dois (2) com, pelo menos, um inquérito amostral e outro censitário e em cinco (5) municípios não houve registro de realização de qualquer tipo de inquérito. As maiores taxas de positividade nos inquéritos censitários foram observadas em Urânia 25,4%, Votuporanga 20,1% e Palmeira D'Oeste 19,0%. Entre os municípios com inquéritos amostrais, Palmeira D'Oeste, apresentou maior taxa de positividade 26,1%. A maioria dos municípios não realizou os inquéritos censitários e/ou

amostrais, como preconizado pelo Programa Vigilância e Controle da LV (PVCLV). A principal via de acesso a região rodovia Euclides da Cunha percorre o território de 14 municípios que apresentaram transmissão ou presença de vetor. A interligação entre as ferrovias Ferroban e Ferronorte aponta possível rota de disseminação vinda de Mato Grosso do Sul. Com base nos resultados obtidos é possível concluir que a LV está em crescente expansão geográfica na região. Altas prevalências de LVH e LVC na região do DRS XV. A maioria dos municípios não atende ao programa de PVCLV. O contínuo processo migratório, a rodovia Euclides da Cunha e a ferrovia Ferronorte se apresentam como possíveis rotas de expansão da LV.

Palavras Chaves: 1. Leishmaniose Visceral, 2. Inquéritos Epidemiológicos, 3. Epidemiologia, 4. Diagnóstico Sorológico, 5. Letalidade

ABSTRACT

The aim of this study was to describe the seroepidemiological characteristics of visceral leishmaniasis (VL) in DRS XV, region of São José do Rio Preto, São Paulo, between 2008 and 2012. The secondary data from human cases were analyzed, the presence of vectors and survey results serological canines. From the first records of VL in the region in 2008 in Jales and Urandia, there was growing expansion reaching 23 other municipalities by 2012. Were reported 251 suspected cases of human VL (HVL), of which 99 (39.4%) laboratory confirmed, 68 (68.7%) of the autochthonous DRS XV region. There was a predominance of males, the most affected age group was for children under 10 and adults over 51 years old. The case lethality rate for the period was 16.2%, higher than the average for the state, estimated at 8.3%. The relationship between the number of confirmed cases and deaths, available in SINAN/NET in municipal, state and national levels differ as to the number of cases, 61 were in the national SINAN with 10 deaths, while the state SINAN 68 with 11 deaths. In relation to canine VL (CVL) were analyzed blood samples from 42,343 dogs. During that time we used four different algorithms, and 12,871 (28.4%) examined only by indirect immunofluorescence assay (IFT); 632 (1.4%) by enzyme immunoassay (EIA) and IFT, both groups from blood eluate collected on filter paper; 22,387 (49.4%) by EIA and IFT and 9,453 (20.8%) for the Dual Path Platform (TR-DPP®) and EIA these two groups examined with blood serum. Of the 25 municipalities included in the study, 12 conducted sample survey, eight (8) census survey, two (2) with at least one sample survey and other census and five (5) municipalities there was no record of accomplishment of any type of survey. The highest positivity rates in census surveys were observed in Urandia 25.4%, 20.1% Votuporanga and Palmeira D'Oeste 19.0%. Among the municipalities with sample surveys, Palmeira D'Oeste, showed a higher positivity rate (26.1%). Most municipalities did not conduct the census and / or sample surveys, as recommended by the Programme Monitoring and Control LV (PVCLV). The main access road to the highway region Euclides

da Cunha runs through the territory of 14 municipalities that presented transmission or presence of vector. The interconnection between Ferroban and Ferronorte railways points possible route of dissemination of Mato Grosso do Sul. Based on the results it can be concluded that VL is growing geographic expansion in the region. High prevalence of HVL and CVL in the DRS XV region. Most municipalities do not meet the PVCLV. The continuous migration process, Euclides da Cunha highway and railroad Ferronorte present as possible VL expansion routes.

Key Words: 1. Visceral Leishmaniasis, 2. Epidemiological Surveys, 3. Epidemiology, 4. Serological Diagnosis, 5. Lethality

LISTA DE ABREVIATURAS

BOL_CÃO	Boletim de Coleta e Registro de Exame Laboratorial e Eutanásia em Atividade de Inquérito Canino
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BAB	<i>Blood Agar Base</i>
CCD	Coordenadoria de Controle de Doenças
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEP	Comitê Ética em Pesquisa
CLR-IAL/SJRP	Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto
CTC	Conselho Técnico Científico
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DOE	Diário Oficial do Estado
DRS XV	Departamento Regional da Saúde - Região de São José do Rio Preto
EIE	Ensaio imunoenzimático
ESP	Estado de São Paulo
FERROBAN	Ferrovia Bandeirantes
FERRONORTE	Ferrovia Norte Brasil
FIOCRUZ	Fundação Instituto Osvaldo Cruz
GVE	Grupo de Vigilância Epidemiológica
GVE XXIX	Grupo de Vigilância Epidemiológica – São José do Rio Preto
GVE XXX	Grupo de Vigilância Epidemiológica - Jales
HE	Hematoxilina e eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>

<i>L. infantum chagasi</i>	<i>Leishmania infantum chagasi</i>
<i>Lu. cruzi</i>	<i>Lutzomyia cruzi</i>
<i>Lu longipalpis</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
LPI	Local Provável de Infecção
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MS	Ministério da Saúde
NNN	<i>Novy-MacNeal-Nicole</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PVCLV/ESP	Programa de Vigilância e Controle em Leishmaniose Visceral do Estado de São Paulo
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorfim</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SES	Secretaria de Estado da Saúde
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SINAN/NET/SVS/MS	Sistema de Informação de Agravos de Notificação /Versão Net/ Sistema de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde
SINAN/NET/SES/CVE	Sistema de Informação de Agravos de Notificação /Versão Net/ Secretária Estadual de Saúde/Centro de Vigilância Epidemiológica
SINAN/NET/SES/GVE	Sistema de Informação de Agravos de Notificação /Versão Net/ Secretária Estadual de Saúde/Grupo de Vigilância Epidemiológica
SIGH-Lab	Sistema de Informação e Gestão Hospitalar de Laboratório
SJRP	São José do Rio Preto
SMS	Secretaria Municipal de Saúde

SP-320	Rodovia Estadual de São Paulo Euclides da Cunha (Mirassol à Rubinéia)
SP-461	Rodovia Estadual de São Paulo Gabriel Melhado (Bilac à Birigui); Deputado Roberto Rolemberg (Birigui à Turiuba); Doutor Otaviano Cardoso Filho (Turiuba à Nhandeara); Pericles Bellini (Nhandeara à Cardoso)
SP-463	Rodovia Estadual de São Paulo Deputado Jorge Maluly Neto (Clementina à Araçatuba); Dr. Elyeser Montenegro Magalhães (Araçatuba à Jales)
SP-479	Rodovia Estadual de São Paulo Miguel Jabur Elias (Votuporanga à Pontes Gestal); Frederico Pontes Gestal (Pontes Gestal à Riolândia)
SP-543	Rodovia Estadual de São Paulo Percy Waldir Semeguini (Fernandópolis à Ouroeste)
SP-557	Rodovia Estadual de São Paulo Henrique Risso (Turmalina à Urânia)
SP-561	Rodovia Estadual de São Paulo Jarbas de Moraes (Jales à Santa Albertina); Armindo Pilhalarme (Santa Albertina)
SP-563	Rodovia Estadual de São Paulo Euclides de Oliveira Figueiredo (Teodoro Sampaio à Andradina); Euphly Jalles (Marinópolis à Jales)
SP-595	Rodovia Estadual de São Paulo Gerson Dourado de Oliveira (Castilho à Ilha Solteira); Dos Barrageiros (Ilha Solteira à Santa Fé do Sul)
SR	Serviço Regional
SUCEN	Superintendência do Controle de Endemias
TMB	Tetrametilbenzidina
TR-DPP®	Teste Rápido <i>Dual Path Platform</i>
TRALd	Teste Rápido Anticorpo <i>Leishmania donovani</i>

WB

Western Blot

WHO

World Health Organization

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

FIGURA 1. Distribuição dos municípios do estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral em dezembro de 2014	26
FIGURA 2. (A) Formas amastigota (seta) no interior de uma célula fagocítica, e (B) Promastigota de <i>Leishmania sp.</i>	27
FIGURA 3. Flebotomíneo do gênero <i>Lutzomyia spp</i>	28
FIGURA 4. Ciclo Biológico de <i>Leishmania ssp</i>	30
FIGURA 5. Lâmina de microscopia direta com presença de forma amastigota de <i>Leishmania</i> no interior do macrófago (seta)	32
FIGURA 6. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), não reagente (A) e reagente (B), utilizando-se antígeno de formas promastigotas de <i>Leishmania major</i> , marcadas pela fluoresceína	34
FIGURA 7. Placa da reação do ensaio imunoenzimático (EIE) com antígeno de <i>Leishmania major like</i> . Os poços em amarelo demonstram reação reagente	34
FIGURA 8. Esquema representativo da classificação epidemiológica da leishmaniose visceral dos municípios no estado de São Paulo	41
FIGURA 9. Mapa da região administrativa de São José do Rio Preto	45
FIGURA 10. Mapa do estado de São Paulo e suas fronteiras com estados de Mato Grosso do Sul e Minas Gerais	47
FIGURA 11. Esquema representativo das formas de coletas de sangue nos inquéritos sorológicos caninos e os algoritmos utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.....	52
FIGURA 12. Classificação epidemiológica para a leishmaniose visceral dos municípios da região administrativa de São José do Rio Preto nos anos de 2008 (A), 2009 (B), 2010 (C), 2011 (D) e 2012 (E)	56
FIGURA 13. Casos autóctones de leishmaniose visceral humana na região de abrangência do DRS XV, segundo o local provável de infecção e ano de diagnóstico no período de 2008 a 2012	61

FIGURA 14. Casos autóctones de leishmaniose visceral humana na região de abrangência do DRS XV, segundo o critério de definição do diagnóstico, no período de 2008 a 2012	62
FIGURA 15. Casos autóctones de leishmaniose visceral humana, evolução clínica e letalidade, distribuídos conforme o município de infecção na região do DRS XV, no período de 2008 a 2012.....	63
FIGURA 16. Coeficiente de incidência de casos de leishmaniose visceral humana (100.000 habitantes) no Brasil, estado de São Paulo e região do DRS XV, no período de 2008 a 2012.....	66
FIGURA 17. Números de casos confirmados e óbitos por leishmaniose visceral humana, registrados nos sistemas do SINAN/NET/SVS/MS, SINAN/NET/SES/CVE e SINAN/NET/SES/GVE, no período de 2008 a 2012	67
FIGURA 18. Taxas de positividade de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> observadas nos inquéritos sorológicos caninos, realizados em animais no domicílio em municípios da região do DRS XV, no período de 2008 a 2012.....	68
FIGURA 19. Resultados observados na utilização de diferentes algoritmos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, em municípios da região do DRS XV no período 2008 a 2012.....	69
FIGURA 20. Taxas de rejeição de amostras coletadas no período de 2008 a 2012, para a realização do diagnóstico da leishmaniose visceral canina na região do DRS XV, segundo o algoritmo utilizado	71
FIGURA 21. Relação entre os algoritmos utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, no período de estudo, e o tempo (dias) gasto para examinar todas as amostras recebidas.....	72
FIGURA 22. Taxas de concordância (%) entre as técnicas utilizadas, durante a vigência de cada um dos algoritmos utilizados para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, na região do DRS XV no período de 2008 a 2012	73

FIGURA 23. Municípios da região do DRS XV com transmissão leishmaniose visceral canina e/ou humana, com realização de inquérito soroepidemiológico canino tipo censitário no período 2008 a 2012.....	74
QUADRO 1. Índice demográfico dos municípios da região do DRS XV que realizaram inquérito sorológico canino censitário para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, período de 2008 a 2012.....	75
QUADRO 2. Características geográficas e climáticas observadas nos municípios da região do DRS XV que realizaram inquérito sorológico canino censitário para o diagnóstico da leishmaniose visceral canino, no período de 2008 a 2012.....	76
QUADRO 3. Municípios limítrofes associados e a presença de rodovia e ferrovia nos municípios da região da DRS XV, que realizaram inquérito sorológico censitário para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, no período de 2008 a 2012	77
FIGURA 24. Municípios da região do DRS XV com presença do vetor <i>Lu. longipalpis</i> , e realização de inquérito soroepidemiológico canino tipo amostral, no período de 2008 a 2012.	80
QUADRO 4. Características demográficas, climáticas observadas nos municípios da região do DRS XV que realizaram inquérito sorológico canino amostral, para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina no período de 2008 a 2012.	81
QUADRO 5. Municípios limítrofes associados com a presença de rodovia e ferrovia nos municípios da região do DRS XV, que realizaram inquérito sorológico canino amostral para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina no período de 2008 a 2012.....	82
FIGURA 25. Mapa ferroviário com as principais ferrovias que interligam a região de São José do Rio Preto, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso	87
FIGURA 26. A- Mapa do Brasil, destacando o estado de São Paulo. B- Mapa destacando a região de São José do Rio Preto, e a localização com as fronteiras do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Paraná, seta (1) indica um eixo secundário de disseminação da LV, de Araçatuba para a região de São José do Rio Preto, a partir do eixo primário do Mato Grosso do Sul para	

Araçatuba; e seta (2) indica uma possível rota de disseminação da LV, a partir de um eixo do Mato Grosso do Sul para região de São José do Rio Preto. **88**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Leishmaniose visceral humana no DRS XV, na região de São José do Rio Preto, no estado de São Paulo, Brasil, 2008-2012	58
TABELA 2. Número de casos suspeitos de leishmaniose visceral humana com residência em municípios de abrangência do DRS XV – São José do Rio Preto, no período de 2008 a 2012	60
TABELA 3. Casos confirmados de leishmaniose visceral humana nos municípios pertencentes ao DRS XV, segundo sexo e faixa etária, no período de 2008 a 2012	63
TABELA 4. Número de casos confirmados, óbitos e taxa de letalidade na região do DRS XV e nas demais regiões autóctones do estado de São Paulo, no período de 2008 a 2012	65
TABELA 5. Número absoluto de amostras reagentes, não reagentes e solicitação de coleta de novas amostras, dos inquéritos sorológicos caninos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, no DRS XV, período de 2008 a 2012.....	68
TABELA 6. Relação entre o ano de início de transmissão da leishmaniose visceral humana e/ou canina, o número de inquéritos sorológicos caninos censitário previstos e total de inquéritos realizados nos municípios da região do DRS XV, no período de 2008 a 2012.....	78
TABELA 7. Resultados dos exames de sangue para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, nos inquéritos sorológicos caninos censitários realizados nos município da região do DRS XV, no período de 2008 a 2012	79
TABELA 8. Inquéritos sorológicos caninos amostrais para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina nos municípios da região do DRS XV, com presença do vetor <i>Lutzomyia longipalpis</i> , no período de 2008 a 2012	85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo Geral	44
3.2. Objetivos Específicos	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1. Áreas de Estudo	45
4.2. Populações de Estudo	48
4.2.1. Casos Humanos.....	48
4.2.2. Casos Caninos.....	49
4.2.3. Vetores.....	51
4.3. Critérios de Inclusão no Estudo	51
4.4. Coleta, Preparação, Registro e Fluxo de Amostra Canina.....	51
4.5. Técnicas Utilizadas no Diagnóstico.....	53
4.5.1. Ensaio Imunoenzimático	53
4.5.2. Reação de Imunofluorescência Indireta.....	54
4.5.3. Teste Rápido Imunocromatográfico	54
5. RESULTADOS	55
5.1. História Natural e Expansão da Leishmaniose Visceral na Região de São José do Rio Preto	55
5.2. Leishmaniose Visceral Humana na Região do DRS XV	57
5.2.1. Análise dos Casos Autóctones de Leishmaniose Visceral Humana na Região do DRS XV	61
5.3. Análise Soroepidemiológica de Leishmaniose Visceral Canina na Região do DRS XV.....	67
5.4. Análise Comparativa entre os Diferentes Algoritmos Utilizados para o Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral Canina	69
5.5. Análise dos Inquéritos Sorológicos Caninos: Censitário e Amostral ..	73
5.5.1. Inquérito Sorológico Censitário	73
5.5.2. Inquérito Sorológico Amostral	80

5.6. Possíveis Rotas de Disseminação da Leishmaniose Visceral na Região de São José do Rio Preto	86
6. DISCUSSÃO.....	89
7. CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	105
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania*. Existem três formas clínicas de leishmanioses, cuja classificação é baseada no quadro clínico apresentado pelo hospedeiro: leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. A forma cutânea é a mais comum, e se caracteriza pelo aparecimento de úlceras na pele. Na forma mucocutânea, observa-se a destruição total ou parcial da mucosa nasal, oral e tecidos circundantes. A forma visceral é a mais grave, sendo caracterizada pelo acometimento de um grande número de órgãos, principalmente baço, fígado, linfonodo e medula óssea. (WHO, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 350 milhões de pessoas encontram-se expostas a infecção por *Leishmania spp.* Anualmente são notificados cerca de 1,3 milhões de casos novos de leishmaniose. Destes, 300 mil casos apenas de leishmaniose visceral (LV), doença crônica e fatal quando não diagnosticada e tratada corretamente. Ainda, segundo a OMS, registra-se aproximadamente 30 mil óbitos/ano (WHO, 2014).

Geograficamente, as leishmanioses encontram-se distribuídas em quatro (4) continentes: Américas, Europa, Ásia e África; apresentando alta endemicidade em 98 países. Dados da OMS apontam Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão do Sul, Sudão e Brasil como os países com os maiores índices de LV (90%) registrados no mundo (WHO, 2014).

A LV é causada por *Leishmania donovani* (*L. donovani*) na Índia e no leste da África, por *Leishmania infantum* (*L. infantum*) na Europa e norte da África (REY, 2008) e nas Américas é causada por *Leishmania chagasi* (*sin. Leishmania infantum*) (SHAW, 2006, MOREIRA *et al.*, 2007).

No presente trabalho será referido como *L. Infantum chagasi* para registro do agente causal da LV nas Américas.

A doença acomete, geralmente, as populações mais pobres desses países, estando intimamente associadas à precariedade ou inexistência de saneamento básico, desnutrição e ocupação desordenada do solo. No Novo Mundo a doença é conhecida como calazar neotropical ou LV (WHO, 2006).

Fatores sociais e econômicos são os que mais contribuem para disseminação da doença (LEMOS & LIMA, 2002). Nos países em desenvolvimento, a LV pode estar diretamente relacionada às modificações no meio ambiente, ao processo de urbanização, à migração e ao trânsito intenso de pessoas, bem como a fatores nutricionais, causando ainda, perdas relacionadas com a produtividade e a vitalidade dos indivíduos infectados (FORATTINI, 1992; CORTES, 1993; MORSE, 1995; DESJEUX, 2001; WHO, 2003).

No Brasil a LV tem sido registrada em vários municípios, apresentando alterações importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominando em ambientes silvestres e rurais e mais recentemente em centros urbanos. A doença atinge as cinco regiões brasileiras sendo que os casos estão mais concentrados na região Nordeste (51,9%), seguida pelas regiões Norte (20,9%), Sudeste (18,9%), Centro-Oeste (8,1%) e Sul (0,2%) (BRASIL, 2010).

Na região de São José do Rio Preto, até 2007, a doença ocorria somente como casos esporádicos, cujas investigações posteriores revelaram tratar-se de casos “importados” (CARDIM *et al*, 2013).

Em 2008 surge o primeiro caso humano no município de Jales, neste mesmo ano no município de Urânia também detectou-se caso canino autóctone. Desde então, a doença está em franca expansão na região (SCANDAR *et al*, 2011).

Atualmente, a classificação epidemiológica dos municípios na região de São José do Rio Preto de acordo com o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do estado de São Paulo (PVCLV/ESP), apresenta 25 municípios com registro da presença do vetor, casos humanos e caninos (RANGEL *et al*, 2013).

As primeiras observações da presença do parasito como agente causal da LV foram feitas por Cunningham, na Índia, no final do século XIX, em indivíduos acometidos pelo *Kalazar*, ou “doença negra”. William Leishman e Charles Donovan, em 1901, identificaram quase simultaneamente o agente da LV em um soldado inglês e em uma criança

indiana, respectivamente. Em 1903, Ross criou o gênero *Leishmania*, denominando *L. donovani* o agente etiológico do calazar indiano (ALVES, 2006). Este gênero abriga um grande número de espécies, das quais aproximadamente vinte e duas são causadoras de infecções cutâneas ou viscerais em seres humanos (ALVAR *et al.*, 2004; DESJEUX, 2004).

Migone (1913) diagnosticou no Paraguai o primeiro caso autóctone brasileiro de LV, de um paciente proveniente do município de Boa Esperança, no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (ALENCAR *et al.*, 1991).

Durante a realização de um estudo para diagnosticar e demarcar a distribuição da febre amarela no Brasil foram encontrados 41 casos de indivíduos infectados por *Leishmania*, identificados em preparações microscópicas de órgãos obtidos *post-mortem*, de pacientes oriundos das regiões Norte e Nordeste do País (PENA, 1934 citado em BRASIL, 2003).

DEANE (1956) fez a primeira descrição da LV, em cães na área urbana, no estado do Ceará, Brasil. Verificou que a doença nem sempre fora esporádica, que era predominantemente rural e, associando os focos endêmicos com a presença do cão infectado, identificou a tríade: homem, cão e raposa como hospedeiros, estes dois últimos tendo um alto parasitismo cutâneo e apontou *Lu. longipalpis*, como único transmissor importante na área de estudo. A pesquisa identificou ainda, que o vetor tinha maior densidade durante a estação chuvosa, no entanto, também foi encontrado após longos períodos de seca, demonstrando alta capacidade de adaptação às condições ambientais.

No Brasil, a LV é uma doença de notificação compulsória, considerada um sério problema de saúde pública devido à gravidade dos casos, magnitude do problema e ampla expansão geográfica. Até 2010, distribuídos por 21 estados brasileiros, foram notificados, em média, 3.357 novos casos e 236 óbitos por ano, com coeficiente de incidência de 2,0 casos/100.000 habitantes, segundo dados do Ministério de Saúde (MS). A letalidade passou de 3,1% em 2000 para 7,1% em 2012 e, para o estado de

São Paulo não se verificou significativa tendência de queda nas taxas de letalidade no período de 1999 a 2013 (RANGEL *et al*, 2015).

O MS, por meio da Portaria Nº 2.472, de 31 de agosto de 2010 (**ANEXO 1**), que define a nova relação de doenças, agravos e eventos de notificação compulsória em saúde pública, ressalta a necessidade da notificação do primeiro registro de LV em canídeo doméstico de área indene, após confirmação da caracterização de *L. infantum chagasi* como agente causal pelo laboratório de referencia nacional (RANGEL *et al*, 2015).

Sabe-se que todos os casos de LV no ESP até 1998, correspondiam a casos importados, ou seja, oriundos de outras regiões endêmicas do país (CAMARGO-NEVES & KATZ 1999). Em 1997, foi registrada pela primeira vez, em área urbana do município de Araçatuba, a presença de *Lu longipalpis* (COSTA *et al.*,1997). Em 1998, detectou-se por meio de inquéritos sorológicos caninos e por técnicas moleculares uma enzootia canina causada por *L. infantum chagasi* em Araçatuba (CAMARGO-NEVES & KATZ 1999, TOLEZANO *et al.* 1999). Em 1999, foi registrado o primeiro caso humano de LV no ESP. Desde então, a ocorrência da doença tem sido observada em municípios situados na região do Planalto Ocidental Paulista, nos quais a transmissão apresenta feição exclusivamente urbana.

Desde o primeiro registro, em 1999 até dezembro de 2014, foram notificados 5.798 casos humanos suspeitos de LV no ESP, sendo 2.467 casos confirmados laboratorialmente. Desses, 2.146 foram classificados como casos autóctones do ESP distribuídos em 85 municípios. A presença do vetor *Lu. longipalpis* foi detectada em 177 municípios, dos quais, 123 apresentam transmissão canina e/ou humana de LV, porém, os outros 54 não registraram casos caninos e/ou humanos da doença, sendo classificados como “Silenciosos Receptivos Vulneráveis” (RANGEL *et al*, 2015) (**FIGURA 1**).

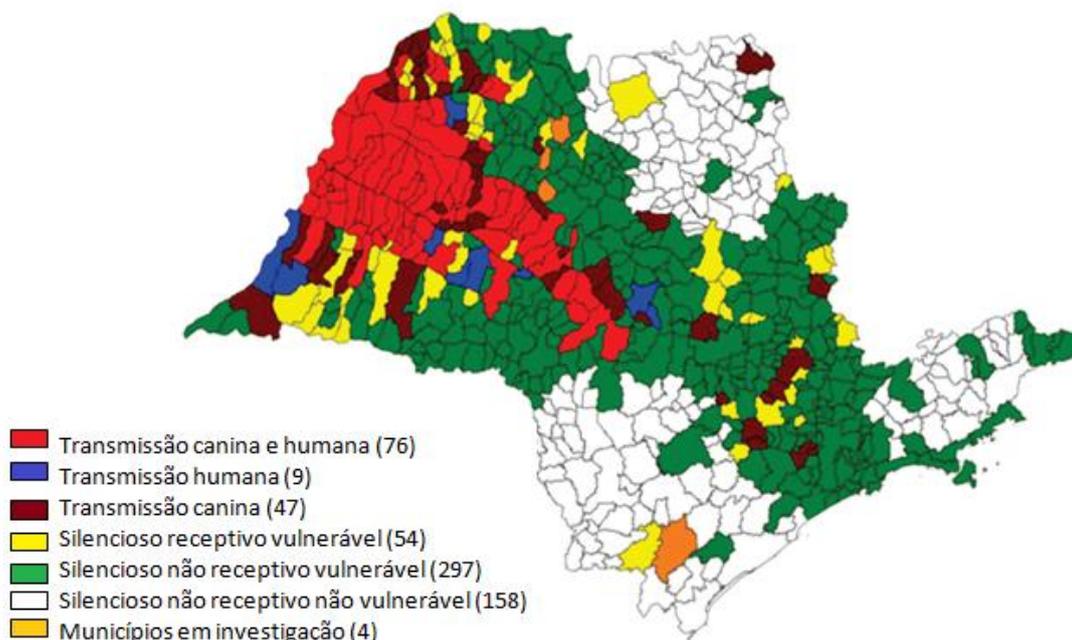


FIGURA 1. Distribuição dos municípios do estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral em dezembro de 2014. **Fonte:** Ciaravollo *et al* (2015); BEPA 2015,(143).

Após as primeiras notificações de casos autóctones de LV no ESP, foram realizados inquéritos amostrais nas populações caninas dos municípios de Bauru, Presidente Prudente, Marília e São José do Rio Preto, por se localizarem num raio de 150 km a partir do município de Araçatuba, com o objetivo de se identificar a área total de transmissão da LV (CAMARGO-NEVES, 2006).

Em 2007, na região de São José do Rio Preto, foi confirmado o primeiro caso humano autóctone de LV no município de Jales. No período de 2008 a julho de 2012, segundo dados do Sistema de informação de agravos de notificação (SINAN) – Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) e da Superintendência do Controle de Endemias (SUCEN), e Grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE) - XXX (Jales) foram notificados 30 casos humanos, sendo: 20 em Jales, com quatro (4) óbitos; oito (8) em Santa Fé do Sul, com um (1) óbito; um (1) em Urânia; e um (1) caso em Aparecida D'Oeste, sendo que, nos quatro (4) municípios, também foram confirmados a presença do vetor e de casos caninos (BERTOLLO *et al*, 2012).

A LV é uma doença infecciosa, não contagiosa cujo agente etiológico é o protozoário da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Três espécies podem causar a doença: *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e *L. chagasi* nas Américas (BADARÓ e DUARTE 1996). Atualmente a *L. chagasi* tem sido considerada idêntica à *L. infantum*, devido a sua análise genética com amplificação de ácido desoxirribonucléico (DNA) polimórfico, análise de sequência de gp63, e hibridização, por não existir diferença entre ambas e por essa razão devem ser consideradas como sinônimos (MAURÍCIO *et al.*, 2000; SHAW 2002; DANTA-TORRES, 2006; SHAW, 2006; AZEVEDO, 2008).

O gênero *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas distintas: amastigota e promastigota (**FIGURA 2**). A forma amastigota apresenta-se como corpúsculos arredondados, aflageladas à microscopia ótica comum. É como amastigota que o parasito se multiplica nos hospedeiros vertebrados. São parasitos intracelulares obrigatórios, com tropismo pelo sistema reticuloendotelial, especialmente pelos macrófagos. A forma promastigota é flagelada e encontrada no intestino médio do flebotomíneo onde se divide exponencialmente e migra para as glândulas salivares como forma infectante. (REY, 2010).

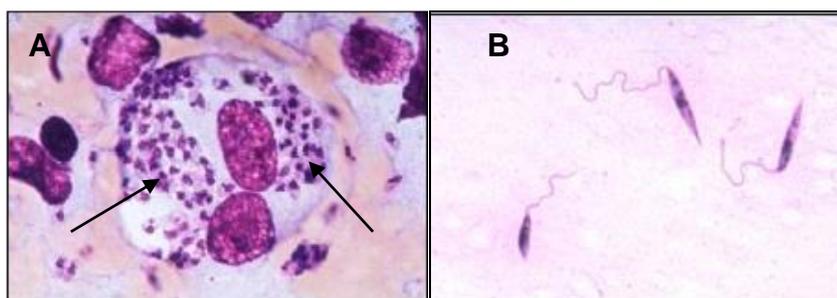


FIGURA 2. (A) Formas amastigota (seta) no interior de uma célula fagocítica, e (B) Promastigota de *Leishmania* sp. **Fonte:** Disponível em: <<http://www.who.int/tdr>>. Acesso em: 02 mar. 2016.

O vetor é um díptero pertencente da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Várias espécies do gênero *Phlebotomus* são incriminadas

na transmissão da doença no Velho Mundo, enquanto que, no Novo Mundo, o vetor é do gênero *Lutzomyia* (LAINSON, 1987) **(FIGURA 3)**.

Lu. longipalpis é responsável pela transmissão da LV na maioria das áreas de ocorrência desta parasitose no Brasil. *Lu. cruzi* tem sido o principal vetor na transmissão da LV em Corumbá e Ladário, Mato Grosso do Sul (DUJARDIN *et al*, 2008).



FIGURA 3. Flebotomíneo do gênero *Lutzomyia* spp. **Fonte:** Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com>>. Acesso em: 02 mar. 2016.

O ciclo biológico do vetor compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto, dependem de um ambiente úmido, sombreado e rico em matéria orgânica em decomposição para seu desenvolvimento (BRASIL, 2003).

ALEXANDER *et al.*, 2002 afirmam que as galinhas (*Gallus gallus*) apesar de atraírem *Lu. longipalpis*, são refratárias à *Leishmania*, portanto não são considerados fontes de infecção. Entretanto, sabe-se que estes animais desempenham importante papel na manutenção de altas densidades do vetor.

MOREIRA JUNIOR, *et al.*, 2003 verificaram que a presença de outros animais (equinos e suínos) podem aumentar o risco de transmissão de infecção pela LV, já que servem de fontes de alimentação para os flebotomíneos durante o repasto sanguíneo.

Nas áreas urbanas, a ação antrópica é pressão importante para mudanças ambientais e paisagísticas favoráveis à colonização do vetor. A isso soma-se o crescente aumento na ocupação desordenada das periferias onde é frequente a falta de saneamento básico (TOLEZANO *et al.*, 2001)

Na LV, o principal reservatório vertebrado silvestre é a raposa, mas animais sinantrópicos como os gambás têm sido encontrados naturalmente infectados (SHERLOCK *et al.*, 1984; CABRERA *et al.*, 2003).

Os cães são considerados importantes reservatórios domésticos no ciclo infeccioso da LV (KEENAN *et al.*, 1984), e compreendem a principal fonte de infecção para os flebotomíneos. Alguns estudos indicam que cerca de 10% a 50% dos cães com anticorpos anti-*Leishmania* são assintomáticos, embora cães com infecções subclínicas e/ou assintomáticas sejam potencialmente fontes de infecção aos flebotomíneos (FEITOSA *et al.*, 2000; ALVAR *et al.*, 2004; GRAVINO, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005; BRASIL, 2006; GREENE, 2006; SÃO PAULO, 2006; BRASIL, 2014).

O ciclo biológico de *Leishmania* é heteroxênico. A forma amastigota presente nos macrófagos do hospedeiro vertebrado infectado é ingerida pelo vetor durante o repasto sanguíneo; transforma-se em promastigota e reproduz-se por divisão binária no tubo digestório do inseto. Durante um novo repasto a forma promastigota metacíclica infectante é inoculada em outros hospedeiros, podendo assim, reiniciar um novo ciclo de desenvolvimento quando fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear. No interior dessas células os parasitos diferenciam-se em amastigota, multiplicam-se até o rompimento das mesmas e são fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, podendo haver disseminação para vísceras, linfonodos e medula óssea (BRASIL, 2006; BRASIL, 2014) **(FIGURA 4)**.

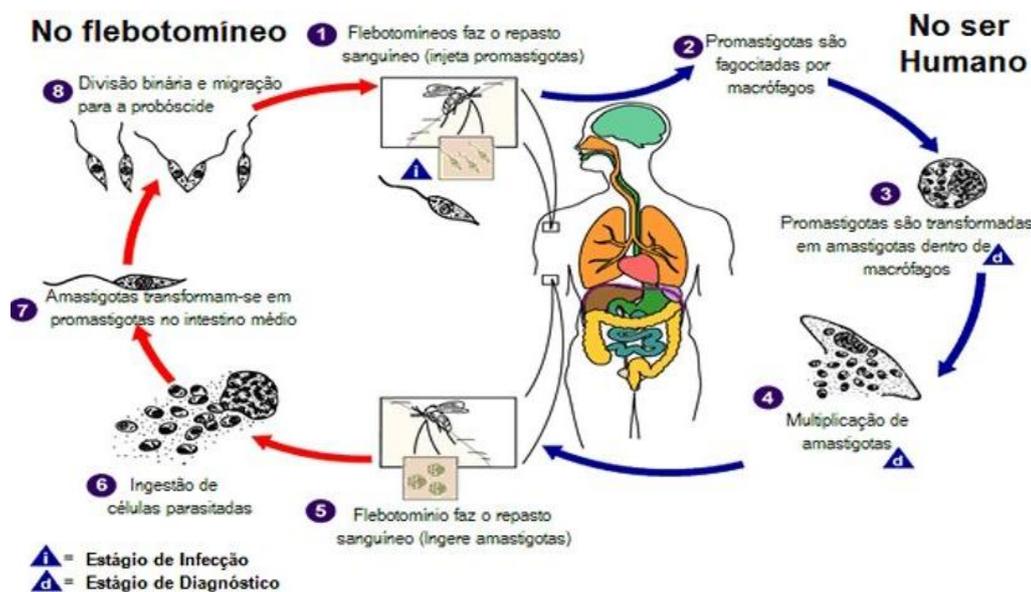


FIGURA 4. Ciclo Biológico de *Leishmania* spp. **Fonte:** Center of Disease Control & Prevention. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpd/html/LLeishmaniasis.htm>> Acesso em: 06 mar. 2016.

São conhecidos três ciclos de transmissão de *L. infantum chagasi*: **1) Silvestre** – a circulação é basicamente enzoótica, entre o vetor e canídeos silvestres, especialmente *Dusicyon vetulus* (nordeste e sudeste) e *Cerdocyon thous* (norte), além de alguns marsupiais e pequenos roedores. O homem e os cães domésticos podem adquirir a infecção ao penetrar no ambiente florestado. **2) Peri-domicílio** – quando animais sinantrópicos infectados se aproximam desse ambiente a procura de alimentos, e podem vir a infectar flebotomíneos que posteriormente poderão transmitir o parasito para outros hospedeiro vertebrados, o cão doméstico ou o homem. **3) Domicílio** - com a participação do cão doméstico infectado como a principal fonte de infecção para *Lu. longipalpis*, que posteriormente poderá transmitir *L. infantum chagasi* para outros cães e para o homem. (REBELO *et al*, 1999).

As manifestações clínicas da LV no homem são caracterizadas por febre intermitente, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia e linfadenopatia. Observa-se tosse, diarréia e dor abdominal como queixas frequentes na fase aguda da infecção. Progressivamente, o paciente pode

apresentar hemorragia gengival e digestiva, edema, icterícia, ascite, anorexia e desnutrição. Nestes pacientes, o óbito é geralmente determinado pelas hemorragias e infecções intercorrentes (MICHALICK & GENARO, 2005).

O período de incubação no homem varia de 10 dias a 24 meses, sendo em média de dois a quatro meses (SÃO PAULO, 2006).

Na LV canina (LVC) o quadro clínico do animal caracteriza-se principalmente por descamações, eczema e lesões cutâneas, ulcerações na pele localizadas frequentemente na orelha, focinho, cauda e articulações, e pêlo opaco. Na fase avançada observa-se onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjutivite, coriza, apatia, diarréia, vômito, hemorragia intestinal, edema de pata e hiperqueratose. Na fase terminal observa-se paresia das patas posteriores, caquexia, inanição culminando com o óbito do animal (BRASIL, 2006; BRASIL, 2014).

O diagnóstico, tanto nos seres humanos quanto nos animais, é baseado nos sinais clínicos, nos dados epidemiológicos e no diagnóstico laboratorial (SÃO PAULO, 2000).

O diagnóstico clínico baseia-se na observação de sinais e sintomas, tais como febre, emagrecimento e esplenomegalia, entretanto, o quadro clínico pode ser confundido com outras doenças que apresentam quadros clínicos semelhantes, tais como: neoplasias como o linfoma e as colagenoses, a febre tifóide, enterobacteriose septicêmica prolongada, esquistossomose mansônica, brucelose, toxoplasmose disseminada, tuberculose miliar, malária e a histoplasmose. Portanto, é essencial a existência de métodos laboratoriais sensíveis e específicos para o diagnóstico da LV (BRASIL, 2002; BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006, BRASIL, 2014).

A investigação epidemiológica é utilizada com muita frequência em casos de doenças transmissíveis, mas que se aplica a outros grupos de agravos. Consiste no estudo de campo realizado a partir de casos notificados (cl clinicamente declarados ou suspeitos) e de portadores. O objetivo é avaliar

a ocorrência de agravos e suas implicações para a saúde coletiva. Sempre que possível, deve conduzir à confirmação do diagnóstico, à determinação das características epidemiológicas da doença, à identificação das causas do fenômeno e à orientação sobre as medidas de controle adequadas para impedir a ocorrência de novos casos. É utilizada na ocorrência de casos isolados ou de epidemias (BRASIL, 2002).

O diagnóstico laboratorial específico da LV pode ser realizado, por meio de técnicas parasitológicas, imunológicas e moleculares. No diagnóstico sorológico da LV é necessário considerar o diagnóstico diferencial com outras doenças, principalmente a doença de Chagas e histoplasmose, em humanos. Em cães podem ter reações cruzadas principalmente com erliquiose e babesiose (BRASIL, 2014).

O diagnóstico parasitológico pode ser realizado por meio do exame microscópico direto (após coloração), isolamento *in vivo* (inoculação em animais de laboratório) e *in vitro* (cultura em meios de cultura acelular) e análise histopatológica. O diagnóstico parasitológico permite identificar o agente etiológico até o nível de gênero *Leishmania*; para caracterização da espécie, há necessidade de utilizar análise isoenzimática ou técnicas moleculares. Para exame microscópico direto, o material como o aspirado de linfonodo, medula óssea e/ou *imprint* de pele devem ser corados pelos métodos de Giemsa, Wright ou Leishman (ALENCAR *et al.*, 1991), e Panótico (BRASIL, 2003). **(FIGURA 5).**

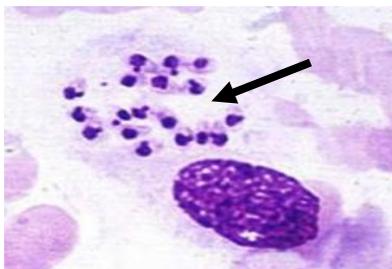


FIGURA 5. Lâmina de aspirado de linfonodo de cão, corado com giemsa, presença de forma amastigota de *Leishmania sp*, no interior do macrófago (seta) **Fonte:** <http://vet.uga.edu/vpp/archives/NSEP/leishmania/Port/Leish03.htm>. Acesso em: 12 Mai. 2015.

O isolamento *in vitro* aumenta a probabilidade de detecção do parasito, o meio usualmente empregado é o *Novy-MacNeal-Nicole* (NNN). O meio acelular bifásico BHI+Ducrey (*Brain Heart Infusion + Ducrey*) ou BHI+BAB (*Brain Heart Infusion + Blood Agar Base*) é um método de cultura tradicional em tubos e em microcultura. (GUTIERRES *et al.*, 2007).

Na análise histopatológica, fragmentos de órgão linfóide ou de pele são fixados em lâmina com formol a 10%, corados pela hematoxilina e eosina (HE) e examinados em microscópio óptico. O diagnóstico é confirmado mediante identificação da forma amastigota. Geralmente, os achados histopatológicos são apenas sugestivos e não específicos. Como detectam os parasitos nos tecidos por meio de anticorpos específicos, as técnicas imunocitoquímicas ou imunohistoquímicas apresentam maior sensibilidade em relação ao exame histopatológico (LOUREIRO *et al.*, 1998; FERRER 1999).

O método parasitológico apresenta especificidade de 100%, mas em virtude da distribuição heterogênea do parasito nas amostras, apresenta sensibilidade variável (GONTIJO, 2004).

Os testes imunológicos são métodos indiretos de diagnóstico por meio de detecção de anticorpos *anti-Leishmania* em soro, tais como, a RIFI, a EIE, teste de aglutinação direta (DAT) e o *western blot* (WB) (MANSON-BAHR, 1987).

A RIFI, consiste na reação de soros com os parasitos, forma promastigota (*Leishmania sp.*), fixados em lâmina de microscopia (**FIGURA 6**). Posteriormente, emprega-se conjugado anti-IgG de cão marcada com isotiocianato de fluoresceína, para evidenciação da reação. A RIFI possui sensibilidade superior a 90% e especificidade superior a 70% (MANSON-BAHR, 1987; VEXANET *et al.*, 1993; MANCIANTI *et al.*, 1995). A especificidade é prejudicada por reações cruzadas com os agentes etiológicos responsáveis pela doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (MANSON-BAHR, 1987; SUNDAR, *et al* 2002).

Para o diagnóstico canino, a RIFI até recentemente, foi utilizada nas investigações de foco de transmissão em inquéritos sorológicos censitários

ou amostrais para avaliar a prevalência da doença e para a confirmação das amostras reagentes pelo EIE (VIGILATO, 2004, BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006; BRASIL, 2014).

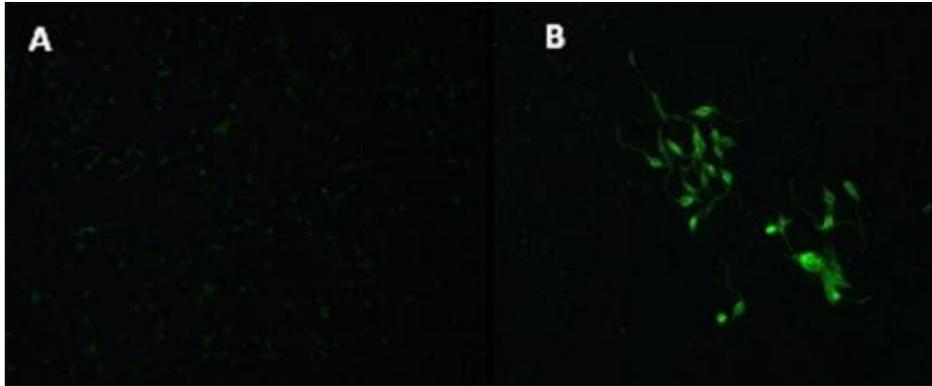


FIGURA 6. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI), não reagente (A) e reagente (B), utilizando-se antígeno de formas promastigotas de *Leishmania major*, marcadas pela fluoresceína. **Fonte:** Disponível em: <<http://www.scielo.br/img/revistas/pvb/v34n3/a10fig01.jpg>>. Acesso em: 09 mar. 2016.

O EIE baseia-se na utilização de antígenos solúveis de *Leishmania major like* adsorvido em microplacas, e anticorpos marcados com a enzima peroxidase, no qual permite a detecção, titulação e quantificação de substâncias de interesse biológico (**FIGURA 7**).

A sensibilidade do EIE varia de 90% a 100% e a especificidade entre 85% a 94% (VEXANET *et al*, 1993). Raramente apresenta reações cruzadas com o agente etiológico da malária e tripanossomatídeos (MANSON-BAHR, 1987).



FIGURA 7. Placa da reação do ensaio imunoenzimático (EIE) com antígeno de *Leishmania major like*. Os poços em amarelo demonstram reação reagente. **Fonte:** CLR-IAL/SJRP

Os métodos diagnósticos sorológicos EIE, como teste de triagem, e a RIFI (titulação $\geq 1:40$), como confirmatório da LVC, recomendados pelo PVCLV para os órgãos de saúde pública no Brasil, foram utilizados até 2012, na rotina dos inquéritos caninos nos municípios com registro da doença.

O DAT é um teste semi-quantitativo, muito utilizado em áreas endêmicas da Índia, desenvolvido para utilização em campo (SUNDAR *et al.*, 2006). Consiste em fixar o material biológico em formalina a 10%, corá-las com comassie azul brilhante, e posteriormente incubá-la. Após o período de incubação em temperatura ambiente de 18 horas a aglutinação se completa e se, os anticorpos contra o protozoário estiverem presentes, uma reação de aglutinação poderá ser observada a olho nu (FERREIRA & ÁVILA, 2001).

Vários estudos têm demonstrado sensibilidade variando entre 93,4 a 98,9% e especificidade entre 85,9 a 96,9% (CHAPPUIS *et al.*, 2006). Entretanto, o DAT apresenta algumas desvantagens em relação às demais metodologias, entre as quais podemos citar: a necessidade de diversas diluições da amostra, período de incubação relativamente longo, alto custo do antígeno, baixa estabilidade do antígeno aquoso e falta de padronização na leitura. (SUNDAR, 2002).

A técnica de WB possui uma sensibilidade 91% e 100% de especificidade. Para sua realização são utilizados antígenos de promastigota ou amastigota separados por eletroforese. Em estudo, realizado na França, com cães assintomáticos provenientes de área endêmica para LVC, os resultados de RIFI e EIE foram negativos, entretanto pelo WB foram detectados anticorpos específicos em 66% destes animais. Cerca de 90% dos cães que apresentaram resultados positivos para o WB também confirmaram os resultados pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). Estes resultados sugerem que a prevalência de cães infectados por *L. infantum chagasi* seja maior daquela detectada através das metodologias de RIFI e EIE, embora, não se saiba o potencial de infecção que estes cães apresentam para o vetor (BERRAHAL *et al.*, 1996).

A PCR é a técnica que tem sido utilizada com maior frequência para o diagnóstico e o monitoramento da leishmaniose em municípios indenes (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2007). Trata-se de uma metodologia que possui uma sensibilidade de 70 a 100% e especificidade de 85 a 99%, para detecção de DNA de *Leishmania spp*, podendo ser utilizada para avaliar uma ampla variedade de amostras biológicas humanas, caninas, reservatórios silvestres e vetores (GOMES *et al.*, 2008).

A sensibilidade da PCR também pode variar em função da qualidade do material biológico utilizado. Estudo que avaliou a sensibilidade da PCR associada à hibridização em diferentes amostras biológicas obtidas de cães infectados (assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos), apresentou melhor sensibilidade para linfonodo (95%), pele do abdômen (65%), pele da orelha (70%) e soro (70 a 94%). Nesse mesmo estudo, a sensibilidade obtida por meio de cultura de linfonodo foi de 55% (TRAVI *et al.*, 2001).

Nos últimos anos vários testes rápidos imunocromatográficos desenvolvidos apresentando altos níveis de sensibilidade e especificidade, fácil execução e interpretação tanto em campo quanto em laboratório, elevada eficiência, possibilitando a redução do custo operacional do diagnóstico. Estes testes utilizam como antígenos proteínas recombinantes como K39 e K26, bem como, também utilizam proteínas extraídas de bactérias (proteínas A e G), que compõe os reagentes marcadores dos testes para o imunodiagnóstico da LVH (CARVALHO *et al.*, 2003; CHAPPUIS *et al.*, 2006; SUNDAR, *et al.*, 2006; De ASSIS *et al.*, 2008) e canina (REITHINGER *et al.*, 2002; DA COSTA *et al.*, 2003; METTLER *et al.*, 2005; BISUGO *et al.*, 2007; LEMOS *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2010).

O Kalazar Detect™ Rapid Test (Kalazar Detect® InBios International, Seattle, WA, USA) é um teste rápido imunocromatográfico empregado para a determinação qualitativa de anticorpos contra o antígeno recombinante k39 de *L. infantum chagasi* em seres humanos (LEMOS *et al.*, 2003).

O TRALd (teste rápido anticorpo *L. donovani*) é um teste rápido que detecta anticorpos anti-*Leishmania*, em humanos que foi elaborado a partir

da adaptação da proteína recombinante k39 para um teste imunocromatográfico (BADARÓ, 1996 *apud* DOURADO *et al*, 2007).

O DiaMed *IT-LEISH*[®] (produzido pela DiaMed AG Cressier sur Morat, Suíça), é um teste rápido imunocromatográfico que permite a detecção rápida de anticorpos, também contra o antígeno recombinante k39 de *L.infantum chagasi* em seres humanos (SUNDAR *et al.*, 2003).

Dentre as novas tecnologias imunocromatográficas para o imunodiagnóstico da LVC, inclui-se o teste rápido *Dual Path Platform* (TR-DPP[®]) - LVC, patenteado pela Chembio Diagnostics e desenvolvido pelo Instituto Bio-Manguinhos (FUNED, 2010). Trata-se de um teste qualitativo que visa à detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza como antígeno a proteína recombinante K28 (K9 + K26 + K39). Esta proteína é o produto de um gene clonado a partir de *L. infantum chagasi* e que contém uma repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas de *Leishmania* (*L. donovani*, *L. infantum chagasi*). A presença de anticorpos anti-K39 é indicativa de infecção, e ainda não foi relatada reatividade com outros tripanossomatídeos (BURNS-JR *et al.*, 1993; BISUGO *et al.*, 2007).

GRIMALDI *et al.* (2012), utilizando o TR-DPP[®], demonstrou elevada especificidade (96%) e baixa sensibilidade (47%) na identificação de cães assintomáticos infectados, no entanto a sensibilidade do teste é significativamente maior (98%) para detecção de animais sintomáticos.

Em 2012, ocorreu uma alteração significativa no algoritmo visando o diagnóstico sorológico canino. Desta forma, a metodologia de EIE, anteriormente utilizada para a triagem sorológica, foi substituída pelo TR-DPP[®] LV e a RIFI utilizada como ensaio confirmatório foi substituída pelo EIE. (Nota Técnica nº 01/2011 – CGDT/CGLAB/DEVIT/SVS/MS), passando a triagem a ser uma atividade realizada pelos municípios quando possível **(ANEXO 2)**.

O tratamento é indicado para indivíduos com LV e sintomatologia clínica, pois a partir da manifestação de sintomas, na maioria dos casos, a doença não regride espontaneamente, podendo levar o paciente a óbito. Os

efeitos colaterais mais comuns são a toxicidade cardíaca, hepática e renal (BRASIL, 2003).

O tratamento tradicional é feito com antimoniato pentavalente N-metil Glucamina, e apresenta vários inconvenientes, tais como, as vias de aplicação, intramuscular ou endovenosa, que podem ser dolorosas e desconfortáveis. Além disso, estas drogas precisam ser administradas diariamente por longos períodos, o que muitas vezes requer hospitalização e desconforto ao paciente, além do alto custo aos cofres públicos (BRAGA *et al*, 2007). As drogas tradicionais também apresentam alta toxicidade e resistência (TEMPONE *et al*, 2005).

Como tratamentos alternativos destacam-se a anfotericina B e suas formulações lipossomais (anfotericina B-lipossomal e anfotericina B-dispersão coloidal) (GONTIJO & MELO, 2004). O principal efeito colateral da anfotericina B verificado nos pacientes está relacionado ao quadro de insuficiência renal. A formulação lipossomal da anfotericina (AmBisome) é eficaz e apresenta baixa toxicidade, mas possui custo elevado. (BRASIL, 2003).

O controle de cura da LV no tratamento é eminentemente clínico e envolve o desaparecimento da febre, a recuperação do apetite e do estado geral, já ao final da primeira semana de tratamento. A normalização dos parâmetros hematológicos ocorre em torno da segunda semana. A redução da hepatoesplenomegalia é lenta, porém progressiva. A positividade das reações sorológicas perdura por meses (SÃO PAULO, 2006).

A portaria interministerial do MS nº 1.426 de 11 de Julho de 2008 (**ANEXO 3**), proíbe em todo território nacional, o tratamento da LVC dos animais infectados ou doentes, com produtos de uso humano ou produtos não-registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), aplicando-se ao Médico Veterinário infrator e penalidades do Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, no artigo nº 268 do Código Penal e as infrações e penalidades previstas conforme a Lei número No-6.437, de 20 de agosto de 1977, e no Decreto-Lei No-467, de 13 de fevereiro de 1969. (BRASIL, 2008)

As tentativas de tratamento de LVC, por meio de fármacos empregados no tratamento da LVH tais como: antimoniato pentavalente, anfotericina B, alopurinol e aminosidina têm apresentado baixa eficácia (GRAMICCIA *et al.*, 1992; POLI *et al.*, 1997; CAVALIERO *et al.*, 1999; CORTADELLAS 2003). O uso rotineiro de fármacos em cães produz diminuição temporária dos sinais clínicos, que pode variar de alguns meses a um ano, não previne a ocorrência de recidivas e tem efeito limitado na infectividade para flebotomíneos (ALVAR *et al.*, 1994; CORTADELLAS 2003).

Segundo REITHINGER e DAVIES (1999), uma alta proporção de cães clinicamente curados permanece infectante para o vetor. Soma-se a essa problemática, o risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas (GRAMICCIA *et al.*, 1992).

As estratégias de controle, hoje utilizadas, estão dirigidas verticalmente para o controle do reservatório canino por meio da realização de inquérito sorológico para diagnóstico e recolhimento dos animais infectados por *L. infantum chagasi*. Em relação à população humana, destaca-se a necessidade de diagnóstico e tratamento precoce de todos os suspeitos. A partir da confirmação de um caso de LVH recomenda-se a realização de atividades de controle vetorial, por meio de tratamento químico com inseticidas no entorno do local provável de transmissão, num raio de até 200 metros (SÃO PAULO, 2006). Entretanto, essas medidas, muitas vezes realizadas de forma isolada, não apresentam efetividade para redução da incidência da doença (BRASIL, 2014).

Outra medida de controle da LV é o manejo ambiental, que consiste na eliminação de toda matéria orgânica em decomposição e redução da área sombreada em quintais, terrenos baldios e logradouros públicos, por meio de informação aos responsáveis pelos imóveis. Além disso, é realizado levantamento ambiental, identificando imóveis com condições mais favoráveis à proliferação do vetor. (SÃO PAULO, 2006).

SOUSA *et al.*, (2001) afirmaram que a diminuição da população de inseto e dos reservatórios em regiões endêmicas exerce importante impacto

no declínio da incidência humana, enquanto outros autores sustentam que a eliminação do cão e a borrifação de inseticidas em áreas com casos humanos e caninos não são suficientes para o controle eficiente da endemia.

Entre as medidas preventivas da LV dirigidas ao reservatório urbano, cita-se a vacina anti-*Leishmania*, a qual ainda carece de estudos de custo e efetividade, e a coleira impregnada com deltametrina a 4% (piretróide), que tem demonstrado resultados satisfatórios nos estudos realizados, apresentando redução das taxas de alimentação sanguínea e efeito letal para as diferentes espécies de flebotomíneos. (KILLICK-KENDRICH, 1997; CAMARGO-NEVES, 2004; FERROGLIO, 2008).

O PVCLV/ESP tem como objetivo a redução da morbidade e da letalidade por LV por meio do diagnóstico e tratamento precoce dos casos, bem como diminuir os riscos de transmissão mediante controle da população de reservatórios caninos e do agente transmissor.

O programa é subdividido em atividades relacionadas à vigilância epidemiológica e às medidas de prevenção e controle do vetor, do reservatório doméstico e para seres humanos além de promover ações de educação em saúde (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006; BRASIL, 2014).

Quanto à classificação da LVC, de acordo com PVCLV/ESP, os municípios são divididos em dois grandes grupos: silenciosos (sem a confirmação de casos humanos e/ou caninos autóctones) e com transmissão (com a confirmação de casos humanos e/ou caninos autóctones) (SÃO PAULO, 2006) **(FIGURA 8)**

1. Município silencioso não receptivo não vulnerável: Incluem-se os municípios sem confirmação de casos autóctones humanos e/ou caninos; sem presença do vetor e distantes de município endêmico.

2. Município silencioso não receptivo vulnerável: Incluem-se os municípios sem confirmação de casos autóctones humanos e/ou caninos; sem presença do vetor e próximos de município endêmico.

3. Município silencioso receptivo não vulnerável: Incluem-se os municípios sem confirmação de casos autóctones humanos e/ou caninos; com presença do vetor e distantes de município endêmico

4. Município silencioso receptivo vulnerável: incluem-se os municípios sem confirmação de casos autóctones humanos e/ou caninos; com presença de vetor, próximos de município endêmico

5. Município com transmissão canina e/ou humana: Nestes municípios com transmissão humana e/ou canina confirmada, recomenda-se o diagnóstico precoce, realizando o exame no animal, permitindo a eutanásia de cães infectados (soropositivos) e participando do controle da população canina.

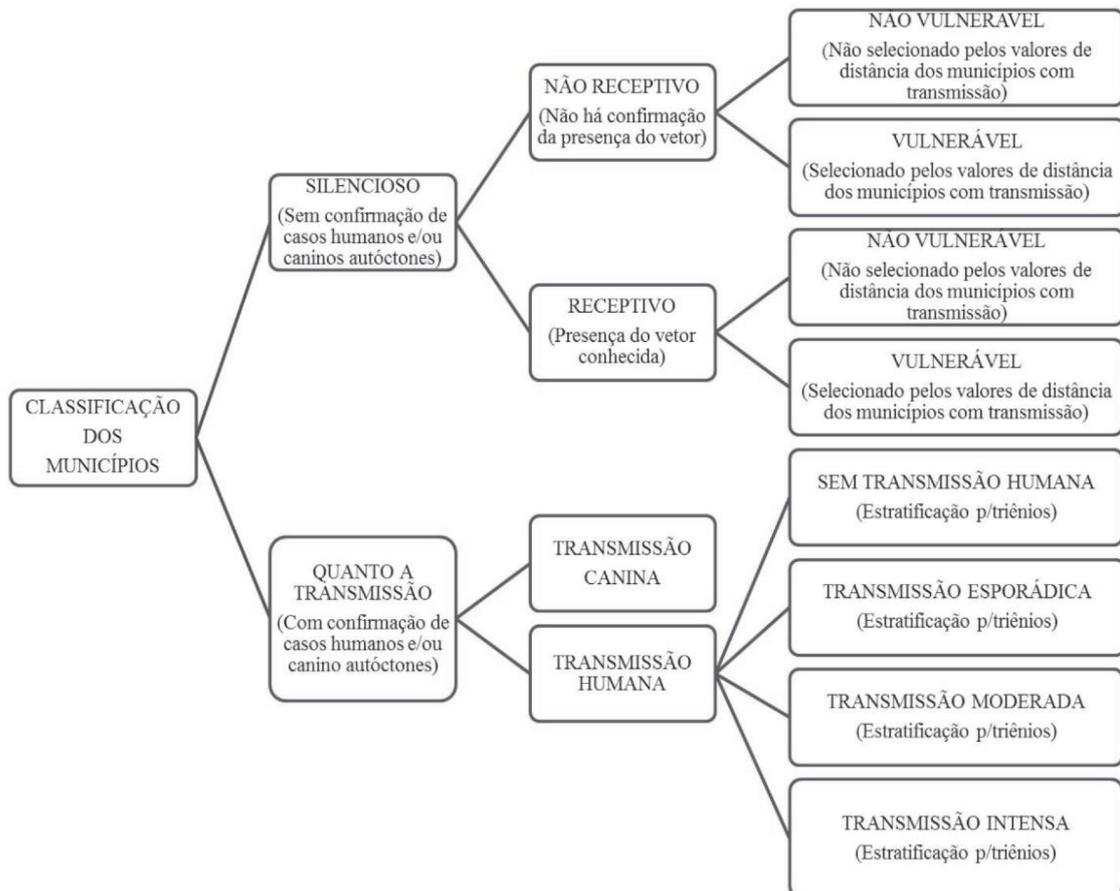


FIGURA 8. Esquema representativo da classificação epidemiológica da leishmaniose visceral dos municípios no estado de São Paulo. **Fonte:** Ciaravolo *et al.* 2015. BEPA, 2015; 12(143) 9-22.

Considerando ainda os casos de LVH, o MS recomenda que a os municípios sejam classificados com base na média de casos nos últimos três (3) anos. Divididos em dois grupos: com transmissão e sem transmissão. De acordo com a média de casos humanos os municípios com transmissão de LVH são estratificados em: com transmissão esporádica $< 2,4$; moderada $\geq 2,4$ a $<4,4$ e intensa $\geq 4,4$. Os municípios com transmissão moderada e intensa são considerados prioritários para as ações de vigilância e controle da LV (BRASIL, 2006).

O PVCLV/ESP preconiza a realização de inquéritos sorológicos caninos, censitário e amostral, visando conhecer, mapear e divulgar a situação epidemiológica da doença nas áreas com transmissão ativa ou com potencial de transmissão, e identificar os cães sorologicamente reagentes para posterior realização da eutanásia (BRASIL, 2003; SÃO PAULO, 2006; BRASIL, 2006; BRASIL, 2014).

No inquérito sorológico amostral o objetivo é monitorar a positividade da LVC, em setores urbanos, sendo realizado anualmente ou a cada dois anos, em municípios indenes, onde há o registro da presença do vetor, para averiguar a ausência de enzootia em cães. O inquérito sorológico censitário tem o objetivo de monitorar a prevalência da LV assim como o controle por meio da identificação e eliminação dos cães infectados, deve ser realizado anualmente, por três (3) anos consecutivos em zona urbana de município silencioso e receptivo com população canina menor de 500 cães; em setores urbanos de municípios com transmissão moderada ou intensa e em zonas rural. (SÃO PAULO, 2006).

A classificação epidemiológica dos municípios de abrangência do DRS XV região de São José do Rio Preto, segundo o PVCLV/ESP, embasada pelo serviço regional (SR) da SUCEN e GVE, está classificada conforme representada no **ANEXO 4**. Segundo RANGEL *et al*, 2013, foram classificados na região do DRS XV, 25 municípios com presença de vetor e/ou transmissão canina e/ou humana.

2. JUSTIFICATIVA

O processo de rápida expansão geográfica e urbanização da LV conduzem à necessidade de se estabelecer medidas mais eficazes de vigilância e controle. Na região deste estudo a presença de LV foi registrada pela primeira vez em 2008 nos municípios de Jales e Urânia, a partir de então, tem se observado crescente expansão e disseminação da doença, com registros expressivos de números de cães infectados que foram eutanasiados assim como a presença de casos humanos. A avaliação da efetividade dos inquéritos sorológicos caninos, preconizados pelo PVCLV/ESP, pode contribuir para a melhoria das medidas de controle da LV, na região de São José do Rio Preto. O presente estudo reveste-se ainda, de importância para a região, seja pela identificação dos municípios endêmicos, como também das possíveis rotas da expansão dos focos de transmissão da LV. Essa informação associada às características ambientais e topográficas subsidiará aos serviços de municípios de saúde, construir o planejamento das ações de vigilância e controle da LV.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar os aspectos soroepidemiológicos da LV no DRS XV região de São José do Rio Preto no período de 2008 a 2012.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever a história natural e a expansão da LV na região de São José do Rio Preto;
2. Analisar os casos humanos de leishmaniose visceral na região de São José do Rio Preto no período de 2008-2012;
3. Avaliar a soro-positividade da LVC na região de São José do Rio Preto no período de 2008-2012;
4. Realizar análise comparativa entre os diferentes algoritmos utilizados para diagnóstico da LV, no período de 2008 a 2012;
5. Avaliar a efetividade dos inquéritos sorológicos caninos de como ação de vigilância e controle na região de São José do Rio Preto, tal como preconizado pelo PVCLV/ESP;
6. Estudar as possíveis rotas de disseminação da LV na região de São José do Rio Preto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Estudo epidemiológico descritivo, realizado a partir de dados secundários, obtidos por meio de análises soropidemiológicas, da rotina de casos suspeitos de LV e por meio de inquéritos censitário e/ou amostral caninos, no período de 2008 a 2012.

4.1. ÁREAS DE ESTUDO

O estudo foi desenvolvido na região administrativa de São José do Rio Preto, pertencente ao DRS XV, que corresponde à área de abrangência do GVE XXIX (São José do Rio Preto com 67 municípios) e do GVE XXX (Jales com 35 municípios) (**FIGURA 9**).

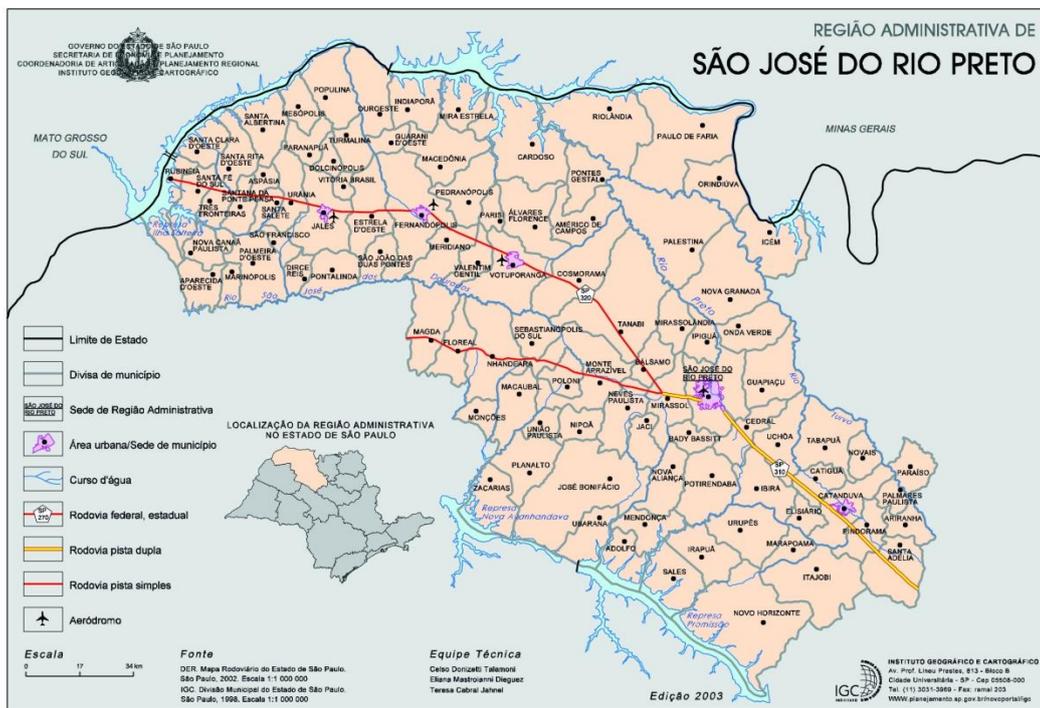


FIGURA 9. Mapa da região administrativa de São José do Rio Preto. Fonte: Disponível em: <<http://www.regiaodesaojosedoriopreto.sp.gov.br/nossacidadelocalizacao>>. Acesso em: 20 de Nov. 2013.

Compreende os seguintes municípios:

- **GVE XXIX** – Adolfo, Álvares Florence, Américo de Campos, Ariranha, Bady Bassit, Bálsamo, Cardoso, Catanduva, Catiguá, Cedral, Cosmorama, Elisiário, Embaúba, Fernando Prestes, Floreal, Gastão Vidigal, General Salgado, Guapiaçu, Ibirá, Icem, Indiaporã, Ipiruá, Irapuã, Itajobi, Jaci, José Bonifácio, Maucaubal, Magda, Marapoama, Mendonça, Mirassol, Mirassolândia, Monções, Monte Aprazível, Neves Paulista, Nhandeara, Nipoã, Nova Aliança, Nova Granada, Novais, Novo Horizonte, Onda Verde, Orindiúva, Palestina, Palmares Paulista, Paraíso, Parisi, Paulo de Faria, Pindorama, Pirangi, Palnalto, Poloni, Pontes Gestal, Potirendaba, Riolândia, Sales, Santa Adélia, São José do Rio Preto, Tabapuã, Tanabi, Ubarana, Uchoa, União Paulista, Urupês, Valentim Gentil, Votuporanga, Zacarias.
- **GVE XXX** – Aparecida D'Oeste, Aspásia, Dirce Reis, Dolcinópolis, Estrela D'Oeste, Fernandópolis, Elisiário, Guarani D'Oeste, Jales, Macedônia, Meridiano, Mesópolis, Mira Estrela, Nova Canaã Paulista, Ouroeste, Palmeira D'Oeste, Paranapuã, Pedranópolis, Pontalinda, Populina, Rubinéia, Santa Albertina, Santa Clara D'Oeste, Santa Fé do Sul, Santa Rita D'Oeste, Santa Salete, Santana da Ponte Pensa, São Francisco, São João das Duas Pontes, São João de Iracema, Sebastianópolis do Sul, Três Fronteiras, Turmalina, Urânia, Vitória Brasil.

A região localizada no Noroeste Paulista, possui cerca de 1.470.348 mil habitantes (5,2% do estado) e extensão territorial de 37.167.52 km² (15% do estado), possui fronteira com os estados de Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (**FIGURA 10**).

A região é cortada por importantes rodovias estaduais e federais, entre as quais pode-se citar: a Washington Luís (SP-310), Assis Chateaubriant (SP-425) e BR-153, conhecida como Transbrasiliana. Além das rodovias, merece destaque o sistema ferroviário que serve a região. A ferrovia Bandeirantes (Ferroban), antiga Ferrovia Araraquarense corta a região de Araraquara a Santa Fé do Sul, neste ponto cruza com a divisa do Mato Grosso do Sul, onde passa a ser chamada de ferrovia Norte Brasil (Ferro Norte), indo até Rondonópolis em Mato Grosso. Destaca-se ainda um aeroporto de médio porte, na cidade de São José do Rio Preto, que atende não apenas ao transporte de passageiros como de cargas, bem como a Hidrovia Tietê-Paraná.

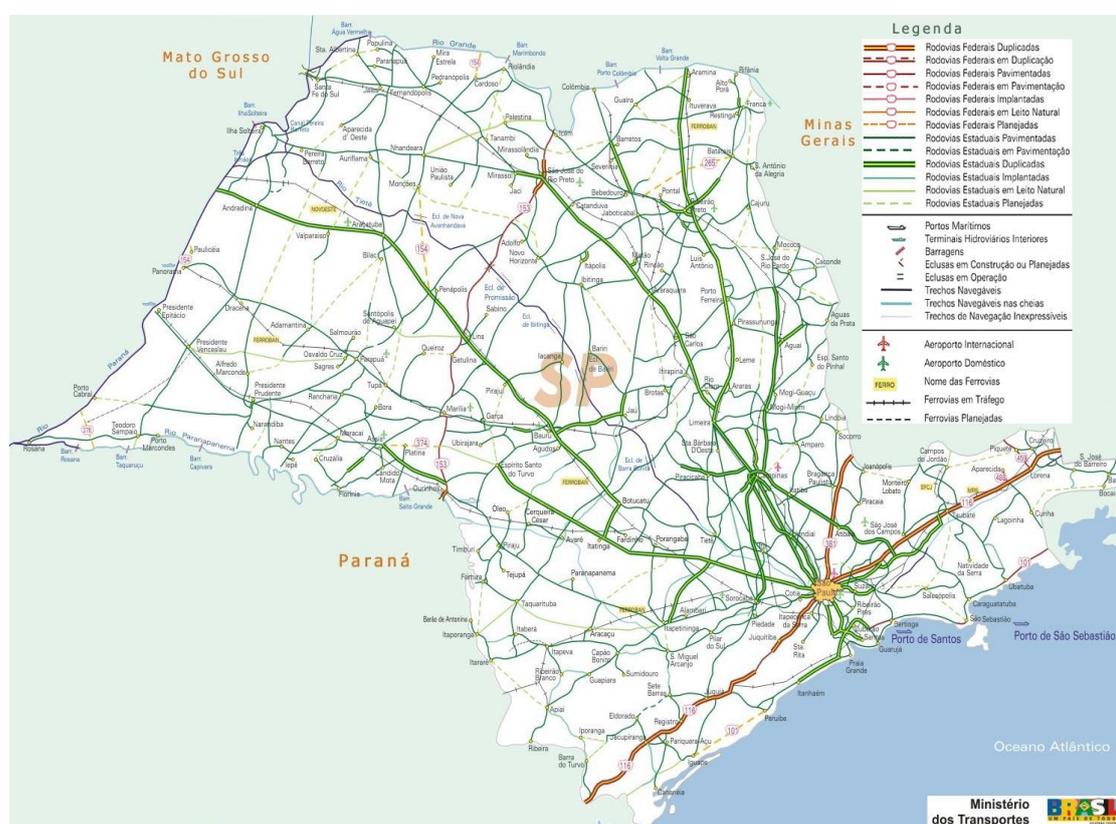


FIGURA 10. Mapa do estado de São Paulo e suas fronteiras com estados de Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. **Fonte:** Disponível em: <<http://www2.transportes.gov.br/bit/01-inicial/01-estadual/estados>>. Acesso em: 22 nov. 2012.

Segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, o clima é do tipo tropical de altitude, com inverno seco e ameno com a temperatura média do mês mais frio superior a 18°C, precipitação média do mês mais seco inferior a 60mm, e a temperatura média anual é de 25,3°C.

4.2. POPULAÇÕES DO ESTUDO

4.2.1. Casos humanos

Foram analisados 251 casos notificados pelo SINAN de pacientes com suspeita clínica de LVH atendidos nos serviços de saúde de referência para este agravo, na região de abrangência do DRS XV no período de 2008 a 2012.

Para analisar os casos suspeitos de LVH, foram construídas planilhas em EXCEL versão 2007 (Microsoft Office), contendo dados do SINAN, fornecido pelos GVEs XXIX e XXX, e informações do Sistema de Informação e Gestão Hospitalar/ Laboratório (SIGH-Lab), obtido pelo Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto (CLR-IAL/SJRP).

A classificação final dos casos LVH foi estabelecida pelo GVEs XXIX e XXX, considerando os critérios laboratoriais e/ou clínico epidemiológicos. Para definição dos casos autóctones, foram considerados o município de residência e o local provável de infecção (LPI).

A partir dos casos autóctones diagnosticados nos serviços de saúde da região do DRS XV, foram listados os municípios que compõem a região de abrangência do DRS XV, e analisadas as seguintes variáveis: data de notificação, município de residência, sexo, idade, evolução do caso e taxa de letalidade.

Para alguns dos resultados obtidos foi possível realizar a análise estatística a partir da construção de tabelas de contingência 2x2. A relação de diferenças observadas para algumas variáveis, por exemplo, para

letalidade entre as taxas para a região de São José do Rio Preto e para o restante do estado de São Paulo; em relação à maior positividade para indivíduos do sexo masculino e, entre aqueles pacientes em faixas etárias inferior a 10 e superior a 51 anos.

Foi utilizado o teste de X^2 . A significância estatística foi determinada para $P \leq 0,05$ (FISCHER & YATES, 1971).

Onde:

$$X^2 = \sum \left[\frac{(O - E)^2}{\sum (E)} \right]$$

X^2 – Qui quadrado.

O - Valores observados.

E - Valores esperados.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CEP) nº 205.081/2013 (**ANEXO 5**).

4.2.2. Casos caninos

No presente estudo foram analisados os resultados de 45.343 amostras de sangue de cães, incluídos nos inquéritos soropidemiológicos censitários e/ou amostrais, para o diagnóstico da LVC, no período de 2008 a 2012.

A definição de amostragem para coleta de amostra canina para o inquérito sorológico censitário e amostral foi estabelecida de acordo com as orientações do PVCLV /ESP, conforme determina o Manual de Vigilância e Controle LV no ESP (SÃO PAULO, 2006).

Considerou-se ainda a capacidade de atendimento da demanda para o diagnóstico da LVC do laboratório de referência regional CLR-IAL/SJRP e a disponibilidade dos kits fornecidos pelo MS. No período de 2009 a 2011, quando da redução do fornecimento desses insumos, ficou

estabelecido em 100 amostras o tamanho da população canina no inquérito sorológico canino.

No inquérito soroepidemiológico censitário foram coletadas amostras de sangue de toda a população canina do município, com transmissão humana e/ou canina conforme determina o Manual de Vigilância e Controle LV no ESP (SÃO PAULO, 2006).

As informações referentes ao domicílio do cão, data da coleta do sangue para diagnóstico da LVC e resultado dos exames laboratoriais, registradas em Boletins de Coleta e Registro de Exame Laboratorial e Eutanásia em atividade de inquérito canino (BOL_CÃO 3) (**ANEXO 6**), conforme modelo do Manual de Vigilância e Controle da LV no ESP, foram resgatadas dos arquivos do CLR IAL/SJRP.

Foram construídas tabelas distintas de municípios classificados como censitários e para os amostrais, utilizando o programa WORD, versão 2007 (Microsoft Office), com informações das características geográficas, climáticas, índice demográfico, municípios limítrofes, presença de rodovia e ferrovia.

No estudo foram analisadas as variáveis: população canina, município de residência, ano de transmissão, tipo de inquérito sorológico, tipo de amostra, método de diagnóstico, taxa de positividade, total de inquéritos sorológicos realizados e início/término das atividades. Todas as informações foram digitadas em planilha EXCEL versão 2007 (Microsoft Office).

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) nº06/2013 (**ANEXO 7**).

Foram calculados os coeficientes de soro-positividade canina obtidos dos resultados dos inquéritos caninos sorológicos, conforme a fórmula:

Coeficiente de soro-positividade = **A x 100/B**

A= número de cães soropositivos em um determinado inquérito sorológico;

B= população canina examinada no mesmo inquérito sorológico.

Na análise de concordância bruta entre os métodos empregados na triagem sorológica e teste confirmatório de diagnósticos da LVC, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de concordância} = \frac{\text{Concordâncias}}{\text{Concordâncias} + \text{Discordâncias}} \times 100$$

4.2.3. Vetores

As informações sobre a presença de *Lu. longipalpis* foram fornecidas pelo Laboratório de Entomologia da SUCEN regional de São José do Rio Preto. Os dados obtidos foram resultados de coletas de rotina de flebotomíneos do serviço de vigilância ambiental pelas equipes da SUCEN, conforme preconizado pelo Manual de Vigilância e Controle do ESP, nos municípios sob investigação, seguindo a ocorrência de casos humanos e/ou caninos, com características sugestivas para proliferação do vetor no período de 2008 a 2012.

4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO NO ESTUDO

Foram incluídos no estudo, dados soroepidemiológicos provenientes da rotina do PVCLV/ESP, realizados por meio de inquérito sorológico canino censitário e/ou amostral, concluídos em sua totalidade, nos municípios sob investigação, ou seja, classificados como município silencioso receptivo vulnerável, devido à presença do vetor e municípios com transmissão canina e/ou humana.

4.4. COLETA, PREPARAÇÃO, REGISTRO E FLUXO DE AMOSTRA CANINA

A coleta de sangue dos 45.343 cães foi realizada por médicos veterinários ou técnicos treinados dos serviços de zoonoses dos municípios participantes dos inquéritos soroepidemiológicos.

Durante o período de estudo, foram utilizados duas (2) formas de coletas de amostras de sangue em cães para os inquéritos sorológicos: eluato em papel de filtro e soro sanguíneo, e quatro (4) algoritmos diferentes: somente pela RIFI; por EIE e RIFI, ambos os grupos de amostras examinadas em eluato de sangue coletado em papel de filtro; por EIE e RIFI e por TR-DPP® e EIE, esses dois grupos examinados com soro sanguíneo (FIGURA 11).

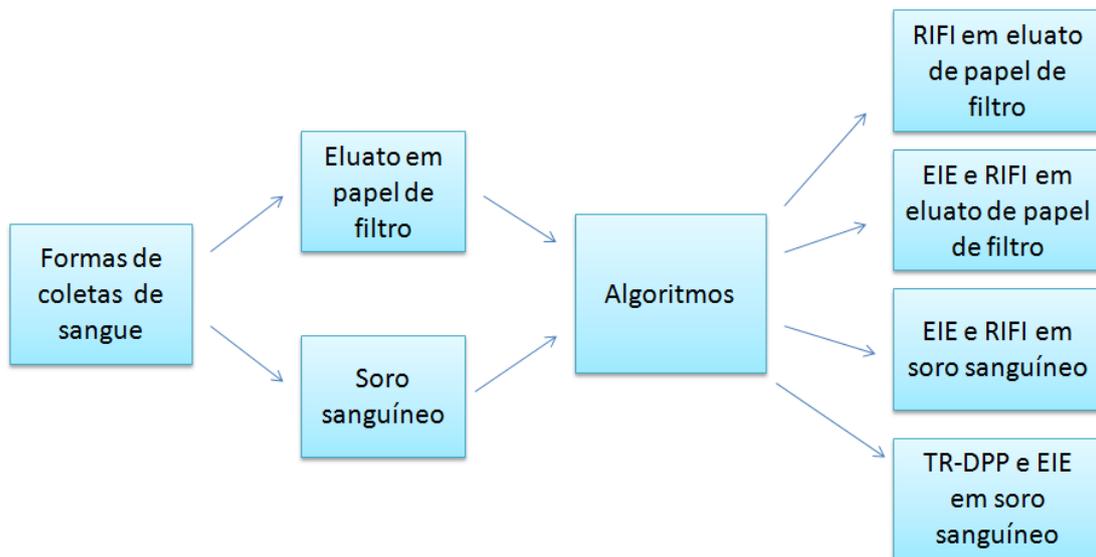


FIGURA 11. Esquema representativo das formas de coletas de sangue nos inquéritos sorológicos caninos e os algoritmos utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, no período de 2008 a 2012.

Até junho de 2010, as amostras de sangue dos cães eram coletadas em papel de filtro marca Whatman nº1, através de punção da ponta da orelha com uma lanceta, impregnando-se uma área mínima de 3x3 cm do papel de filtro padronizada, distribuída uniformemente na frente e no verso. As amostras eram acondicionadas à temperatura de 4°C ou 20°C por até 30 dias ou à -20°C até 60 dias da coleta, protegidas em saco plástico livre de

umidade, conforme orienta a Nota Técnica da Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD) nº 03/2007 DOE de São Paulo de 15/11/07 **(ANEXO 8)**.

A partir dessa ocasião, as amostras de sangue dos cães após serem coletadas por punção venosa, foram transferidas para tubo seco para obtenção de soro sanguíneo e realização do diagnóstico da LVC, conforme Nota Técnica da CCD nº 02/2009 DOE de São Paulo de 24/12/09, que determina a substituição da utilização do eluato do papel de filtro por amostra de soro sanguíneo **(ANEXO 9)**. O volume coletado varia de 1,0 a 3,0 ml, de acordo com o tamanho do cão.

Para a descentralização da realização do TR-DPP® para os municípios com transmissão e/ou sob investigação, houve a necessidade de capacitação dos profissionais técnicos daqueles municípios, o exame passa a ser realizado no município por um médico veterinário, desta forma agiliza-se a liberação de resultados negativos. Toda a amostra reagente no TR-DPP® obrigatoriamente foi encaminhada para confirmação pelo método EIE no CLR-IAL/SJRP. As amostras foram cadastradas pelo laboratório de referência até fevereiro/2010 manualmente em livros de registros, após este período o cadastramento foi informatizado por meio do SIGH-Lab, o que possibilitou o rastreamento e a geração de relatórios dos exames solicitados.

Após o processamento das amostras caninas, procedeu-se o encaminhamento dos resultados para o SR-08 da Sucen e este ao coordenador do Programa no município.

4.5. TÉCNICAS UTILIZADAS NO DIAGNÓSTICO

4.5.1. Ensaio imunoenzimático

Para o EIE utilizou-se o Kit EIE-LVC produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, licenciado no Ministério da Agricultura sob o n. 8968/04, em 22/09/2004, realizado conforme orientações do fabricante **(ANEXO 10)**.

Este ensaio consiste na reação de antígenos solúveis purificados a partir de formas promastigotas de *Leishmania major* obtidos em culturas, adsorvidos nas cavidades de microplacas de polietileno, frente ou contra anticorpos específicos para *Leishmania* possivelmente presentes nas amostras de soro ou eluato de sangue de cães, devidamente diluídas.

4.5.2. Reação de Imunofluorescência Indireta

Para a RIFI utilizou-se o Kit IFI-LVC produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, licenciado no Ministério da Agricultura sob o n.8972/04 em 04/10/2004, realizado conforme as instruções do fabricante **(ANEXO 11)**.

O ensaio da RIFI consiste na reação de anticorpos específicos para *Leishmania* possivelmente presentes nas amostras de soro ou eluato de sangue de cães diluídas 1:40, com o antígeno de *Leishmania* (formas promastigotas) fixado em lâminas marcadas com fluoresceína.

4.5.3. Teste Rápido Imunocromatográfico

Para o TR imunocromatográfico utilizou-se o Kit TR-DPP® LVC produzido por Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ, licenciado no Ministério da Agricultura sob o n.9561/2011, realizado conforme as instruções do fabricante **(ANEXO 12)**.

Trata-se de um ensaio imunocromatográfico que utiliza de um lado, a combinação da proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal, e de outro, antígenos recombinantes k28 (fusão do k39, k26 e k9) específicos de *Leishmania* ligados a uma membrana. (BIO-MANGUINHOS, 2011).

5. RESULTADOS

5.1. HISTÓRIA NATURAL E EXPANSÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Na região de abrangência do DRS XV de São José do Rio Preto, até 2007, a doença ocorria somente com casos esporádicos, cujas investigações epidemiológicas posteriores revelaram tratar-se de casos “importados” (CARDIM *et al*, 2013).

A transmissão da LV na região iniciou-se no ano de 2008, com o registro de três casos humanos no município de Jales. A investigação entomológica apontou a presença do vetor *Lu. longipalpis* e na investigação do foco houve o encontro de cães positivos. No mesmo ano, no município de Urânia foi confirmada a presença de cão positivo e do vetor. Em 2009, foi notificado o primeiro caso humano em Urânia. Concomitantemente, em Palmeira D'Oeste e Santa Fé do Sul detectaram-se cães positivos e a presença do vetor *Lu. longipalpis* foi registrada nos municípios de Aspásia, Santana da Ponte Pensa, Santa Salete e Votuporanga. No ano de 2010, Santa Fé do Sul confirmou quatro (4) casos de LVH, Marinópolis registrou a presença do vetor, e em Rubinéia, Santa Albertina, Votuporanga e Santana da Ponte Pensa, confirmou-se cães infectados. A progressão da doença na região caracteriza-se pela expansão de dois (2) em 2008 para 11 municípios com detecção da doença humana e/ou canina ou presença de vetor. No ano de 2011 os municípios de Aparecida D'Oeste e Votuporanga registraram os primeiros casos humanos. E foi detectada a presença de *Lu. longipalpis* nos municípios de Três Fronteiras, Dolcinópolis e Valentim Gentil. Em 2012, a transmissão canina e presença do vetor foram registradas em Fernandópolis. De acordo com a classificação epidemiológica do programa PVCLV no ESP (RANGEL *et al*, 2013), a detecção do vetor neste ano subiu

de cinco (5) para 15 municípios. Até o final do ano de 2012 a região do DRS XV, totalizou 25 municípios com transmissão humana e/ou canina e/ou presença de vetor. **(FIGURA 12)**

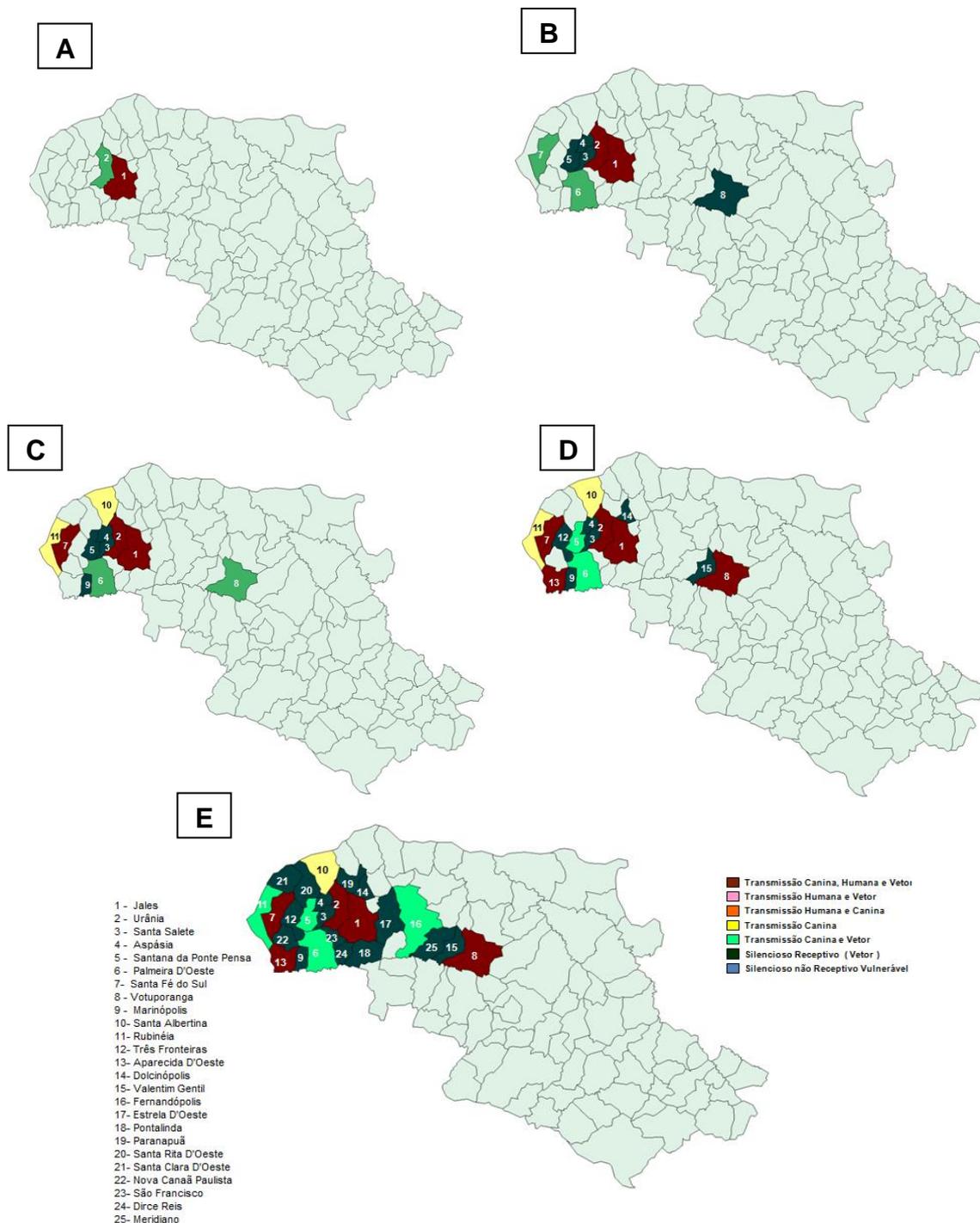


FIGURA 12. Classificação epidemiológica para a leishmaniose visceral dos municípios da região administrativa de São José do Rio Preto nos anos de 2008 (A), 2009 (B), 2010 (C), 2011 (D) e 2012 (E). **Fonte:** Sucen SR 08.

5.2. LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA NA REGIÃO DO DRS XV.

No período de 2008 a 2012 foram notificados 251 casos suspeitos de LVH, dos quais 99 (39,4%) casos foram confirmados pela clínica epidemiológica e/ou laboratorialmente, 68 (68,7%) foram considerados autóctones da região do DRS XV de São José do Rio Preto, 25 (25,2%) eram importados de outros estados ou municípios e 6 (6,1%) classificados como indeterminados ou ignorados **(TABELA 1)**.

Dentre os casos confirmados, (86,9%) 86/99 residiam em municípios da área de abrangência do DRS XV e (13,1%) 13/99 foram diagnosticados nos serviços de saúde dessa região, no entanto residiam fora desta região.

Considerando ainda os casos de LVH confirmados, (19,2%) 19/99 pacientes com residência na região do DRS XV adquiriram a infecção em outros municípios ou estados. Sendo, um (1) caso de Bady Bassit, importado de Votuporanga; um (1) de Cosmorama, importado de Votuporanga; dois (2) de Fernandópolis, importados de Minas Gerais e Adamantina, respectivamente; um (1) de Ipiguá, importado da Bahia; dois (2) de Mirassol, importados de Dracena e Mato Grosso, respectivamente; um (1) de Orindiúva, importado de Valparaíso; um (1) de Ouroeste, importado de Mato Grosso do Sul; dois (2) de Pedranópolis, importados do Maranhão; um (1) de Pontalinda, importado de Santa Fé do Sul; um (1) de Santana da Ponte Pensa, importado de Votuporanga; seis (6) de São José do Rio Preto, importados de Votuporanga, Bahia, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Goiás e Pereira Barreto, respectivamente **(TABELA 1)**.

TABELA 1. Leishmaniose visceral humana no DRS XV, na região de São José do Rio Preto, no estado de São Paulo, Brasil, 2008-2012*.

Casos suspeitos e confirmados segundo o local de residência - 251				Casos confirmados segundo local de infecção - 99					
Casos suspeitos segundo local de residência - 152				Casos confirmados segundo local de residência - 99		Casos importados de outros DRS ou estados - 25		Casos autóctones do DRS XV ou indeterminado/ignorado - 74	
Município	Total	Município	Total	Município	Total	Município	Total	Município	Total
Auriflâma**	1	Planalto	1	Andradina**	1	Adamantina**	1	Jales	23
Araçatuba**	1	Pontalinda	1	Aparecida D'Oeste	1	Andradina**	1	Urânia	1
Aspásia	1	Ponte Gestal	1	Bady Bassit	1	Bahia***	2	Santa Fé do Sul	10
Birigui**	2	Presidente Venceslau **	1	Barretos **	1	Barretos**	1	Aparecida D'Oeste	1
Catanduva	2	Riolândia	2	Birigui**	3	Birigui**	3	Votuporanga	33
Fernandópolis	16	Rondônia***	1	Cosmorama	1	Dracena**	1	Indeterminado/ignorado	6
Guaíra**	1	Rubinéia	2	Embaúba	1	Goiás***	1	Total	74
Guapiaçu	1	Santa Fé do Sul	14	Fernandópolis	2	Junqueirópolis**	1		
Guarani D'Oeste	1	São Francisco	1	Guapiaçu	1	Mato Grosso***	1		
Itapura**	1	São José do Rio Preto	19	Ibirá	1	Mato Grosso do Sul***	5		
Iturama**	2	Tabapuã	2	Ipiguá	1	Maranhão***	3		
Jales	16	Tanabi	1	Jales	23	Minas Gerais***	1		
José Bonifácio	2	Três Fronteiras	1	Junqueirópolis**	1	Pereira Barreto**	1		
Macedônia	1	Urânia	1	Macaubal	1	Promissão**	1		
Maranhão***	1	Vitória Brasil	2	Mato Grosso do Sul***	3	Tocantins***	1		
Mato Grosso do Sul ***	2	Votuporanga	31	Mirassol	2	Valparaíso**	1		
Minas Gerais***	1	Total	152	Oriundiuva	1	Total	25		
Mirassol	1			Ouroeste	1				
Monte Aprazível	1			Pedranópolis**	2				
Monte Azul Paulista **	1			Pontalinda	1				
Nova Granada	5			Promissão**	1				
Novo Horizonte**	3			Santa Fé do Sul	9				
Olímpia**	1			Santana da Ponte Pensa	1				
Onda Verde	1			São José do Rio Preto	6				
Palestina	1			Tanabi	1				
Palmares Paulista	1			Tocantins***	1				
Palmeira D'Oeste	1			Urânia	1				
Pedranópolis**	1			Votuporanga	30				
Pindorama	2			Total	99				

* Fonte: SINAN/NET/SVS/MS – SINAN/NET/SES/GVE São José do Rio Preto e CLR-IAL de SJRP.

** Paciente residente em outra região do estado de São Paulo, com diagnóstico realizado na região do DRS XV.

*** Paciente residente em outro estado do Brasil, com e diagnóstico realizado na região do DRS XV.

Dos casos suspeitos com residência na região do DRS XV (76,1%) 166/218 eram moradores dos municípios de Fernandópolis, São José do Rio Preto, Jales, Santa Fé do Sul e Votuporanga. Deste total, (10,8%) 18/166 eram residentes de Fernandópolis, município com registro da presença de *Lu. longipalpis* e focos de transmissão da LVC, porém sem autoctonia para LVH. Verificou-se que (15,1%) 25/166 eram moradores de São José do Rio Preto, município sede da região, sem registro da presença do vetor e de transmissão canina, até o final do período de estudo **(TABELA 2)**.

Outro aspecto a ser destacado são os casos confirmados tratados como indeterminados ou ignorados, observou-se que todos os municípios em questão pertencem ao DRS XV, e até término deste estudo, ainda não havia sido esclarecida a definição do local provável de infecção (LPI).

TABELA 2. Número de casos suspeitos de leishmaniose visceral humana com residência em municípios de abrangência do DRS XV – São José do Rio Preto, no período de 2008 a 2012*.

Município de residência DRS XV	Casos suspeitos					Total
	2008	2009	2010	2011	2012	
Aparecida D'Oeste				1		1
Aspásia					1	1
Bady Bassit			1			1
Catanduva					2	2
Cosmorama					1	1
Embaúba				1		1
Fernandópolis		5	3	3	7	18
Guapiaçu		1			1	2
Guarani D'Oeste					1	1
Ibirá	1					1
Ipigua				1		1
Jales	4	6	7	15	7	39
José Bonifácio		1	1			2
Macaubal	1					1
Macedônia				1		1
Mirassol		1		1	1	3
Monte Aprazível					1	1
Nova Granada		2		3		5
Onda Verde					1	1
Orindiuva				1		1
Ouroeste	1					1
Palestina					1	1
Palmares Paulista			1			1
Palmeira D'Oeste	1					1
Pindorama		1		1		2
Planalto		1				1
Pontalinda				1	1	2
Pontes Gestal				1		1
Riolândia			1	1		2
Rubinéia	1		1			2
Santa Fé do Sul		1	6	9	7	23
Santana da Ponte Pensa		1				1
São Francisco				1		1
São José do Rio Preto	1	1	6	7	10	25
Tabapuã				1	1	2
Tanabi	1			1		2
Três Fronteiras					1	1
Urânia		1		1		2
Vitória Brasil		1			1	2
Votuporanga		2	2	18	39	61
Total	11	25	29	69	84	218

* **Fonte:** SINAN/NET/SVS/MS – SINAN/NET/SES/GVE São José do Rio Preto e CLR-IAL de SJRP.

5.2.1. Análise dos Casos autóctones de leishmaniose visceral humana na região do DRS XV

De acordo com dados do SINAN/NET/SES/GVE, durante o período de estudo, dos 102 municípios de abrangência do DRS XV de São José do Rio Preto, apenas cinco (5) possuem transmissão de LVH; sendo que dos 68 casos autóctones de LVH da região, Votuporanga contribuiu com 33 (48,5%), Jales 23 (33,8%), Santa Fé do Sul 10 (14,7%) e Urânia e Aparecida D'Oeste, com 1 (1,5%) caso cada município (**FIGURA 13**).

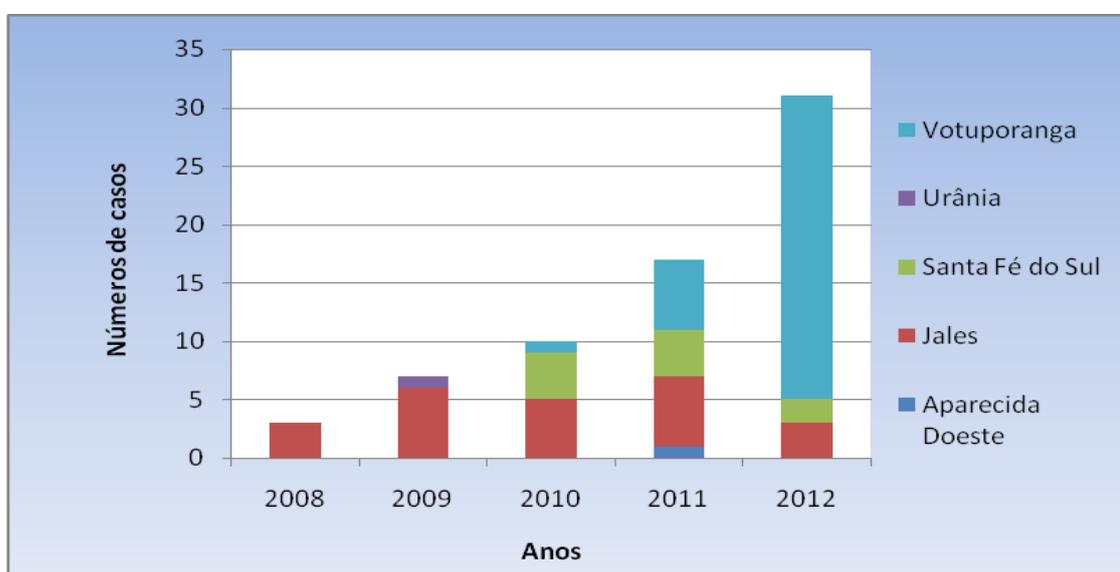


FIGURA 13. Casos autóctones de leishmaniose visceral humana na região de abrangência do DRS XV, segundo o local provável de infecção e ano de diagnóstico no período de 2008 a 2012.

Quanto à confirmação do diagnóstico, o critério clínico laboratorial foi utilizado em (94,1%) 64/68 dos casos, enquanto outros (5,95%) 4/68 foram definidos apenas pelo clínico epidemiológico (**FIGURA 14**).

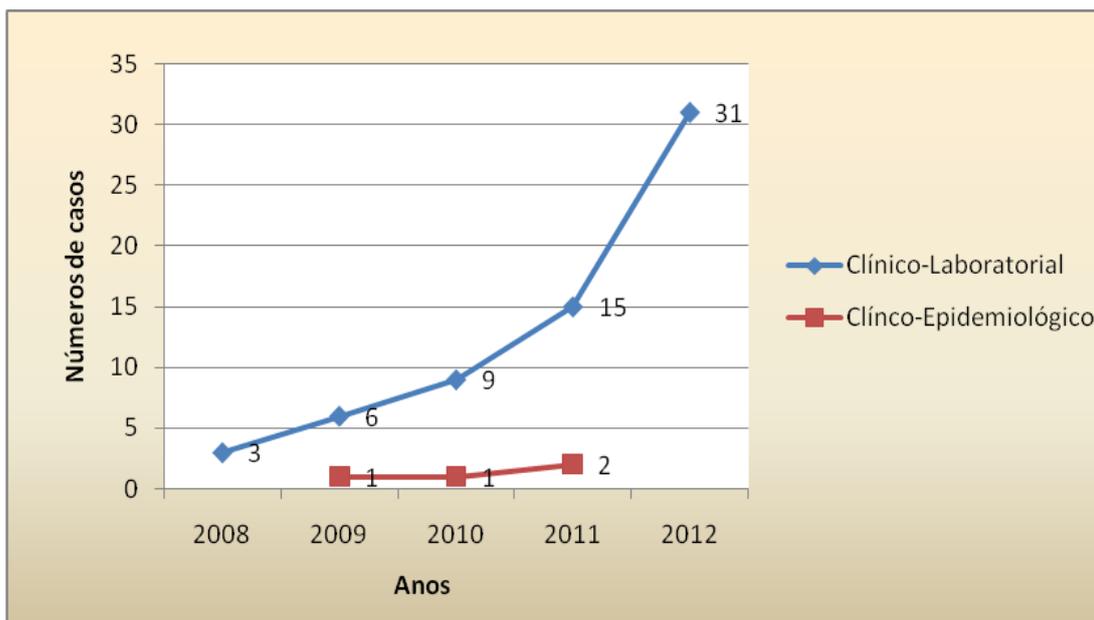


FIGURA 14. Casos autóctones de leishmaniose visceral humana na região de abrangência do DRS XV, segundo o critério de definição do diagnóstico, no período de 2008 a 2012.

A maior frequência de LVH ocorreu em indivíduos do sexo masculino (76,5%) 52/68, sendo que as crianças com faixa etária menor de 10 anos (27,9%) 19/68 e adultos acima de 51 anos (35,3%) 24/68 foram os mais afetados. **(TABELA 3)**. A análise estatística, realizada pelo teste do qui quadrado, considerando a razão de distribuição da população brasileira, por sexo, aproximadamente igual, razão 1:1 (IBGE, 2010 – www.ibge.gov.br/apps/população/projeção), revelou que a maior frequência de casos de LVH observadas para indivíduos do sexo masculino foi estatisticamente significantes, $\chi^2 = 15,30$, ao nível de $P \leq 0,001$.

TABELA 3. Casos confirmados de leishmaniose visceral humana nos municípios pertencentes ao DRS XV, segundo sexo e faixa etária, no período de 2008 a 2012.*

Município de Infecção		Faixa etária					Acima de 51 anos	Total	% Total
		< 10 anos	11 a 20 anos	21 a 30 anos	31 a 40 anos	41 a 50 anos			
Aparecida D'Oeste	Masculino		1					1	100,0
	Feminino								
Jales	Masculino	9	1	2	1	1	4	18	78,3
	Feminino	2	3					5	21,7
Santa Fé do Sul	Masculino			1	1		4	6	60,0
	Feminino	2					2	4	40,0
Urânia	Masculino				1			1	100,0
	Feminino								
Votuporanga	Masculino	3		2	6	2	12	25	75,8
	Feminino	3		1		2	2	8	24,2
Total	Masculino	12	2	5	9	4	20	52	76,5
	Feminino	7	3	1		1	4	16	23,5
	Geral	19	5	6	9	5	24	68	100,0

* **Fonte:** SINAN/NET/SES/GVE São José do Rio Preto e Jales

Da mesma forma, a análise estatística, realizada pelo teste do qui quadrado, considerando a razão de distribuição etária da população brasileira (IBGE, 2010 – www.ibge.gov.br/apps/população/projeção), revelou que a maior frequência de casos de LVH observadas para essas faixas etárias são estatisticamente significantes, $\chi^2 = 19,06$, ao nível de $P \leq 0,001$.

Considerando ainda a faixa etária dos pacientes com LVH, verificou-se maior incidência em adultos acima de 51 anos no município de Votuporanga, enquanto em Jales a maior frequência foi em crianças menores de 10 anos.

A cura foi o registro de evolução clínica mais frequente em (76,4%) 52/68 dos casos. No período do estudo, entre 2008 a 2012, foram registrados 11 óbitos por LVH, com taxa de letalidade de 16,2%, superior à média observada no ESP, avaliada em 8,3% nesse mesmo período. A maior taxa de letalidade foi observada no município de Santa Fé do Sul 20,0%,

seguido por Jales e Votuporanga com 17,4% e 15,1% respectivamente (FIGURA 15).

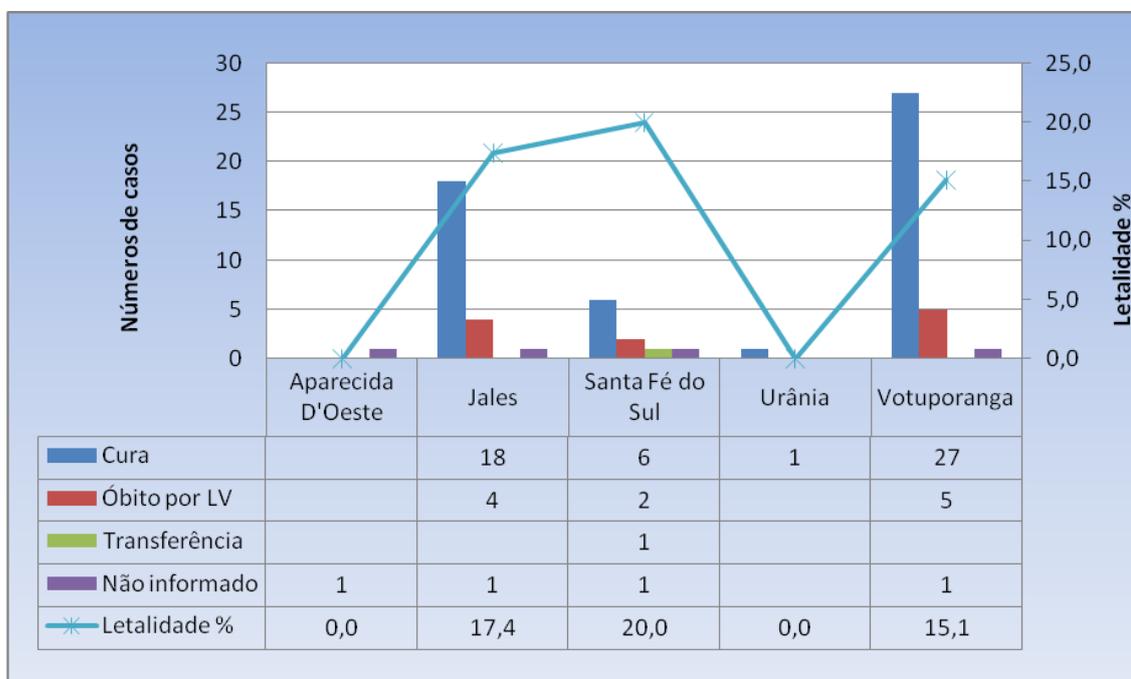


FIGURA 15. Casos autóctones de leishmaniose visceral humana, evolução clínica e letalidade, distribuídos conforme o município de infecção na região do DRS XV, no período de 2008 a 2012.

Comparando-se as taxas de letalidade de outras regiões no ESP com transmissão autóctone de LVH, a região do DRS XV apresentou o menor número de casos registrados no período 2008 a 2012, porém com maior taxa de letalidade (TABELA 4).

TABELA 4. Número de casos confirmados, óbitos e taxa de letalidade na região do DRS XV e nas demais regiões autóctones do estado de São Paulo, no período de 2008 a 2012.*

Regiões de Transmissão Autóctone		Casos Autóctones						
		GVE Araçatuba	GVE Bauru	GVE Marília	GVE Presidente Venceslau	GVEs Jales / São José do Rio Preto	Total	% Total
2008	Casos	73	97	61	60	3	294	29,1
	Óbitos	6	12	2	3	1	24	28,9
	% Letalidade	8,2	12,4	3,3	5,0	33,3	8,16	
2009	Casos	49	63	35	25	7	179	17,7
	Óbitos	5	2	6	1	0	14	16,9
	% Letalidade	10,2	3,2	17,1	4,0	0	7,82	
2010	Casos	30	43	32	31	10	146	14,4
	Óbitos	4	2	4	4	1	15	18,1
	% Letalidade	13,3	4,6	12,5	12,9	10,0	10,27	
2011	Casos	47	49	34	41	17	188	18,6
	Óbitos	5	4	0	3	6	18	21,7
	% Letalidade	10,6	8,2	0	7,3	35,3	9,57	
2012	Casos	51	52	33	37	31	204	20,2
	Óbitos	5	2	1	1	3	12	14,4
	% Letalidade	9,8	3,8	3,0	2,7	9,4	5,88	
Total	Casos	250	304	195	194	68	1011	100,0
	Óbitos	25	22	13	12	11	83	100,0
	% Letalidade	10,0	7,2	6,7	6,2	16,2	8,2	

* **Fonte:** SINAN/NET/SES/CVE Prof. Alexandre Vranjac, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

A análise estatística, realizada pelo teste do qui quadrado, comparando os valores das taxas de letalidade para LVH, observadas para a região do DRS XV e o restante do estado, no período de 2008 até 2012 (www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_leishvis.html), revelou que a letalidade para LVH na região do DRS XV foi significativamente maior que a média da letalidade observada nas outras regiões paulista, $\chi^2 = 6,14$, ao nível de $P \leq 0,05$.

O coeficiente de incidência de casos de LVH na região do DRS XV variou de 0,14/100.000 habitantes a 2,10/100.000 habitantes no período de

2008 a 2012 (SINAN/NET/SVS/MS (Brasil), SINAN/NET/SES/CVE (ESP), SINAN/NET/SES/GVE de São José do Rio Preto e Jales (DRS XV). Em 2008 a região do DRS XV apresentou coeficiente de incidência inferior às taxas do ESP e do Brasil. No entanto, a partir de 2009 houve aumento de casos de LVH na região, sendo superior a registrada no ESP neste mesmo período, mantendo-se elevada durante os anos de 2010 e 2011, e superior à taxa nacional em 2012 (**FIGURA 16**).

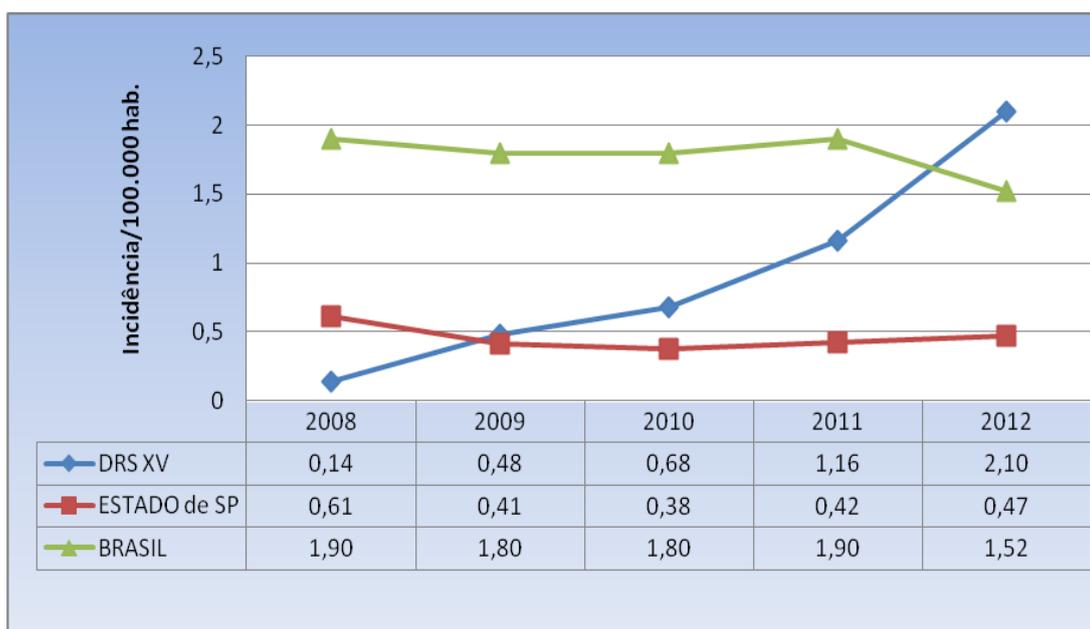


FIGURA 16. Coeficiente de incidência de casos de leishmaniose visceral humana (100.000 habitantes) no Brasil, estado de São Paulo e região do DRS XV, no período de 2008 a 2012. * **Fonte:** SINAN/NET/SVS/MS (Brasil), SINAN/NET/SES/CVE (ESP), SINAN/NET/SES/GVE de São José do Rio Preto e Jales (DRS XV).

As análises comparativas entre os casos confirmados x óbito de LVH, disponíveis para consulta pública do SINAN/NET/SVS/MS, SINAN/NET/SES/CVE e recebidos pelo SINAN/NET/SES/GVE de São José do Rio Preto e Jales, evidenciaram a existência de discordâncias quanto ao número de casos confirmados e óbitos. Foram encontrados durante o período de estudo, 71 casos de LVH no SINAN/NET/SES/CVE, 68 no SINAN/NET/SES/GVE e 61 no SINAN/NET/SVS/MS. Quanto ao número

total de óbitos foram 10 registros pelo SINAN/NET/SVS/MS e SINAN/NET/SES/CVE e, 11 registros pelo SINAN/NET/SES/GVE (**FIGURA 17**).

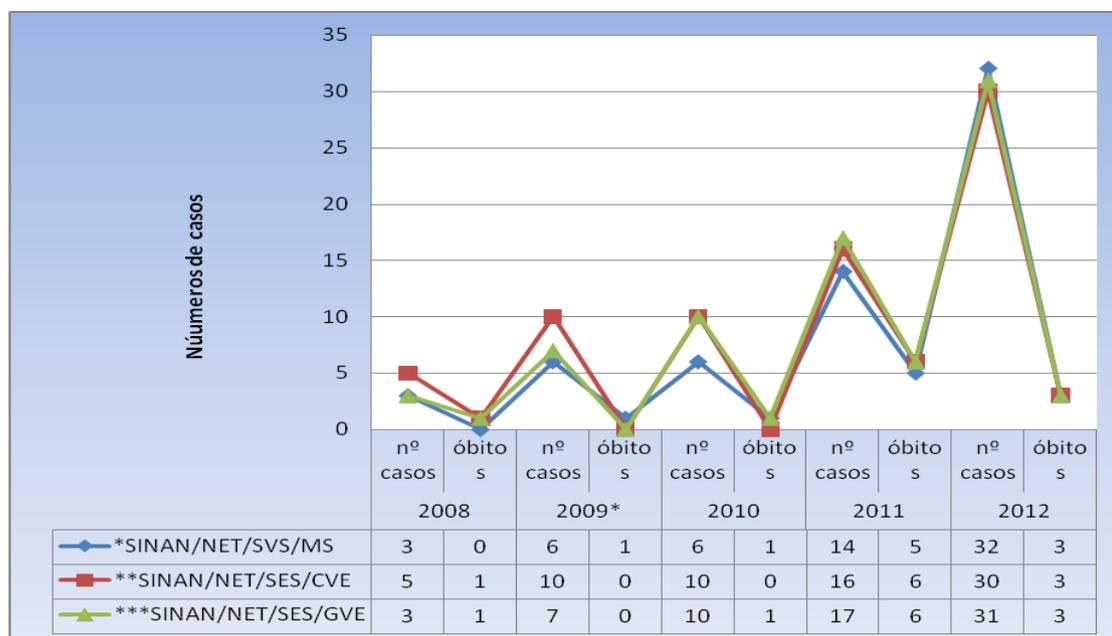


FIGURA 17. Números de casos confirmados e óbitos por leishmaniose visceral humana, registrados nos sistemas do SINAN/NET/SVS/MS, SINAN/NET/SES/CVE e SINAN/NET/SES/GVE, no período de 2008 a 2012.

Fonte: * SINAN/NET/SVS/MS. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.df>> Acesso em 10 Ago. 2015. ** SINAN/NET/SES/CVE. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_lpi.htm>; Acesso em 08 Abr.2015 ; *** Dados do SINAN/NET/SES/GVE Jales e São José do Rio Preto.

5.3. ANÁLISE SOROEPIDEMIOLÓGICA DOS CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA REGIÃO DO DRS XV

Foram analisadas 45.343 amostras de sangue de cães, para o diagnóstico da LVC na região do DRS XV. Na **TABELA 5** estão registrados os resultados reagentes e não reagentes, bem como das solicitações para coleta de novas amostras, durante o período de 2008 a 2012.

TABELA 5. Número absoluto de amostras reagentes, não reagentes e solicitação de coleta de novas amostras, dos inquéritos sorológicos caninos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, no DRS XV, período de 2008 a 2012.

Ano	Nº de amostras Reagentes	Nº de amostras Não Reagentes	*Solicitação de Novas amostras	Total
2008	97	302	43	442
2009	838	7.352	616	8.806
2010	1.382	5.473	820	7.675
2011	1.132	9.106	1.234	11.472
2012	1.892	14.053	1.003	16.948
Total	5.341	36.286	3.716	45.343

* Amostras inadequadas para realização (hemólise, lipêmica, volume insuficiente ou coleta inadequada) ou com resultado indeterminado no EIE (zona cinza).

Verificou-se as maiores taxas de positividade nos anos de 2008 (21,9%) e 2010 (18,0%), enquanto a taxa média de positividade na região foi de 14,1% para o período de 2008 a 2012, sendo que todos os cães eram no domicílio (**FIGURA 18**).

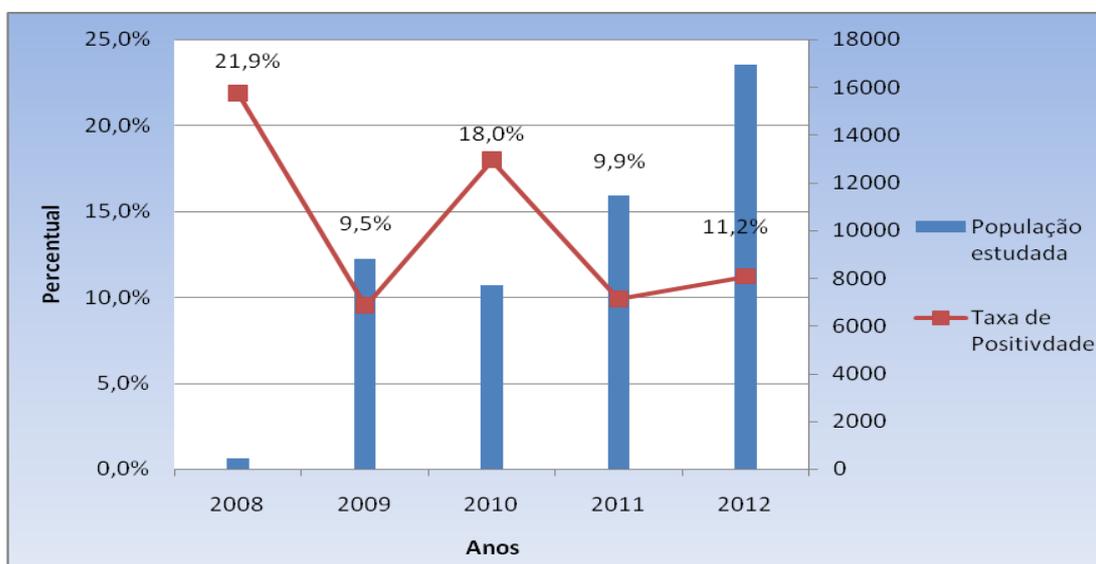


FIGURA 18. Taxas de positividade de anticorpos anti-*Leishmania* observadas nos inquéritos sorológicos caninos, realizados em animais no domicílio em municípios da região do DRS XV, no período de 2008 a 2012.

5.4. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES ALGORITMOS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.

Ao longo do período do estudo foram utilizados diferentes algoritmos para o diagnóstico da LVC. Das 45.343 amostras, 12.871 (28,4%) foram examinadas somente pela RIFI; 632 (1,4%) por EIE e RIFI, ambos os grupos de amostras examinadas a partir de eluato de sangue coletado em papel de filtro; 22.387 (49,4%) por EIE e RIFI e 9.453 (20,8%) por TR-DPP® e EIE, para esses dois grupos foram examinadas amostras com soro sanguíneo (FIGURA 19).

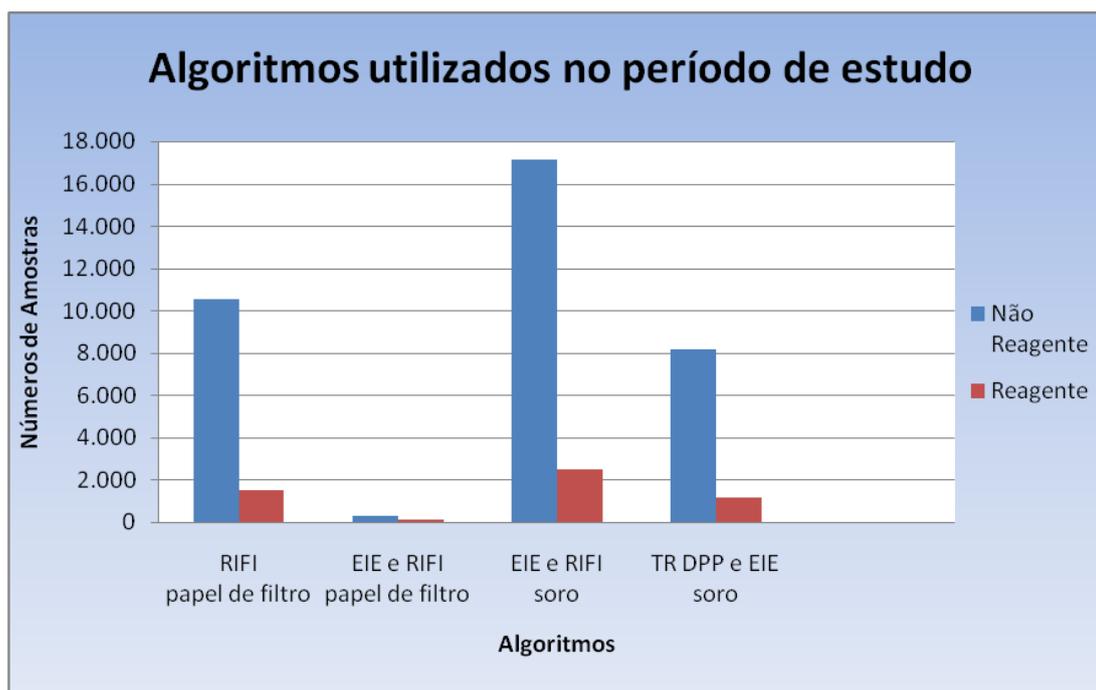


FIGURA 19. Resultados observados na utilização de diferentes algoritmos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, em municípios da região do DRS XV no período 2008 a 2012.

Neste estudo o primeiro algoritmo utilizado no período de setembro 2008 a junho de 2010, considerava a RIFI em eluato de sangue coletado em

papel de filtro como a única técnica laboratorial para a realização do diagnóstico da LVC. Cabendo a RIFI o papel duplo de triar e identificar as amostras não reagentes correspondentes aos cães e, confirmar os animais positivos ou “infectados”.

Das 12.871 amostras de sangue coletadas, 10.532 (81,8%) apresentaram ausência de fluorescência, isto é, de reatividade frente às formas promastigotas, 1.519 (11,8%) apresentaram fluorescência de reatividade frente às promastigotas e 820 (6,4%) amostras foram consideradas inadequadas para realização do exame.

No mesmo período, de janeiro a fevereiro de 2010, também foi utilizado o método de EIE como método de triagem sorológica e a RIFI como teste confirmatório, em amostras de eluato de sangue coletados em papel de filtro. Foram examinadas 632 amostras, destas 458 (72,5%) não reagentes, 153 (24,2%) reagentes e 21 (3,3%) amostras inadequadas. Devido ao curto período em que este algoritmo foi utilizado, procedeu-se apenas análise de concordância bruta entre os métodos que foi de 28,4%.

A partir de julho de 2010 até junho de 2012 utilizou-se um novo algoritmo para o diagnóstico da LVC, substituindo-se o eluato de sangue coletado em papel de filtro por soro sanguíneo. Assim, foram coletadas 22.387 amostras, sendo 17.123 (76,5%) não reagentes, 2.484 (11,1%) reagentes e 2.780 (12,4%) amostras consideradas inadequadas para a realização do exame. Não se observou diferença no percentual de reatividade entre ambos os algoritmos, ou seja, eluato de sangue colhido em papel de filtro e sangue total colhido em tubo seco.

A partir de julho de 2012 e até o presente, o algoritmo preconizado pelo MS inclui um ensaio imunocromatográfico TR-DPP® para a realização da triagem sorológica e o EIE como teste confirmatório. Das 9.453 amostras analisadas, 8.173 (86,5%) foram não reagentes, 1.185 (12,5%) reagentes, e 95 (1,0%) das amostras estavam inadequadas para análise.

Na análise das amostras consideradas inadequadas para a realização do diagnóstico da LVC, foi observado que as amostras de sangue coletadas em tubos secos, para o algoritmo EIE como teste de triagem e

RIFI como confirmatório foram as de maior rejeição e solicitação de nova amostra, (11,2%) 2.507/22.387. Dentre as causas estão: as amostras coletadas de forma incorreta; hemólise, lipemia; centrifugação; armazenamento e transporte.

Com a implantação do algoritmo atualmente em uso e a descentralização do teste TR-DPP® para os serviços municipais de saúde, com a capacitação continuada dos agentes de zoonoses, houve uma diminuição expressiva deste percentual (0,4%) 95/9.453. **(FIGURA 20).**

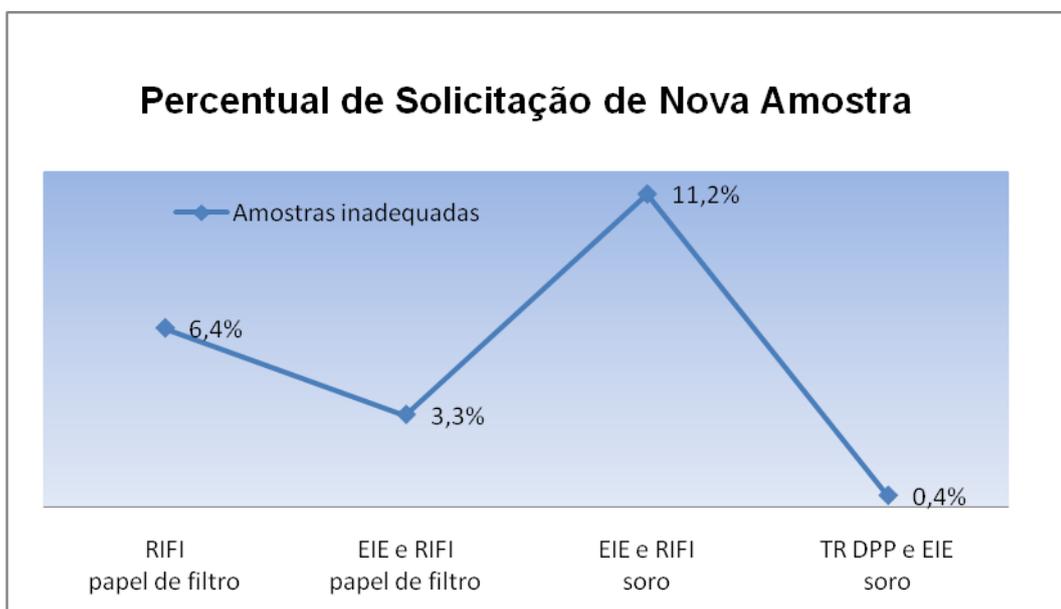


FIGURA 20. Taxas de rejeição de amostras coletadas no período de 2008 a 2012, para a realização do diagnóstico da leishmaniose visceral canina na região do DRS XV, segundo o algoritmo utilizado.

Comparando-se o tempo médio para examinar todas as amostras coletadas nos diferentes períodos e algoritmos, observou-se que o algoritmo de teste único, exame pela RIFI em amostras de eluato de sangue coletado em papel de filtro, consumiu em média 630 dias para o processamento de 12.785 amostras, isso representou a necessidade, em média entre 60 e 90 dias para a liberação dos resultados de cada amostra examinada. No algoritmo TR-DPP® como triagem sorológica e o EIE como teste

confirmatório, foram em média 180 dias para examinar 9.801 amostras, em média, entre 15 a 20 dias para a liberação dos resultados. A linearidade aponta que o algoritmo atual demanda menor tempo (dias) em relação aos demais (**FIGURA 21**).

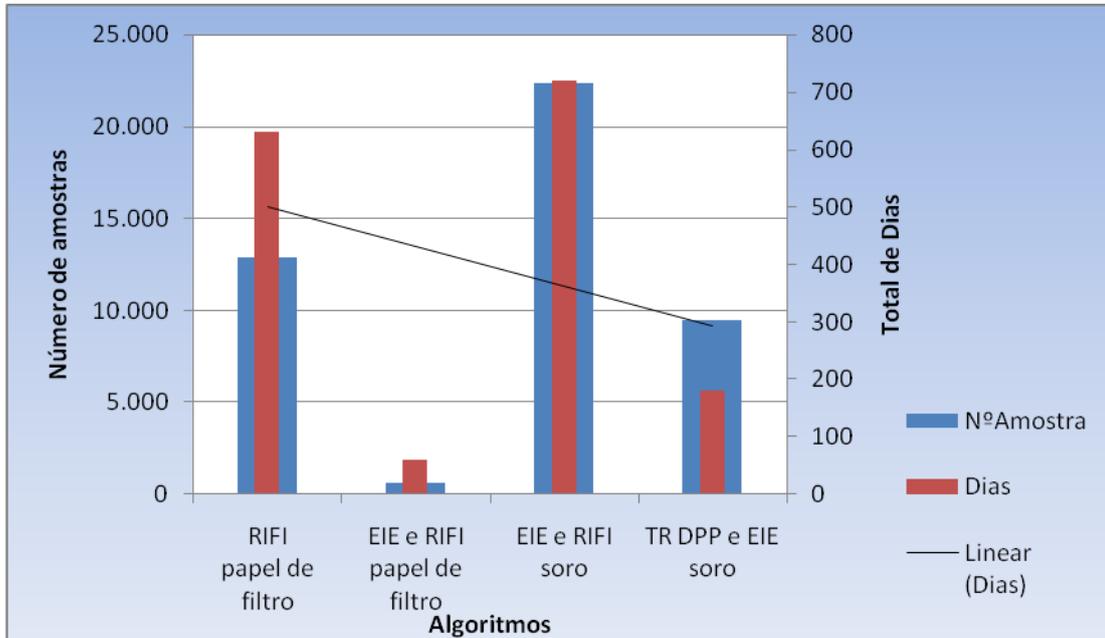


FIGURA 21. Relação entre os algoritmos utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, no período de estudo, e o tempo (dias) gasto para examinar todas as amostras recebidas.

Em relação à avaliação das taxas de concordância bruta entre os métodos de diagnósticos da LVC utilizados na triagem sorológica e teste confirmatório, o TR-DPP®/EIE apresentou melhor desempenho 58,5% (**FIGURA 22**).

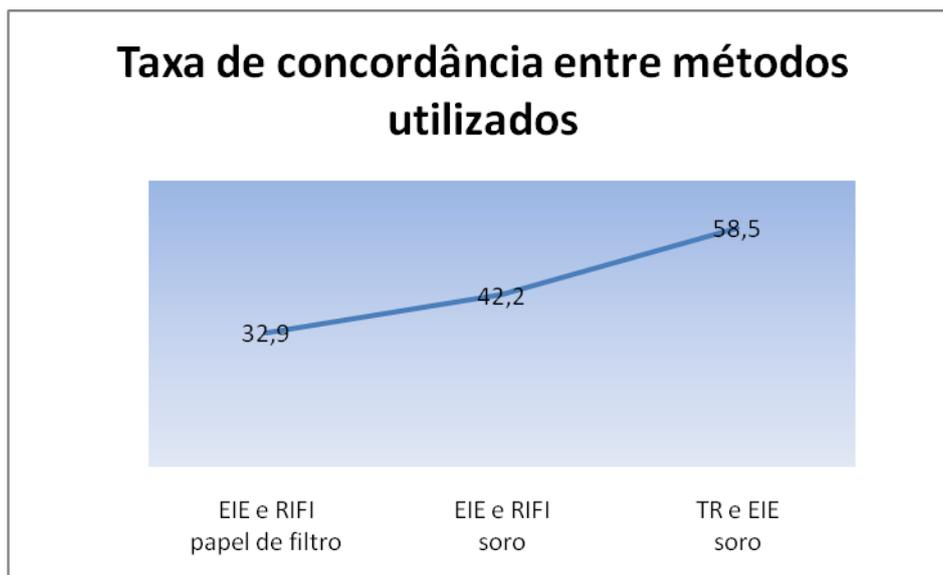


FIGURA 22. Taxas de concordância (%) entre as técnicas utilizadas, durante a vigência de cada um dos algoritmos utilizados para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, na região do DRS XV no período de 2008 a 2012.

5.5. ANÁLISE DOS INQUÉRITOS SOROLÓGICOS CANINOS: CENSITÁRIO E AMOSTRAL

5.5.1. Inquérito Sorológico Censitário

Com base na classificação epidemiológica da LV no ESP, durante o período de estudo foi indicado à realização do inquérito sorológico censitário em 10 municípios: Aparecida D'Oeste, Fernandópolis, Jales, Palmeira D'Oeste, Rubinéia, Santa Albertina, Santa Fé do Sul, Santana da Ponte Pensa, Votuporanga e Urânia (**FIGURA 23**).

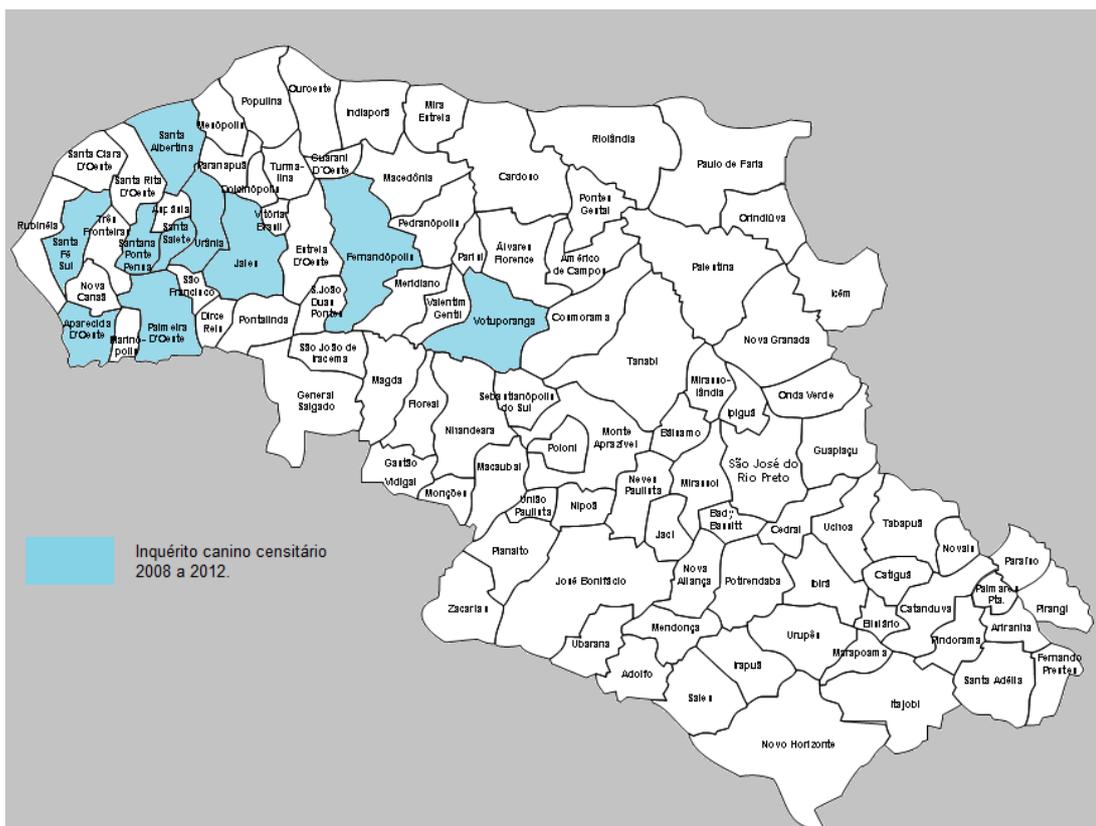


FIGURA 23. Municípios da região do DRS XV com transmissão de leishmaniose visceral humana e/ou canina, com realização de inquérito soropidemiológico canino tipo censitário no período 2008 a 2012. **Fonte:** CLR-IAL/SJRP

Os **QUADROS 1 e 2** apresentam as características demográficas, geográficas e climáticas respectivamente, dos municípios que realizaram inquérito do tipo censitário, para o diagnóstico da LVC, no período de 2008 a 2012. No **QUADRO 3** são apresentadas as relações de municípios limítrofes e a associação com a presença de rodovias e ferrovias para municípios com transmissão da LVC e/ou LVH.

QUADRO 1. Índice demográfico dos municípios da região do DRS XV que realizaram inquérito sorológico canino censitário para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, período de 2008 a 2012.

Municípios	População Humana	Urbana	Rural	Homem	Mulher	Taxa de Alfabetização (%)	IDH-M (%)
JALES	47.012	44.239	2.773	22.986	24.026	94,3	0.804
URÂNIA	8.836	7.436	1.400	4.395	4.441	90,9	0,765
SANTANA DA PONTE PENSA	1.641	1.097	544	841	800	79,8	0,753
PALMEIRA DOESTE	9.584	7.268	2.316	4.805	4.719	91,2	0,765
SANTA FÉ DO SUL	29.239	28.088	1.151	14.084	15.255	93,6	0,809
VOTUPORANGA	84.692	72.807	11.885	41.336	43.392	92,5	0,79
RUBINEIA	2.862	2.355	507	1.415	1.447	88,0	0,788
SANTA ALBERTINA	5.723	4.891	832	2.905	2.818	84,8	0,784
APARECIDA DOESTE	4.450	3.645	805	2.177	2.273	81,9	0,759
FERNANDÓPOLIS	64.696	62.714	1.982	31.518	33.178	94,0	0,797

Fonte: IBGE/ 2010

QUADRO 2. Características geográficas e climáticas observadas nos municípios da região do DRS XV que realizaram inquérito sorológico canino censitário para o diagnóstico da leishmaniose visceral canino, no período de 2008 a 2012.

Municípios	Área (km ²)	Latitude (sul)	Longitude (oeste)	Altitude (m)	Densidade Demográfica (hab./km ²)	Clima (*)	Bioma	*Temp. máxima média °C	*Temp. média °C	*Temp. mínima média °C	Precipitação (mm) (*)
JALES	368,5	20°16'08"	50°32'45"	478	127,5	Tropical	Mata Atlântica	30,9	25,4	17,8	1222
URÂNIA	208,9	20°14'46'	50°38'35"	458	42,2	Tropical	Mata Atlântica	30,8	23,9	17,1	1252
SANTANA DA PONTE PENSA	130,3	20°15'11"	50°47'50"	426	12,5	Temperado	Mata Atlântica	31,0	24,1	17,2	1315
PALMEIRA D'OESTE	319,2	20°24'59"	50°45'43"	433	30,0	Tropical	Mata Atlântica	30,9	24,0	17,1	1383
SANTA FÉ DO SUL	208,9	20°12'40"	50°55'33"	370	140,4	Tropical	Mata Atlântica	31,2	24,3	17,4	1265
VOTUPORANGA	424,1	20°25'02"	49°58'22"	525	223,2	Tropical	Mata Atlântica	30,0	24,0	18,0	1448
RUBINEIA	236,9	20°10'46"	51°00'08"	317	11,1	Temperado	Mata Atlântica	31,8	24,8	17,8	1258
SANTA ALBERTINA	272,8	20°01'55"	50°43'40"	420	20,9	Subtropical	Mata Atlântica	31,2	24,3	17,4	1241
APARECIDA D'OESTE	179,0	20°26'58"	50°52'47"	413	24,8	Tropical	Mata Atlântica	31,0	24,1	17,2	1247
FERNANDÓPOLIS	550,0	20°17'02"	50°14'45"	535	117,6	Tropical	Mata Atlântica	30,2	23,3	16,6	1349

Fonte: IBGE, 2010/ *Cepagri-Unicamp, 2013

QUADRO 3. Municípios limítrofes associados e a presença de rodovia e ferrovia nos municípios da região do DRS XV, que realizaram inquérito sorológico censitário para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, no período de 2008 a 2012.

Municípios	Município Limítrofe	Mesorregião	Microrregião	Rodovias	Linha Férrea
JALES	Paranapuã, Mesópolis, Vitória Brasil, Estrela D' oeste, Pontalinda, Dirce Reis, São Francisco e Urânia	São José do Rio Preto	Jales	SP-320, SP-463, SP-561 e SP-563	sim
URÂNIA	Aspásia, Santa Albertina, Santa Salete, Jales, Santana da Ponte Pensa e São Francisco	São José do Rio Preto	Jales	SP-320	sim
SANTANA DA PONTE PENSA	Santa Rita D' oeste, Santa Salete, Aspásia, Palmeira D' oeste e Três Fronteiras	São José do Rio Preto	Jales	SP-320	sim
PALMEIRA D'OESTE	Santana da Ponte Pensa, Santa Salete, São Francisco, Dirce Reis, Marinópolis, Aparecida d' Oeste e Nova Canaã Paulista, Auriflama, Guzolândia e Sud Mennucci	São José do Rio Preto	Jales	SP-563	não
SANTA FÉ DO SUL	Rubinéia, Santa Clara d'Oeste, Santa Clara d'Oeste, Três Fronteiras, Nova Canaã Paulista e Aparecida d'Oeste	São José do Rio Preto	Jales	SP-320 e SP-595	sim
VOTUPORANGA	Álvares Florence, Cosmorama, Sebastianópolis do Sul, Nhandeara, Floreal, Magda, Valentim Gentil e Parisi	São José do Rio Preto	Votuporanga	SP-320, SP-461 e SP-479	sim
RUBINEIA	Santa Clara D'Oeste, Aparecida D'Oeste, Suzanápolis, Santa Fé do Sul, Iha Solteira e Aparecida do Taboado	São José do Rio Preto	Jales	SP-320	não
SANTA ALBERTINA	Paranapuã, Mesópolis, Aspásia, Santa Rita d'Oeste e Urânia	São José do Rio Preto	Jales	SP-561	não
APARECIDA D'OESTE	Santa Fé do Sul, Nova Canaã Paulista, Palmeira d'Oeste, Marinópolis, Sud Mennucci, Suzanápolis e Rubinéia	São José do Rio Preto	Jales	SP-563	não
FERNANDOPOLIS	Macedônia, Pedranópolis, Meridiano, São João das Duas Pontes e Estrela D'Oeste	São José do Rio Preto	Fernandópolis	SP-320, SP-557, SP-543	sim

Fonte: Wikipédia, 2013.

Na **TABELA 6** é apresentada a relação entre o ano de início de transmissão da LV, humana ou canina, o número de inquéritos caninos necessários, segundo o que é preconizado pelo PVCLV/ESP e o total de inquéritos realizados pelos municípios no período de 2008 a 2012.

TABELA 6. Relação entre o ano de início de transmissão da leishmaniose visceral humana e/ou canina, o número de inquéritos sorológicos caninos censitários previstos e totais de inquéritos realizados nos municípios da região do DRS XV, no período de 2008 a 2012.

Municípios	Ano do 1º registro LV	Inquéritos censitários previstos	Inquéritos censitários realizados	Início/Término
JALES	2008	5	1º	2008 a 2010
			2º	2010 a 2012*
URÂNIA	2008	5	1º	2008 a 2009
			2º	2010 a 2012*
SANTA FÉ DO SUL	2009	4	1º	2009 a 2010
			2º	2011 a 2012*
PALMEIRA D'OESTE	2009	4	1º	2009 a 2011
			2º	2012*
SANTANA P. PENSA	2010	3	1º	2010 a 2011
			2º	2012
VOTUPORANGA	2010	2	1º	2010 a 2011
			2º	2011 a 2012
SANTA ALBERTINA	2010	3	1º	2010 a 2011
RUBINEIA	2010	3	1º	2010 a 2011
			2º	2012*
APARECIDA D'OESTE	2011	2	1º	2011
			2º	2012*
FERNANDOPOLIS	2012	1	1º	2012*

*Não concluído até 2012.

Na **TABELA 7**, estão apresentadas as informações referentes aos resultados das amostras de sangue coletadas para cada município. As maiores taxas de positividade foram observadas nos municípios de Urânia 25,4%, Votuporanga 23,3% e Palmeira D'Oeste 19,0%.

TABELA 7. Resultados dos exames de sangue para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, nos inquéritos sorológicos caninos censitários realizados nos município da região do DRS XV, no período de 2008 a 2012.

Municípios	Inquérito censitário	Período/Ano conclusão	Pop. Canina	Total Coletados	Confirmados	Negativos	Indeterminado	Nova Amostra	Taxa de Positividade
JALES	1º	2008 a 2010	7.050	6.773	798	5.523	0	452	12,6%
	2º	2010a 2012*	7.950	3.009	424	2.112	16	473	16,6%
URÂNIA	1º	2008 a 2009	1.355	1.349	318	933	0	98	25,4%
	2º	2010 a 2012*	1.188	444	167	213	0	48	43,9%
SANTA FÉ DO SUL	1º	2009 a 2010	6.644	4.296	412	3.708	0	176	10,0%
	2º	2011a 2012*	7.684	6.644	1143	4.892	8	601	18,9%
PALMEIRA D'OESTE	1º	2009 a 2011	1.412	897	132	561	0	204	19,0%
	2º	2012*	1.333	246	25	216	5	0	10,2%
SANTANA PONTE PENSA	1º	2010 a 2011	262	271	8	240	0	23	3,2%
	2º	2012	273	227	3	222	2	0	1,3%
VOTUPORANGA	1º	2010 a 2011	15.878	4.355	589	2.341	0	1.425	20,1%
	2º	2011 a 2012	17.931	10.423	2.334	7.668	0	1.190	23,3%
SANTA ALBERTINA	1º	2010 a 2011	1.857	2.037	17	1936	0	84	0,9%
RUBINEIA	1º	2010 a 2011	491	281	13	223	0	46	5,5%
	2º	2012*	478	218	7	209	1	1	3,2%
APARECIDA D'OESTE	1º	2011	850	901	48	779	0	74	5,8%
	2º	2012*	788	453	21	417	15	0	4,6%
FERNANDOPOLIS	1º	2012*	16.233	935	6	921	8	0	0,6%

*Não concluído até 2012.

5.5.2. Inquérito Sorológico Amostral

Os 18 municípios com recomendação para a realização do inquérito sorológico amostral durante o período do estudo foram: Aspásia, Dirce Reis, Dolcinópolis, Estrela D'Oeste, Marinópolis, Meridiano, Nova Canaã Paulista, Palmeira D'Oeste, Paranapuã, Pontalinda, Santa Saete, Santa Clara D'Oeste, Santa Rita D'Oeste, Santana da Ponte Pensa, São Francisco, Três Fronteiras, Valentim Gentil e Votuporanga (**FIGURA 24**).

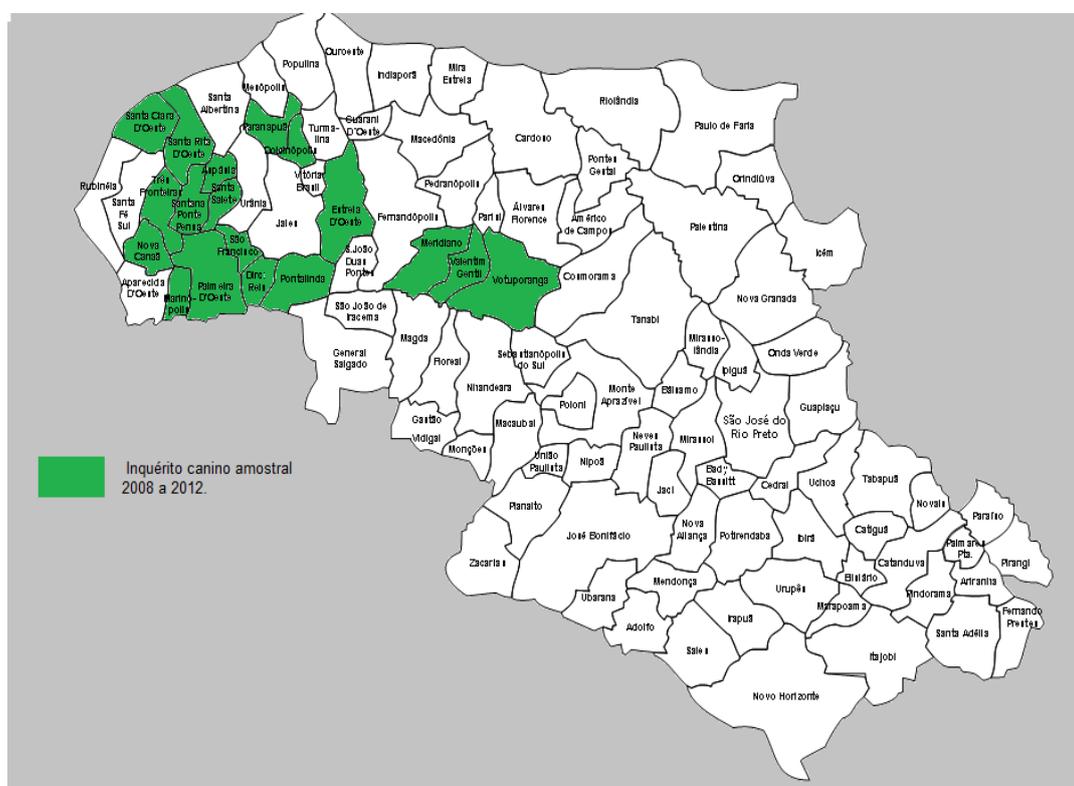


FIGURA 24. Municípios da região do DRS XV com presença do vetor *Lu. longipalpis*, e realização de inquérito soroepidemiológico canino tipo amostral, no período de 2008 a 2012. **Fonte:** CLR-IAL/SJRP

Destes, apenas 12 realizaram inquéritos sorológicos caninos amostrais. O **QUADRO 4** apresenta as características demográficas e climáticas/geográficas. No **QUADRO 5** estão relacionados os municípios limítrofes e a presença de rodovias e ferrovias.

QUADRO 4: Características demográficas, climáticas observadas nos municípios da região do DRS XV que realizaram inquérito sorológico canino amostral, para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina no período de 2008 a 2012.

MUNICÍPIOS	Localização Geográfica (Lat. e Long.)	Altitude (m)	Área (Km2)	Clima	Temp. média °C	População Humana (hab.) *	Densidade Demográfica (hab./km²)*
ASPÁSIA	20°09'32" S 50°43'38" O	403	69,3	Subtropical	24,4	1.809	26,1
DOLCINÓPOLIS	20°07'23"S 50°30'48"O	463	78,3	Tropical	24	2.096	26,8
ESTRELA D'OESTE	20°17'16"S 50°24'03"O	456	296,4	Tropical	23,6	8.208	27,7
MARINÓPOLIS	20°26'26"S 50°49'23"O	408	77,8	Tropical	24,2	2.286	27,1
NOVA CANAÃ PAULISTA	20°23'09"S 50°56'57"O	401	124,4	Tropical	24,2	2.114	16,9
PALMEIRA D'OESTE	20°24'59"S 50°45'43"O	433	319,2	Tropical	24	9.584	30
PARANAPUÃ	21°46'05"S 50°46'18"O	474	140,5	Tropical	23,9	3.815	27,2
PONTALINDA	20°26'27"S 50°31'24"O	435	210,2	Tropical	24,2	4.074	19,4
SANTA CLARA D'OESTE	20°05'38"S 50°55'35"O	401	183,4	Tropical	24,4	2.084	11,4
SANTA RITA D'OESTE	20°08'37"S 50°49'48"O	400	210,1	Tropical	24,2	2.543	12,1
SANTANA DA PONTE PENSEA	20°15'11"S 50°47'50"O	426	130,3	Temperado	21,1	1.641	12,5
SANTA SALETE	20°14'41"S 50°41'18"O	460	78,4	Tropical	24,1	1.447	18,2

Fonte: Wikipédia / (*) IBGE/2010

QUADRO 5: Municípios limítrofes associados e a presença de rodovias e ferrovias nos municípios da região do DRS XV, que realizaram inquérito sorológico canino amostral para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina no período de 2008 a 2012.

Municípios	Município Limítrofe	Mesorregião	Microrregião	Rodovias	Linha Férrea
ASPÁSIA	Urânia, Santa Salete, Santa Rita D'Oeste, Santana da Ponte Pensa e Santa Albertina	São José do Rio Preto	Jales	SP-320,	não
DOLCINOPOLIS	Jales, Vitória Brasil, Turmalina e Paranapuã	São José do Rio Preto	Jales	SP-557, SP-463	não
ESTRELA DOESTE	Fernandópolis, São João das Duas Pontes, Pontalinda, Jales e Vitoria Brasil	São José do Rio Preto	Fernandópolis	SP-320	sim
MARINÓPOLIS	Palmeira, Sud Mennucci e Aparecida D'Oeste	São José do Rio Preto	Jales	SP-563	não
NOVA CANAÃ PAULISTA	Palmeira e Aparecida D'Oeste	São José do Rio Preto	Jales	SP-595	não
PALMEIRA D'OESTE	Santana da Ponte Pensa, Santa Salete, São Francisco, Dirce Reis, Marinópolis, Aparecida d' Oeste, Nova Canaã Paulista, Auriflama, Guzolândia e Sud Mennucci	São José do Rio Preto	Jales	SP-563	não
PARANAPUÃ	Jales, Dolcinópolis, Urânia, Santa Albertina, Turmalina e Populina	São José do Rio Preto	Jales	SP-561, SP-557, SP-463	não
PONTALINDA	Jales, Dirce Reis, General Salgado, São João das Duas Pontes, São João de Iracema e Estrela D'Oeste	São José do Rio Preto	Jales	SP-463	não
SANTA CLARA D'OESTE	Santa Fé do Sul, Santa Rita D'Oeste, Rubinéia e Santa Albertina	São José do Rio Preto	Jales	SP-320	não
SANTA RITA D'OESTE	Santa Fé do Sul, Santana da Ponte Pensa, Santa Clara D'Oeste, Três Fronteiras, Santa Albertina e Aspásia	São José do Rio Preto	Jales	SP-320, SP-595	não
SANTANA DA PONTE PENSA	Aparecida d' Oeste e Nova Canaã Paulista, Auriflama, Guzolândia e Sud Mennucci Santa Rita D'oeste, Santa Salete, Aspásia, Palmeira D'oeste e Três Fronteiras	São José do Rio Preto	Jales	SP-320	sim
SANTA SALETE	Urânia, São Francisco, Três Fronteiras, Santana da Ponte Pensa e Aspásia	São José do Rio Preto	Jales	SP-320	sim

Fonte: Wikipédia, 2013.

Dentre os 12 municípios com previsão de realização de inquéritos sorológicos caninos amostrais, para o período de 2008 a 2012, Palmeira D'Oeste e Santana da Ponte Pensa, passaram para a condição de realização de inquéritos caninos censitários em razão da confirmação da autoctonia da transmissão da LVC, identificada quando da realização dos primeiros inquéritos caninos amostrais em 2009. Em Votuporanga, antes mesmo da realização de qualquer inquérito canino amostral, foi confirmada a autoctonia da transmissão da LVC, a partir da investigação de casos diagnosticados no atendimento de demanda espontânea efetivada por munícipes que suspeitaram da doença em animais de sua propriedade. Assim em Votuporanga, desde a realização do primeiro inquérito canino, foi adotado o tipo censitário.

Os municípios de Votuporanga, Valentim Gentil, Três Fronteiras, São Francisco, Dirce Reis e Meridiano não realizaram inquérito amostral durante o período de estudo, portanto não tiveram seus resultados analisados.

A taxa média de positividade dos municípios com inquéritos amostrais foi de 3,11%. Quando avaliada a taxa de positividade em cada município observou-se que, Palmeira D'Oeste, Marinópolis e Santa Salete foram aqueles que apresentaram as maiores taxas; 26,1%, 10,1% e 4,0% respectivamente **(TABELA 8)**.

Quanto às características demográficas dos municípios, Votuporanga e Fernandópolis foram aqueles com registro de maiores populações humana e canina, com mais de 16.000 e 17.000 cães, respectivamente. No período, Dolcinópolis teve a menor população canina, com aproximadamente 200 cães.

Em relação à proporção entre o número de habitantes e o número de cães nos municípios de estudo, confirmou-se uma relação média de 1/ 5 (1 cão para cada 5 habitantes).

Quanto às características geográficas, os municípios incluídos no estudo não apresentaram diferenças, quando considerado o tipo de inquérito canino, censitário ou amostral a que estiveram vinculados. O clima predominante é o tropical com inverno seco e temperatura média de 24,03°C, com precipitação média anual 1.292 mm. Fernandópolis e Votuporanga

apresentam maior área territorial, altitudes em relação aos demais e também maiores índices de precipitação (mm).

TABELA 8. Inquéritos sorológicos caninos amostrais para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina nos municípios da região do DRS XV, com presença do vetor *Lutzomyia longipalpis*, no período de 2008 a 2012.

Municípios	Ano do 1º registro da presença do vetor	Inquéritos previstos	Período de inquérito	Pop. Canina	Total Coletados	Confirmados	Negativos	Nova Amostra	Taxa de Positividade
Palmeira D'Oeste	2009	1º	2009	1.412	188	49	121	18	26,1%
Santa Salete	2009	1º	2012	234	100	4	96	0	4,0%
Santana da Ponte Pensa	2009	1º	2009	278	100	0	100	0	0,0%
Aspásia	2009	1º	2012*	248	29	0	26	3	0,0%
Marinópolis	2010	1º	2012*	226	69	7	61	1	10,1%
Dolcinópolis	2011	1º	2012	202	90	0	89	1	0,0%
Estrela D'Oeste	2012	1º	2012	1.230	206	2	188	16	0,9%
Pontalinda	2012	1º	2012	419	200	2	198	0	1,0%
Paranapuã	2012	1º	2012	747	103	1	102	0	1,0%
Santa Rita D'Oeste	2012	1º	2012	438	152	1	150	1	0,7%
Santa Clara D'Oeste	2012	1º	2012	380	242	9	222	11	3,7%
Nova Canaã Paulista	2012	1º	2012	216	105	1	89	15	0,9%
Votuporanga**	2009	1º	0	0	0	0	0	0	
Três Fronteiras**	2011	1º	0	0	0	0	0	0	
Valentim Gentil**	2011	1º	0	0	0	0	0	0	
Dirce Reis**	2012	1º	0	0	0	0	0	0	
Meridiano**	2012	1º	0	0	0	0	0	0	
São Francisco**	2012	1º	0	0	0	0	0	0	

*Não concluído até 2012.

** Não realizado nenhum inquérito.

5.6. POSSÍVEIS ROTAS DE DISSEMINAÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

A região de São José do Rio Preto está localizada no Noroeste Paulista, servida por várias e importantes rodovias que interligam essa região com outras partes do estado e do País. A rodovia Euclides da Cunha (SP-320) é a principal via de acesso à região. Inicia-se em Mirassol passando por Votuporanga, Fernandópolis, Jales, Santa Fé do Sul terminando em Rubinéia, onde se conecta com a rodovia federal (BR-158) no estado do Mato Grosso do Sul. A rodovia atravessa o território de 14 municípios que apresentam transmissão ou presença de vetor, além de interligar-se com outras rodovias vicinais.

A ferrovia Bandeirantes (Ferroban) antiga ferrovia Araraquarense percorre desde o município de Araraquara até o município de Santa Fé do Sul, neste ponto a ferrovia se conecta a linha tronco, onde cruza com a divisa do Mato Grosso do Sul, e passa a ser chamada de ferrovia Norte Brasil (Ferro Norte), indo até Rondonópolis em Mato Grosso (**FIGURA 25**).

Dos 10 municípios que realizaram inquéritos caninos do tipo censitários, seis (6) convivem com a Ferrovia Ferroban, margeando ou adentrando seus territórios, Votuporanga, Fernandópolis, Jales, Urânia, Santa Fé do Sul e Santana da Ponte Pensa. Entre os 18 municípios preconizados para realizarem inquéritos caninos do tipo amostral, cinco (5) Santa Salete, Valentim Gentil, Meridiano, Estrela D'Oeste e Três Fronteiras são interligados pela linha férrea.

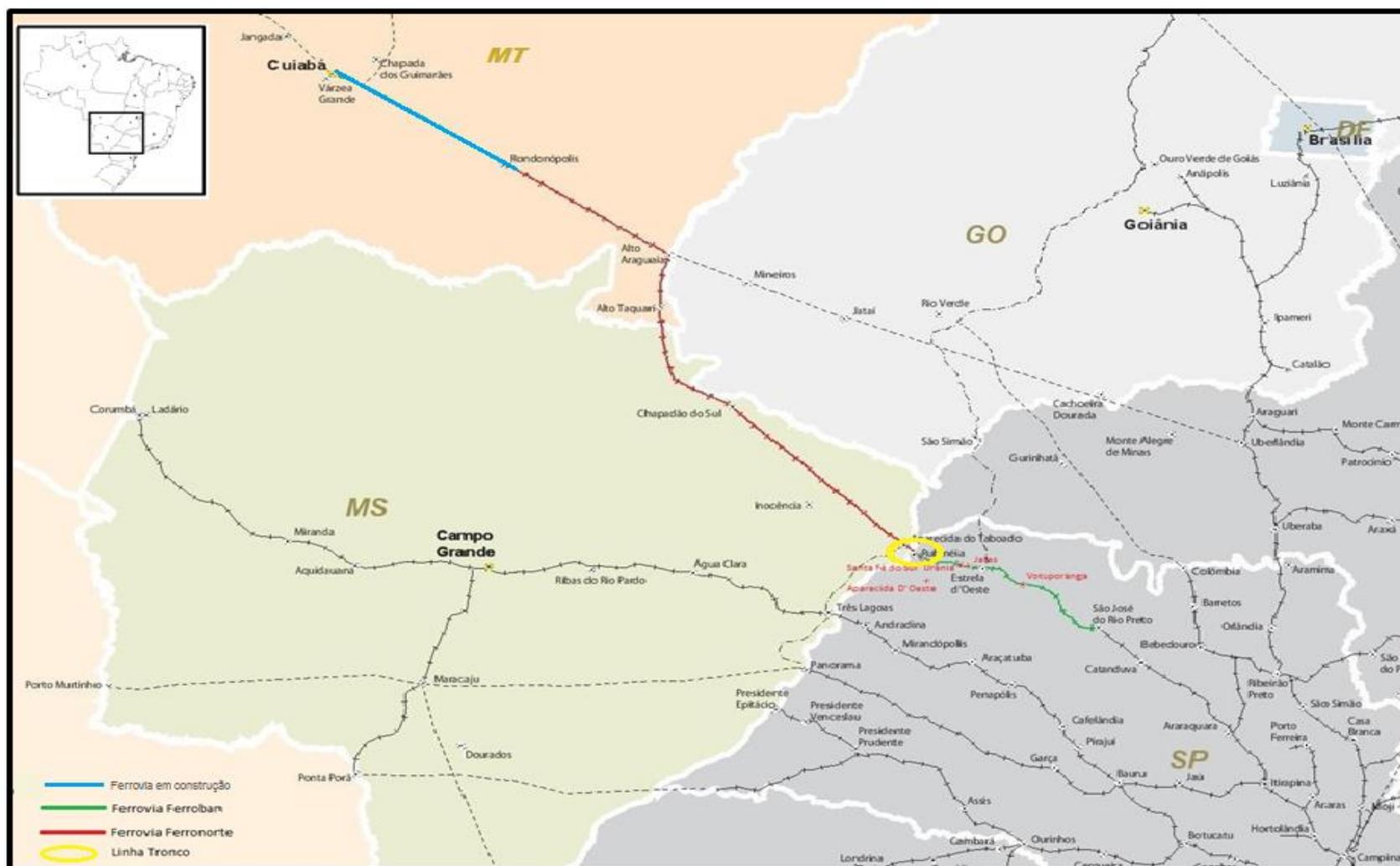


Figura 25. Mapa ferroviário com as principais ferrovias que interligam a região de São José do Rio Preto, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso.

No estudo observou-se que a possível rota de disseminação também segue o mesmo sentido noroeste-sudeste, no entanto, apresentou à hipótese que além do eixo secundário a partir do eixo primário principal, exista outro eixo no sentido nordeste-sudeste, vindo da região do Mato Grosso do Sul para região de São José do Rio Preto (**FIGURA 26**).

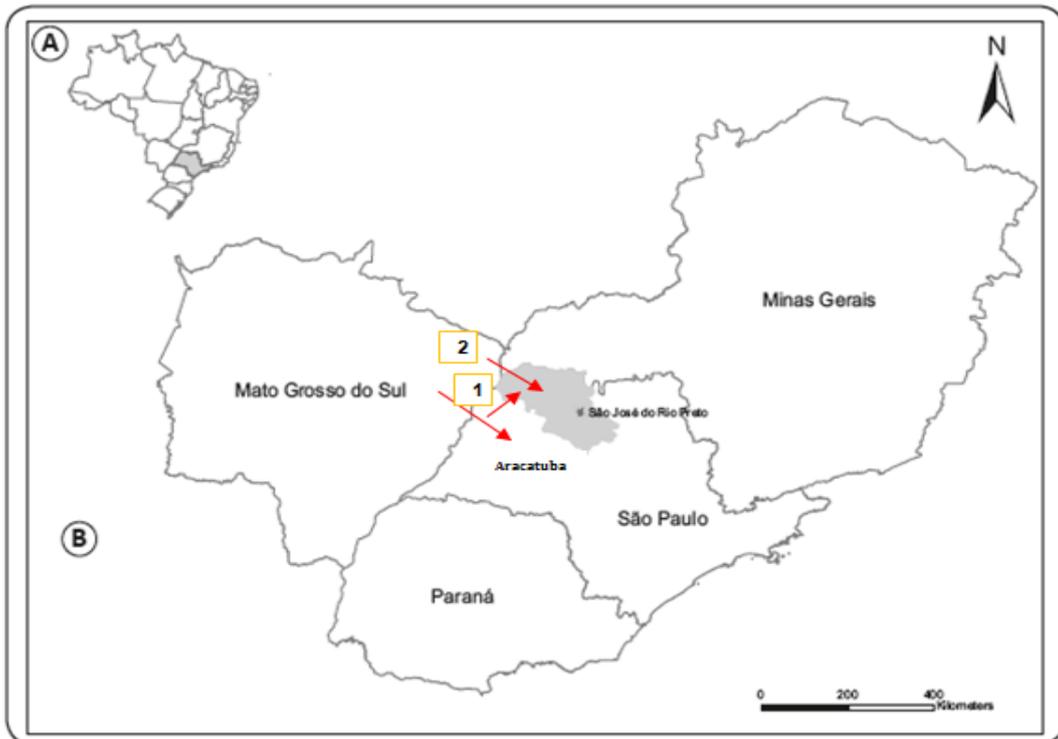


Figura 26. A- Mapa do Brasil, destacando o estado de São Paulo. B- Mapa destacando a região de São José do Rio Preto, e a localização com as fronteiras do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Paraná, seta (1) indica um eixo secundário de disseminação da LV, de Araçatuba para a região de São José do Rio Preto, a partir do eixo primário do Mato Grosso do Sul para Araçatuba; e seta (2) indica uma possível rota de disseminação da LV, a partir de um eixo do Mato Grosso do Sul para região de São José do Rio Preto.

7 DISCUSSÃO

Nos últimos 35 anos, a LV reemergiu em diferentes partes do mundo com preocupante intensidade de novos casos e focos de transmissão autóctone (ZIJLSTRA *et al.*, 1991; ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2000).

Autoridades dos governos de Bangladesh, Índia e Nepal, países que concentram mais de 65% dos casos de LV implantaram programas visando à redução da incidência para um (1) caso por 10.000 habitantes até meados da década de 2010 (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Também na Europa houve um incremento nas preocupações com a expansão da LVH, tanto em relação ao número de casos clínicos quanto e, principalmente em relação às infecções subclínicas (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Pesquisadores de diferentes países alertaram para a grande variação na proporção entre infecções assintomáticas e casos clínicos diagnosticados, oscilando em média entre três (3) e até dez infecções subclínicas para cada caso diagnosticado, respectivamente 3:1 até 10:1. No Quênia essa proporção chegou a 4:1; na Etiópia até 5,6:1. Porém, em alguns países foram indicados números maiores, como no Sudão, chegando até 11:1; no Irã até 13:1; no Brasil até 18:1 e na Espanha a proporção assintomáticos: sintomáticos chegam a 50:1 (BADARÓ *et al.*, 1986, ZIJLSTRA *et al.*, 1994, SCHAEFER *et al.*, 1995, ALI & ASHFORD, 1994, DAVIES *et al.*, 1999, MORAL *et al.*, 2002, CHAPPUIS *et al.*, 2007, MORAIS, 2011).

No Brasil até meados da década de 1980 a LV era considerada predominantemente uma doença de ambientes silvestre e rural. Este padrão epidemiológico vem se modificando com a crescente a urbanização e expansão geográfica das leishmanioses, em municípios onde a doença não ocorria anteriormente (DESJEUSX, 2001; BEVILACQUA *et al.*, 2001; MARZOCHI, 2004; GONTIJO, 2004).

É na década de 1980 que se inicia o período dos registros de epidemias no ambiente urbano e a rápida expansão dos focos de

transmissão (COSTA & ARAUJO, 1990; COSTA *et al.*, 1995; ARAÚJO *et al.*, 2012).

A velocidade da expansão dos espaços ocupados por *Lu. longipalpis*, principal vetor de *L. infantum chagasi* no ambiente endêmico urbano ficou bem demonstrado no ESP. Em 1997, COSTA *et al.*, comunicaram o primeiro encontro de *Lu. longipalpis* em área urbana do estado, no município de Araçatuba. No intervalo de 11 anos, até 2008, a presença do vetor estava confirmada em mais de 80 municípios paulistas (Grupo de estudos em leishmanioses, 2008). Nesse mesmo ano, no DRS XV, foi registrado em Jales, de forma simultânea o primeiro encontro do vetor, os primeiros casos caninos autóctones e, foi notificado o primeiro caso e óbito de LVH na região.

No período considerado no presente estudo, de 2008 até 2012, foi confirmada a presença de *Lu longipalpis* em 23 municípios da região do DRS XV, o mesmo encontrado por RANGEL *et al.*, (2013).

A urbanização é considerada a mais importante modificação na epidemiologia da LV, inicialmente observada no Brasil, seguida no Paraguai (CANESE, 1998), Argentina (SALOMÓN & ORELLANO, 2005) e Uruguai (SALOMÓN *et al.*, 2011). O processo de urbanização e dispersão de *Lu. longipalpis* no ambiente urbano envolve fatores climáticos, ambientais e sócio-econômicos (SALOMÓN *et al.*, 2015). A urbanização é considerada, também, o principal obstáculo para a efetividade dos programas de controle (PAHO, 2013)

A urbanização é entendida como uma mudança de comportamento na preferência ou adaptação do inseto, de ambientes naturais para ambientes altamente modificados e, a dispersão é a colonização e representa a possibilidade de ocupação de áreas fora da área geográfica conhecida para uma dada espécie. São conceitos distintos que representam particularidades e características diversas em diferentes escalas de tempo e espaço (QUINTANA *et al.*, 2012). Para *Lu. longipalpis* admite-se que o que ocorre é a dispersão da urbanização (SALOMÓN *et al.*, 2015). O vetor

adaptou-se a um novo ambiente urbano, e a partir de então dispersou para outros espaços nas cidades.

Na região de São José do Rio Preto, até 2007, haviam esporádicos registros de casos de LV, cujas investigações posteriores revelaram tratar-se de casos “importados” (CARDIM *et al.*, 2013). Em 2012, foram classificados 25 municípios com transmissão humana e/ou canina e/ou presença do vetor (CIARAVOLLO *et al.*, 2015).

Nesse período foram notificados 99 casos de LVH, dos quais 68,7% (68/99) classificados como autóctones de municípios abrangidos por este DRS. Dos casos humanos autóctones da região, em Jales, Santa Fé do Sul e, Votuporanga observou-se a concentração de 97,0% (66/68) dos casos na região. Cabe destacar que neste último município em apenas dois anos foram diagnosticados e notificados 48,5% (33/68) dos casos autóctones.

No presente estudo as taxas de incidências dos casos de LVH foram semelhantes àquelas descritas por CARDIM *et al.*, (2013), inferiores às das demais regiões do ESP para mesmo período.

CARDIM *et al.*, (2013), afirmaram que com exceção da região de São José do Rio Preto as demais regiões apresentam um pico seguido de queda nas taxas de incidência. O estudo também aponta que a região de São José do Rio Preto apresenta aumento exponencial nas taxas de incidência anual, no entanto, em relação às demais regiões administrativas, em 2011 e 2012 houve aumento das taxas de incidência nas regiões de Bauru e Araçatuba.

Dentre todos os casos de LVH notificados na região da DRS XV, 25,3% (25/99) foram classificados como casos importados de outros municípios paulistas ou de outros estados brasileiros. Isso reforça a atenção para a intensa movimentação e deslocamento de pessoas no Brasil, o que pode favorecer a circulação de patógenos de uma dada região endêmica para outra ainda indene.

Essa situação adquirirá uma maior importância epidemiológica se essa movimentação incluir cães naturalmente infectados por *L. infantum chagasi*, na medida em que desde os estudos pioneiros de DEANE &

DEANE, 1955, indicaram que os canídeos, o cão doméstico e as raposas, são reservatórios ou fontes de infecção mais efetivos do que o homem para infectar *Lu. longipalpis*. Essa condição de deslocamento de cães infectados para áreas sem transmissão autóctone foi estudado por PARANHOS-SILVA *et al.*, (1998), em Jequié, Bahia, revelando o papel desses animais no estabelecimento de novos focos de transmissão e, como consequência interferindo nas ações de controle anteriormente planejadas.

Foi possível confirmar que para LVH diagnosticada na região de abrangência do DRS XV prevaleceu à importância e a opção pelo critério clínico laboratorial, registrada para 94,1% dos casos autóctones, tal como preconizados nos manuais de vigilância e controle da LV (BRASIL, 2006 e SÃO PAULO, 2006). Observação semelhante foi assinalada por SILVA & GAIOSO, (2013), para o estado do Pará, quando no período de 2007 a 2011, do total notificação de LVH analisadas, o critério clínico laboratorial para confirmação diagnóstica esteve presente 88,8% (1.544/1.738) dos casos.

Relatos recentes indicam que para a LVH no Brasil há um predomínio no sexo masculino e em faixas etárias mais baixas e mais altas. Assim foi observado na região norte, no Pará (SILVA & GAIOSO, 2013); na região nordeste, no Ceará (CAVALCANTE & VALE, 2014), no Piauí (COSTA *et al.*, 1990), no Rio Grande do Norte (LEITE & ARAÚJO, 2013), em Sergipe (GÓES *et al.*, 2014), em Pernambuco (DANTAS-TORRES, 2006); na região centro-oeste, em Mato Grosso (MESTRE & FONTES, 2007), em Brasília (CARRANZA-TAMAYO *et al.*, 2010); na região sudeste, no Rio de Janeiro, MARZOCHI *et al.*, 2009, em São Paulo (VIEIRA *et al.*, 2014).

No presente estudo, foi observado o mesmo padrão de maior ocorrência de casos de LVH em indivíduos do sexo masculino, concentrando 76,5 % dos casos. Da mesma forma, para a LVH autóctone da região do DRS XV observou-se que 63,2 % dos pacientes estavam nas faixas etárias menores de 10 anos e maiores de 51 anos de idade.

Considerando aspectos do hábito crepuscular e noturno na atividade de hematofagia de *Lu longipalpis*, é possível pensar em transmissão intra ou

peridomiciliar. Similarmente, a preferência por faixa etária inferior a 10 anos é argumento favorável a possibilidade de uma introdução recente de focos de transmissão autóctone. E, isso é o que ficou registrado nos municípios da região do DRS XV com registro dos primeiros casos humanos autóctones em 2008 em Jales, 2009 em Urânia, em 2010 em Santa Fé do Sul e, em 2011 em Aparecida D'Oeste e Votuporanga.

Ainda que a maior parte dos casos evolua para cura clínica, as maiores taxas de letalidade concentram-se entre os menores de 10 anos e os mais idosos, acima dos 60 anos (CAVALCANTE & VALE, 2014). No Brasil, no período de 1980 até 2008 foram registrados mais de 3.800 óbitos por LV. Alguns autores associam, ao menos em parte, o diagnóstico tardio, desnutrição, anemia severa, icterícia, diarreia, presença de co-morbidades e complicações hemorrágicas entre os principais fatores que resultam em óbito dos pacientes (BRAGA *et al.*, 2013; LISBOA *et al.*, 2014).

Em estudo realizado por MALADOSSO *et al.*, (2012), com objetivo de identificar os fatores associados à letalidade na LV no ESP, no período de 1999 até 2005, a partir da análise das notificações de 376 casos, a taxa de letalidade observada foi significativamente maior para a faixa etária de maior ou igual a 50 anos. Nesse período, a taxa de letalidade média foi de 14,1% enquanto no restante do país permaneceu ao redor de 7,0%.

RANGEL *et al.*, 2015, registraram que a letalidade em São Paulo oscilou no período entre 1999 e 2013. No último período, de 2011 a 2013 foi observada discreta redução na letalidade, porém sem significância estatística. De importância identificaram que o risco de óbitos foi maior entre os municípios classificados como de transmissão intensa e moderada.

No presente estudo, de forma semelhante a outros registros acima assinalados, a letalidade por LV autóctone na região abrangida pelo DRS XV manteve-se em 16,2%, significativamente maior, quase o dobro daquilo que ficou registrado, em 8,3%, para o estado para o mesmo período de 2008 a 2012.

No município de Barra Mansa, uma nova região com transmissão da LV no Rio de Janeiro, PIMENTEL *et al.*, (2014), descreveram a elevada

letalidade de 44,4% (4/9), muito mais alta que a letalidade média de 7,8% registrada entre os anos de 2000 e 2009 para aquele estado. Os autores destacam a necessidade de sensibilização de clínicos sobre a possibilidade de surgimento de casos de LV com quadros clínicos atípicos, particularmente em novas áreas de transmissão.

Ainda que na região do DRS XV tenha sido registrado um menor número de casos do que o notificado para outras regiões paulistas é possível relacionar algumas circunstâncias na tentativa de explicar a letalidade expressiva na região de São José do Rio Preto:

- Diagnóstico tardio da LV em região ainda indene para a parasitose;
- Falta de nexos entre o quadro clínico observado e LV;
- Falta de estratégia de busca ativa de sintomas compatíveis com LV mesmo que já esteja bem estabelecida a presença do vetor e da transmissão canina;
- Dificuldade para a confirmação no diagnóstico laboratorial.

A transcorrer de maneira similar ao verificado para outras regiões paulistas e mesmo em outros estados, com o passar dos anos, apesar das dificuldades para a completa interrupção da transmissão da LVH, espera-se que tanto em relação ao número de novos casos como e, principalmente em relação à letalidade, nos próximos períodos haja uma efetiva redução de casos e interrupção dos registros de óbitos.

No presente estudo, a divergência nos bancos de dados do SINAN municipal, estadual e federal, chama a atenção para a necessidade de uma investigação epidemiológica mais apurada quanto ao local provável da infecção e, principalmente que o fluxo de informações seja ágil e preciso para garantir a construção dos planejamentos das ações de vigilância e controle da LV e que os dados e registros indiquem aquelas áreas prioritárias de desenvolvimento dos serviços. Se, por exemplo, a autoctonia não estiver totalmente descartada nos casos de LV registrados pelo SINAN/NET (municipal, estadual ou federal) nos municípios de Embaúba, Ibirá, Macaúbal, Valentim Gentil e Tanabi (**QUADRO 1**), isso poderá

representar prejuízo ou omissão em relação a decisão pela implementação ou não das ações de controle da LV.

De acordo com GALVÃO *et al.*, (2008), a falta de informações confiáveis, completas e precisas, no banco de dados do SINAN e especialmente a falta de avaliação periódica pelos municípios responsáveis pela informação junto ao sistema nacional, coloca em risco o planejamento e gerenciamento de serviços de saúde.

O estudo de GALVÃO *et al.*, (2008), aponta erros de notificação e até casos de subnotificação ao sistema, o que prejudica as políticas de controle da doença. A notificação adequada tem grande importância, pois através dela é possível traçar um perfil epidemiológico mais próximo da realidade.

No Brasil, os Programas de Vigilância e Controle da LV tem sido suportados em pressupostos que se interligam e direcionam as principais ações com vistas à redução da morbidade e a diminuição ou mesmo a interrupção da letalidade. As principais ações são: o diagnóstico e tratamento precoce de todos os casos humanos; identificação e controle dos reservatórios domésticos de *L. infantum chagasi*, que são os cães domésticos naturalmente infectados; controle dos vetores.

Sem dúvida, são as ações direcionadas ao reservatório canino aquelas que assumem maior destaque ou visibilidade para a população. De um lado, todo o caráter negativo decorrente da necessidade do recolhimento e eutanásia dos animais soropositivos, de outros os questionamentos e dúvidas quanto à fidedignidade dos testes diagnósticos utilizados nos inquéritos soropidemiológicos. Para COSTA & VIEIRA, (2001), o controle do reservatório canino é o componente que apresenta "o menor suporte técnico-científico" entre as estratégias do PVCLV.

No estado de São Paulo, na grande maioria das vezes observou-se padrão de ocorrência espaço-temporal na qual a doença em cães precedeu a detecção de casos humanos (NEVES, 2011). Embora o número de municípios com transmissão de LVH no ESP seja bem inferior quando comparado aos que apresentam a transmissão de LVC, na maioria das

vezes, observa-se maior frequência de transmissão entre os municípios que apresentam ambos (transmissão canina e transmissão humana), o que demonstra que na maioria dos focos, a enzootia canina deve ter precedido o aparecimento em casos humanos, ainda que a infecção em cães seja mais prevalente (D'ANDREA *et al.*, 2009).

Entretanto, ainda que o primeiro registro de LV na região de abrangência do DRS XV, no município de Jales em 2008, tenha sido em humanos, nos demais municípios, prevaleceu à antecedência dos registros da enzootia canina.

O período entre 2008 e 2012 em análise no presente estudo incluiu a utilização de quatro diferentes algoritmos para a realização dos diagnósticos para a LVC. Além disso, até a metade do ano de 2010 trabalhou-se com eluato de amostras de sangue coletadas em papel de filtro. A partir de então somente foram examinadas amostras de soro sanguíneo.

No primeiro deles, apenas a RIFI foi utilizada para o diagnóstico laboratorial. Isso ocorreu num período inicial de registros e investigações de focos de transmissão da LVC em diversos municípios da região do DRS XV.

A RIFI nesse período cumpria simultaneamente dois papéis: teste de triagem para diagnosticar os animais soronegativos e teste confirmatório da infecção, tal como preconizado pelo PVCLV. A disponibilidade de uma única técnica para a identificação de animais que, em tese, uma vez diagnosticados sororreagentes deveriam ser recolhidos e submetidos à eutanásia representou uma das condições relacionadas por COSTA & VIEIRA, (2001) sobre a insuficiência técnica para suportar o componente controle do reservatório canino.

As taxas de prevalência da infecção canina estiveram sempre em valores $\geq 9,5\%$, com média de $14,1\%$ para todo o período. O quantitativo de novas coletas, em decorrência de amostras consideradas inadequadas variou entre $5,9$ e $10,8\%$ podendo ser explicado, em parte, por resultados "indeterminados", em situações de zona cinza no ensaio imunoenzimático e, pela qualidade da amostra enviada ao laboratório.

Mesmo considerando as dificuldades para uma análise de desempenho entre os vários algoritmos em razão de se tratar de conjuntos de amostras coletadas de animais e municípios distintos, em diferentes períodos, pode-se destacar que a cada novo algoritmo utilizado foram adicionadas características favoráveis à sua implementação. Assim, além da diminuição das taxas de rejeição de amostras foi possível:

- a inclusão de um segundo teste laboratorial e a necessidade de resultados reagentes em ambos os testes para a liberação de resultados positivos;

- a substituição do eluato de amostra coletada em papel de filtro pelo soro sanguíneo diminuindo assim as incertezas em relação à qualidade e tipo de papel de filtro utilizado e, eliminou as distorções relativas ao volume de amostra aplicado por unidade de área e sobre as condições de armazenamento até a entrega no laboratório;

- a inclusão de um novo teste no formato imunocromatográfico, com antígeno recombinante mais específico, como teste de triagem para identificar os animais negativos, possibilitando a diminuição das taxas de rejeição de amostras e aumento do número de amostras examinadas, bem como descentralizando a execução do teste até o nível municipal pelas equipes de controle de zoonoses.

Esses aspectos e necessidades mereceram referência em COSTA & VIEIRA, (2001); GRIMALDI *et al.*, (2012).

O algoritmo atualmente em uso favorece uma diminuição considerável no tempo necessário para a realização do diagnóstico laboratorial, ou seja, desde a coleta da amostra até a liberação dos resultados. No período de utilização da RIFI em amostras coletadas em papel de filtro, em média eram necessários de 60 a 90 dias para a liberação dos resultados. Atualmente, com a utilização do teste imunocromatográfico são necessários entre 15 e 20 dias apenas.

Em relação às taxas de concordância bruta entre os métodos diagnósticos utilizados, ainda que o novo algoritmo TR-DPP® (triagem) e EIE (confirmatório) tenha contribuído para a diminuição na discordância,

atualmente, o teste EIE confirma pouco menos de 60% dos TR-DPP® reagentes.

De acordo com LAURENTI *et al.*, (2014), o TR DPP® apresenta um bom desempenho como teste sorológico para LVC, visto que detecta tanto cães assintomáticos e sintomáticos em proporções iguais. Apesar da sua sensibilidade ainda não ser a ideal, melhorou a precisão do novo protocolo de diagnóstico LVC no Brasil, especialmente para os cães infectados. Além disso, considerando a maior especificidade de TR-DPP® (95,1% vs 77,8%), valor preditivo positivo (95,1% vs 81,1%) e valor de probabilidade positiva (18,3% versus 4,1%) em comparação com o EIE BIOMANGUINHOS, a utilização de TR-DPP® como um teste de confirmação, em vez de um teste de triagem foi sugerido.

Quanto à efetividade das ações de controle da LVC, o estudo revela que a maioria dos municípios não atende ao PVCLV/ESP, no cumprimento das ações de controle por meio de inquéritos caninos censitários ou amostrais previsto anualmente. SCANDAR *et al.*, (2011) revelaram que a descontinuidade das ações de controle, tanto aquelas relacionadas ao reservatório doméstico como as relacionadas ao vetor, são fatores que favorecem a manutenção da transmissão.

O controle da LVC consiste principalmente na retirada dos animais errantes; na busca ativa e eutanásia dos cães infectados, detectados por meio de exame parasitológico ou sorologia positiva. (SÃO PAULO, 2006). Outra estratégia que poderia ser utilizada seria a investigação de casos autóctones caninos, que poderia ser realizada juntamente com campanhas de vacinação anti-rábica (LANGONI, 2001).

Segundo WERNECK, (2008), embora as teorias fundamentadas sobre medidas de controle tragam boa sustentação, não há evidências de sua efetividade. Em São Paulo, essas medidas não têm sido efetivas para conter a disseminação da doença que está em plena expansão.

Observações semelhantes foram apresentadas por WERNECK, (2010); COSTA, (2012), quanto à expansão da endemia. DYE, (1996), indicou ser mais efetivo investir em estratégias para o controle do vetor.

COURTENAY *et al.*,(2002), concluíram que a eutanásia canina falha como medida de controle da LVC em razão das elevadas prevalências de infecção e "infecciosidade" entre esses animais; a quantidade de diagnósticos para identificar a "infecciosidade" nesses animais e, a demora entre a realização dos diagnósticos e a retirada e eutanásia dos cães infectados.

A partir de uma revisão detalhada, do ponto de vista histórico, de aspectos éticos e científicos, sobre a eutanásia de canina como medida de controle em diferentes países em que essa ação foi empregada, COSTA, (2001) concluiu pela inexistência de evidências de sucesso dessa estratégia. Propôs a necessidade de revisão do PVCLV e, que a medida deveria ser abolida, considerando as implicações éticas e pela mínima ou nenhuma comprovação científica de sua efetividade para o controle da LV.

COSTA *et al.*, (2013), construíram modelo matemático para avaliação do impacto da retirada de cães infectados em áreas endêmicas em cenários de transmissão esporádica, moderada e intensa, tendo concluído que a ação poderá ser efetiva em áreas de esporádica ou moderada transmissão mas ressaltaram dificuldades relacionadas à adoção da eutanásia como uma atividade desenvolvida mecanicamente em larga escala.

No presente estudo observou-se a dificuldade dos municípios para conclusão dos inquéritos sorológicos caninos dentro de um mesmo ano, como preconizado pelo PVCLV. Em alguns municípios, o tempo utilizado para conclusão do inquérito sorológico canino anual, foi de até dois (2) anos. Da mesma forma, alguns municípios demoraram muito tempo para iniciar as atividades do diagnóstico de cães infectados, por meio de inquéritos sorológicos caninos nos municípios com presença de vetor. Nos municípios de Aspásia e Santa Salete, apesar da detecção da presença do vetor em 2009, somente após três (3) anos, foram realizadas as coletas referentes ao inquérito canino.

Apesar das dificuldades enfrentadas pelas administrações públicas municipais, principalmente a falta de recursos humanos e financeiros, é

importante ressaltar que a detecção tardia dos casos de LVC, poderá modificar o perfil epidemiológico da doença no município durante este intervalo sem atividade, e conseqüentemente casos de LVC e LVH poderiam já estar circulando.

No período de estudo, nos municípios com presença do vetor em que foi realizada a investigação, foram encontrados casos caninos confirmados sorologicamente e, as demais investigações realizadas vieram confirmar a autoctonia da transmissão da leishmaniose visceral canina.

A prevalência da LVC na região de São José do Rio Preto é superior à taxa de prevalência do ESP. De acordo com o Manual de Vigilância e Controle da LV, para municípios que não possuem uma estimativa de prevalência conhecida, deve-se utilizar 2% como parâmetro (BRASIL, 2003).

Em relação à proporção entre o número de habitantes e o número de cães nos municípios de estudo, aponta uma relação média de 1/ 5 (1 cão para cada 5 habitantes). Na definição de Diretrizes, Objetivos, Metas e Indicadores para os anos de 2013-2015, com vistas ao fortalecimento do planejamento do Sistema Único de Saúde e a implementação do Contrato Organizativo da Ação Pública da Saúde, consta que a população canina existente em um município pode ser estimada entre 10% e 20% da população humana, o que representaria uma relação de 1 cão para cada 10 pessoas ou 1 cão para cada 5 pessoas, respectivamente, o que demonstra estarem na média do estado. (Pasteur, NOTA TÉCNICA 02 - IP/CCD/SES-SP – 07/10/2013).

A dispersão espaço-temporal da LV, acompanhada do rápido crescimento das cidades, aumento da pobreza, baixas condições sanitárias, aumento da ação antrópica no meio ambiente, grandes empreendimentos de engenharia, aumento das migrações, são características propícias para expansão da doença na escala regional, nacional e até global (MACHADO, 2013; CLABORN, 2014).

SCANDAR *et al.*, (2011) apontam que a introdução do parasito em regiões sem transmissão poderia ser explicada pelo envio de cães

infectados assintomáticos de outras áreas, para não serem eutanasiados como preconiza o PCVLLV.

No estudo observou-se que a rodovia Euclides da Cunha (SP-320) principal via de acesso a região de São José do Rio Preto, apresenta importante papel na disseminação da LV. A rodovia percorre o território de 14 municípios que apresentam transmissão ou presença de vetor, além de interligar-se com outras rodovias vicinais.

Assim como a rodovia, a ferrovia Bandeirantes (Ferroban) antiga ferrovia Araraquarense também demonstra grande importância na expansão da LV na região. Dos 25 municípios estudados, que realizaram inquéritos caninos do tipo censitários e amostrais, 11 convivem com a Ferrovia Ferroban, margeando ou adentrando seus territórios.

Tanto a rodovia como a ferrovia fazem a interligação com o Estado de Mato Grosso do Sul, e se conectam com a rodovia federal (BR-158) no estado do Mato Grosso do Sul.

ANTONIALLI *et al.*, (2007) aponta que o início da LV no Mato Grosso do Sul, coincide no espaço e no tempo, com a execução do projeto de construção do Gasoduto Bolívia-Brasil, expandindo-se no sentido oeste para leste, de Corumbá para Três lagoas, passando por Campo Grande.

CARDIM *et al.*, (2013) também aponta que a disseminação da LV segue um eixo primário principal, no sentido noroeste-sudeste, seguindo do Mato Grosso do Sul para Araçatuba pela rodovia Marechal Rondon, e associada a construção do gasoduto Bolívia-Brasil. A partir do eixo principal a doença expandiu-se para outras regiões, através de um eixo secundário no sentido sul para as regiões de Presidente Prudente e Marília, e no sentido norte para região de São José do Rio Preto.

No presente estudo observou-se e confirmou-se que a rota de disseminação segue este mesmo sentido descrito por CARDIM *et al.*, (2013), ou seja, noroeste-sudeste. No entanto, além do eixo secundário de Araçatuba para região de São José do Rio Preto, pode-se sugerir a hipótese que exista outro eixo primário na disseminação da doença, vindo do Mato Grosso do Sul direto para região de São José do Rio Preto.

8 CONCLUSÕES

- O presente estudo permitiu resgatar dados soroepidemiológicos importantes, durante o período de 2008 a 2012 na região de abrangência do DRS XV de São José do Rio Preto. (SP), que contribuem para maior conhecimento do perfil da ocorrência deste agravo;
- Observou-se que a LV está em crescente expansão geográfica na região de São José do Rio Preto;
- Verificou-se que a região de São José do Rio Preto apresentou aumento exponencial nas taxas de incidência anual de LVH, sendo superior a taxa nacional no ano de 2012;
- Verificou-se que a maioria dos casos de LVH diagnosticados na região de abrangência do DRS XV de São José do Rio Preto, concentrou-se nos municípios de Jales, Santa Fé do Sul e Votuporanga;
- Confirmou-se que para o diagnóstico da LVH na região de abrangência do DRS XV prevaleceu o critério clínico laboratorial, com predomínio do sexo masculino, enquanto que a faixa etária mais acometida foi para menores de 10 anos e maiores de 51 anos de idade;
- Observou-se, na região estudada, que a taxa de letalidade de LVH foi significativamente maior do que a registrada para o estado de São Paulo para o mesmo período, sendo os menores e os mais idosos, acima de 60 anos foram às pessoas mais acometidas;

- Verificou-se a existência de divergências de números de casos confirmados e óbitos por LVH nos bancos de dados do SINAN/NET, as notificações necessitam de investigação epidemiológica mais apurada quanto ao local provável de infecção, e comunicação ou revisões periódicas nos registros do SINAN/NET, mais ágeis nos níveis municipal, estadual e federal;
- Demonstrou-se altas prevalências da LVC em comparação com outras regiões do estado de SP;
- Observou-se que a cada novo algoritmo utilizado foram adicionadas características favoráveis à sua implementação, e diminuição das taxas de rejeição de amostras inadequadas;
- O algoritmo atual utilizando TR-DPP® como teste triagem, contribuiu para a diminuição das taxas de rejeição de amostras, e a descentralização da execução deste teste aumentou o número de amostras examinadas pelas equipes de controle de zoonoses dos municípios;
- O algoritmo TR-DPP® e EIE permitiu uma diminuição do tempo (horas/dias) necessário para realização do diagnóstico laboratorial da LVC;
- A concordância bruta entre os métodos utilizados no diagnóstico da LVC revelou que ainda que o novo algoritmo TR-DPP® (triagem) e EIE (confirmatório) tenha contribuído para a diminuição na discordância atualmente, o teste EIE confirma menos de 60% dos TR-DPP® reagentes.

- A discordância nos resultados entre o teste de triagem e o confirmatório indica a necessidade de busca por novas alternativas para o diagnóstico canino;
- Verificou-se que a maioria dos municípios não conseguiu atender ao planejamento anual para a realização de inquéritos censitários e/ou amostrais, como preconizado pelo Programa Vigilância e Controle LV/ESP;
- Observou-se que o tempo gasto para finalização dos inquéritos sorológicos caninos preconizados pelo PVCLV, em alguns municípios foi de até dois (2) anos, e nos municípios de Aspásia e Santa Salete apesar da detecção da presença do vetor em 2009 somente foram iniciaram as coletas referentes aos inquéritos caninos após três (3) anos;
- A proporção entre o número de habitantes e o número de cães nos municípios de estudo aponta uma relação média de 1/ 5 (1 cão para cada 5 habitantes) e demonstrando estar dentro da média do estado de São Paulo;
- Demonstrou-se que as linhas tronco da estrada de ferro Ferrobán, antiga Ferro Araraquara, ferrovia Ferronorte e a rodovia Euclides da Cunha (SP-320) desempenham um importante papel na disseminação da LV na região;
- Observou-se e confirmou-se que a rota de disseminação segue o sentido noroeste-sudeste. No entanto, pode-se sugerir a hipótese que além do eixo secundário de Araçatuba para região de São José do Rio Preto, exista outro eixo na disseminação da doença, vindo do Mato Grosso do Sul direto para região de São José do Rio Preto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alencar JE, Dietze R. Leishmaniose Visceral. In: Veronesi R. Doenças infecciosas e parasitárias. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p. 706-17.

Alexander B, De Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2002; 8: p. 1480-5.

Ali A, Ashford RW. Visceral leishmaniasis in Ethiopia. IV. Prevalence, incidence and relation of infection to disease in an endemic area. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994; 88: p. 289-93.

Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*. 2005; 127: p. 227-32.

Antoniali SAC, Torres TG, Paranhos Filho AC, Tolezano JE. Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. *J Infect*. 2007; 54(5): p. 509-14. Disponível em: DOI: 10.1016 /j. jinf 2006.08.004

Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, *et al*. Canine leishmaniasis clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1994; 88(2): p. 371-8

Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*. 2004; 57: p. 1-87.

Alvar J; Vélez ID; Bern C; Herrero M; Desjeux P; Cano, *et al*. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. WHO leishmaniasis control team. *PLoS One* 2012; e 35671. HYPERLINK doi:10.1371/journal.pone.

Alves WA. Controle da leishmaniose visceral baseado no reservatório canino. In Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis visceral en Las Américas. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de Salud; 2006. p. 94-8.

Araújo VEM, Morais MHF, Reis IA, Rabello A, Carneiro M. Early Clinical Manifestations Associated with Death from Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(2): e1511. Available from: doi:10.1371/journal.pntd.0001511.

Azevedo MA, Dias AK, De Paula HB, Perri SH, Nunes CM. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoróo, Estado do Mato Grosso, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2008; 17(3): p. 123-7.

Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, *et al*. New perspective on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J.Infect.Dis*. 1986; 154: p. 1003-11.

Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, *et al*. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *The Journal of infectious Diseases*. 1996; 173: p. 758-61.

Badaró R, Duarte M. Leishmaniose visceral (Calazar). In: Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu; 1996; p. 1234-59.

Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996; 55(3): p. 273-7.

Bertollo DMB, Tolezano JE, Hiramoto RM, Bocchi MR. Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Estado de São Paulo. Expansão da endemia na região de São José do Rio Preto. *Boletim do Instituto Adolfo Lutz*. 2012; 22: p. 66-70.

Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2001; 53: p. 1-8.

Bisugo MC, Araújo MFL, Taniguchi HH, Cunha E, Santos AA, Pessoto-Junior M, *et al*. Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 2007; 66(2): p. 185-93.

Braga FG, Bouzada MLM, Fabri RL, Matos MO, Moreira FO, Scio E, *et al*. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; v.111: p. 396-402.

Braga ASC, Toledo-Junior ACC, Rabello A. Factors of poor prognosis of visceral leishmaniasis among children under 12 years age. A retrospective monocentric study in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil, 2001-2005. *Rev. Soc. Bras.Med.Trop*. 2013;46: p.55-9.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Fundação Nacional de Saúde (Funasa). Brasília; 2002; p.842.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de

Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília; 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília; 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. Boletim eletrônico epidemiológico. (2): 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria Interministerial Nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecu. Biblioteca Virtual da Saúde. [Online].; 2008 [cited 2011 dez 10. Available from: "<http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau delegis/2008/html>"]

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose visceral. Brasília; 2014.

Burns-Junior JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaró R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America (PNAS). USA. 1993; 90(2): p. 775-9.

Cabrera MA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SA, Silva AVM, *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. Revista Instituto Medicina Tropical. 2003; 42(5): p. 79-83.

Camargo-Neves VLF, Katz G. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical. 1999; 32(3): p. 63-4

Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Pauliquévis JC. Avaliação da efetividade da utilização de coleiras impregnadas com Deltametrina a 4% para o controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, São Paulo, Boletim Epidemiológico Paulista. 2004; 12.

Camargo-Neves VLF de, Glasser CM, Cruz LL, Almeida RG. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. 2006; p. 13-4.

Canese A. focos de leishmaniose visceral canina en las ciudades de Lambaré y Villa Elisa. Rev. Parag. Microbiol. 1998; 18: p.18-24.

Carranza-Tamayo CO, Carvalho MSL, Bredt A, BofilL MIR, Rodrigues RMB, Silva AD, *et al.* Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.2010; 43: p. 396-9.

Cardim MFM, Rodas LAC, Dibo RM, Guirado MM, Oliveira AM,

Chiaravalloti-Neto F. Introdução e expansão da Leishmaniose visceral americana em humanos no estado de São Paulo, 1999-2011. *Revista de Saúde Pública*. 2013; 47(4): p. 691-700.

Carvalho SFC, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of Recombinant k39 Antigen in the Diagnosis of Brazilian Visceral Leishmaniasis. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003; 68(3): p. 321-4.

Cavaliere T, Arnold P, Mathis A, Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P. Clinical, serologic, and parasitology follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 1999; 13: p. 330-4.

Cavalcante IJM, Vale MR. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral (calazar) no Ceará no período de 2007 a 2011. *Rev. Bras. Epidemiol.* 2014; 17: p. 911-24.

Ciaravolo RMC, Oliveira SS, Hiramoto RM, Henriques LF, Taniguchi HH, Viviani Junior A, *et al.* Classificação epidemiológica dos municípios segundo o programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral no Estado de São Paulo, dezembro de 2014. *Bepa*. 2015; 12(143): p. 9-22.

Chappuis F, Rijal S, Desjeux P, Karki BMS, Koirala S, Loutan L, *et al.* Field validity, reproducibility and feasibility of 56 diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. *Tropical Medicine and International Health*. 2006; 11(1): p. 31-40.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 2007; 5: p. 873-82.

Claborn DM. *Leishmaniasis: trends in epidemiology, diagnosis and treatment*. Rijeka: InTech, 2014.

Courtenay O, Quinell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *JID*. 2002; 186: p. 1314-20.

Cortadellas O. Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of amphotericin B desoxycholate in the management of canine leishmaniasis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2003; 17(6): p. 808-12.

Cortes JA. *Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais* São Paulo: Livraria Varela; 1993: p. 227.

Costa AIP, Casanova C, Rodas LAC, Galati EAB. Geographical distribution and first record of *Lutzomyia longipalpis* in urban area in São Paulo State, Brazil. *Revista de Saúde Pública*. 1997; 31(6): p. 632-3.

Costa CHN, Pereira HF, Araujo MV. *Epidemia da Leishmaniose Visceral*

no estado do Piauí, Brasil (1980-1986). Rev. Saúde Pública, 1990; 24: p. 361-372.

Costa JML, Vianna GMC, Saldanha ACR, Nascimento MDSB, Alvim AC, Burattini MN, *et al.* Leishmaniose Visceral no Estado do Maranhão, Brasil. A Evolução de uma Epidemia. Cad. Saúde Pública, 1995; 11: p.321-4.

Costa CHN, Vieira JBF. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2001; 34: p.223-8.

Costa FAL. The dog as a risk factor in transmission of visceral leishmaniasis: A review. AID. 2012; Available from: doi: 10.4236/aid.2012.22006.

Costa DNCC, Codeço CT, Silva MA, Werneck GL. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2013; Available from: .doi: 10.1371/journal.pntd.0002355.

Da Costa RT, França JC, Mayrink W, Nascimento E, Genaro O, Campos-Neto A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens k39 and k26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2003; 97(6): p. 678-82.

D'andrea LAZ, Camargo-Neves VLF, Sampaio SMP, Kronka SN, Sartor IF. American visceral leishmaniasis: disease control strategies in Dracena microregion in Alta Paulista, SP, Brazil. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2009;15(2):306.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Revista Instituto Medicina Tropical. 2006; 48(3): p. 151-6.

Dantas-Torres F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. Rev. Saúde Publica. 2006; 40: p. 537-41.

Davies CR, Cavgani MAS. Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. Parasitology.1999; 119: p. 247-57.

De Assis TSM, Braga ASC, Pedras MJ, Barral AMP, De Siqueira IC, Costa CHN, *et al.* Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. Epidemiologia e Serviços de Saúde. 2008; 17(2): p. 107-16.

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. Hospital, Rio de Janeiro. 1955; 48: p. 61-76.

Deane LM. Leishmaniose Visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária; 1956.

Desjeux P. The increase risk for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001; 95: p. 239-41

Desjeux P. Leishmaniasis. *Nature Reviews*. 2004; 2: p. 692-3.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Disease*. 2004; 27(5): p. 305-18.

Dourado ZF, Silva HD, Silveira-Lacerda EP, Garcia-Zapata MTA. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). *Revista de Patologia Tropical*. 2007; 36(3): p. 205-14.

Dujardin JC, Campino L, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, *et al.* Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis. *Europe Emerging Infectious Disease*. 2008; 14(7): p. 1013-28.

Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am.J.Trop. Med,Hyg*. 1996; 55: p.125-30.

Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizoto MC, Perri SH. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba- SP, Brasil. *Clínica Veterinária*. 2000; 28: p. 36-44.

Ferreira AW, Avila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Ferrer L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In Killick-Kendrick R. *Canine Leishmaniasis: an update International Canine Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum*. Barcelona; 1999; p. 6-10.

Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Trisciuglio A. Evaluation of ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet Parasitol*. 2007; (144)1-2, p. 162-6.

Fischer RA, Yates F. Tabelas estatísticas: para pesquisa em biologia, medicina e agricultura. Ed. Universidade de São Paulo e Ed. Polígono, 1971; p.150.

Forattini OP. *Ecologia, epidemiologia e sociedade*. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo: Artes Médicas; 1992.

Funed. Fundação Ezequiel Dias. [Online]. Minas Gerais; 2010 [cited 2012 Ago 19]. Available from: <http://www.isaude.net/pt->

BR/noticias/6636/geral/funed-valida-teste-mais-rapido-para-leishmaniose-visceral-canin.

Galimbert MZ, Katz G, Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Casanova CC, Costa AI, *et al.* Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1999.

Galvão, PRS *et al.* An evaluation of the SINAN health information system as used by the Hansen's disease control programme, Pernambuco State, Brazil. Lepr Rev 2008; p. 217-8.

Góes MAO, Jeraldo VLS, Oliveir AS. Urbanização da leishmaniose visceral: aspectos clínicos e epidemiológicos em Aracaju, Sergipe, Brasil. Rev. Bras. Med. Fam. Comunidade. 2014; 9: p.119-26.

Gomes AHS, Ferreira IMR, Lima MLR, Cunha EA, Garcia AS, Araujo MFL, *et al.* PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. Veterinary Parasitology. 2007; 144: p. 234–41.

Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FGC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. The Veterinary Journal. 2008; 175: p. 45-52.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Revista Brasileira de Epidemiologia. 2004; 7: p. 338-49.

Gramiccia M, Gradoni L, Orsini S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum*, isolated from dogs after several courses of drug treatment. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 1992; 86(6): p. 613-20.

Gravino AE. Interpretation of laboratory data during cryptic leishmaniasis in dog. Parasitologia. 2004; 46(1-2): p. 227-9.

Grupo de estudos em Leishmanioses. Centro de Vigilância Epidemiológica "Alexandre Vranjac", Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Atualização da classificação epidemiológica dos municípios para a leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. Bepa, 2008; 5: p. 22-5.

Greene CE. Leishmaniasis. Infectious diseases of the dog and cat. Saunders Elsevier. 2006; 2: p. 685-97.

Grimald GJR, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Pinto ID, Azevedo CT, *et al.* Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on dual-path-platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012; 106: p. 54-9.

Guitierres A, Tolezano JE, Garcia ELR, Westphalen EVN, Araujo MFL,

Taniguchi HH, *et al.* A microculture system able to provide in vitro conditions for growing *Leishmania (Viannia) braziliensis* since a single parasite. In: XXIII Reunião de pesquisa aplicada em doenças de chagas e Leishmanioses. Anais XXIII Reuniao de pesquisa aplicada em doença de chagas e leishmanioses. 2007; p. 55-6.

Iijima M, Kadoya H, Hatahira S, Hiramatsu S, Jung G, Martin OF, *et al.* Nanocapsules incorporating IgG Fc-binding domain derived from *Staphylococcus aureus* protein A for displaying IgGs on immunosensor chips. Biomaterials. 2011; 32(6): p. 1455-64.

Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK, Johnson AJ. Visceral leishmaniasis in the german shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. Veterinary Pathology. 1984; 21: p. 74.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. Medical and Veterinary Entomology, Oxford. 1997; 11, p. 105-11.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W & Killic-Kendrick R. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London: Academic Press; 1987; p. 1-120.

Langoni H, Shimabukuro FH, Mendonça AO, Araújo WN, Mendaça LJP, Luvizotto MCR. Caracterização clínica dos casos de leishmaniose canina diagnosticados durante o ano de 1999, no serviço de diagnóstico de zoonoses da FMVZ – Unesp. In: Parasitologia Jornada Paulista de Parasitologia. Botucatu; 2000.

Langoni H, Modolo JR, Souza LC, Araújo WN, Shimabukuro FH, Mendonça AO, *et al.* Epidemiological vigilance for canine Leishmaniasis in the country of Botucatu, SP, Brazil. Ars. Jaboticabal. 2001;(17)3, p.196-200.

Laurenti MD, Leandro Junior MVS, Tomokane TY, De Iucca HRL, Aschar M, Souza CSF, *et al.* Comparative evaluation of the DPP CVL rapid test for canine serodignosis in area of visceral leishmaniasis. Veterinary Parasitology. 2014; p. 444-50.

Leite AI, Araújo LB. Leishmaniose visceral: Aspectos epidemiológicos relacionados aos óbitos em Mossoró-RN. Rev.Patol. Trop. 2012; 42: p. 301-8

Lemos JC, Lima SC. A geografia médica e as doenças infectoparasitárias. Caminhos da Geografia. 2002; 3: p. 74-86.

Lemos EM, Carvalho SFG, Corey R, Dietze R. Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante k39 no diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

2003; 36(supl 2).

Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MAB, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect™) in dogs with and without signs of the disease. *Journal Acta Tropical*. 2008; 107(1): p. 205–7.

Lima VMF, Fattori KR, Michelin AF, Neto LS, Vasconcelos RO. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2010; 173(3-4): p. 330-3.

Lisboa JLC, Costa GS, Araújo AR, Souza VMP. Determinantes Letais Contribuintes para Óbitos por Leishmaniose Visceral. *Rev. Estatística UFOP*, 2014; 3: 358-63.

Loureiro MD, Martinez MC, Boursiquot JM, This P. Molecular marker analysis of *Vitis vinifera* 'Albarino' and some similar Grapevine cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1998; 123(5): p. 842-8.

Machado CJS. Ciências, políticas públicas e sociedade sustentável. Rio de Janeiro: E Papers, 2013.

Maladosso G, Fortaleza CM, Ribeiro AF, Cruz LL, Nogueira PA, Lindoso JAL. American visceral leishmaniasis: Factors associated with lethality in the State of São Paulo, Brazil. *J.Trop.Med*. 2012; Available from: doi: 10.1155/2012/281572.

Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania Infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 1995; 59(1): p. 13-21.

Manson-Bahr PE. Diagnosis.. In Peters W & Killic-Kendrick R. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press; 1987. p. 703-29.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging anthrozoosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Pública*. 2004; 10: p. 359-75.

Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, *et al.* Visceral leishmaniasis in the Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2009; 42: p. 570-80.

Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology today*. 2000; 16(5): p. 188-9.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes A. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(11): p. 515-9.

Mestre GLC, Fontes CJF. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso, 1998-2005. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40(1): p. 42-8.

Michalick MSM, Genaro O. Leishmaniose visceral americana. In Neves DP. *Parasitologia Humana*. 11^a ed. São Paulo: Aheneu; 2005; p. 67-83.

Mongodin E, Bajolet O, Hinrasky J, Puchelle E, Bentzmann S. Cell Wall-associated Protein A as a tool for immunolocalization of *Staphylococcus aureus* in infected human airway epithelium. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2000; 48(4): p. 523-33.

Moral L, Rubio EM, Moya M. A leishmanin skin test survey in the human population of Alacanti region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. *Trans.R. Soc.Trop.Med.Hyg*. 2002; 96: p. 129-32.

Moraes MHF. Avaliação das atividades de controle de leishmaniose visceral na Regional Noroeste de Belo Horizonte. 2006 a 2010. Tese. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011; p.191.

Moreira-Junior ED, Souza VMM, Sreenivasan M, Lopes NL. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *Annals of Journal Tropical Medicine and Hygiene*. 2003; 69: p. 393-7.

Moreira M, Luvizotto M, Garcia J, Corbett C, Laurenti M. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*. 2007; 145(3-4): p. 245-52.

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Journal Emerging Infectious Diseases*. 1995; 1: p. 7-15.

Neves VLFC, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF, Cruz OG. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cad Saúde Pública*. 2001; 17(5): p. 1263-7.

Pan American Health Organization (PAHO) - Reunión de los Programas Nacionales de Leishmaniasis en Las Americas. Informe final. 2013; 2a. Available from: org/hq/index.php?option=com_docmn&task=doc_view&gid.

Paranhos-Silva M, Nascimento EG, Melro MC, Oliveira GG, Santos WL, Carvalho LCP, *et al*. Cohort study on canine emigration and *Leishmania*

infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Tropica*. 1998; 69: p. 75-83.

Penna HA. Leishmaniose Visceral no Brasil. *Brasil-Médico*. 1934; 48: p. 949-50.

Pimentel MIF, Alves ELM, Silva MHFF, Moza PG, Almeida PMP, Cunha CS, *et al.* High visceral leishmaniasis mortality rate in Barra Mansa, a new area of visceral leishmaniasis transmission in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2014; 47: p.521-3.

Poli A, Sozzi S, Guidi G, Bandinelli P, Mancianti F. Comparison os aminosidine (paramomycin) and sodim stibogluconate for tratament of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitololy*. 1997; 71: p. 263-71.

Quintana MG, Fernández MS, Salomón OD. Distribution and abundance of Phlebotominae, vectors of leishmaniasis, in Argentina: spatial amd temporal analysis at different scales. *J.Trop.Med.* 2012. Avaiable from: doi: 10.1155/2012/652803.

Rangel O, Hiramoto RM, Henriques LF, Taniguchi HH, Ciaravolo RMC, Tolezano JE, *et al.* Classificação epidemiológica dos municípios do Estado do Estado de São Paulo segundo o Programa de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral Americana. *Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)*. 2013; 10(111): p. 3-14.

Rangel O, Oliveira SS, França AC, Ciaravolo MR, Henrique LF. Leishmaniose visceral no estado de São Paulo: Tendência geral da letalidade entre 1999 a 2013 e o risco de óbitos por estratificação epidemiológica dos municípios e regionais de Vigilância Epidemiológica entre 2011 a 2013. *Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)*. 2015; 12(143): p.1-8.

Rebello JMM, Leonardo FS, Costa JML, Pereira YNO, Silva FS. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área endêmica de Leishmaniose na regioao dos cerrados, estado do Maranhão, Brasil. *Cadernos de Saude Publica*. 1999; 15(3): p. 623-30.

Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*canis familiaris*) a reservoir host of american cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Annals of Journal Tropical Medical and Hygiene*. 1999; 61: p. 530-41.

Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Counihan H, Espinoza CJ, Gonzalez JS, *et al.* Leishmania (Viannia) spp. Dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002; 96(1): p. 76–8.

Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitarias do homem nos trópicos ocidentais. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Rey L. Parasitologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo (SES/SP). Leishmaniose visceral Americana. Informe Técnico. 2000; p. 29.

São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo (SES/SP). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo; 2006.

Salomón OD, Orellano PW. *Lutzomyia longipalpis* in Clorida, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina. Mem.Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2005; 100: p. 475-6.

Salomón OD, Basmajdian Y, Fernández MS, Santini MS. *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. Mem.Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2011; 106: p. 381-2.

Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MMS, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. Mem.Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2015; 110: p. 831-46.

Scandar SAS, Silva RA, Cardoso-Junior RP, Oliveira FH. Ocorrência de leishmaniose visceral americana na região de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil. Boletim Epidemiológico Paulista. 2011; 8(88): p. 13-22.

Schaefer KU, Kurtzhals JA, Gachihi GS, Muller AS, Kager PA. A prospective sero-epidemiological study of visceral leishmaniasis in Baringo District, Rift Valley Province, Kenya. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 1995; 89: 471-5.

Silva ES, Gaioso ACI. Leishmaniose visceral no Estado do Pará. Rev. para. med. 2013; 27: p. 1-8.

Shaw JJ. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of *leishmania* species in Central and South America. In: Farrell J. World Class Parasites: *Leishmania*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2002; p. 11-31.

Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2006; 101: p. 577-9.

Saraiva L, Leite CG, Carvalho LOA. Information System and Geographic Information System Tools in the Data Analyses of the Control Program for Visceral Leishmaniasis from 2006 to 2010 in the Sanitary District of Venda Nova, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Journal of Tropical

Medicine. 2012; 9.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi-Junior G. Natural infections of the *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Memoria do Instituto Oswaldo Cruz*. 1984; 79: p. 515.

Sousa CBP, Santos WR, Franca-Silva JC. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001; 65: p.510–7.

Solano-Gallego L, Morrel P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(2): p. 560–3.

Sundar S, Singh RK, Bharti K, Maurya RS, Delafosse I, Jacquier P. Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine e Parasitology*. 2002; 96: p. 19-23.

Sundar S, Maurya RK, Singh RK, Bharti K, Delafosse I, Jacquier P. Evaluation of a new rapid immunochromatographic diagnostic test (Diamed-it Leish) for Indian visceral leishmaniasis and PKDL. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. ASTMH 52nd Annual Meeting. 2003; p. 3-7

Sundar S, Maurya R, Singh R, Bharti K, Chakravarty J, Parekh A, *et al*. Rapid, noninvasive diagnosis of visceral Leishmaniasis in India: Comparison of two immunochromatographic strip tests for detection of anti-K39 antibody. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(1): p. 251-3.

Tempone AG, Borborema SET, Gualda NC, Andrade-Junior HF, Yogi A, Carvalho CS, *et al*. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids-producing families. *Phytomedicine*. 2005; 12: p. 382-90.

Tolezano JE, Luvizotto MCR, Uliana SRB, Araújo MFL, Taniguuchi HH, Barbosa JAR. Leishmaniose visceral americana (LVA) em Araçatuba, região oeste do estado de São Paulo. Investigações laboratoriais e diagnóstico de uma doença emergente em terras paulistas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1999; 32: p. 218.

Tolezano JJ, Taniguchi HH, Elias C, Larosa R. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 2001; 60(1): p.47-51.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis In Colombia: Relationship between clinical and parasitologic status And infectivity for sand flies. *Annals Journal of Tropical Medical and*

Hygiene. 2001; 64(2-4): p. 119–24.

Vexanet JA, Castro JAF, Cavalcante R, Silva MRP, Batista WH, Campos JH, *et al.* Preliminary observations on the diagnosis and transmissibility of canine visceral leishmaniasis in Terezina, N. E. Brasil. Archives Institut Pasteur. 1993; 70(3-4): p. 467-72.

Vieira CP, Oliveira AM, Rodas LAC, Dibo MR, Guirado MM, Chiaravalloti-Neto F. Temporal, spatial and spatiotemporal analysis of the occurrence of visceral leishmaniasis in humans in the City of Birigui, State of São Paulo, from 1999 to 2012. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2014; 47: p. 350-8.

Vigilato MAN. Distribuição especial da leishmaniose visceral canina e humana no município de Birigui. In Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Dissertação (mestrado). Botucatu; 2004. p. 200.

Werneck GL, Pereira TJCF, Farias GC, Silva FO, Chaves FC, Gouvêa MV, *et al.* Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial –Epidemiol Serv Saude. 2008;17(2):87-96. DOI:10.5123/S1679-49742008000200002

Werneck GL. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. Cad.Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2010; .26: p.644-5.

World Health Organization (WHO). Report on Global surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases - Leishmaniasis. 2000. Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/

World Health Organization (WHO). Programme for the Surveillance and control of leishmaniasis. [Online].; 2003 [cited 2012 Jan 11. Available from: HYPERLINK "<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>"

World Health Organization (WHO). [The 17th Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases]; 2006.

World Health Organization (WHO). [Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis]. 2010.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis Situation and trends. [Online].; 2014 [cited 2014 Nov 14. Available from: www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/index.htm.

Zijlstra EE, Ali MS, El-Hassan AM, El-Thoum IA; Satti M; Ghalib HW, *et al.* Kala-azar in Displaced People from Southern Sudan: Epidemiological, Clinical and Therapeutic Findings. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1991; 85: p. 365-9.

Zijlstra EE, Ali MS, El-Hassan AM, El-Thoum IA; Satti M; Ghalib HW.

Endemic kala-azar in eastern Sudan: a longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994; 51: p. 826-36.

ANEXOS

ANEXO 1. Orientações sobre a Portaria Nº 2.472 de 31 de agosto de 2010, que define a nova relação de doenças e agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA
Esplanada dos Ministérios, Edifício Principal, 2º andar
70.304-000 Brasília-DF
Tel. (061) 3213 - 8297

NOTA TÉCNICA N.º 33/2010/Sub-ZVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS

Assunto: **Orientações sobre a Portaria Nº 2.472 de 31 de agosto de 2010 que define a nova relação de doenças e agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória.**

1. No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) é considerada um problema de saúde pública, tendo em vista sua elevada magnitude e ampla expansão geográfica. Está distribuída em 21 Unidades Federadas com média de 3.357 casos ao ano e 236 óbitos

2. Uma vez que o cão é o principal reservatório urbano da LV e que a enzootia canina precede a ocorrência de casos humanos, ressalta-se a importância da detecção precoce da ocorrência da infecção em cães em municípios indenes, visando o desencadeamento de ações de vigilância e controle a fim de delimitar a área de transmissão e reduzir o risco de transmissão aos humanos.

3. Diante disso, encaminhamos em anexo a Portaria Nº 2.472, de 31 de agosto de 2010 que define a nova relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória para ampla divulgação aos profissionais de saúde do estado e municípios, incluindo médicos veterinários de órgãos públicos e privados.

4. Destacamos o item III do anexo II que relaciona como sendo de notificação compulsória:

(...)

5. Canídeos

Raiva: canídeos domésticos ou silvestres que apresentaram doença com sintomatologia neurológica e evoluíram para morte num período de até 10 dias ou confirmado laboratorialmente para raiva.

Leishmaniose visceral: primeiro registro de canídeo doméstico em área indene, confirmado por meio da identificação laboratorial da espécie *Leishmania chagasi*.

(...)

5. De acordo com os Art. 4º, parágrafo 1º e Art. 5º, parágrafo 5º da referida Portaria, as doenças, agravos e eventos constantes do Anexo II devem ser notificados às Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde (SES e SMS) em, no máximo, 24 (vinte e quatro) horas a partir da suspeita inicial, que por sua vez deverão informar imediatamente à SVS/MS, sendo também necessário o seu registro no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) no prazo máximo de 7 (sete) dias a partir da data de notificação.

6. Visto o exposto, o Grupo Técnico das Leishmanioses deste Ministério esclarece que torna-se compulsória a notificação do registro de 1º caso de leishmaniose visceral canina suspeito em área indene por telefone, e-mail ou fax, e compulsório o seu registro no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), após a caracterização da espécie *Leishmania chagasi* pelo Laboratório de Referência Nacional. As notificações destes casos deverão ser feitas por meio da ficha de investigação de epizootias (anexo), com o preenchimento dos campos 8-Suspeita

Subcoordenação de Zoonoses Vetoriais e Raiva

diagnóstica e 28-Diagnóstico final com a opção 7, “outros” e especificar com os dizeres “1º caso LVC”, conforme exemplo a seguir:

8	Suspeita diagnóstica	1ª suspeita diagnóstica	7	2ª suspeita diagnóstica	<input type="checkbox"/>	3ª suspeita diagnóstica	<input type="checkbox"/>
1 - Raiva	3 - Febre do Vírus do Nilo Ocidental	5 - Febre Amarela	7 - Outro. Especificar: 1º caso LVC				
2 - Encefalite Equina	4 - Encefalite Espongiforme Bovina	6 - Influenza Aviária					

Conclusão	28	Diagnóstico final	7	29	Data do encerramento
	1-Raiva	3-Febre do Vírus do Nilo Ocidental	5-Febre Amarela	7-Outro. Especificar:	
2-Encefalite Equina	4 - Encefalite Espongiforme Bovina	6-Influenza Aviária	1º caso LVC		

7. Ressalta-se ainda, que apenas serão considerados positivos, nestas situações supracitadas, aqueles animais cujo exame parasitológico confirme a infecção pela espécie *Leishmania chagasi*, em laudo emitido pelo Laboratório de Referência Nacional.

8. As normas complementares e demais disposições contidas na Portaria supracitada serão publicadas por ato específico do Secretário de Vigilância em Saúde no prazo de 90 (noventa) dias, contados a partir da publicação da mesma.

9. Para maiores informações, e envio das fichas de notificação de epizootias, entrar em contato com o Grupo Técnico das Leishmanioses (61) 3213-8158 / 8156, e-mail: leishmanioses@saude.gov.br, Fax: (61) 3213-8184.

Brasília, de setembro de 2010.

Francisco Edilson Ferreira Junior GT-Leishmanioses Sub-ZVR/CGDT/DEVEP/SVS	De Acordo, ____/____/2010 Coordenação de Doenças Transmissíveis
Aprovo a nota técnica. Em ____/____/2010	
Departamento de Vigilância Epidemiológica	

Subcoordenação de Zoonoses Vetoriais e Raiva

ANEXO 2. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da LVC. Nota Técnica nº 01/2011 – UVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS.

SIPAR - Ministério da Saúde Registro Número: <u>25000</u> <u>227.865/2011-11</u>
 MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública Setor Comercial Sul; Quadra 04; Bloco A; Ed. Principal; Unidade VI – MS 70.304-000 – Brasília/DF Telefone/Fax: (61) 3213-8294/3213-8316
NOTA TÉCNICA CONJUNTA Nº 01 /2011 – CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS
Assunto: Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)
<p>1. O Ministério da Saúde vem por meio desta Nota esclarecer e divulgar a substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC).</p> <p>2. Os métodos diagnósticos sorológicos da LVC recomendados pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) para os órgãos de saúde pública no Brasil são o Ensaio Imunoenzimático (Elisa) como método de triagem e a Reação de Imunofluorescência Indireta (Rifi) – (titulação $\geq 1:40$) como confirmatório, utilizados na rotina e nos inquéritos caninos em municípios onde já houve registro da doença.</p> <p>3. Os conjuntos diagnósticos utilizados para a realização dos testes sorológicos possuem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e são produzidos pelo laboratório Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – RJ (Fiocruz-RJ).</p> <p>4. Nos últimos anos houve uma melhora significativa na qualidade do diagnóstico laboratorial da LVC realizado na rede pública. Esse fato se dá pela preocupação do Ministério da Saúde (MS) em aprimorar as ferramentas utilizadas. Esses testes são avaliados sob todos os parâmetros para definição de um teste sorológico a ser utilizado em saúde pública, tais como: sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo, valor preditivo positivo, reprodutibilidade, multiplicidade, facilidade e exequibilidade.</p> <p>5. Com intuito de aperfeiçoar a técnica de diagnóstico da LVC, o MS encomendou um estudo à Fiocruz/RJ, cuja metodologia considerou os pontos abordados no parágrafo anterior. O estudo tinha como objetivo construir um painel sorológico de 1.600 cães oriundos de quatro municípios endêmicos de diferentes regiões administrativas do país, visando utilizá-lo para validar os testes sorológicos da LVC atualmente adotados na Rede Pública e do teste rápido imunocromatográfico - uma inovadora plataforma tecnológica de imunoensaio cromatográfico de duplo percurso, composta por uma mistura de proteínas recombinantes (k26 e k39) representativas de regiões antigênicas da <i>Leishmania chagasi</i>- que a Bio-Manguinhos pretendia também produzir.</p>
<small>Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública</small>

6. O relatório final do estudo foi elaborado no mês de maio de 2011 em uma reunião onde participaram representantes da Fiocruz/RJ, Fundação Ezequiel Dias de Minas Gerais, Instituto Aldolfo Lutz de São Paulo, Laboratório do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande/MS, Grupo Técnico das Leishmanioses/MS e Coordenação Geral de Laboratórios/MS. Com base nos resultados do estudo as principais considerações e recomendações contidas no relatório foram:

7. O cenário utilizado atualmente no Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, realizando a triagem com o Elisa e o confirmatório com a Rifi (titulação $\geq 1:40$), apresentou sensibilidade e especificidade dentro do esperado, entretanto, nessa avaliação, o cenário que utilizou o teste rápido imunocromatográfico como triagem e o Elisa como confirmatório demonstrou melhor acurácia que os demais. Adicionalmente, estes dois testes apresentaram uma melhor reprodutibilidade entre laboratórios em relação à Rifi.

8. É importante considerar a operacionalização dos testes e a oportunidade nos resultados. O teste rápido imunocromatográfico como teste de triagem apresenta vantagens e facilidades, tais como: a rapidez, simplicidade, praticidade, realização a partir de uma pequena amostra de sangue total, soro ou plasma, além de não exigir equipamentos laboratoriais específicos e especialização tecnológica. O Elisa, por sua vez, permite a realização de um número maior de amostras e fornece resultados automatizados, eliminando a subjetividade na leitura.

9. Em virtude disso ficou estabelecido a substituição do cenário utilizado atualmente (triagem com Elisa e confirmação com Rifi – titulação 1:40) pelo cenário utilizando o teste rápido imunocromatográfico como teste de triagem e o Elisa como teste confirmatório.

10. A realização do teste rápido imunocromatográfico poderá ser feita a partir de amostras de sangue total, soro ou plasma. Enquanto para a realização do Elisa está indicado apenas o soro sanguíneo obtido de coleta de punção venosa, não sendo recomendado mais o uso do papel filtro.

11. Espera-se com a implantação do teste rápido imunocromatográfico solucionar ou minimizar alguns problemas atualmente enfrentados, tais como: reduzir o número de animais falso positivos e falso negativos, agilizar a retirada dos animais infectados, diminuir a sobrecarga dos laboratórios de saúde pública e assim como minimizar ou eliminar a intermitência no fornecimento de kits de Elisa por parte do laboratório produtor.

12. O protocolo recomendado no relatório final do estudo supracitado, utilizando o teste rápido imunocromatográfico como triagem e o Elisa como confirmatório, será adotado pelo PVC-LV e implantado gradativamente à medida que o fornecimento dos insumos produza um estoque suficiente para tal. A implantação iniciou-se no mês novembro de 2011 em dois municípios e espera-se que até o final de 2012 todos os estados brasileiros estejam adotando o novo protocolo. Cabe ressaltar que antes da adoção do novo protocolo, as equipes das Secretarias Estaduais de Saúde serão treinadas pelo laboratório produtor, quanto aos procedimentos de execução e interpretação dos resultados do teste rápido imunocromatográfico.

13. Desta forma, é fundamental que as secretarias estaduais e municipais de saúde se preparem para as mudanças operacionais que ocorrerão com a implantação do novo protocolo diagnóstico da LVC.

14. Maiores detalhes deste processo de implantação serão tratados com os responsáveis pelas Vigilâncias Epidemiológicas e de Laboratórios das Leishmanioses das Secretarias Estaduais de Saúde.

Brasília, 29 de dezembro de 2011

MARCIA LOPES DE CARVALHO
Coordenadora Geral de Doenças
Transmissíveis
Substituta

LEANDRO QUEIROZ SANTI
Coordenador Geral de Laboratórios de Saúde
Pública

De acordo,

MARIANA PASTORELEO VEROTTI
Diretora de Vigilância das Doenças Transmissíveis
Substituta

Mariana P. Verotti
Diretora do Departamento de Vigilância das
Doenças Transmissíveis
Substituta

ANEXO 3. Portaria interministerial do MS nº 1.426 de 11 de Julho de 2008.



Ministério da Saúde
Gabinete do Ministro

PORTARIA INTERMINISTERIAL Nº 1.426, DE 11 DE JULHO DE 2008

Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

O MINISTRO DE ESTADO DA SAÚDE E O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso das atribuições que lhes confere o inciso II do parágrafo único do art. 87 da Constituição, e

Considerando o Decreto-Lei Nº 51.838, de 14 de março de 1963, que dispõe sobre as normas técnicas especiais para o combate as leishmanioses no País;

Considerando o Decreto-Lei Nº 467, de 13 de fevereiro de 1969, que dispõe sobre a fiscalização de produtos de uso veterinário, dos estabelecimentos que os fabricam e dá outras providências;

Considerando o Decreto Nº 5.053, de 22 de abril de 2004, que aprova o regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem ou comerciem, e dá outras providências;

Considerando a Lei Nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, que dispõe sobre infrações à legislação sanitária federal, estabelecendo as sanções;

Considerando a Lei Nº 6.259, de 30 de outubro de 1975, que dispõe sobre as ações de vigilância epidemiológica;

Considerando a Resolução No- 722, de 16 de agosto de 2002, que aprova o Código de Ética do Médico Veterinário e que revogou a Resolução Nº 322, de 15 de janeiro de 1981;

Considerando o Informe Final da Consulta de expertos, Organização Pan-Americana da Saúde (OPS) Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre Leishmaniose Visceral em Las Américas, de 23 a 25 de novembro de 2005;

Considerando o Relatório Final do Fórum de Leishmaniose Visceral Canina, de 9 a 10 de agosto de 2007;

Considerando as normas do "Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral" do Ministério da Saúde;

Considerando que não há, até o momento, nenhum fármaco ou esquema terapêutico que garanta a eficácia do tratamento canino, bem como a redução do risco de transmissão;

Considerando a existência de risco de cães em tratamento manterem-se como reservatórios e fonte de infecção para o vetor e que não há evidências científicas da redução ou interrupção da transmissão;

Considerando a existência de risco de indução a seleção de cepas resistentes aos medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses em seres humanos; e

Considerando que não existem medidas de eficácia comprovada que garantam a não-infectividade do cão em tratamento, resolvem:

Art. 1º - Proibir, em todo o território nacional, o tratamento da leishmaniose visceral em cães infectados ou doentes, com produtos de uso humano ou produtos não-registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Art. 2º - Definir, para efeitos desta Portaria, os seguintes termos:

I - risco à saúde humana: probabilidade de um indivíduo vir a desenvolver um evento deletério de saúde (doença, morte ou seqüelas), em um determinado período de tempo;

II - caso canino confirmado de leishmaniose visceral por critério laboratorial: cão com manifestações clínicas compatíveis com leishmaniose visceral e que apresente teste sorológico reagente ou exame parasitológico positivo;

III - caso canino confirmado de leishmaniose visceral por critério clínico-epidemiológico: todo cão proveniente de áreas endêmicas ou onde esteja ocorrendo surto e que apresente quadro clínico compatível de leishmaniose visceral, sem a confirmação do diagnóstico laboratorial;

IV - cão infectado: todo cão assintomático com sorologia reagente ou parasitológico positivo em município com transmissão confirmada, ou procedente de área endêmica. Em áreas sem transmissão de leishmaniose visceral é necessária a confirmação parasitológica; e

V - reservatório canino: animal com exame laboratorial parasitológico positivo ou sorologia reagente, independentemente de apresentar ou não quadro clínico aparente.

Art. 3º - Para a obtenção do registro, no MAPA, de produto de uso veterinário para tratamento de leishmaniose visceral canina, o interessado deverá observar, além dos previstos na legislação vigente, os seguintes requisitos:

I - realização de ensaios clínicos controlados, após a autorização do MAPA; e

II - aprovação do relatório de conclusão dos ensaios clínicos mediante nota técnica conjunta elaborada pelo MAPA e o Ministério da Saúde (MS).

§ 1º O pedido de autorização para realização de ensaios clínicos controlados deve estar acompanhado do seu Protocolo.

§ 2º Os ensaios clínicos controlados devem utilizar, preferencialmente, drogas não destinadas ao tratamento de seres humanos.

§ 3º A autorização do MAPA vincula-se à nota técnica conjunta elaborada pelo MAPA e o MS.

Art. 4º - A importação de matérias-primas para pesquisa, desenvolvimento ou fabricação de medicamentos para tratamento de leishmaniose visceral canina deverá ser solicitada previamente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, devendo a mesma estar acompanhada do protocolo de estudo e respectivas notas do artigo anterior.

Art. 5º - Ao infrator das disposições desta Portaria aplica-se:

I - quando for médico veterinário, as infrações e penalidades do Código de Ética Profissional do Médico Veterinário;

II - o art. 268 do Código Penal; e

III - as infrações e penalidades previstas na Lei No- 6.437, de 20 de agosto de 1977, e no Decreto-Lei No- 467, de 13 de fevereiro de 1969.

Art. 6º - O MS e o MAPA deverão adotar as medidas necessárias ao cumprimento efetivo do disposto nesta Portaria.

Art. 7º - As omissões e dúvidas por parte dos agentes públicos cujas funções estejam direta ou indiretamente relacionadas às ações de controle da leishmaniose visceral, na aplicação do disposto nesta Portaria serão apreciadas e dirimidas pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS) e pela Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA/ MAPA).

Art. 8º - Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

JOSÉ GOMES TEMPORÃO
Ministro de Estado da Saúde

REINHOLD STEPHANES
Ministro de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ANEXO 4: Classificação epidemiológica dos municípios do DRS XV, dados do Serviço Regional 08 (BEPA, 2013).

GVE	102 MUNICIPIOS DRS XV	CLASSIFICAÇÃO EPIDEMIOLOGICA BEPA 2013
XXIX	ADOLFO	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	ÁLVARES FLORENCE	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	AMÉRICO DE CAMPOS	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	ARIRANHA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	BADY BASSITT	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	BÁLSAMO	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	CARDOSO	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	CATANDUVA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	CATIGUÁ	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	CEDRAL	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	COSMORAMA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	ELISIÁRIO	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	EMBAÚBA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	FERNANDO PRESTES	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	FLOREAL	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	GASTÃO VIDIGAL	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	GENERAL SALGADO	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	GUAPIAÇU	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	IBIRÁ	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	ICÉM	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	IPIGUÁ	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	IRAPUÃ	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	ITAJOBI	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	JACI	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	JOSÉ BONIFÁCIO	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	MACAUBAL	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	MAGDA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	MARAPOAMA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	MENDONÇA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	MIRASSOL	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	MIRASSOLÂNDIA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XIXX	MONÇOES	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	MONTE APRAZÍVEL	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	NEVES PAULISTA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	NHANDEARA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	NIPOÃ	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	NOVA ALIANÇA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	NOVA GRANADA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	NOVAIS	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL

XXIX	NOVO HORIZONTE	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	ONDA VERDE	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	ORINDIÚVA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	PALESTINA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	PALMARES PAULISTA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	PARAÍSO	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	PARISI	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	PAULO DE FARIA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	PINDORAMA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	PIRANGI	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	PLANALTO	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	POLONI	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	PONTES GESTAL	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	POTIRENDABA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	RIOLÂNDIA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	SALES	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	SANTA ADÉLIA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	SEBASTIANÓPOLIS DO SUL	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	TABAPUÁ	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	TANABI	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	UBARANA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	UCHOA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	UNIÃO PAULISTA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	URUPÊS	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	VALENTIM GENTIL	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXIX	VOTUPORANGA	TRANSMISSÃO CANINA E HUMANA
XXIX	ZACARIAS	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	APARECIDA D'OESTE	TRANSMISSÃO CANINA E HUMANA
XXX	ASPÁSIA	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	DIRCE REIS	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	DOLCINÓPOLIS	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	ESTRELA D'OESTE	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	FERNANDÓPOLIS	TRANSMISSÃO CANINA
XXX	GUARANI D'OESTE	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	INDIAPORÃ	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	JALES	TRANSMISSÃO CANINA E HUMANA
XXX	MACEDÔNIA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	MARINÓPOLIS	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	MERIDIANO	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	MESÓPOLIS	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	MIRA ESTRELA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	NOVA CANAÃ PAULISTA	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL

XXX	OUROESTE	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	PALMEIRA D"OESTE	TRANSMISSÃO CANINA
XXX	PARANAPUÃ	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	PEDRANÓPOLIS	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	PONTALINDA	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	POPULINA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	RUBINÉIA	TRANSMISSÃO CANINA
XXX	SANTA ALBERTINA	TRANSMISSÃO CANINA
XXX	SANTA CLARA D"OESTE	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	SANTA FÉ DO SUL	TRANSMISSÃO CANINA E HUMANA
XXX	SANTA RITA D"OESTE	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	SANTA SALETE	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	SANTANA DA PONTE PENSA	TRANSMISSÃO CANINA
XXX	SÃO FRANCISCO	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	SÃO JOÃO DAS DUAS PONTES	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	SÃO JOÃO DE IRACEMA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	TRÊS FRONTEIRAS	SILENCIOSO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	TURMALINA	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL
XXX	URÂNIA	TRANSMISSÃO CANINA E HUMANA
XXX	VITÓRIA BRASIL	SILENCIOSO NÃO RECEPTIVO VULNERÁVEL

ANEXO 5: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CEP).

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASPECTOS SOROEPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA NA DRS XV REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, ESTADO DE SÃO

Pesquisador: Denise Maria Bussoni Bertollo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 04261912.9.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo

Patrocinador Principal: Financiamento

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 205.081

Data da Relatoria: 21/02/2013

Apresentação do Projeto:

Sem alterações em relação ao parecer anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Em relação ao que foi pedido no parecer anterior, relativo aos objetivos primários, a coordenadora apenas substituiu o texto anterior ("por meio da realização de inquérito sorológico...") pela frase "obtidos por meio da rotina de análise laboratorial", sem maiores detalhes como está no resumo. No entanto, pela metodologia proposta nesta segunda versão pode-se concluir que o projeto fará apenas análise de dados existentes no IAL S. José do Rio Preto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Mínimos, por tratar-se de estudo com base em dados secundários.

Benefícios: Sem alterações em relação ao parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem alterações em relação ao parecer anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram esclarecidas as questões apontadas no parecer anterior em relação à dispensa do TCLE.

Recomendações:

Recomenda-se a adequação da equipe de pesquisa na Plataforma conforme relatada no projeto

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

original anexado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os autores responderam de forma satisfatória às pendências apresentadas, exceto pela equipe de pesquisa no formulário da plataforma que continua diferindo daquela descrita no projeto anexado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/1996 - cabe ao pesquisador: a)desenvolver o projeto conforme delineado; b)elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d)manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e)encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f)justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEP/IAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

SAO PAULO, 25 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
Maria de Fátima Costa Pires
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

ANEXO 7: Aprovação Comitê de Ética Animal (CEUA).



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-IAL



São Paulo, 19 de novembro de 2013.

Parecer Projeto 06/2013 – CEUA IAL/Pasteur

Venho pela presente informar que o projeto de pesquisa **“Aspectos soroepidemiológicos da Leishmaniose visceral Americana na DRS XV de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo”**, sob coordenação do Dr. José Eduardo Tolezano, Pesquisador Científico do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz e da Sra. Denise Maria Bussoni Bertollo do Centro de Laboratório Regional de São José do Rio Preto, foi considerado **APROVADO**, e poderá ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.

O presente projeto utilizará dados de amostras caninas extraídos do Sistema de Informação de Gestão Hospitalar (SIGH) a partir de um banco de dados onde estão inseridas informações cadastrais.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios **ANUAIS** à CEUA-IAL, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários e permitindo também a elaboração de relatórios anuais que são realizados por esta CEUA-IAL e que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Atenciosamente,

Raquel dos Anjos Fazioli
Coordenadora da CEUA-IAL

Dr. José Eduardo Tolezano
Diretor Técnico II - CRB 3762/88
Centro de Parasitologia e Micologia
Instituto Adolfo Lutz 25.XI.13

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 355
11º Andar – Salas 1102 – Cerqueira César
São Paulo – SP – CEP: 01246-902
Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br

ANEXO 8: Utilização de papel de filtro como meio de coleta de amostras de sangue para realização de exame de imunofluorescência indireta. Nota Técnica da CCD nº 03/2007 DOE de São Paulo de 15/11/07.

Diário Oficial

Poder Executivo

Estado de São Paulo

Seção I

Palácio dos Bandeirantes

Av. Morumbi, 4.500 - Morumbi - CEP 05698-900 - Fone: 3745-3344

Nº 216 – DOE de 15/11/07

COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS

Comunicado

Nota Técnica: 03/2007

Assunto: Utilização de papel filtro como meio de coleta de amostras de sangue para realização de exame de imunofluorescência indireta.

A Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, em consonância com o Ministério da Saúde, preconiza em áreas com transmissão de leishmaniose visceral americana - LVA, a utilização de dois métodos sorológicos, para o diagnóstico de cães infectados por *Leishmania chagasi*: o ensaio imunoenzimático - EIE, produzido por BioManguinhos, para a "triagem" dos animais não reagentes e a reação de imunofluorescência indireta - RIFI, também produzida por BioManguinhos, para a confirmação dos resultados reagentes. Esta última técnica é definida como "padrão ouro" para a confirmação de animais infectados, sendo uma utilizada pelos serviços de saúde de diversos países do mundo com transmissão de LVA.

Na ausência do EIE, a RIFI é a técnica de escolha para definir o diagnóstico de animais positivos para LVA canina, não havendo na literatura nacional ou internacional estudos científicos consistentes e de validação que contrapõem esta recomendação.

Considerando:

a utilização do papel filtro como meio de coleta de amostras de sangue na inviabilidade de punção venosa;

a praticidade desta coleta em inquéritos caninos e a maior facilidade de conservação e transporte das amostras demonstrada em estudos;

a utilização desta técnica, em inquéritos soropidemiológicos, para outros agravos como: a esquistossomose mansônica, doença de Chagas, malária e toxoplasmose;

o não prejuízo no resultado de amostras colhidas por punção auricular para obtenção de sangue total para impregnação em papel filtro;

estudos realizados por pesquisadores da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e de outras Instituições brasileiras como: Universidade Federal da Bahia, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz/Fiocruz, Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz, Fundação Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro, Fundação Ezequiel Dias demonstrando que:

1 - existe alta concordância do diagnóstico parasitológico (pelo método direto de material obtido por meio da punção de linfonodo) quando comparado ao método sorológico - RIFI, utilizando amostras coletadas em papel filtro;

2 - existe alta concordância quando comparados materiais coletados pela impregnação de papel filtro e soro, utilizando a RIFI;

3 - existe alta sensibilidade e especificidade quando comparado a RIFI à reação de polimerase em cadeia (PCR) realizadas de material coletado com papel filtro.

Esta Coordenadoria reitera a orientação dos manuais de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo (SES 2006) e de Vigilância Controle da Leishmaniose Visceral (MS, 2003) de utilizar o papel filtro para o diagnóstico da LVA canina observando: a marca do papel (Whatman nº 1 ou Klabin 80) e as condições de coleta e de armazenamento

das amostras (manter até 30 dias da coleta em temperatura ambiente (em torno de 20°C) ou à 4°C ou até 60 dias da coleta à -20°C, protegidas em saco plástico livre de umidade).

Bibliografia Consultada

1. Braga MDM e cols. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, 31 (5), 1998: 262-268.
2. Camargo-Neves VLF. Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo, Brasil. São Paulo, 2004 [Tese de Doutorado. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
3. Gomes AH e cols. Avaliação da capacidade de absorção e distribuição de amostras de sangue total em diferentes tipos de papel filtro. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 63(2), 2004: 262-268.
4. Gomes HR e cols. Comparação entre Elisa de soro e de eluato de sangue para o imunodiagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, 34 (Supl. I), 2001: 197-198.
5. Marinkelle CJ e cols. Recomendaciones para el almacenamiento de sueros absorbidos em papel de filtro bajo condiciones rurales, para el diagnostico de infección chagásica con la prueba de imunofluorescência. *Rev. Inst. Med. Tropical de São Paulo*, 20 (2), 1978: 112-114.
6. Pallacios X e cols. Detección de anticuerpos contra *Tripanosoma cruzi* en Somoto, Nicaragua, mediante Elisa indirecto e en papel de filtro. *Rev. Panam. Publica/Pan. Am. J. Public Health*, 8(6), 2000: 411-417.
7. Silva e cols. Optimized PCR for the diagnosis oh human visceral leishmaniasis using samples on filter paper. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, 34 (Supl. I), 2001: 232.
8. Silva e cols. Reprodutibilidade ao longo do dos testes sorológicos para leishmaniose visceral canina utilizando amostras de sangue dessecado em papel filtro. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, 38 (Supl. I), 2005: 402.
9. Silva RM. Estudo comparativo entre métodos de Elisa e imunofluorescência indireta na análise de amostras de sangue de cães provenientes de municípios endêmicos e enzoóticos para leishmaniose visceral americana. São Paulo, 2005 [Tese de Doutorado. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
10. Walton BC e col. Utilization of whole blood specimens on filter paper for indirect fluorescent antibody tests for toxoplasmosis. *J. Parasitol*, 57 (3), 1971: 678-680.
11. Wanderley DMV e cols. Confronto de resultados de reações de imunofluorescência indireta (RIFI) realizadas para diagnósticos de malária utilizando-se amostras de sangue coletadas em papel filtro e em tubos capilares. *Rev. Brás. De Malariol. D Trop.*, 34, 1982: 87-92.
12. Yáñez S e cols. Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. *Rev. Panam. Publica/Pan. Am. J. Public Health*, 3(3), 1998: 174-178

ANEXO 9: Utilização do soro sanguíneo para a realização do diagnóstico sorológico da LVC. Nota Técnica CCD 02/2009 DOE de São Paulo de 24/12/2009.

Diário Oficial

[Poder Executivo](#)

Estado de São Paulo

Seção I

Palácio dos Bandeirantes

Av. Morumbi, 4.500 - Morumbi - CEP 05698-900 - Fone: 3745-3344

Nº 240 – DOE de 24/12/09 – p.33 - seção 1

COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS

Nota Técnica CCD - 02/2009

Programa de Vigilância e Controle da Leishmanose Visceral Americana do Estado de São Paulo (PVCLVA):

Diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral canina

Assunto: Utilização de soro sanguíneo para a realização do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina.

A Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, em consonância com o Ministério da Saúde preconiza em áreas de transmissão de leishmaniose visceral americana – LVA, a utilização de pelo menos dois métodos laboratoriais para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVcanina) ou seja para a identificação de cães infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Neste instante, o Ministério da Saúde é o órgão responsável pelo abastecimento da Rede de Laboratórios de Saúde Pública com kits para a realização dos diagnósticos sorológicos pelo Ensaio Imunoenzimático – EIE e pela Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI. o teste EIE é utilizado no PVCLVA como diagnóstico de triagem para a identificação dos animais não infectados e a RIFI é utilizada como teste confirmatório de LVcanina para aqueles animais com resultados positivos no EIE. A RIFI é reconhecida como teste de referência para a confirmação da infecção canina em serviços de saúde de vários países do mundo com transmissão da leishmaniose visceral.

Em situações de ausência do EIE, a RIFI é a técnica de escolha para definir o diagnóstico sorológico dos cães positivos para a LV.

Considerando:

- a. A necessidade de adequar as previsões e propostas para o Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo em relação ao diagnóstico laboratorial e inquéritos caninos, com a real capacidade de resposta da estrutura laboratorial;
- b. A necessidade de diminuição do tempo necessário para realização e liberação dos resultados do diagnóstico da LVcanina;
- c. A necessidade de realização de controle de qualidade intra e interlaboratorial do diagnóstico da LVcanina;
- d. as limitações para o tempo e condições de conservação das amostras de sangue aplicadas em papel-filtro, indicadas pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, através do Laboratório de Referência Nacional para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, em 30 dias o prazo de validade dessas amostras (Fluxo para o diagnóstico da leishmaniose visceral – SVS/Funed);
- e. que a maioria dos estados brasileiros que convivem com a leishmaniose visceral adotam em seus programas de controle a realização do diagnóstico laboratorial da LVcanina com amostras de soro sanguíneo;

- f. os interferentes do diagnóstico laboratorial relacionados com a qualidade das amostras de sangue coletadas em papel filtro;
- g. A qualidade e identificação do papel-filtro para a coleta das amostras de sangue;
- h. A descontinuidade periódica no suprimento de kits para o diagnóstico sorológico da LVcanina;
- i. O aumento extraordinário das discordâncias (34,0- 100,0%) entre os resultados obtidos com o uso dos kits IFI e EIE-Leishmaniose Canina fornecidos pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LVcanina em amostras de sangue coletadas em papel filtro;
- j. A alta concordância (79,0-97,0%) entre os resultados obtidos com o uso dos kits IFI e EIE-Leishmaniose Canina fornecidos pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LVcanina em amostras de soro sanguíneo.

Esta Coordenadoria comunica e orienta:

1. Para os municípios que iniciarão as atividades de coleta de sangue de cães para o diagnóstico da LVcanina, a partir de 01/01/2010 o diagnóstico sorológico de LVcanina será realizado apenas a partir de amostras de soro sanguíneo;
2. Para os municípios que já realizam essas atividades de controle prevê-se um período de 180 dias, a contar da data da publicação desta Nota Técnica, para a transição e substituição da coleta de sangue de cães em papel filtro para coleta de sangue em tubo seco para obtenção de soro sanguíneo;
3. Os procedimentos de venopunção canina e as condições de armazenamento das amostras até o envio aos laboratórios integrantes da Rede Estadual de Laboratórios para o Diagnóstico das Leishmanioses deverão seguir as orientações do Anexo 1.
4. Ficam revogadas a Nota Técnica 03/2007 e a orientação do Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo (SES 2006) que previam a possibilidade de utilização de amostras de sangue coletadas em papel filtro para o diagnóstico laboratorial. Deve ser ressaltado que o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (Ministério da Saúde, 2006) recomenda a utilização de soro sanguíneo para o diagnóstico sorológico da LVcanina.

Anexo 1

Condições dos procedimentos de venopunção canina e armazenamento das amostras até o envio aos laboratórios integrantes de Rede Estadual de Laboratórios para o Diagnóstico das Leishmanioses

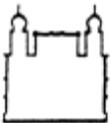
1. Os procedimentos referentes à coleta de sangue para a realização do diagnóstico sorológico canino são de responsabilidade técnica de médico- veterinário vinculado ao serviço municipal de saúde;
2. Informar o proprietário do animal em relação aos procedimentos que serão realizados;
3. Registrar e identificar o animal e seu proprietário na planilha e no tubo de coleta;
4. Separar o material necessário e colocar luvas de procedimento;
5. Realizar a contenção do animal de maneira a proporcionar o mínimo estresse, associado à segurança do funcionário e/ou proprietário envolvido;
6. Selecionar o local da punção e após anti-sepsia introduzir agulha percutaneamente através da veia distendida utilizando prévio garrote manual abaixo do ponto de colheita;
7. Realizar a venopunção de 3-5 mL de sangue, conforme o porte do animal, no caso de cães com menos de 1 kg, coletar 1,5 a 2 mL de sangue;
8. Após completar o volume desejado, retirar a seringa ou o outro equipo de coleta, desfazer o garrote antes de remover a agulha e comprimir manualmente o local de punção com algodão embebido em solução anti-séptica;
9. Retirar a agulha e transferir o sangue coletado para tubos secos;

10. Acondicionar o tubo com o sangue coletado em estante ou suporte apropriado em caixa de isopor com gelo reciclável em quantidade suficiente para a manutenção de refrigeração, não congelamento;
11. Ao final de cada período de trabalho, manhã ou tarde, as amostras deverão ser entregues ao setor responsável pela separação por centrifugação do soro sanguíneo;
12. Após a separação, o soro sanguíneo será transferido para frasco tipo flaconete ou similar previamente identificado e devidamente fechado para evitar vazamentos, sendo mantido em temperatura de 2-8 o C até a entrega no Laboratório;
13. As amostras de soro sanguíneo deverão ser entregues no Laboratório no prazo máximo de 7 (sete) dias após a coleta do sangue do animal.

Bibliografia Consultada

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.120 p.: il. color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
2. São Paulo (Estado). Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de 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: a Secretaria, 2006.
3. Braga MDM e cols. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. Rev. Soc. Bras. Med. Tropical, 31 (5), 1998: 262-268.
4. Gomes AH e cols. Avaliação da capacidade de absorção e distribuição de amostras de sangue total em diferentes tipos de papel filtro. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 63(2), 2004: 262-268.
5. Gomes HR e cols. Comparação entre Elisa de soro e de eluato de sangue para o imunodiagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Rev. Soc. Bras. Med. Tropical, 34 (Supl. I), 2001: 197-198.
6. Silva e cols. Reprodutibilidade ao longo do dos testes sorológicos para leishmaniose visceral canina utilizando amostras de sangue dessecado em papel filtro. Rev. Soc. Bras. Med. Tropical, 38 (Supl. I), 2005: 402.
7. Silva RM. Estudo comparativo entre métodos de Elisa e imunofluorescência indireta na análise de amostras de sangue de cães provenientes de municípios endêmicos e enzoóticos para leishmaniose visceral americana. São Paulo, 2005 [Tese de Doutorado. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
8. Instituto Adolfo Lutz – 2007. Orientação Técnica de coleta de material biológico da Seção de Recepção e Colheita de Material do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo. 18p.
9. Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. BEPA, 6 (67), 2009: 1323.
10. Silva MV. Avaliação de testes sorológicos para leishmaniose visceral canina utilizando coleta de amostra sanguínea em papel de filtro. Ouro Preto, 2005 [Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto].
11. Lopes STA, Biondo AW, Santos AP. Manual de Patologia Clínica Veterinária. 3ª edição, 2007. Depto. Clínica de Pequenos Animais – Universidade Federal de Santa Maria, RS.

ANEXO 10: Instrução de Técnica do Kit EIE A LVC Bio-Manguinhos.



FIOCRUZ

EIE-LEISHMANIOSE CANINA BIO-MANGUINHOS

(MATERIAL FORNECIDO PARA 384 REAÇÕES)
ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE CANINA



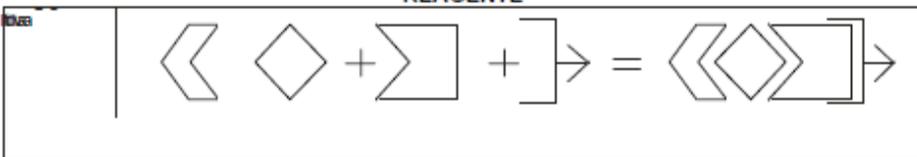
PRINCÍPIO DO ENSAIO:

Este ensaio consiste na reação de soros de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* (complexo *L. donovani*) obtidos a partir de cultura "in vitro", que são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/strips (fase sólida). A seguir adicionam-se, devidamente diluídos, os soros controle do teste e as amostras a serem analisadas, que possuindo anticorpos específicos, vão se fixar aos antígenos. Na etapa seguinte, ao se adicionar uma anti-globulina de cão marcada com a enzima peroxidase, esta se ligará aos anticorpos caso estejam presentes.

Para evidenciação da reação, utiliza-se uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB) que pela ação da peroxidase com o peróxido de hidrogênio forma um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico que interrompe a reação, passa a apresentar uma coloração amarela, em caso positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente).

ESQUEMA DO TESTE:

REAGENTE



NÃO REAGENTE



MATERIAL FORNECIDO:

Componentes	Quantidade
Diluyente de Amostras/Conjugado [5X]	90 ml
Lectina de leite	10 g
Tampão de Lavagem [20X]	120 ml
Diluyente do Substrato	60 ml
Cromógeno (TMB)	0,7 ml
Substrato (H ₂ O ₂)	0,2 ml
Solução de Ácido Sulfúrico 2M	30 ml
Soro Positivo	0,25 ml
Soro Negativo	0,25 ml
Conjugado	0,4 ml
Molduras/strips duplas sensibilizadas	04/24
Folhas Adesivas	08
Manual de Instruções	01

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO:

- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc)
- Água destilada
- Micropipetas mono e multicanais e ponteiros
- Barquetes ou reservatórios
- Estufa a 37°C
- Luvas descartáveis
- Hipoclorito de sódio ou água sanitária
- Espectrofotômetro, com filtro de 450 nm, para microplacas
- Lavador automático ou sistema de vácuo com pente de lavagem e/ou pipeta Pasteur
- Balança semi-analítica
- Caso utilize amostras em papel de filtro: picotador de 6 mm e agitador rotacional

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL FORNECIDO:

MANTER ENTRE 2-8°C:

Frasco contendo Diluente de Amostras/Conjugado [5X]
Frasco contendo Tampão de Lavagem [20X]
Frasco contendo Diluente do Substrato
Frasco de Cromógeno (TMB)
Frasco de Substrato (H₂O₂)
Frasco contendo Solução de Ácido Sulfúrico WM
Lectina de leite

MANTER À -20°C:

04 Suportes contendo 24 strips sensibilizadas
Frasco de Soro Positivo
Frasco de Soro Negativo
Frasco de Conjugado

Todos os componentes do teste, devem ser guardados nas temperaturas indicadas desde o ato do recebimento do conjunto, permanecendo estáveis pela validade definida na caixa principal do conjunto.

OBS.: A temperatura de transporte, com bobinas de gelo reciclável, permite que o conjunto se mantenha em condições adequadas, durante 24-36 horas.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES:

- Todo material biológico pode representar uma fonte de infecção e risco químico. Portanto, ao manusear qualquer dos reagentes deste conjunto, observe as precauções necessárias. Além disso, a qualidade dos resultados obtidos depende do cumprimento das boas normas de segurança.
- As amostras de soro ou plasma assim como os controles podem conter agentes infecciosos e devem ser manipulados com cuidado.
- A solução de TMB (cromógeno) é irritante para pele e mucosas. Além disso, não devem entrar em contato com metais.
- Usar luvas descartáveis e jaleco durante todas as etapas do teste.
- Desprezar ponteiros, luvas, vidrarias, frascos, strips, etc, em solução de hipoclorito de sódio a 1/20 ou água sanitária 1/10.
- Nunca misturar componentes de lotes diferentes.
- Todos os frascos utilizados para diluir os componentes e preparar o substrato devem ter sido muito bem lavados e rinsados abundantemente com água destilada.
- Os strips só podem ser utilizados uma única vez, e recomenda-se evitar tocar a parte superior.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO PARA AMOSTRAS DE SORO:

1 - Preparo do diluente de amostras/conjugado

Nº strips duplas	Nº de reações	Dil. amostra/conjugado (5X)	Leite em pó (pesar)	H ₂ O destilada
1	Até 16	3,0 ml	0,3 g	12,0 ml
2	Até 32	6,0 ml	0,6 g	24,0 ml
3	Até 48	8,0 ml	0,8 g	32,0 ml
4	Até 64	10,0 ml	1,0 g	40,0 ml
5	Até 80	12,0 ml	1,2 g	48,0 ml
6	Até 96	14,0 ml	1,4 g	56,0 ml

2 - Diluir em tubos 5 µl dos soros controle e das amostras de soros de cães a serem analisadas, previamente homogeneizadas, em 500 µl do diluente de amostra/conjugado (1:100).

3 - Distribuir 100 µl dos soros controle já diluídos da seguinte forma: na coluna 1 fileira "A" e "B" o soro controle positivo, na "C" e "D" o controle negativo, na "E" e "F" somente o diluente de amostra/conjugado (sem soro) que servirá de controle do conjugado. Nos outros orifícios, distribuir 100 µl das amostras teste já diluídas nos respectivos orifícios correspondentes (seguir protocolo).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 59	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83
B	CP	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 68	Amostra 76	Amostra 84
C	CN	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85
D	CN	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 86
E	SS	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 79	Amostra 87
F	SS	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 80	Amostra 88
G	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 81	Amostra 89
H	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 58	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 82	Amostra 90

CP = Controle Positivo; CN = Controle Negativo; SS = Sem Soro.

4 - Selar os "strips" com a folha adesiva e incubar a 37°C por 30 minutos.

5 - Preparo do tampão de lavagem:

Nº strips duplas	Nº de reações	Tampão de Lavagem (20X)	H ₂ O destilada
1	Até 16	2,0 ml	38,0 ml
2	Até 32	3,0 ml	57,0 ml
3	Até 48	4,0 ml	76,0 ml
4	Até 64	5,0 ml	95,0 ml
5	Até 80	7,0 ml	133,0 ml
6	Até 96	8,0 ml	152,0 ml

6 - Descolar cuidadosamente a folha adesiva, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem (200 µl/orifício). Aguarde 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

7 - Diluir o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparado anteriormente. Preparo do conjugado:

Nº strips duplas	Nº de reações	Tampão de Lavagem (20X)	H ₂ O destilada
1	Até 16	5,0 ml	5 µl
2	Até 32	5,0 ml	5 µl
3	Até 48	10,0 ml	10 µl
4	Até 64	10,0 ml	10 µl
5	Até 80	15,0 ml	15 µl
6	Até 96	15,0 ml	15 µl

8 - Homogeneizar bem e distribuir 100 µl da diluição do conjugado em cada orifício dos "strips".

9 - Selar e incubar os "strips" conforme descrito no item 4 e aspirar e lavar conforme descrito no item 6.

10 - Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro.

11 - Preparo do substrato:

Nº strips duplas	Nº de reações	T. Substrato	Cromógeno (TMB)	Substrato (H ₂ O ₂)
1	Até 16	2,5 ml	25 µl	5 µl
2	Até 32	4,0 ml	40 µl	8 µl
3	Até 48	6,0 ml	60 µl	12 µl
4	Até 64	8,0 ml	80 µl	16 µl
5	Até 80	10,0 ml	100 µl	20 µl
6	Até 96	12,0 ml	120 µl	24 µl

12 - Distribuir 100 µl do substrato rapidamente em todos os orifícios.

13 - Incubar a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos.

14 - Bloquear a reação adicionando 50 µl de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceda a leitura.

LEITURA:

- Ligar o Espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450 nm, e após alguns minutos para estabilização do feixe de luz, zerar o aparelho no ar e iniciar a leitura.

- Cálculo do Cut-Off: $CO = \bar{X} CN \times 2$

CO = Cut-Off.

$\bar{X} CN$ = Média da densidade ótica dos orifícios do Controle Negativo.

OBS.: O operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (ss) não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

RESULTADOS:

AMOSTRAS REAGENTES = As que apresentarem densidade ótica igual ou superior ao Cut-Off.

AMOSTRAS NÃO REAGENTES = As que apresentarem densidade ótica inferior ao Cut-Off.

OBS.: Recomendamos a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na "faixa cinza", considerada neste teste, entre o valor obtido para o Cut-Off e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2.

Mantendo-se as Amostras na "faixa cinza", após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO PARA AMOSTRAS COLHIDAS EM PAPEL FILTRO

1 - Preparo do diluente de amostras/conjugado:

Nº strips duplas	Nº de reações	Dil. amostra/ conjugado (5X)	Leite em pó (pesar)	H ₂ O destilada
1	Até 16	3,0 ml	0,3 g	12,0 ml
2	Até 32	6,0 ml	0,6 g	24,0 ml
3	Até 48	8,0 ml	0,8 g	32,0 ml
4	Até 64	10,0 ml	1,0 g	40,0 ml
5	Até 80	12,0 ml	1,2 g	48,0 ml
6	Até 96	14,0 ml	1,4 g	56,0 ml

2 - Em tubos previamente descontaminados, limpos e secos, colocar 2 picotes (6 mm) de cada amostra coletada em papel de filtro Whatman nº 1 picote (6 mm) para papel filtro Klabin 80, nos tubos correspondentes.

3 - Adicionar 400 µl de diluente de amostra/conjugado, por tubo, para as amostras coletadas em papel Whatman nº 1 ou 500 µl para amostras coletadas em papel Klabin 80.

4 - Colocar a estante de tubos em agitador rotacional para eluir as amostras coletadas em papel de filtro. Deixar os tubos em leve agitação por 1 hora.

5 - Diluir em tubos, 5 µl dos soros controle positivo e negativo, previamente homogeneizados, em 500 µl do diluente de amostra/conjugado (1:100).

6 - Diluir 100 µl dos controles e das amostras eluídas da seguinte forma: na coluna 1 fileira "A" e "B" o soro controle positivo, na "C" e "D" o controle negativo, na "E" e "F" somente o diluente de amostra/conjugado (sem soro) que servirá de controle do conjugado. Nos outros orifícios, distribuir 10 µl das amostras teste já eluídas, nos respectivos orifícios correspondentes (seguir protocolo).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 59	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83
B	CP	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 68	Amostra 76	Amostra 84
C	CN	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85
D	CN	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 86
E	SS	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 79	Amostra 87
F	SS	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 80	Amostra 88
G	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 81	Amostra 89
H	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 58	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 82	Amostra 90

CP = Controle Positivo; CN = Controle Negativo; SS = Sem Soro.

6 - Selar os strips com a folha adesiva e incubar a 37°C por 30 minutos.

7 - Preparo do tampão de lavagem:

Nº strips duplas	Nº de reações	Tampão de Lavagem (20X)	H ₂ O destilada
1	Até 16	2,0 ml	38,0 ml
2	Até 32	3,0 ml	57,0 ml
3	Até 48	4,0 ml	76,0 ml
4	Até 64	5,0 ml	95,0 ml
5	Até 80	7,0 ml	133,0 ml
6	Até 96	8,0 ml	152,0 ml

8 - Descolar cuidadosamente a folha adesiva, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem (200 µl/orifício). Aguarde 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

9 - Preparo do conjugado:

Nº strips duplas	Nº de reações	Tampão de Lavagem (20X)	H ₂ O destilada
1	Até 16	5,0 ml	5 µl
2	Até 32	5,0 ml	5 µl
3	Até 48	10,0 ml	10 µl
4	Até 64	10,0 ml	10 µl
5	Até 80	15,0 ml	15 µl
6	Até 96	15,0 ml	15 µl

10 - Homogeneizar bem e distribuir 100 µl da diluição do conjugado em cada orifício dos "strips".

11 - Selar e incubar os "strips" conforme descrito no item 6 e aspirar e lavar conforme descrito no item 8.

12 - Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro.

13 - Preparo do substrato:

Nº strips duplas	Nº de reações	T. Substrato	Cromógeno (TMB)	Substrato (H ₂ O ₂)
1	Até 16	2,5 ml	25 µl	5 µl
2	Até 32	4,0 ml	40 µl	8 µl
3	Até 48	6,0 ml	60 µl	12 µl
4	Até 64	8,0 ml	80 µl	16 µl
5	Até 80	10,0 ml	100 µl	20 µl
6	Até 96	12,0 ml	120 µl	24 µl

14 - Distribuir 100 µl do substrato rapidamente em todos os orifícios.

15 - Incubar a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos.

16 - Bloquear a reação adicionando 50 µl de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceda a leitura.

LEITURA:

- Ligar o Espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450 nm, e após alguns minutos para estabilização do feixe de luz, zerar o aparelho no ar e iniciar a leitura.

- Cálculo do Cut-Off: $CO = \bar{X} CN \times 3$

CO = Cut-Off.

$\bar{X} CN$ = Média da densidade ótica dos orifícios do Controle Negativo.

OBS.: O operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (ss) não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

RESULTADOS:

AMOSTRAS REAGENTES = As que apresentarem densidade ótica igual ou superior ao Cut-Off.

AMOSTRAS NÃO REAGENTES = As que apresentarem densidade ótica inferior ao Cut-Off.

OBS.: Recomendamos a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na "faixa cinza", considerada neste teste, entre o valor obtido para o Cut-Off e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2.

Mantendo-se as Amostras na "faixa cinza", após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Cuba, C.A.; Marsden, PH.D.; Barreto, A.C.; Rocha, R.; Sampaio, R.R.; Patziuff, L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. *Biol. Sanit. Param.*, 89:195-208, 1980.
2. Knonvall, G. Purification of Staphylococcal Protein A using immunosorbents. *Scand. J. Immunol.*, 2:31-36, 1973.
3. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye. *Biding Analytical Biochemistry*, 72, 1976.
4. Lyerla, H.C.; Forrester, T.F. Immunofluorescence methods in virology course. No. 8231-c Center for Disease Control.
5. Hudson, L.; Hay, F.C. Practical immunology. Oxford, London: Edinburg Melbourne Blackwell Sientific Publications, 1976.
6. Lowry, O.H.; Resebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randal, R.J. *J. Biol. Chemical*, 193:265-275.
7. Nakane, P.K.; Kawavi, A. Peroxidase. Labeled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 22(12), 1974.

8. Tsang, V.C.N.; Peralta, J.M.; Simons, A.R. Enzyme linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.*, 92:377-391, 1983.
9. Jolley, M.E. Antigen detection by particle concentration fluorescence immunoassay. Pandex (Research Report), 3: FEB.
10. Mancini, G.; Carbonara, A.O.; Heremans, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2:235-254, 1965.
11. WHO. Tehe Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 54:129-139, 1976.
12. Wisdon, G.B. Enzyme-Immunoassay. *Clin. Chem.*, 22/8:1243-1255.
13. Taie, F.A.F.; Balado, R.F. Inzimo-Immunoensayo. *Acta Bioquim. Clin. Latinoamericana*, 4:191-194, 1977.
14. Angulo, G.P.; Vela, M.C.M. El metodo ELISA. *Tecnicas y Aplicacion Laboratorio*, 65(385):59-77, 1978.
15. Soller, A. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Microbiological Associates*, 2(1), 1978.
16. Langone, J.J. Applications of immobilized protein A in immunochemical techniques. *J. Immunol. Meth.*, 55:277-296.
17. Montoya, A.; Castell, J.V. Long term storage of peroxidase-labelled imunoglobulins for use in enzyme immunoassay. *J. Immun. Meth.*, 99:13-20, 1978.
18. Mac Crindle, C.; Sch Wenzer, K.; Jolley, M.E. Particle concentration fluorescence immunoassay: A new immunoassay technique for quantification of human immunoglobulins in serun. *Clin. Chem.*, 31(9):1487-1490, 1985.
19. Guimarães, M.C.S. Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. *Ver. Socied. Bras. Med. Trop.*, 18(2):117-120, 1985.

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS:

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto, poderão ser obtidas junto a:
Fundação Oswaldo Cruz/Bio-Manguinhos/Laboratório de Reativos
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos – CEP: 21045-900 – Rio de Janeiro – RJ
CGC: 33.781.055/0015-30
Tel.: (0XX21) 598-4285 / 564-2344 – FAX: (0XX21) 260-4627
SAC: 0800210310

EDIÇÃO: agosto 2000

Protocolo para Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Leishmaniose Canina

Lote: _____ Validade: _____ EIE nº: _____ Data: _____

Disposição das Amostras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Densidade Ótica das Amostras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Técnico Responsável: _____

Observações: _____

ANEXO 11: Instrução de Técnica do Kit IFI- LVC Bio-Manguinhos.



IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
Bio-Manguinhos

IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA PARA
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos
IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA PARA
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
(material fornecido para 2000 determinações)

PRINCÍPIO DO TESTE:
O conjunto apresentado é utilizado na detecção de anticorpos contra *Leishmania* em soros de cães. O teste de imunofluorescência indireta consiste na reação de soros com parasitas (*Leishmania*), fixados em lâminas de microscópio. Nesta etapa seguinte, utiliza-se um conjugado fluorescente, para evidenciar a reação.
A leitura é realizada com auxílio de microscópio que utiliza incidência de luz azul e ultravioleta, sendo considerado reagente os soros que apresentarem fluorescência e não reagente os soros que apresentarem ausência de fluorescência, tomando-se como referência os soros controle positivo e negativo que devem ser incluídos em cada lâmina.

ESQUEMA DO TESTE:

Reação Positiva



Reação Negativa



IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 3

MATERIAL FORNECIDO:

Identificação	Componentes	Apresentação
R-01	Antígeno de <i>Leishmania</i>	4 Fr. 0,1 mL
R-02	Conjugado Anti-cão / FITC	1 Fr. 1 mL
R-03	Glicina Tamporada pH 9,0 ± 0,5	1 Fr. 25 mL
R-04	Asa de Esano 0,1%	1 Fr. 2,5 mL
R-05	Controle Negativo	1 Fr. 0,5 mL
R-06	Controle Positivo	1 Fr. 0,5 mL
	Caixas com 50 lâminas	4 caixas
	Manual de Instruções de Uso	

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO:

- Água destilada.
- Vidraria básica em geral (cubos, pipetas, provetas, etc).
- Pipetador monocalibral ajustável e ponteiro.
- Luvas descartáveis.
- Hipoclorito de sódio a 2,5% ou Água sanitária.
- Estufa a 37°C.
- Tampão fosfato/salino (PBS) - pH 7,2.
- Lâminas.
- Microplacas.
- Câmara âmida e cubos de lavagem.
- Microscópio para fluorescência.

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL:
Manter entre 2° e 8°C: R-01, R-02, R-03, R-04, R-05, R-06.
Todos os componentes do kit devem ser armazenados nas temperaturas indicadas deste modo de conservação do conjunto, porém sendo estes pela validade definida na caixa principal do kit.
Obs.: a temperatura de transporte, com bobinas de gelo seco/álcool, permite que o conjunto se mantenha em condições adequadas durante 24 a 36 horas.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES:
Somente para uso "IN VITRO".

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos, podendo representar uma fonte de infecção. Portanto, ao manusear qualquer um dos reagentes desse conjunto, observe as precauções de biossegurança necessárias.
A qualidade dos resultados obtidos com esse conjunto diagnóstico depende do cumprimento às boas normas de segurança de laboratório, tais como:

- as amostras, assim como lâminas e cubos insumos devem ser esterilizados e manipulados adequadamente;
- não gerar aerossóis e controlar antes de usar;
- utilizar equipamento de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis, jaleco e protetor facial em todas as etapas do teste;
- descartar ponteiros, luvas, pipetas de vidro, frascos, lâminas usadas, etc., em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- para evitar inalações, nunca tocar com os dedos na parte superior da lâmina;
- nunca reproprietar as lâminas;
- não usar os reagentes após sua data de validade;
- utilizar frascos e vidrarias rigorosamente limpas, pois resíduos de detergentes e/ou substâncias oxidantes podem interferir na reação;
- nunca misturar componentes de lotes diferentes.

PREPARO DO TAMPÃO FOSFATO pH 7,2 (PBS):

Sala	Quantidade
Cloreto de Sódio (NaCl) 0,9% (1,1M)	8,77 g
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (Na ₂ HPO ₄) 8K - 0,002M	1,02 g
Fosfato de Sódio Monobásico Anidro (NaH ₂ PO ₄) 10K - 0,002M	0,34 g
Água destilada q.s.p. (quantidade suficiente para)	1000 mL

ATENÇÃO: os sais descritos acima, quando não utilizados na forma a níqua, deverão ser suas quantidades recalculadas em função das moléculas de água presentes. Verifique sempre no rótulo dos produtos a composição dos sais e o peso molecular.

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 5

Exemplo de cálculo de peso para preparo da PBS quando se utiliza o fosfato dibásico hidratado com 12 moléculas de água. Cálculo:

$$\begin{aligned} \text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ Anidro} - \text{Peso Molecular} &= 142 \quad \text{pesar } 1,02 \text{ g} \\ \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{Peso Molecular} &= 358 \quad \text{pesar } X \text{ g} \\ \frac{142 - 1,02}{358 - X} &= \frac{1,02 \times 358}{142} = 2,57 \text{ g} \end{aligned}$$

Nesse exemplo, onde o Fosfato Dibásico é hidratado com 12 moléculas de água, devem-se pesar 2,57g para preparar a PBS.

TITULAÇÃO DO CONJUGADO:

Objetivo do conjugado varia em função das condições de trabalho, do microscópio utilizado e do operador.

O laboratório deverá repetir a titulação do conjugado sempre que houver troca de lentes do lúmen do microscópio, ou quando se observar queda da intensidade da fluorescência no controle positivo ao longo do tempo.

1- Fixar as lâminas em água destilada por 30 minutos, após o que se encharca em álcool, e depois-las estocadas em álcool comercial até sua utilização, quando deverão ser cuidadosamente limpas e secas com o auxílio de gaze ou papel absorvente.

2- Separar 3 lâminas e pipetar 10 µL do antígeno em cada uma delas, tendo o cuidado de mantê-lo homogêneo durante o preparo.

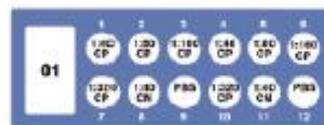
3- Deixar secar de um dia para o outro à temperatura ambiente ou duas horas a 37 °C, para uma boa fixação dos parasitas.

ATENÇÃO: trabalhar com a parte superior da lâmina onde encontram-se os parasitas fixados.

4- Fazer um protocolo de teste, conforme modelo abaixo, indicando a posição das diluições do Controle Positivo (CP), o do Controle Negativo (CN) além dos controles do conjugado (PBS).

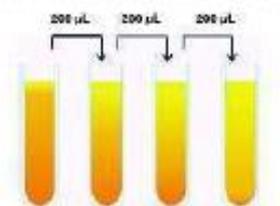
5 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

Ex:



5- Diluir em PBS o controle positivo 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, e diluir o controle negativo 1/40, utilizando o esquema de diluição serido a seguir:

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 7



ATENÇÃO: homogeneizar o conteúdo de cada tubo antes de transferir o volume de 200 µL para o tubo seguinte.

6- Adicionar 10 µL das diluições de soro por orifício, conforme o seu protocolo, em cada uma das 3 lâminas anteriormente preparadas.

ATENÇÃO: evitar que a ponta da pipeteta toque ou raspe a superfície da lâmina, pois este procedimento provocará a retirada dos parasitas. Tomar cuidado para que o conteúdo de diferentes poços não se misturem. Utilizar uma pipeteta para cada tubo a ser titulado ou utilizar uma pipeteta para cada controle na ordem de teste para melhor diluição.

7- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37 °C, em escura.

8 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

8- Examinar lâminas 3 (três) vezes em PBS, nos cubos de Imagen, por 5 minutos cada banho.

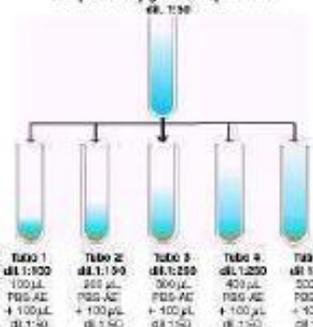
9- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez em água destilada.

10- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos a 37 °C, em escura, para secar. No entanto não exceder muito nessa etapa.

11- Preparar uma solução de PBS-Anti de Evans (PBS-AE) a 0,004%. Colocar em um tubo 120 µL de Anti de Evans (0,1%) e 2880 µL de PBS.

12- Diluir o conjugado anti-lúmen marcado com fluorescência, conforme descrito a seguir:

20 µL de Conjugado + 180 µL PBS-AE de 1:100



13- Adicionar 10 µL das diluições do conjugado por orifício nas lâminas correspondentes conforme esquema a seguir:

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Rio-Mangueiras - 5

Lâmina 1 -
diluição 1:80



Lâmina 2 -
diluição 1:160



Lâmina 3 -
diluição 1:320



- 14- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, em escura.
- 15- Lavar as lâminas 3 (três) vezes com PBS em cuba de lavagem apropriada, 5 minutos cada lavagem e, em seguida, lavar rapidamente as lâminas uma vez em água destilada.
- 16- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos em escura a 37°C para secagem. No entanto, não exceder muito nesta etapa.
- 17- Adicionar de 3 a 4 gotas de glicina tamponada sobre as lâminas, cobrindo-as com lamínula. Manter-as ao abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura.

10 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Rio-Mangueiras

DEFINIÇÃO DO TÍTULO DO CONJUGADO

Para a leitura, utilizar o microscópio de Imunofluorescência e objetiva com aumento de 40X. O título do conjugado será a diluição em que se observar fluorescência até o poço correspondente ao título do controle positivo (Máx título do frasco) e ausência de fluorescência em diluições correspondentes ao controle negativo e ao PBS (controle de conjugado). Os limites aceitáveis de titulação do conjugado para aprovação do teste de Imunofluorescência indireta estão em torno de 1:100 até 1:640.

PROCEDIMENTO DO TESTE:

- 1- Ferver as lâminas em água destilada por 30 minutos, após a água entrar em ebulição e deixá-las secar em álcool comercial até a utilização, quando deverão ser cuidadosamente limpas e secas com o auxílio de gaze ou papel absorvente.
- 2- Fazer o protocolo para determinar o número de lâminas a serem preparadas, considerando o número de amostras e suas diluições (1:40 e 1:80).



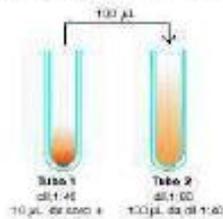
- Obs. 1: conforme recomendação de especialistas, as amostras teste devem ser submetidas ao teste de Imunofluorescência pelo menos nas diluições 1:40 e 1:80.
- Obs. 2: os controles positivo e negativo, diluídos 1:40, devem estar presentes em todas as lâminas para comparações no momento da leitura.

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Rio-Mangueiras - 11

- 3- Pingar 10 µL do antígeno em cada orifício da lâmina, sendo o cubículo de manômetro homogeneizado durante o preparo. Deixar secar de um dia para o outro a temperatura ambiente, ou duas horas a 37°C para uma hora fixação dos parasitas.

ATENÇÃO: estar atento com a parte superior da lâmina onde encontram-se os parasitas fixados.

- 4- Diluir os soros amostra e teste (1:40 e 1:80) e os controles positivo (1:40) e negativo (1:40), em PBS, conforme esquema a seguir:



- 5- Adicionar 10 µL das diluições de soro por orifício, conforme o protocolo previamente elaborado. Deve-se tomar cuidado para que as amostras não se misturem durante a incubação.
- 6- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C.
- 7- Lavar as lâminas 3 (três) vezes em PBS, nas cubas de lavagem por 5 minutos cada banho.
- 8- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez em água destilada.
- 9- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos a 37°C para secar. No entanto, não exceder muito nesta etapa.
- 10- Preparar, mesmo nos dias de uso, uma solução PBS-AE, conforme tabela a seguir:

12 IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Rio-Mangueiras

Nº lâminas	Vol. PBS	Vol. Anti de leish (0,1%)
2	480 µL	20 µL
4	560 µL	40 µL
6	640 µL	60 µL

- 11- Diluir o conjugado na proporção adequada, conforme indicação prévia. Adicionar 10 µL da diluição do conjugado em cada orifício das lâminas.

- Obs. 1: diluir somente o quantidade de conjugado necessária para utilização no mesmo dia.
- Obs. 2: evitar pipetar menos de 5 µL de conjugado para minimizar a possibilidade de erros na diluição.

- 12- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, em escura.
- 13- Lavar as lâminas 3 (três) vezes em PBS, nas cubas de lavagem, por 5 minutos cada banho.
- 14- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez em água destilada.
- 15- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos a 37°C, em escura, para secar. No entanto, não exceder muito nesta etapa.
- 16- Adicionar de 3 a 4 gotas de glicina tamponada sobre as lâminas, cobrindo-as com lamínula. Manter-as ao abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura.
- 17- É recomendado que a leitura da reação ocorra no período de até 4 horas após a execução do teste, mantendo-se as lâminas ao abrigo da luz.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO:

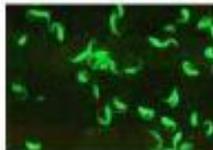
- 1- Para a leitura e interpretação das reações utilizar o microscópio de Imunofluorescência e objetiva de 40X. Focar a lâmina na posição do controle positivo e observar a fluorescência presente, de acordo com o padrão descrito a seguir.
- 2- Focar a lâmina na posição do controle negativo e observar a ausência de fluorescência nos parasitas, bem como a coloração de fundo "background".

IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos 13

3- Proceder a leitura das amostras, considerando os padrões a seguir:

Amostras reagente:

Aquelas cores que, a partir da diluição 1:60, inclusive, apresentarem fluorescência na membrana dos parasitas, mais intensa que o background observado no antifofo do controle negativo.



Amostras não reagente:

As cores teste que não apresentarem fluorescência.



ÍNDICES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE:

Na literatura encontra-se em diversos trabalhos comparando as performances das metodologias de IFI, ELISA e Aglutinação, entre outros. Nestes trabalhos, o desempenho da IFI está em torno de 90% para sensibilidade e 90% para especificidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- CAMARGO, M.E.; REDONATO, C. Cross-reactivity in immunofluorescence for Trypanosoma and Leishmania antibodies. *Acta Trop. Med. Hyg.* 1994; 38: 500-505.
 - CADA, C.A.; WARDEN, R. D.; BARRETO, A. C.; ROCHA, R.; SAMPÃO, R.E.; PATIÑO, L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. *Bol. Of. Sanit. Paris* 1987; 89: 195-208. (USA,

10 - IFI - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - Bio-Manguinhos

C.A.; WARDEN, R.D.; BARRETO, A. C.; ROCHA, R.; SAMPÃO, R.E.; PATI, R.P.P. L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. *Bol. Of. Sanit. Paris* 1987; 89: 195-208.
 - GOMES-OLIVEIRA, M.E.S.; CELESSE, R.L.; CORREIA, E.M. Antigenes de Leishmania major-like e L. braziliensis no teste de imunofluorescência (IgGIF) na Leishmaniose Mucosa cutânea. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1991; 24 (supl. B): 112.
 - *Methods in Immunology - A Laboratory Test for Instruction and Research*, Third Edition, Benjamin Cummings Publishing Company, 1991.
 - *Fluorescent Antibody Techniques*, CDC, 2, 284, (USA, 1961).
 - *Labelled Antibodies in Diagnostics and Medicine*, Naraxis Press and Metaxa PH International Book Company, 1978.
 - ALVES, R.A.; DEVLACQUARD, Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico de leishmaniose visceral de leishmaniose cutânea em queijos: aspectos epidemiológicos no caso da epidemia de Belo Horizonte e Minas Gerais, Brasil, 1993 - 1997. *Cad. Saúde Pública* 20(1): Rio de Janeiro 2004.

ATENÇÃO:

Este produto destina-se prioritariamente para atendimento das demandas dos Programas Públicos de controle da Leishmaniose Visceral, e ainda para Projetos de Pesquisa realizados por Instituições Públicas do País.

Identado no *Pln. de Agricultura* sob o nº 8972, em 04/10/2004, Resp. Téc. Méd. Vet. Dr. Joel Matewicz, CRMV/RJ 2342

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS:

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a: Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz/Departamento de Reagentes para Diagnóstico/ CNPJ 33.781.000/0015-70/ Av. Brasil, nº686 - CEP: 21040-900 - Rio de Janeiro - RJ/ Tel: (21) 3862.0303 - FAX: (21) 2561.0277/ SAC: 0800.210.310 - www.bio.fiocruz.br
 edição: dezembro de 2004
 EM_068_07Br

ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
MODELO DE PROTOCOLO

IFI nº: _____ Data: ___/___/___

Kit: _____ Lote: _____
 Validade: _____

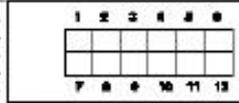
Lâmina nº:

1 _____ 7 _____
 2 _____ 8 _____
 3 _____ 9 _____
 4 _____ 10 _____
 5 _____ 11 _____
 6 _____ 12 _____



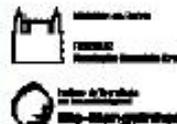
Lâmina nº:

1 _____ 7 _____
 2 _____ 8 _____
 3 _____ 9 _____
 4 _____ 10 _____
 5 _____ 11 _____
 6 _____ 12 _____



Técnico responsável: _____

Observações: _____



Tel.: (21) 3862.9393
 FAX: (21) 2561.0277
 SAC: 0800.210.310
www.bio.fiocruz.br

ANEXO 12. Instrução de Técnica do Kit TR-DPP® Bio-Manguinhos.



TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
Bio-Manguinhos
(USO VETERINÁRIO)

TESTE RÁPIDO QUALITATIVO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE CÃO PARA LEISHMANIA
(material fornecido para 20 determinações)

INDICAÇÃO DE USO

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos é um teste de imagem imunocromatográfico de uso rápido para detecção, em cães, de anticorpos específicos para Leishmania, em amostras plasmáticas ou soro após total extração.

O teste é usado para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina em associação a outros exames. O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos é indicado para uso por profissionais de saúde de acordo com as instruções fornecidas.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

A leishmaniose é causada por um parasita protozoário do gênero Leishmania. Esse doença é endêmica em 88 países, afetando 200 milhões de pessoas. A leishmaniose está presente em áreas desde a floresta tropical das Américas do Sul e Central aos desertos do Cedo da Ásia, norte da África, Índia, Sudeste e Oeste. Há cerca de 300.000 novos casos anuais de leishmaniose visceral humana^{1,2}. Entre os anos de 1994 a 1999, 37.258 novos casos de LV humana foram relatados pelo Ministério da Saúde³.

A LV apresenta uma sintomatologia variada. Quando é uma doença crônica e predominantemente letal se não tratada, ocorre em aproximadamente 90% dos casos. Sinais clínicos da doença incluem febre, anemia, icterícia, perda de peso e inchaço no fígado, rins e glândulas salivares⁴.

A infecção pode ser prevenida evitando-se a picada de Leishmanioses através de protocolos como: evitar picadas em áreas afetadas. Testes para LV são muito difíceis e geralmente requerem o uso de métodos permanente ou estabelecimento de sêrtes.

A LV é uma zoonose na qual os cães são os principais reservatórios, sendo importantes reservatórios para o parasita⁵. A transmissão ocorre através de um vetor (cão-do-mato, flebotomídeo) através de uma picada. Programas de controle para LV incluem o controle de cães infectados, identificação através de teste sorológico. Este procedimento está presente em várias importantes etapas do controle empregando os cães⁶.

Verão estudos sobre a imunofluorescência, imunodifusão, PCR e ELISA, os métodos mais utilizados em uso para este diagnóstico^{7,8} e os métodos sorológicos são bastante específicos para realizar os métodos de diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral canina (LVC).

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos é um teste de imagem imunocromatográfico, que emprega uma combinação única de antígenos recombinantes específicos para a detecção de anticorpos específicos para Leishmania, em cães. O rápido, simples e fácil de usar e pode ser armazenado à temperatura ambiente (2 a 30°C).

PRINCÍPIO DO TESTE

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos emprega uma combinação de proteínas A conjugada a partículas de ouro coloidal e anticorpos específicos da amostra para Leishmania. Em seguida, ocorre a reação com antígenos recombinantes de Leishmania ligados a uma membrana (base sólida).

A amostra é aplicada no poço #1 (AMOSTRA + TAMPAO), seguida pela aplicação do tampão de corrida. O tampão penetra o fluxo lateral promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Após a migração da amostra e do tampão ao longo do suporte de teste, deve-se adicionar tampão de corrida no poço #2 (TAMPÃO). O conjugado se liga aos anticorpos específicos para Leishmania produzindo uma linha (ou linhas) na área do TESTE (T). Na ausência de anticorpos para Leishmania a linha (ou linhas) não aparece na área do TESTE (T). Em testes de controle, a amostra controlada é adicionada ao longo do suporte produzido uma linha (ou linhas) na área do CONTROLE (C), o que demonstra o funcionamento adequado das reagentes.

MATERIAL FORNECIDO

Suportes DPP® contendo Antígenos de Leishmania e o Conjugado de Ouro Coloidal e Biotina em Membranas Especiais	20 unidades
Tampão de Corrida	01 frasco (5 mL)
Alças Coloridas Descartáveis (C-142)	20 unidades
Leucostix Câmara Descartáveis	20 unidades
Manual de Instrução de Uso	01 unidade

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO

- Corante para o resultado
- Material de limpeza para o suporte (tampão descartável e alça colorida)
- Lixa descartável

- Resguardar sempre para descarte de material biológico.
- Anexo 10N

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL

O TR DPP[®] Lactimantase Vacinal Canina Do-Mangueiras deve ser armazenado entre 2 e 8°C. Recomendase a conservação do lit em geladeira somente em locais onde a temperatura ambiente ultrapasse 30°C. Não congelar o lit ou os seus componentes. Os suportes de teste devem permanecer lacrados até o momento de sua utilização. O tempo de contida deve ser mantido em seu recipiente original. Caso o lit seja guardado sob refrigeração assegurar-se de que todos os componentes estejam à temperatura ambiente no momento de sua utilização.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Servente para uso em diagnósticos in vitro.

Servente para uso veterinário.

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos potencialmente representam uma fonte de risco. Ao manusear este conjunto, observe as precauções de biossegurança necessárias.

A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento das Boas Práticas de Laboratório, tais como:

- O teste deve ser realizado apenas por profissionais de saúde, seguindo as instruções cuidadosamente manuais.
- Não realizar mais de 5 testes por vez. Esta conduta reduz falhas no procedimento do teste, bem como na interpretação dos resultados.
- As amostras devem ser homogeneizadas antes do uso.
- As amostras de sangue não usadas imediatamente após a coleta, devem ser refrigeradas entre 2 e 0°C, podendo ser usadas em até 3 dias.
- Amostras de soro ou plasma podem ser conservadas entre 2 e 8°C, por 3 dias após a coleta, até que sejam utilizadas no teste. Caso a realização do teste não seja possível dentro desse período, as amostras devem ser congeladas (-20°C ou abaixo).
- Equipamentos de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis e máscaras, devem ser utilizados em todas as etapas de realização do teste.
- Os testes a seguir devem ser utilizados após a data de validade.
- Componentes de lit de lotes diferentes nunca devem ser misturados.
- A integridade dos componentes do lit sempre deve ser verificada. Em especial, assegure-se de que o embolagem dos suportes esteja íntacta. Caso algum dos componentes do lit demonstre irregularidade, apore o lit evitando que seja utilizado e entre em contato com o SAC do Do-Mangueiras.
- Nunca fracionar os lits.
- Não toque nunca diretamente no suporte de teste. Utilize sempre o dispositivo fornecido no lit, seguindo as orientações dadas nos Procedimentos do Teste.
- Cuidado ao adicionar a amostra: a água deve ser inserida em posição vertical e a amostra deve ser aplicada ao centro do orifício do poço # 1 (AMOSTRA + TAMPAO) do suporte de teste.
- Cuidado ao adicionar o tempo de contida: o frasco deve ser inserido em posição vertical e apenas duas gotas do líquido devem ser depositadas ao poço # 1 (AMOSTRA + TAMPAO) do suporte de teste onde se encontra a amostra.
- Ajustar o nível líquido e o volume após o desaparecimento das cores das linhas T (TESTE) e C (CONTROLE) adicionando quatro gotas do tempo de contida ao poço # 2 (TAMPAO).

ATENÇÃO: Alguns resultados negativos podem aparecer em um prazo de 10 minutos, mas são necessários 30 minutos para detectar um resultado não reagente. Ler os resultados em ambiente bem iluminado. Não ler os resultados após 25 minutos de início do tempo de contida ao poço # 2 (TAMPAO).

- Após o uso, suportes, pastilhas, lâminas, água coletora e frasco devem ser descartados em conformidade ou em solução de hipoclorito de sódio a 2,0% como material biológico potencialmente infeccioso.

COLETA DE AMOSTRA

ATENÇÃO: para o perfil hantavírus do teste, use 5 µL de amostra e seguir as instruções de procedimento do teste.

O TR DPP[®] Lactimantase Vacinal Canina Do-Mangueiras pode ser realizado com amostra de soro, plasma ou sangue total venoso.

Sangue total

Utilize a técnica para obter sangue a partir do veia, punção no coto do animal. Para teste imediato utilizar as duas coletas.

Sangue Total Venoso

Coleta o sangue asepticamente em tubo contendo EDTA, heparina ou citrato de sódio. Certifique-se que o tubo de sangue foi bem misturado antes da amostragem. Siga cuidadosamente o procedimento do teste.

Soro

devido do sangue total coletado asepticamente por punção de veia com um tubo litico sem anticoagulante. Deixe o sangue coagular a temperatura ambiente. Centífuge o sangue a 2000rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Separe o soro do coágulo para estas análises.

Nota

Colocar o sangue total com anticoagulante, centrifugar a 2000rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente e separar o plasma sobrecoberto.

PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DO TESTE RÁPIDO TR DPP™ LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - BIO-MANGUINHOS

1. Certifique-se de que o amostra e os testes estão à temperatura ambiente. Caso a amostra tenha sido refrigerada ou congelada, permita que a mesma atinja a temperatura ambiente antes de ser testada.

2. Retire o número necessário de componentes do TR DPP™ LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (IO - MANGUINHOS) e coloque-os sobre uma superfície plana. Caso o kit tenha sido guardado sob refrigeração, certifique-se de que os componentes do kit estejam à temperatura ambiente no momento do uso.



3. Retire o suporte de teste do envelope laminado e identifi-que-o com o nome do animal ou número de identificação, além do número do lote do kit de onde o teste foi retirado.



4. Verificar a integridade de todos os componentes e a validade de 2 (dois) lotes na parte de teste do suporte, sendo 1 (uma) lote de cor azul e 1 (uma) lote de cor verde. Caso uma unidade desses lotes esteja expirada, retirar o suporte de teste para que não seja usado e consultar o ocorrido ao SAC do Bio-Manguinhos. Em seguida, utilizar um novo suporte de teste para continuar o procedimento.

5. Escovar a alça coletora de 5 µl, na amostra a ser testada, permitindo que a alça seja preenchida com a amostra. Alternativamente, podem-se utilizar micropipetas automáticas, calibradas e ajustadas para 5 µl.



6. Segurar a alça coletora na posição vertical e tocar no disco de aplicação da amostra, poço # 1 (AMOSTRA + TAMPAO) do suporte para liberar 5 µl de amostra. Certifique-se de que a amostra de sangue total, seja na alça integral (exceto) da alça para o local do teste.



7. Vire o fluxo de tampão e manter na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço # 1 (AMOSTRA + TAMPAO). Adicionar 2 (dois) gotas de tampão. Imediatamente, ao poço # 1 (AMOSTRA + TAMPAO).



8. Aguarde 5 (cinco) minutos. Após esse tempo, a linha azul (TESTES) e verde (CONTROLE) da janela devem ter desenvolvido. Em caso contrário, descartar o suporte de teste e repetir o procedimento desde o início usando um novo suporte.



9. Ver o tempo de tempo e mantê-lo na posição vertical (sem inclinação) sobre o poço # 2 (DMFAC). Adicionar 4 (quatro) gotas de tempo, lentamente, ao poço # 2 (DMFAC).



10. Deixar o teste (com por 10 (dez) minutos a temperatura ambiente. Com uma tampa adequada após 2 (duas) minutos, descartar o teste.

11. Leitura do Teste - Não ler os resultados após 25 (vinte e cinco) minutos da adição do tempo de corante ao poço # 2 (DMFAC).

Leitura Visual

Colocar o suporte sobre uma superfície plana e em local bem iluminado. O operador deve se posicionar de forma a manter uma distância de 30 x 30 cm entre o suporte de teste e seus olhos. Observar a presença de fitas e anotar no protocolo de teste.

Leitura com Equipamento - Leitura de Testes DMF

Alternativamente pode-se fazer a leitura dos testes DMF com equipamento específico. Seguir as instruções de uso do equipamento para obtenção dos resultados.

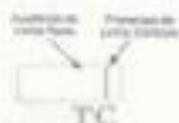
ATENÇÃO: Após a leitura, descartar o suporte, a água e a lâmina utilizadas no teste em um recipiente para descarte de materiais de descarte biológico.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados podem ser interpretados tanto visualmente ou com a ajuda de um leitor DMF. Em caso de dúvida na interpretação do teste, seguir o suporte e fazer contato com o SAC do Bio-Manguinhos.

Resultado NÃO REAGENTE

Um resultado não reagente é resultado por uma fita rosada na área de CONTROLE (C) e nenhuma fita na área de TESTE (T). Esse resultado sugere a ausência de anticorpos para *Leishmania* anexada e não exclui a possibilidade de infecção por *Leishmania*.



Resultado REAGENTE

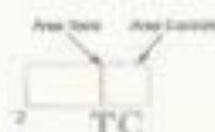
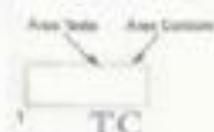
A detecção de duas fitas rosadas, uma na área de CONTROLE (C) e outra na área de TESTE (T), indica um resultado reagente. A presença de fita na área de TESTE (T) está de acordo a múltiplos testes conforme a concentração de anticorpos específicos. Assim, a fita na área de TESTE (T) pode ter aparência diferente da fita na área de CONTROLE (C), isto não invalida o teste. Um teste reagente significa que anticorpos para *Leishmania* foram detectados.

ATENÇÃO: Um resultado reagente deve ser confirmado conforme recomendações do Ministério da Saúde.



Resultado INVÁLIDO

Uma fita rosada deve sempre aparecer na área de CONTROLE (C), independente da presença ou não de fita na área de TESTE (T). Caso uma fita rosada não seja vista na área de CONTROLE (C), o teste deve ser considerado inválido. Um resultado inválido não pode ser interpretado. Seguir o manual e fazer contato com o SAC do Bio-Manguinhos. Seguir o procedimento de teste com um novo suporte de teste.



CONFIRMAÇÃO DE DESEMPENHO DO TESTE

As tirinhas do teste, uma lista controlada aparecerá na área de CONTROLE (C), tanto nas amostras negativas quanto nas positivas. Esta lista serve de controle interno, confirmando o desempenho adequado do teste.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- O TR DPP® Leishmaniases Visceral Canina - Bio-Manguinhos deve ser utilizado com água, presente na embalagem original.

Outros tipos de amostras de sangue coletadas em tubos contendo anti-coagulantes que são citrato, heparina ou EDTA, podem gerar resultados inadequados. Para amostras de soro, coletar sangue sem anti-coagulante.

- O TR DPP® Leishmaniases Visceral Canina - Bio-Manguinhos deve ser utilizado seguindo as instruções contidas neste manual visando à obtenção de resultados adequados.

- Proceda e leitura do teste em no máximo 20 minutos.

- Sempre abra o envelope contendo o suporte de teste no momento de sua utilização.

- Um resultado reagente indica a presença de anticorpos para leishmanias na amostra testada.

- Um resultado não reagente não exclui a possibilidade de exposição a hidátos ou infecção por leishmanias. Uma resposta humoral a uma exposição recente pode levar alguns meses até atingir níveis detectáveis.

- Um animal infectado com Leishmanias que esteja recebendo algum tipo de medicamento pode produzir resultado falso negativo.

ÍNDICES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

A sensibilidade e a especificidade para Leishmanias foram determinadas pela avaliação da capacidade do teste rápido TR DPP® Leishmaniases Visceral Canina - Bio-Manguinhos de detectar anticorpos específicos para Leishmanias em amostras clínicas de cães. Comparado ao teste parasitológico, para estas amostras, o teste rápido TR DPP® Leishmaniases Visceral Canina - Bio-Manguinhos apresentou sensibilidade de 98,3% (107/111), sendo 1 amostra indeterminada. Quando comparado ao Teste ISE (Bio-Manguinhos), para amostras de cães sem suspeita de leishmaniose, o TR DPP® Leishmaniases Visceral Canina - Bio-Manguinhos apresentou uma especificidade de 91,4% (179/196), sendo 6 amostras indeterminadas.

REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE

As boas práticas de fabricação e laboratoriais, associadas a estabilidade e rapidez na utilização do TR DPP® Leishmaniases Visceral Canina - Bio-Manguinhos, garantem sua reprodutibilidade, repetitividade e estabilidade, podendo ser utilizado como método seguro e eficaz na detecção de anticorpos específicos para a identificação da infecção por Leishmanias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. The UNICEF-WFP World Bank-WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). www.mt.ictd.org/diseases/leishmaniasis/leishmaniasis.htm, 2002.
2. CDC. Division of Parasitic Diseases. www.cdc.gov/ncez/dod/dpd/parasitic/leishmaniasis/acade.htm, 2004.
3. PALUCHNIK DE SOUSA, C.B., dos Santos, W.R., Franca-Silva, J.C., da Costa, R.T., Reis, A.B., Palanci, M., Meyrick, W., Deane, D. Impact of Canine Control of the Epidemiology of Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 69: 510-517, 2004.
4. ASHFORD, D.A., David, J.R., Freire, M., David, R., Sienkoff, L., de Amorim e Galvão, M., Sampaio, D.H., Dantas, R. Studies on Control of Visceral Leishmaniasis: Impact of Dog Control on Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 59: 53-57, 1998.
5. REITZINGER, R., Quirós, E.J., Alexander, B., Davies, C.R. Rapid Detection of Leishmania infection Infection in Dogs: Comparative Study Using and Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. *J Clin Microbiol*, 40: 2352-2356, 2002.
6. DO ROSARIO, E.Y., Gouveia, D., Franca-Silva, J.C., da Costa, R.T., Meyrick, W., Reis, A.B., Carneiro, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude Leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105: 197-200, 2000.
7. FERREZ, R., Santos da Costa, M.V., Reis, A., Paqueta, A., Ferreira, A.L., Santos, C.D., Fernandes, A.R., Gathell, R.T., Campos-Neto, A., Grenfell, B. J. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of asymptomatic and asymptomatic Leishmania infantum visceral infections in dogs. *Chronic Infectious*, 14: 544-548, 2007.

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) | FIOCRIZ | Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21045-100 | Rio de Janeiro-RJ | CNPJ 33.761.025/0001-35. SAC 08000-210-310 | sac.mt@biofocma.br | www.biofocma.br | fidata@biofocma.br