

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES**

**Centro de Ciências da Saúde**

**Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas**

**SARAH PERPÉTUO DE CASTRO PIRES**

**INVESTIGAÇÃO DA EXPANSÃO GEOGRÁFICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL  
AMERICANA POR MEIO DE INQUÉRITO DE INFECÇÃO CANINA EM ÁREAS  
RECEPTIVAS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL**

**Vitória**

**2015**

**SARAH PERPÉTUO DE CASTRO PIRES**

**INVESTIGAÇÃO DA EXPANSÃO GEOGRÁFICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA POR MEIO DE INQUÉRITO DE INFECÇÃO CANINA EM ÁREAS RECEPTIVAS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo para a obtenção do Título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Aloísio Falqueto  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Blima Fux

**Vitória**

**2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

P667i Pires, Sarah Perpétuo de Castro, 1984 -  
Investigação da expansão geográfica da leishmaniose  
visceral americana por meio de inquérito de infecção canina em  
áreas receptivas no estado do Espírito Santo, Brasil / Sarah  
Perpétuo de Castro Pires – 2015.  
51 f. : il.

Orientador: Aloísio Falqueto.  
Coorientador: Blima Fux.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da  
Saúde.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Expansão geográfica.  
3. Espírito Santo. I. Falqueto, Aloísio. II. Fux, Blima.  
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

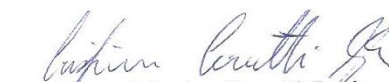
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

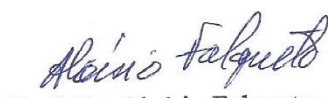
A mestranda SARAH PERPÉTUO DE CASTRO PIRES apresentou a dissertação intitulada **“Investigação da Expansão Geográfica da Leishmaniose Visceral Americana por meio do Inquérito de Infecção Canina em Áreas Receptivas no Estado do Espírito Santo, Brasil”** em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** ( ) **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica e bioquímica SARAH PERPÉTUO DE CASTRO PIRES a obter o Grau de MESTRA EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 05 de agosto de 2015

  
Prof. Dr. Antonio Teva  
(Membro Externo)

  
Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior  
(Membro Interno)

  
Prof. Dr. Aloísio Falqueto  
(Orientador)

  
Prof. Dra. Blima Fux  
(Coorientadora)

## AGRADECIMENTO

As batalhas enfrentadas na graduação, curso de especialização, em Laboratórios de Saúde Pública em Minas Gerais e no Espírito Santo como farmacêutica-bioquímica e na seleção do mestrado foram muitas até alcançar mais esta conquista em minha vida!

Lembro quando ainda em Minas Gerais o desejo forte em cursar o mestrado me motivou a retornar para Vitória e buscar pela linha de pesquisa em leishmaniose visceral. Meu primeiro contato com o Núcleo de Doenças Infecciosas/UFES não foi tão acolhedor, mas não desisti! Na busca por linhas de pesquisa e orientadores, encontrei, então, o professor Falqueto com um conhecimento ímpar e uma simplicidade cativante. Com prontidão ele me acolheu e redefinimos o projeto! Posteriormente, conheci a professora Blima, pessoa e profissional maravilhosa que me deu todo incentivo e apoio! Então, demos início aos trabalhos. Com a conclusão deste marco em minha vida, só tenho a agradecer por esta vitória!!

Agradeço primeiramente a DEUS, pelo seu amor e misericórdia. ELE me fortaleceu a cada manhã para seguir em frente e enfrentar os desafios. *“Eu te amarei do coração, ó SENHOR, fortaleza minha. O SENHOR é o meu rochedo, e o lugar mais forte, e o meu libertador; o meu Deus, a minha fortaleza, em quem confio; o meu escudo, a força da minha salvação e o meu alto refúgio.”* Salmo 18 (1-2).

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo, aos professores e colegas do curso por me proporcionarem esse crescimento intelectual e profissional.

Agradeço a CAPES pelo financiamento do projeto.

Agradeço aos meus orientadores, professores Falqueto e Blima, pelo carinho, confiança, trabalho desempenhado e por todo o conhecimento repassado. Além de despertar em mim uma visão epidemiológica, bem diferente do trabalho de bancada em análises laboratoriais inerente à minha profissão! Eles são exemplos de pesquisadores e professores! E que venha o doutorado!!

Agradeço aos meus pais, Magda e Levy, por serem os melhores pais que Deus poderia me dar! Eles são minha base e meu porto seguro, sem eles nada seria possível Eles são exemplos de

caráter, amor e dedicação! Agradeço também ao meu padrasto Fred e aos meus irmãos Simão e Sophia, minha “pipoca”, pelo eterno amor e carinho! Vocês estão no meu coração!!

Agradeço ao meu esposo Bruno pelo amor, companheirismo, apoio e incentivo em todos os momentos. Muitas foram as horas em frente ao computador, nas aulas e no trabalho de campo, o privando assim de minha companhia. Mas, a sua compreensão e amor minimizavam esta ausência. Te amo, meu amor!

Agradeço a minha família, meus avós, meus sogros, cunhados, tios, primos e a todos os meus amigos e colegas de trabalho pelo incentivo, amor e apoio! Agradeço em especial à minha tia Joilza, em memória, pelo eterno carinho e exemplo de dedicação.

Agradeço ao Claudiney, o “encantador de cães”, pela sua disponibilidade, empenho e conhecimento. O seu apoio foi fundamental para o trabalho de campo. Muito obrigada!

Agradeço aos proprietários e aos animais que foram primordiais para a realização do trabalho de investigação.

Agradeço ao professor Gustavo Leite pela colaboração com os mapas!

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma ajudaram para que eu alcançasse esta conquista! Muito obrigada!

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Sexo e raça dos cães investigados no período de março de 2013 a junho de 2014 nas áreas receptivas à leishmaniose visceral americana no estado do Espírito Santo..... p. 37

**Tabela 2.** Origem dos cães investigados no período de março de 2013 a junho de 2014 nas áreas receptivas à leishmaniose visceral americana, no estado do Espírito Santo ..... p. 38

**Tabela 3.** Investigação da infecção canina por leishmaniose visceral americana por meio do teste rápido DPP<sup>®</sup> LVC e ELISA LVC<sup>®</sup> da Bio-Manguinhos, no período de março de 2013 a junho de 2014, em áreas receptivas à doença no estado do Espírito Santo, Brasil ..... p. 39

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Municípios endêmicos e receptivos à ocorrência da leishmaniose visceral americana no estado do Espírito Santo, Brasil ..... p. 27
- Figura 2.** Municípios receptivos à ocorrência da leishmaniose visceral americana no estado do Espírito Santo, Brasil, investigados no estudo ..... p. 31
- Figura 3.** Teste rápido DPP<sup>®</sup> LVC, envolvendo a plataforma do teste, os procedimentos para execução do teste e os possíveis resultados ..... p. 32
- Figura 4.** Coleta de sangue total de cães investigados para a análise laboratorial de triagem, pelo teste rápido DPP<sup>®</sup> LVC, Bio-Manguinhos, nas áreas receptivas à presença da leishmaniose visceral americana investigadas pelo estudo no estado do Espírito Santo, Brasil ..... p. 33
- Figura 5.** Leitor óptico da Bio-Manguinhos que mede a reflectância da reação em unidades relativas de luz ..... p. 34
- Figura 6.** Características geoclimáticas de relevo acidentado e afloramentos rochosos das áreas receptivas à leishmaniose visceral americana investigadas no estado do Espírito Santo, Brasil ..... p. 36



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BA	Bahia
BIO-MANGUINHOS	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
CE	Ceará
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CÓR	Córrego
DPP	Plataforma de duplo percurso
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
<i>L.</i>	Leishmania
LACEN ES	Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo
<i>Lu.</i>	Lutzomyia
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
LVC	Leishmaniose visceral canina
MG	Minas Gerais
MS	Mato Grosso do Sul
PA	Pará
PCLV	Programa de Controle da Leishmaniose Visceral
RJ	Rio de Janeiro

RLU	Unidades relativas de luz
SESA	Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo
SRD	Sem raça definida
TMB	Tetrametilbenzidina
TO	Tocantins
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
WHO	World Health Organization

## RESUMO

A leishmaniose visceral é um problema de saúde pública que está presente em 65 países, sendo relatados cerca de 500 mil novos casos anualmente. A expansão geográfica da doença e sua urbanização têm sido relatadas em vários países, inclusive no Brasil. A partir da década de 80, ocorreu de forma mais intensa, a urbanização da leishmaniose visceral americana (LVA) aliada em conjunto a adaptação do vetor *Lutzomyia longipalpis*, acometendo grandes centros urbanos. A presença do *L. longipalpis* no Espírito Santo está associada a um conjunto de características geoclimáticas que define as áreas propícias à reprodução e sobrevivência do vetor. A definição destas variáveis, juntamente a um levantamento entomológico dirigido, possibilitou mapear as áreas receptivas à ocorrência da LVA no estado. Em continuidade às ações de vigilância e a fim de verificar indícios de expansão geográfica da doença, foi realizado um inquérito amostral no reservatório canino, nas áreas receptivas dos municípios de João Neiva, Afonso Cláudio, Rio Bananal, Vila Pavão, Mantenópolis e Santa Teresa. O teste rápido DPP<sup>®</sup> LVC foi adotado como triagem sorológica e o ensaio de ELISA LVC<sup>®</sup> como método confirmatório, ambos da Bio-Manguinhos. Foram investigados 215 cães, sendo que 91,16% dos animais eram nativos das respectivas áreas avaliadas e 92,10% apresentaram-se assintomáticos. Quanto às análises sorológicas, 213 cães apresentaram resultado não reagente na triagem pelo teste rápido DPP<sup>®</sup> LVC. No entanto, as duas amostras soro reagentes na triagem revelaram resultado negativo pelo método de ELISA. Portanto, não foi evidenciada a presença ou vestígio de infecção passada por *Leishmania infantum chagasi*. As áreas receptivas estudadas são localidades rurais que estão fora dos corredores de migração do estado, apesar de serem limítrofes a municípios endêmicos. Os grandes centros urbanos do estado não possuem as características geoclimáticas propícias à ocorrência do vetor da LVA. Assim, no Espírito Santo a expansão geográfica da doença se limitou a áreas rurais, em passado recente, enquanto que, em outros estados brasileiros houve uma intensa urbanização da doença. O monitoramento do reservatório canino deve ser contínuo nos municípios com transmissão da doença, bem como nas áreas receptivas à ocorrência da LVA. O levantamento da fauna flebotomínica e o mapeamento das áreas de risco de transmissão devem ser realizados previamente ao monitoramento do reservatório canino.

**Palavras-chave:** Leishmaniose visceral americana, expansão geográfica, *Lutzomyia longipalpis*, reservatório canino, Espírito Santo.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a public health problem that affects 65 countries, with 500,000 new cases reported annually. The geographical spread of the disease and its urbanization have been reported in several countries, including Brazil. From the 80s, the urbanization of American visceral leishmaniasis form (AVL) was more intense and the adaptation of the *Lutzomyia longipalpis* vector affected large cities and capitals in the Northeast, North, Midwest and Southeast. The presence of *Lu. longipalpis* in the Espírito Santo state is associated with a set of geo-climatic characteristics that defines the suitable areas to vector breeding. Setting these variables along a directed entomological survey made it possible to map the potential areas to the occurrence of AVL in the state. In order to continue the surveillance and to verify geographic disease expansion, a sampling survey was conducted in the canine reservoir in the potential areas of risk of transmission the municipalities of João Neiva, Afonso Claudio, Rio Bananal, Vila Pavão, Mantenópolis and Santa Teresa. The rapid test DPP® LVC was adopted as serological screening and ELISA LVC® test as a confirmatory method, both from Bio-Manguinhos. Out of 215 dogs were investigated, 91.16% were natives from the areas and 92.10% were asymptomatic. Regarding the serological analysis, 213 dogs showed negative result in the rapid screening test DPP® LVC (canine visceral leishmaniasis). However, the two that were reagents in the screening serum samples showed negative results by ELISA. The presence of infection by *L. infantum chagasi* was not demonstrated. The potential transmission risk occurs in rural areas that are out of the corridors of state migration, although bordering the endemic municipalities. The big urban centers of the state lack the geo-climatic characteristics suitable to vector occurrence of AVL. Thus, the geographical spread of the disease in the Espírito Santo state was limited to rural areas in the recent past, while in other states there was an intense urbanization. The monitoring of the canine reservoir should be continued in municipalities with disease transmission, as well as in potential areas to the occurrence of AVL. The survey of sand flies and the mapping of transmission risk areas should be carried before the monitoring of the canine reservoir.

**Keywords:** American visceral leishmaniasis, geographical expansion, *Lutzomyia longipalpis*, canine reservoir, Espírito Santo.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1 Definição da doença</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2 Doença no mundo</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3 Histórico da doença no Brasil</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4 Vigilância da doença</b> .....	<b>21</b>
<b>1.5 Monitoramento do reservatório canino</b> .....	<b>23</b>
<b>1.6 Leishmaniose visceral americana no estado do Espírito Santo</b> .....	<b>24</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>29</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1 Equipe de estudo</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2 Amostra estudada</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3 Amostragem</b> .....	<b>31</b>
<b>4.4 Análise da amostragem</b> .....	<b>32</b>
<i>4.4.1 Coleta e Triagem laboratorial da amostra</i> .....	<b>32</b>
<i>4.4.2 Confirmação laboratorial</i> .....	<b>35</b>
<b>4.5 Comitê de Ética</b> .....	<b>35</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>

<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>8.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Definição da doença

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é causada por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*. É considerada uma enfermidade infecciosa crônica, com formas clínicas envolvendo desde infecções assintomáticas até manifestações clínicas graves, como febre de longa duração e irregular, emagrecimento, hepatoesplenomegalia, anemia, hipergamaglobulinemia, e, finalmente, a evolução ao óbito em mais de 90% dos casos, se o paciente não for submetido ao tratamento específico (BRASIL, 2014).

*Leishmania infantum chagasi* é o agente causador da leishmaniose visceral americana (LVA) (TORRES, 2006). A LV é transmitida por insetos vetores pertencentes à família Psychodidae e gênero *Lutzomyia*. No Brasil, a principal espécie envolvida é *Lu. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e a transmissão ocorre pela picada do flebotomíneo infectado (BRASIL, 2009). *Lu. longipalpis* é encontrada em áreas de peridomicílio, galinheiros e em abrigos de animais, apesar de ser uma espécie primordialmente silvestre (LAINSON & RANGEL, 2005). Marsupial (*Didelphis albiventris*) e as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) são os reservatórios da doença no ambiente silvestre. Na área urbana, a principal fonte de infecção é o cão (*Canis familiaris*) e a enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos da LVA (BRASIL, 2014).

### 1.2 Doença no mundo

A leishmaniose visceral é considerada pela Organização Mundial de Saúde uma das prioridades dentre as doenças tropicais, em decorrência da expansão de sua área de abrangência e do aumento significativo no número de casos. Esta endemia está presente em 65 países, sendo reportados 500 mil novos casos anualmente e cerca de 90% dos casos estão concentrados na Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh e Brasil (WHO, 2001; CONTIJO & MELO, 2004; MAIA-ELKHOURY et al., 2008; BRASIL, 2014). A urbanização e periurbanização da doença têm sido relatadas em alguns países, como Irã, Itália, México, Marrocos e Brasil. Mudanças no ciclo epidemiológico da doença levantam preocupações importantes acerca de novos surtos em áreas

historicamente não endêmicas na Europa e América do Norte, bem como a disseminação da LV para novas localidades em países endêmicos (COSTA et al., 2011).

### **1.3 Histórico da doença no Brasil**

Esta endemia tem uma ampla distribuição em toda a América Latina, estendendo-se do México à Argentina (LAINSON & RANGEL, 2005). Dos casos relatados nas Américas, o Brasil é responsável por aproximadamente 90%, sendo distribuídos em 21 Unidades da Federação e atingindo as cinco regiões geopolíticas (MAIA-ELKHOURY et al., 2008; BRASIL, 2014). O primeiro caso da doença no país foi registrado em 1913, em material de necropsia de um paciente oriundo de Boa Esperança, no estado do Mato Grosso (MIGONE, 1913). Em um estudo de necropsias realizado com a intenção de definir a distribuição da febre amarela no Brasil, foram diagnosticados *post-mortem* 41 casos positivos para *Leishmania*, em fragmentos de vísceras de indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste (PENNA, 1934). Posteriormente, o flebotômíneo *Lutzomyia longipalpis* foi incriminado como espécie vetora e em seguida foram descobertos os primeiros casos da infecção em cães (BRASIL, 2006).

Até o início de 1950, havia 379 casos de LVA relatados no país e acreditava-se que a transmissão era exclusivamente em áreas rurais (CHAGAS & CHAGAS, 1938; ALENCAR, 1983; ALENCAR & DIETZE, 1991; MAIA-ELKHOURY et al., 2008). Entretanto, em 1953, houve um surto da doença na cidade de Sobral, Ceará, levando a mais de 100 óbitos. A grande maioria dos pacientes foi infectada em áreas rurais, porém, em uma pequena parcela, a transmissão ocorreu na área urbana do município de Sobral (ALENCAR, 1983; LAINSON & RANGEL, 2005).

Anteriormente à década de 1950, a ocorrência da doença estava limitada às áreas rurais, pequenas localidades urbanas, e até em cidades maiores, como Sobral e Aracati no estado do Ceará, Jacobina na Bahia e Santarém no Pará (COSTA, 2008). Entretanto, a partir das décadas de 80 e 90, sua urbanização foi estabelecida em grandes metrópoles, em especial nas periferias, com registro de surtos frequentes. A transmissão da LVA passou a acontecer mesmo em áreas totalmente urbanizadas, disseminando-se para outras cidades do Nordeste e para as regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste. Atualmente a doença persiste ainda em áreas rurais e em



pequenas cidades, embora se observe notável contraste entre a ecologia da forma clássica em comparação com a nova apresentação da doença urbana (COSTA et al., 2011).

Em áreas endêmicas de LVA, a seca e a fome levaram à migração de pessoas e cães infectados para as cidades, culminando com a disseminação da doença do interior para os grandes centros urbanos. A alta incidência da LVA nas cidades está localizada nas periferias e bairros pobres, onde a maioria dos imigrantes rurais está concentrada. Associados às condições socioeconômicas precárias, surgem fatores que favorecem a transmissão da LVA, como a estrutura deficiente das casas, locais favoráveis à procriação de flebotomíneos, maior proximidade com cães mal cuidados e desnutridos. Entretanto, este fato não exclui a transmissão em áreas urbanas com níveis socioeconômicos melhores (CONTIJO & MELO, 2004; COSTA et al., 2011).

A urbanização da LVA nos anos 80 foi multifocal, começando em Teresina e São Luís, distantes aproximadamente 400 km. Quase um ano depois, a epidemia atingiu Corumbá e Montes Claros, separadas por uma distância de mais de 1.000 km, em seguida alcançando Natal, Belo Horizonte e Campo Grande e, mais recentemente, Araçatuba. Distinguindo-se das demais cidades, Araçatuba e Campo Grande não apresentaram um crescimento urbano rápido, nem favelas no entorno, de modo que, nessas cidades, a epidemia não se limitou à periferia. Em contraposição, várias outras cidades com bolsões de pobreza nas periferias, como Recife e Salvador, não foram atingidas pela epidemia, mesmo apresentando fluxo migratório intenso (COSTA, 2008). Os dados epidemiológicos destacam também os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Santarém (PA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO). Portanto, a LVA encontra-se em franca expansão para grandes centros urbanos que apresentam aspectos geográficos, climáticos e sociais distintos (BRASIL, 2014).

A região Sudeste do país demonstrou um aumento no padrão endêmico rural da LVA a partir da década de 70, com envolvimento dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, ao longo do vale do Rio Doce. O estado do Rio de Janeiro era considerado livre da doença até 1977, quando foi detectado o primeiro caso autóctone na área periurbana da capital, Rio de Janeiro. Em 2006, já havia 87 casos diagnosticados e a taxa de letalidade era de 10,4%. Inquéritos sorológicos

abrangentes foram realizados em cães, evidenciando que a leishmaniose visceral humana emergiu quase simultaneamente com os casos caninos da doença (MARZOCHI et al., 2009).

Um dado relevante que coincidiu com o primeiro caso humano de LVA na periferia do Rio de Janeiro foi um desmatamento para instalação de linhas elétricas, no período de 1972 a 1979. As empreiteiras recrutaram trabalhadores de diversos locais, incluindo o Nordeste, provavelmente introduzindo homens e animais infectados procedentes de antigas áreas endêmicas (MARZOCHI et al., 2009).

A ocorrência de LVA no estado do Rio de Janeiro ficou limitada à capital até 2011, ano em que foi diagnosticado o primeiro caso autóctone na cidade de Volta Redonda, caracterizando a expansão geográfica da endemia para o sul do estado (SANGENIS et al., 2014).

No estado do Piauí a presença da doença é observada desde 1934, porém se mostrou mais expressiva na década de 70. A partir da década de 80 uma epidemia se alastrou em vasta área do território estadual, concentrando-se principalmente na área urbana da capital Teresina, com mais de 1.000 casos relatados nos seis primeiros anos. A urbanização caótica influenciou diretamente e fez emergir a LVA no espaço urbano de Teresina, tendo como fatores concorrentes o fluxo migratório intenso dentro da própria cidade, além de indivíduos procedentes de áreas rurais endêmicas. Em Teresina, a doença tem demonstrado picos epidêmicos com ciclos de 10 anos evidentes em 1983/84, 1993/94 e 2003/2004. Este fato pode ser explicado pelo acúmulo de indivíduos suscetíveis e pela frequência da ocorrência de desastres naturais, como seca e enchentes, determinando fluxo migratório e agravamento das condições socioeconômicas da população afetada. Assentamentos próximos de áreas florestais, precárias condições de saneamento e acúmulo de matéria orgânica propiciam a criação de flebotomíneos em áreas urbanas. Na periferia da cidade, os galinheiros constituem fontes atrativas de alimento para os flebotomíneos e possibilitam um contato mais próximo com o homem, representando um fator de risco para a infecção (DRUMON & COSTA, 2011). O cão é considerado a principal fonte de infecção da doença na área urbana. No entanto, a eliminação de cães soropositivos não tem interferido na incidência dos casos humanos em Teresina (ARAGÃO et al., 2008; DRUMON & COSTA, 2011).

Em São Luís, capital do estado do Maranhão, a doença foi identificada em 1982, acometendo quatro crianças de uma mesma família, na periferia da cidade. Em seguida, instalou-se uma situação epidêmica, com expansão da doença para outras áreas da ilha de São Luís, com um total de 39 casos autóctones de LVA (COSTA et al., 1995; SILVA, 1986). Até o ano de 1984, 58,5% dos casos registrados eram procedentes da ilha de São Luís. Medidas de controle foram adotadas, como captura e eliminação dos cães soropositivos, dedetização intra e peridomiciliar nas áreas de risco e tratamento dos casos humanos, com conseqüente declínio da doença. Entretanto, a partir de 1988, houve franca expansão da doença, principalmente em áreas suburbanas. Entre os fatores desencadeantes do processo, cita-se a migração de indivíduos de outros estados nordestinos endêmicos para a doença, o fluxo migratório para a área urbana, em decorrência da seca que castigava a região, e a deficiência no sistema de saúde, em relação às ações de vigilância (ALENCAR, 1961; SILVA, 1986; COSTA et al., 1990). Além da domiciliação do vetor *Lu. longipalpis*, em decorrência da destruição de ecossistemas, contribuíram para o aumento na incidência da doença a arborização abundante em quintais de residências, oferta de fonte alimentar humana e animal, acúmulo de lixo e presença de abrigos de animais silvestres dentro do perímetro urbano (COSTA et al., 1995).

Na década de 70, a área metropolitana de Belo Horizonte teve um importante período de expansão em decorrência do processo de industrialização. A população aumentou significativamente, surgindo favelas que continuam em franca expansão até os dias atuais. Em 1989, foi confirmado o primeiro caso humano de LVA em Sabará, cidade satélite localizada na região metropolitana de Belo Horizonte. Em 1994, foi relatado o primeiro caso autóctone da doença em Belo Horizonte, próximo do limite com a cidade de Sabará. Seguiram-se ainda novos relatos, neste mesmo ano, totalizando 35 casos de LVA na capital mineira. No período de 1994 a 1997, foram confirmados 169 casos humanos da doença (OLIVEIRA et al., 2001). As medidas de controle adotadas reduziram a incidência da doença humana, mas foram ineficientes na eliminação da transmissão e na prevenção de novas epidemias. Entre os fatores determinantes para a urbanização da LVA nessa área, pode-se citar a formação de aglomerados populacionais em condições socioeconômicas e de saneamento precárias, possibilitando que a epidemia se disseminasse rapidamente na cidade e áreas no entorno (OLIVEIRA et al., 2001; PROFETA DA LUZ et al., 2001; CONTIJO & MELO, 2004).

Um estudo envolvendo a distribuição espacial da LVA em Belo Horizonte, no período de 1994 a 1997, demonstrou forte correlação linear entre a incidência da doença humana e a prevalência da infecção canina em períodos prévios. O estudo também evidenciou um agrupamento espaço-temporal de casos humanos, de modo que a ocorrência de um caso humano na residência aumentava a chance de adoecimento de novas pessoas na mesma casa, nos três meses subsequentes (OLIVEIRA et al., 2001).

Em Mato Grosso do Sul, a LVA permaneceu restrita aos municípios de Corumbá e Landário, no extremo oeste do estado, por um longo período entre 1913 e 1993. A partir de 1994, a doença se disseminou de Corumbá para Três Lagoas, ao leste do estado. Após 1998, os municípios de Campo Grande, Três Lagoas e Aquidauana apresentaram vários casos humanos da doença e alta taxa de mortalidade (ANTONIALLI et al., 2007). No período de 2001 a 2006, houve grande expansão da doença em Campo Grande, representando 49% dos casos notificados no estado. Nesse período, foram notificados 577 casos, com incidência de 20,98 casos para 100.000 habitantes e uma taxa de letalidade de 8% (BOTELHO & NATAL, 2009).

Grandes impactos ambientais ocorreram para favorecer a urbanização da doença no estado do Mato Grosso do Sul: (i) a construção da estrada de ferro, de 1909 a 1952; (ii) a rodovia federal BR-262, concluída na década de 80; (iii) a construção do gasoduto Bolívia-Brasil, em que muitos trabalhadores da área endêmica de Corumbá migraram para outras cidades e estados vizinhos (ANTONIALLI et al., 2007).

Em relação aos insetos vetores, foram realizadas, a partir de 1999, as primeiras capturas de flebotomíneos em Campo Grande, sendo que *Lu. longipalpis* representou 5,7% dos exemplares capturados. Mesmo que *Lu. longipalpis* se apresente como a principal espécie vetora da doença no país e também no estado de Mato Grosso do Sul, admite-se que em Corumbá, *Lu. cruzi* participe ativamente na transmissão da LVA (ALMEIDA et al., 2013). Ao longo dos anos, tem sido demonstrado aumento da densidade dessa espécie vetora e a sua adaptação ao ambiente urbano, coincidindo com a ocorrência de casos humanos e caninos na cidade (BOTELHO & NATAL, 2009). Almeida e colaboradores (2013), por sua vez, demonstraram uma ampla distribuição de *Lu. longipalpis* no estado, com densidades mais elevadas após o período chuvoso. Dentre as variáveis climáticas, a sazonalidade na temperatura e a média anual de precipitação

foram as que mais influenciaram. O modelo preditivo indicou que, em quase todo o território estadual, há potencial para ocorrência de LVA, com elevado grau de sobreposição entre os modelos para *Lu. longipalpis* e os casos da doença.

No estado de São Paulo, os casos de LVA registrados até 1997 eram importados de outras regiões brasileiras. Naquela data, se registrou a presença de *Lu. longipalpis* na zona urbana de Araçatuba, noroeste do estado, seguindo-se a implantação da enzootia canina, em 1998, e, já no ano seguinte, os primeiros casos humanos autóctones (CAMARGO-NEVES et al., 2001; COSTA, et al., 1997; CARDIM, et al., 2013). Desde então, a endemia vem se expandindo por diversos municípios no estado, com registro de 1.919 casos e 169 óbitos até 2011. A expansão apresentou um eixo principal de disseminação na direção noroeste-sudeste, seguindo a construção do Gasoduto Bolívia-Brasil. As maiores taxas de incidência e mortalidade ocorreram na região de Araçatuba, onde as características climáticas com temperaturas médias mais altas e precipitação pluviométrica mais baixa favorecem a disseminação da doença. Porém, sua expansão para regiões menos quentes e mais úmidas mostra que o vetor adaptou-se a situações climáticas variadas (CARDIM et al., 2013).

Diversos fatores são apontados para explicar o fenômeno de expansão geográfica da doença no estado de São Paulo, como os processos migratórios, o fluxo de pessoas pelas rodovias e ferrovias que interligam as regiões brasileiras e seus centros urbanos, a urbanização e as condições precárias de saneamento, permitindo a adaptação do vetor (CARDIM et al., 2013). Ressalta-se também a mão de obra migrante para o plantio de cana-de-açúcar, em geral proveniente de região Nordeste, endêmica para a doença (BARATA, 2000; CARDIM et al., 2013). A migração de indivíduos provenientes de Minas Gerais também é plausível, desde que a detecção dos primeiros casos caninos e humanos em Araçatuba coincidiu com a expansão da doença na região metropolitana de Belo Horizonte (LUZ et al., 2001; CAMARGO-NEVES et al., 2001; CARDIM et al., 2013). Parece fato notório que o transporte de cães infectados provenientes das várias regiões brasileiras com transmissão de LVA contribuiu para a introdução da endemia no estado de São Paulo (MESTRE & FONTES, 2007; CARDIM, et al, 2013).

Em 2003, houve uma epidemia da LVA no município de Palmas, capital do estado de Tocantins, no Nordeste do Brasil (VILELA et al., 2011). No mesmo ano, o estado do Tocantins

registrou a mais alta prevalência da doença no país, com 20 casos por 100.000 habitantes. Em 2008 e 2009, foram registrados índices de 36,8 e 33 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (BIGELI et al., 2011; VILELA et al., 2011). A disseminação da doença na área parece estar associada ao impacto de mudanças ambientais, a uma alta prevalência de cães infectados e à pobreza da população local. A presença de *Lu. longipalpis* em galinheiros também teve importância epidemiológica na expansão da endemia (BIGELI et al, 2011).

Atualmente, a distribuição geográfica da doença no Brasil se estende desde o norte do Amazonas à região Sudeste, passando pelo Centro-Oeste (MARZOCHI et al., 2009). No entanto, em 2012, a região Nordeste continuava responsável por 43,1% dos casos registrados no território nacional. No período de 2003 a 2012, foi observada uma média anual de 3.565 casos de LVA no país e incidência de 1,9 casos por 100.000 habitantes. No mesmo período, a letalidade média foi de 6,9%, atingindo os percentuais de 8,5% no ano de 2003 e de 8,2 % em 2004. A doença é mais frequente em indivíduos com idade inferior a 10 anos, representando 41,9%, e o sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado, correspondendo a 62,8% (BRASIL, 2014).

#### **1.4 Vigilância da doença**

Para traçar as diretrizes para as ações de prevenção e controle da LVA, o Ministério da Saúde estabeleceu o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV). A vigilância epidemiológica compreende um dos componentes deste programa e visa a reduzir as taxas de letalidade e grau de morbidade utilizando como estratégias o diagnóstico e o tratamento precoce dos casos, bem como a diminuir os riscos de transmissão da doença (BRASIL, 2006). Segundo Palatnik-de-Souza e colaboradores (2001), a redução tanto da presença do vetor como do reservatório canino nas áreas endêmicas deve ter um impacto lógico na redução de casos humanos da doença. Acrescentam, ainda, que o Brasil é o único país endêmico para LVA que adota um programa de controle sistemático desde 1980. Porém, o controle vetorial e de reservatórios representam os maiores desafios, uma vez que envolvem alto custo de execução, há dificuldades operacionais envolvidas e são necessários mais conhecimentos acerca do comportamento do vetor no ambiente urbano (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Conforme os critérios do Ministério da Saúde, os municípios silenciosos são aqueles onde não há registro de casos autóctones de LVA em seres humanos e em cães nos últimos três anos, sendo classificados segundo a vulnerabilidade e a receptividade. A vulnerabilidade de um município é definida pela possibilidade da introdução ou circulação de fontes de infecção de *L. infantum chagasi* e que atende pelo menos a um dos seguintes critérios: possuir fluxo migratório intenso; ser contíguo a município com transmissão de LVA canina ou humana; integrar um mesmo eixo viário dos municípios com transmissão. A receptividade é definida pela confirmação da presença do vetor *Lu. longipalpis* ou *Lu. cruzi*, após a realização do inquérito entomológico (BRASIL, 2014).

A investigação entomológica tem como finalidade verificar a presença do vetor *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi* em municípios silenciosos e com transmissão da LVA e conhecer a dispersão do vetor no espaço geográfico. Associado a isso, o monitoramento entomológico permite conhecer a distribuição sazonal e abundância relativa das espécies vetoras, visando a estabelecer o período mais favorável para a transmissão da doença, direcionando as ações de prevenção e controle químico do vetor. (BRASIL, 2014). *Lu. longipalpis* ocorre em áreas com diferentes condições climáticas, variando desde áreas semiáridas, no bioma da caatinga, até áreas mais úmidas, além de apresentar boa adaptabilidade a diferentes habitat e mudanças ambientais (ALMEIDA et al., 2013). Ao longo dos últimos 30 anos, adicionalmente à expansão geográfica da LVA, essa espécie vetora tem mostrado adaptação a ambientes urbanos e periurbanos, com tendência a invadir o domicílio. Consequentemente, o número de cidades com casos reportados de LVA pelo Brasil tem aumentado de forma constante, já que a população brasileira está concentrada nas áreas urbanas (MARZOCHI et al., 2009; COSTA, 2011).

Quanto à vigilância do cão, considera-se caso canino suspeito todo cão proveniente de área endêmica ou onde esteja ocorrendo surto, com manifestações clínicas compatíveis com a leishmaniose visceral canina (LVC), como febre irregular, apatia, emagrecimento, descamação furfurácea e úlceras na pele, conjuntivite, fezes sanguinolentas, crescimento exagerado das unhas, entre outros (BRASIL, 2014). Como a LVA pode ter uma longa evolução assintomática em cães, mesmo durante este período, o cão soropositivo é uma fonte de infecção para os insetos

vetores (OLIVEIRA et al., 2001; PALATNIK-DE-SOUZA et al., 2001; CONTIJO & MELO, 2004; BRASIL, 2011).

O transporte de cães infectados provenientes de áreas com transmissão de LVA provavelmente contribuiu para a introdução e expansão da doença para novas áreas. Este fluxo pode envolver até mesmo cães assintomáticos escapando da eutanásia por meio dos seus proprietários (CARDIM et al., 2013).

### **1.5 Monitoramento do reservatório canino**

O monitoramento do reservatório canino deve ser realizado pelo inquérito sorológico, censitário ou amostral, nos municípios silenciosos e receptivos à LVA e nos municípios com transmissão moderada e intensa (BRASIL, 2014). O PVCL recomenda o ensaio imunocromatográfico como teste de triagem e o ensaio imunoenzimático (ELISA) como método confirmatório (BRASIL, 2011; BRASIL, 2014). Trata-se de um novo protocolo diagnóstico que envolve o teste rápido DPP<sup>®</sup> LVC do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) que detecta anticorpos específicos contra as proteínas recombinantes K28, é uma junção das proteínas recombinantes rK39 e rK26 de *L. infantum chagasi*, em uma plataforma de duplo percurso (DPP). O teste pode ser realizado em campo, permitindo em até 20 minutos um resultado com alta sensibilidade, não prejudicando o desempenho relacionado à especificidade. Em estudo realizado em área endêmica no estado do Espírito Santo, o teste rápido DPP<sup>®</sup> LVC apresentou potencial aplicabilidade em campo para diagnosticar animais doentes sintomáticos, com sensibilidade de 98% e especificidade de 96%. Porém, a sensibilidade dentre os cães infectados assintomáticos foi de 47%, assim, sugerindo que os anticorpos contra as proteínas rK39 e rK26 podem ser marcadores de doença ativa (GRIMALDI et al., 2012).

O teste de ELISA possibilita o processamento de um número maior de amostras com o fornecimento de resultados automatizados, eliminando a subjetividade da leitura. Este teste consiste na reação de anticorpos presentes no soro ou plasma de cães, com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* obtidos a partir de *cultura in vitro* e previamente adsorvidos nos orifícios da microplaca, fase sólida (BRASIL, 2011). Segundo dados do



fabricante Bio-Manguinhos, o ELISA apresentou sensibilidade de 94,54% e especificidade 91,76% no soro, quando comparado ao método de imunofluorescência indireta.

### **1.6 Leishmaniose visceral americana no estado do Espírito Santo**

A LVA teve origem no Nordeste do país e veio se alastrando pelos estados do Centro-Oeste e Sudeste, atingindo alguns municípios do vale do Rio Doce, em Minas Gerais, até chegar às fronteiras do Espírito Santo. Em 1966, foram relatados os cinco primeiros casos humanos da doença no estado do Espírito Santo, quatro destes no município de Baixo Guandu e um no município de Colatina. Ambos os municípios estão situados no vale do Rio Doce e servidos pela estrada de ferro Vitória Minas. Na mesma época, também foi relatado o primeiro caso canino de LVA no estado, em uma cadela que habitava a mesma residência do doente, em Colatina (MARTINS et al., 1968). Na década de 70, a doença parece ter ficado silenciosa, não chamando a atenção dos responsáveis pelos serviços de saúde, em nível municipal e estadual. Já nas décadas de 80 e 90, a endemia se disseminou no estado, sendo registrados 110 casos de LVA, envolvendo os municípios de Pancas, Águia Branca, São Gabriel da Palha, Nova Venécia, Governador Lindenberg, Baixo Guandu, Itaguaçu, Itarana e São Roque do Canaã (figura 1), situados no vale do Rio Doce, além do município de Água Doce do Norte (SESA, 2004; FALQUETO et al., 2009). A área de ocorrência da LVA no Espírito Santo estende-se pelas regiões noroeste e centro-oeste do estado, apresentando características geográficas e climáticas representadas por relevo acidentado, temperatura com média anual elevada e pouca chuva (PINTO et al., 2012).

Dentre as estratégias de controle da LVA, o combate ao vetor é considerado uma ação primordial nas áreas de ocorrência da doença. Diante da necessidade de conhecimento da fauna flebotomínica em áreas com relatos de casos autóctones de LVA no estado do Espírito Santo, Pinto e colaboradores (2012) investigaram a presença de *Lu. longipalpis* na região endêmica do estado, representada pelo Corredor Central da Floresta Atlântica. No período de 1989 a 2003, foram capturados flebotomíneos em todos os municípios endêmicos, exceto Nova Venécia. O vetor da LVA, *Lu. longipalpis*, foi encontrado em 79 localidades distribuídas em nove municípios com casos autóctones da doença. Os municípios de Pancas e Baixo Guandu foram os responsáveis pela maior densidade vetorial (PINTO et al., 2012). O estudo mostrou uma

abundância da espécie vetora no ambiente peridomiciliar quando comparado ao ambiente de floresta, indicando a ocorrência da transmissão da *L. infantum chagasi* no peridomicílio (PINTO et al., 2012).

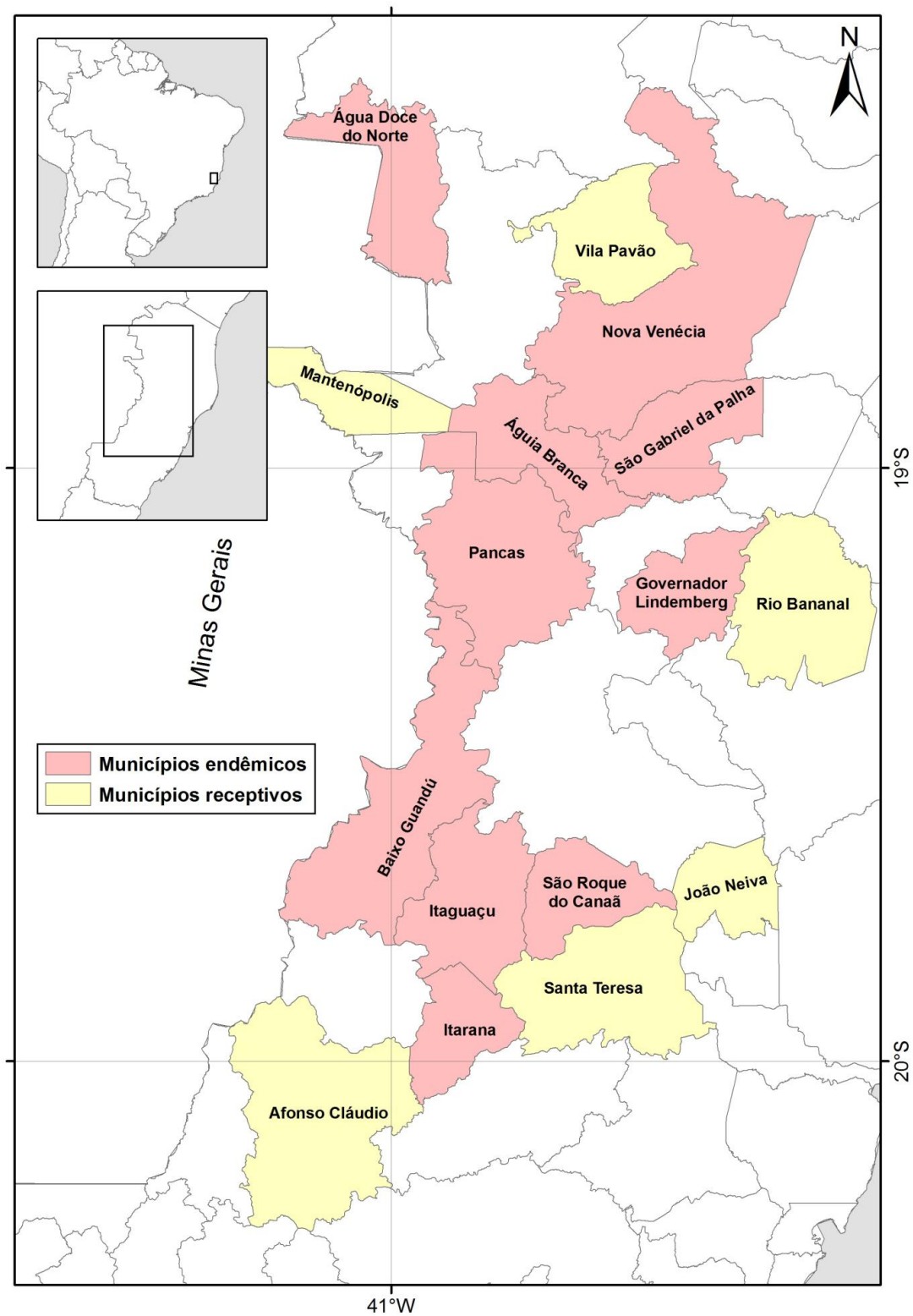
O levantamento entomológico mostrou um padrão similar de distribuição de *Lu. longipalpis* e dos casos autóctones de LVA sinalizando a importância desse flebotomíneo na transmissão da doença no estado. As áreas de ocorrência de *Lu. longipalpis* estão situadas na região do vale do Rio Doce, junto à divisa de Minas Gerais, portanto distantes do Oceano Atlântico. As características geoclimáticas da região favorecem a ocorrência do vetor, uma vez que há menor influência da corrente de ar úmida, com conseqüente clima seco, média anual de chuva menor que 1.000 mm e temperatura anual média de 28°C (PINTO et al., 2012).

De encontro a estes dados, na porção centro-sul do estado, foram detectados três casos humanos autóctones de LVA nos municípios de Vargem Alta e de Rio Novo do Sul, localidades com características geográficas e climáticas diversas daquelas encontradas nas áreas endêmicas do estado. Barreiras geoclimáticas isolam estes municípios das áreas endêmicas no estado, dificultando a dispersão do vetor. A investigação epidemiológica não evidenciou qualquer indício de migração de indivíduos doentes de áreas endêmicas para estas localidades. O vetor *Lu. longipalpis* não foi encontrada na área, sugerindo uma dissociação entre a ocorrência de LVA e a presença do vetor responsável pela transmissão da doença. As únicas espécies capturadas nas três localidades que envolveram os casos humanos foram *Nyssomyia intermedia* e *Micropygomyia schreiberi*. A fauna flebotomínica identificada foi semelhante a encontrada em áreas de transmissão de leishmaniose tegumentar americana (PINTO et al., 2010).

Diante do processo de expansão geográfica da LVA no estado do Espírito Santo, Falqueto e colaboradores (2001) conduziram um estudo que avaliou as variáveis climáticas e geográficas presentes nas áreas endêmicas. Utilizando a ferramenta de geoprocessamento, a partir de um sistema de informações geográficas, os autores definiram as características geoclimáticas das áreas com potencial para ocorrência de *Lu. longipalpis* no estado: (i) relevo acidentado, (ii) altitude de até 450 metros acima do nível do mar, (iii) clima seco e (iiii) afloramentos rochosos.

Com a identificação das áreas propícias à ocorrência da doença, Pinto (2009) realizou um levantamento entomológico dirigido, a fim de fazer inferências sobre a influência das variáveis geoclimáticas na distribuição potencial de *Lu. longipalpis* no estado. O inseto foi encontrado em 84 localidades das 133 investigadas, envolvendo os 10 municípios em que ocorreram os casos humanos de LVA e municípios vizinhos não endêmicos. O levantamento entomológico dirigido possibilitou a identificação dos municípios de Afonso Cláudio, João Neiva, Rio Bananal, Vila Pavão, Mantenópolis e Santa Teresa como áreas receptivas à ocorrência da LVA, já que têm a presença do vetor, porém sem registros de casos humanos da doença (figura 1) (PINTO, 2009).

**Figura 1.** Municípios endêmicos e receptivos à ocorrência de leishmaniose visceral americana no estado do Espírito Santo, Brasil.



## 2 JUSTIFICATIVA

A LVA é um problema de saúde pública que teve início no Brasil em 1913, com o relato do primeiro caso da doença. A trajetória da LVA no país evidencia um panorama de expansão geográfica da região Nordeste para as demais regiões. O processo de urbanização da doença se intensificou a partir da década de 80, envolvendo capitais do Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste.

No estado do Espírito Santo, o primeiro caso humano de LVA foi descrito em 1966, com posterior relato de 110 casos nos anos 80 e 90. A doença também se expandiu geograficamente, atingindo atualmente 10 municípios. Já os municípios de Afonso Cláudio, João Neiva, Mantenópolis, Rio Bananal, Santa Teresa e Vila Pavão foram apontados como áreas receptivas à LVA, a partir do levantamento entomológico dirigido, orientado por uma base de dados georreferenciados que identificava variáveis geográficas e climáticas propícias à ocorrência do vetor. Trata-se de áreas contíguas aos municípios endêmicos de LVA no estado, potencializando o risco de expansão geográfica da doença a partir da migração de indivíduos ou cães infectados para os municípios receptivos.

O controle da população canina e do agente transmissor são os dois pilares que sustentam as ações de vigilância epidemiológica visando a diminuir o risco de transmissão da LVA, mas representam grandes desafios, principalmente no que se refere ao monitoramento do reservatório canino, que deveria ser realizado anualmente para prevenir o surgimento de casos de LVA nas áreas silenciosas e receptivas. Contudo, no estado do Espírito Santo, somente nos últimos anos se tomou conhecimento das novas áreas de ocorrência do vetor, de modo que a situação epidemiológica da LVA nessas áreas ainda permanece desconhecida. O presente projeto propõe-se a investigar a infecção canina nos municípios receptivos para avaliar o comportamento da doença no território estadual.

### **3 OBJETIVO**

- Investigar indícios de expansão geográfica da LVA, por meio de inquérito sorológico canino em seis municípios receptivos à doença, no estado do Espírito Santo.
- Avaliar os fatores determinantes da expansão geográfica da LVA no estado do Espírito Santo.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Equipe do estudo**

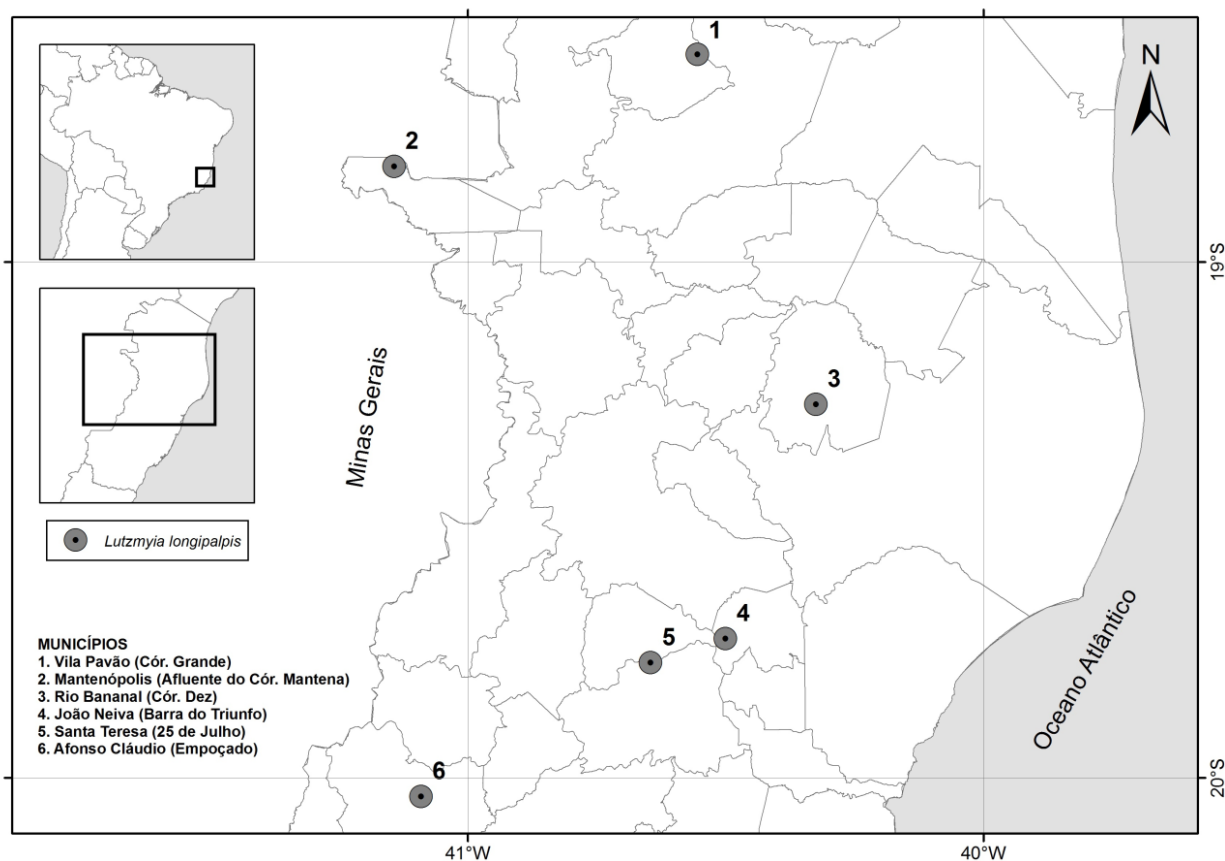
Contou-se com a participação da Unidade de Medicina Tropical e Departamento de Patologia/ setor de Parasitologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), do Núcleo de Entomologia e Malacologia da Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo (NEMES/SESA), das Secretarias Municipais de Saúde dos municípios investigados, do Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo (LACEN ES) e do Ministério da Saúde para a execução deste estudo.

A pesquisa em campo envolveu também profissionais das Secretarias Municipais de Saúde das áreas receptivas à LVA.

### **4.2 Amostra estudada**

Este estudo foi desenvolvido em áreas à LVA, com presença do vetor *Lu. longipalpis*, sem registros de casos humanos da doença, compreendendo os municípios de João Neiva (Barra do Triunfo), Afonso Cláudio (Empoçado), Rio Bananal (Córrego Dez), Vila Pavão (Córrego Grande), Mantenópolis (Afluente do Córrego Mantena) e Santa Teresa (25 de Julho) (figura 2). Os trabalhos de campo foram executados no período de março de 2013 a junho de 2014.

**Figura 2.** Municípios receptivos à ocorrência da leishmaniose visceral americana no estado do Espírito Santo, Brasil, investigados no estudo.



### 4.3 Amostragem

A maioria dos serviços de vigilância das Secretarias Municipais de Saúde possui um censo canino desatualizado. Diante da falta de informação precisa quanto à população canina de cada localidade, utilizou-se como base de dados o conhecimento prévio de que nas áreas rurais há uma proporção de um cão para cada quatro habitantes (1:4). Levou-se em conta a população humana estimada nas localidades de Barra do Triunfo, Empoçado, Córrego Dez, Córrego Grande, Afluente do Córrego Mantena e 25 de Julho e o intuito de se investigar, de forma aleatória pelo menos 50% da população de cada localidade. No momento da coleta dos dados e da amostra biológica, foram analisados os sinais clínicos de doença nos cães, além da cor, raça, idade e origem do animal. O porte do animal, a perda de peso e a anemia foram analisados de forma subjetiva por meio da altura, peso e mucosa ocular.



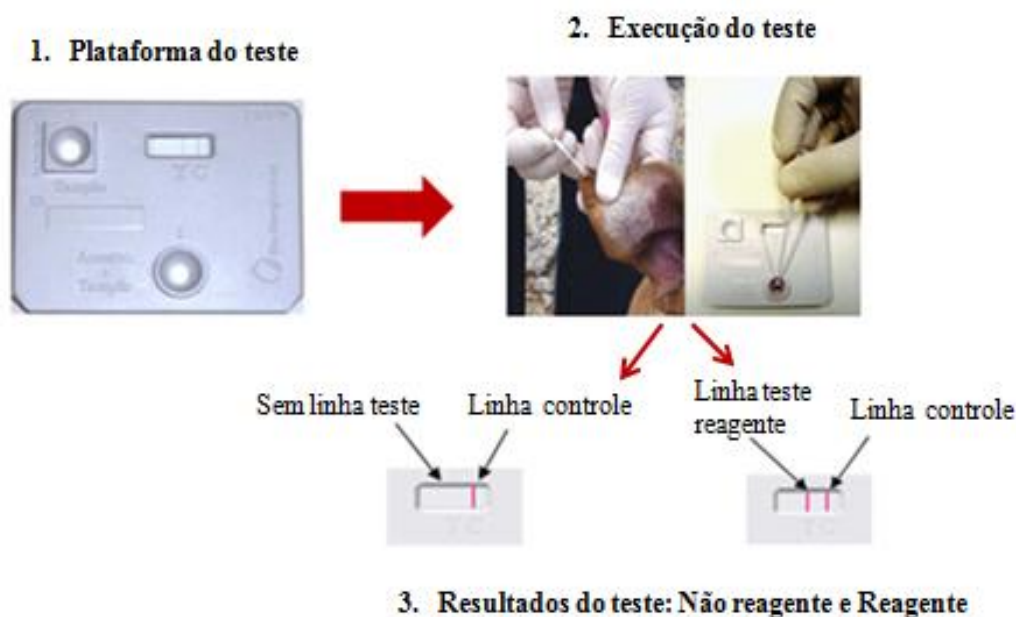
#### 4.4 Análise da amostragem

Para realização deste trabalho foram utilizadas as informações do Programa de Vigilância e Controle das Leishmanioses do Ministério da Saúde que recomenda os seguintes métodos para os inquéritos sorológicos caninos da LVA: o teste rápido imunocromatográfico como teste de triagem e o teste de ELISA como método confirmatório (BRASIL, 2014).

##### 4.4.1 Coleta e Triagem laboratorial da amostra

O ensaio imunocromatográfico utilizado como método de triagem das análises sorológicas do inquérito canino amostral foi o teste rápido DPP<sup>®</sup> LVC, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (figuras 3 e 4).

**Figura 3.** Teste rápido DPP<sup>®</sup> LVC, envolvendo a plataforma do teste, os procedimentos para execução do teste e os possíveis resultados.



(Fonte: Fabricante do DPP<sup>®</sup> LVC, Bio-Manguinhos)

**Figura 4.** Coleta de sangue total de cães investigados para a análise laboratorial de triagem, pelo teste rápido DPP® LVC, Bio-Manguinhos, nas áreas receptivas à presença da leishmaniose visceral americana, investigadas pelo estudo no estado do Espírito Santo, Brasil.



Os procedimentos realizados seguiram as instruções do fabricante. Para obtenção do sangue total realizou-se uma punctura na orelha dos cães com lanceta. O teste possui uma plataforma de duplo percurso com duas tiras de nitrocelulose conectadas em formato de “T” que permite uma distribuição independente da amostra e dos reagentes para detecção de anticorpos na amostra. O teste requer 5µl de amostra de soro, plasma ou sangue total e duas gotas de tampão do kit, sendo adicionadas em sequência à amostra. A amostra diluída migra em direção a segunda tira, contendo uma linha controle e uma linha teste. Na linha teste, como uma banda separada, as proteínas K28, junção das proteínas recombinantes rK39 e rK26, são impregnadas na tira de nitrocelulose. Acrescentou-se quatro gotas de tampão na área do conjugado, partículas de ouro

coloidal liofilizado aliado à proteína A/G, facilitando sua migração entre a segunda tira e a área do teste. Caso haja presença de anticorpos na amostra canina, a proteína A do conjugado se liga a porção constante Fc dos anticorpos que se ligarão aos antígenos impregnados na linha teste, criando um imunocomplexo com coloração visível. Nenhuma banda é visível na área do teste em caso de ausência de anticorpos específicos. Na medida em que as partículas de ouro coloidal continuam migrando pela segunda tira, elas se ligam a um anticorpo de captura impregnado na linha controle e uma banda marrom similar é formada. Tal fato ocorre independente da presença de anticorpo específico para K28 na amostra teste e, como controle positivo, certificar um funcionamento adequado dos imunorreagentes do teste. A leitura visual do teste foi realizada por dois profissionais independentes, 15 minutos após a adição das quatro gotas de tampão na área do conjugado (GRIMALDI et al., 2012). Adicionalmente, utilizou-se um equipamento de leitor óptico que mede a reflectância em unidades relativas de luz (RLU) (figura 5). A escala relativa de intensidade de reação demonstrada por GRIMALDI e colaboradores (2012) corresponde a: ausência de banda (0.86 (0.10-2.78)), banda fraca (3.56 (2.13-4.90)), banda leve (7.45 (5.10-10.47)), banda moderada (32.69 (17.98-32.90)) e banda intensa (53.72 (29.37-81.10)). O valor do limiar de reatividade adotado foi de 3.0 RLU (GRIMALDI et al., 2012).

Os testes foram fornecidos pelo Ministério da Saúde.

**Figura 5.** Leitor óptico da Bio-Manguinhos que mede a reflectância da reação em unidades relativas de luz.



#### 4.4.2 Confirmação laboratorial

Utilizou-se o kit ELISA LVC<sup>®</sup>, Bio-Manguinhos, como método confirmatório para as amostras soropositivas. O teste consiste na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasma de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* obtidos a partir de *cultura in vitro* e previamente adsorvidos nos orifícios da microplaca, fase sólida. Primeiramente, adicionaram-se na microplaca os soros controle positivo, negativo e as amostras devidamente diluídas. As amostras que possuíam anticorpos específicos se ligavam aos antígenos de fase sólida. Na etapa seguinte, adicionou-se um conjugado específico anti-imunoglobulina canina IgG marcado com a enzima peroxidase. Na presença de anticorpos específicos, ocorria a ligação conjugado-anticorpo, evidenciada com a adição da substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB). A peroxidase reduz o peróxido de hidrogênio e leva à oxidação do TMB, formando um composto solúvel de coloração azul turquesa. Posteriormente, adicionou-se o ácido sulfúrico que interrompe a reação e apresenta coloração amarela, caracterizando um teste reagente. Portanto, nos orifícios em que não havia anticorpos específicos das amostras, não se desenvolvia a cor amarela e os soros eram considerados não reagentes. Já nos orifícios em que havia anticorpos específicos das amostras, a cor amarela aparecia, sendo o soro considerado reagente. Os resultados foram avaliados por meio de um espectrofotômetro para microplaca (Biotek ELX 800<sup>®</sup>), em comprimento de onda de 450 nm. As análises foram realizadas pelo LACEN ES.

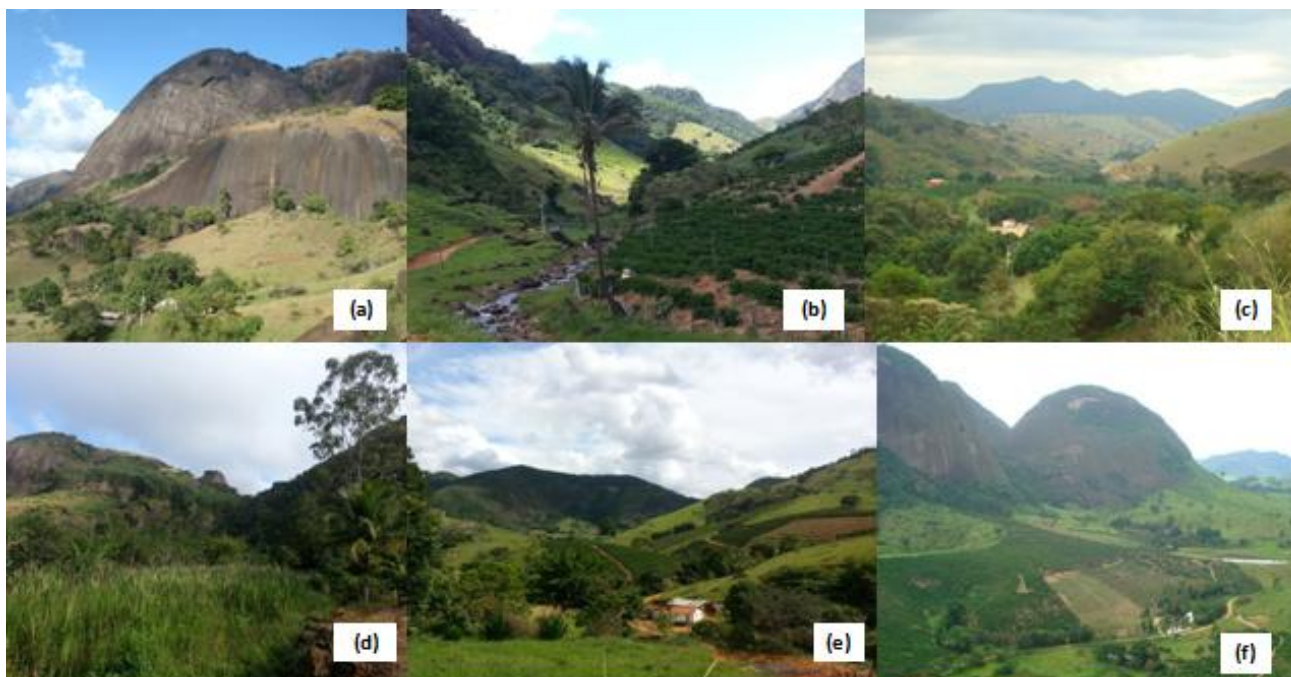
#### 4.5 Comitê de Ética

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais, da UFES (CEUA-UFES), com aprovação em 14 de fevereiro de 2013, sob o no. 065/2012.

## 5 RESULTADOS

Neste estudo foram investigadas as áreas receptoras à LVA, com presença do vetor *L. longipalpis* e sem registros de casos da doença. Constatou-se que essas áreas possuem em comum, características geográficas de relevo acidentado e afloramentos rochosos (figura 6).

**Figura 6.** Características geográficas de relevo acidentado e afloramentos rochosos das áreas receptoras à leishmaniose visceral americana, investigadas no estado do Espírito Santo, Brasil.



- (a) Afonso Cláudio, localidade de Emçoçado.
- (b) João Neiva, localidade de Barra do Triunfo.
- (c) Mantenópolis, localidade de Afluente do Córrego Mantena.
- (d) Rio Bananal, localidade de Córrego Dez.
- (e) Santa Teresa, localidade de 25 de Julho.
- (f) Vila Pavão, localidade de Córrego Grande.

Neste trabalho, foram investigados 215 cães nas áreas receptoras à LVA no estado do Espírito Santo, sendo 31 em Afonso Cláudio, 34 em João Neiva, 52 em Mantenópolis, 32 em Rio Bananal, 32 em Santa Teresa e 34 em Vila Pavão. Dos cães avaliados, 58,14% eram machos e 41,86% eram fêmeas (tabela 1).

**Tabela 1.** Sexo e raça dos cães investigados no período de março de 2013 a junho de 2014 nas áreas receptivas à leishmaniose visceral americana no estado do Espírito Santo.

Municípios receptivos à LVA	Nº de cães investigados	SEXO		RAÇA	
		Macho	Fêmea	SRD*	Raça definida
Afonso Cláudio	31	25	6	24	7
João Neiva	34	21	13	28	6
Mantenópolis	52	20	32	44	8
Rio Bananal	32	17	15	31	1
Santa Teresa	32	23	9	31	1
Vila Pavão	34	19	15	25	9
<b>Total</b>	<b>215</b>	<b>125 (58,14%)</b>	<b>90 (41,86%)</b>	<b>183</b>	<b>32</b>

\* Sem raça definida

Em relação aos animais avaliados, 7,91% apresentavam porte grande, 51,63% apresentavam porte médio e 40,46% porte pequeno. Quanto à idade, 174 cães tinham mais de um ano de vida, 39 tinham menos de um ano de vida e dois tinham idade desconhecida. Em relação à raça dos animais, 183 não possuíam raça definida, 15 eram da raça pinscher, cinco da raça beagle e 12 animais eram das raças basset, labrador, pastor alemão, poodle, rottweiler e yasa. Quanto aos sintomas da LVC, os cães apresentaram-se assintomáticos em 92,10%, sendo que os demais apresentaram alopecia (1,86%), anemia (0,46%), perda de peso (4,65%) e crescimento das unhas (0,93%).

Quanto à origem dos animais, 91,16% eram nativos das respectivas áreas avaliadas, 5,58% procediam de outras localidades e 3,26% eram de procedência desconhecida (tabela 2).

**Tabela 2.** Origem dos cães investigados no período de março de 2013 a junho de 2014 nas áreas receptivas à leishmaniose visceral americana, no estado do Espírito Santo.

Origem do cão	Nº de cães investigados
Origem local	196
Local não identificado	7
Outras localidades	
Colatina, Espírito Santo	2
Divinópolis, Minas Gerais	1
Jacaraípe, Espírito Santo	1
Aracruz, Espírito Santo	1
Linhares, Espírito Santo	1
São Roque do Canaã, Espírito Santo	2
Serra, Espírito Santo	1
Venda Nova do Imigrante, Espírito Santo	2
Vitória, Espírito Santo	1
Total	215

Neste estudo, 213 cães apresentaram resultados não reagentes e dois cães apresentaram soros reagentes na triagem pelo teste rápido DPP<sup>®</sup> LVC, com as leituras de 4,2 e 5,3, respectivamente, sendo um procedente de Mantenópolis, outro de Vila Pavão. No entanto, ao serem testadas pelo método de ELISA, as duas amostras revelaram resultado negativo, sendo que a de Mantenópolis apresentou leitura de 0,079 (limiar de reatividade = 0,120) e a de Vila Pavão com leitura de 0,057 (limiar de reatividade = 0,178) (tabela 3).

**Tabela 3.** Investigação da infecção canina por leishmaniose visceral americana por meio do teste rápido DPP<sup>®</sup> LVC e ELISA LVC<sup>®</sup> da Bio-Manguinhos, no período de março de 2013 a junho de 2014, em áreas receptivas à doença no estado do Espírito Santo, Brasil.

Municípios receptivos à LVA	Nº de cães investigados	DPP		ELISA	
		Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Reagente
Afonso Cláudio	31	31			
João Neiva	34	34			
Mantenópolis	52	51	1*	1**	
Rio Bananal	32	32			
Santa Teresa	32	32			
Vila Pavão	34	33	1***	1****	
Total	215	213	2	2	0

\* DPP reagente (leitura: 4,2)

\*\* ELISA não reagente (leitura: 0,079, limiar de reatividade = 0,120)

\*\*\* DPP reagente (leitura: 5,3)

\*\*\*\* ELISA não reagente (leitura: 0,057, limiar de reatividade = 0,178)



## 6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente inquérito sorológico canino evidenciam que a doença parece estar contida nos dez municípios endêmicos, pelo menos desde o ano de 2000. Nesse ano, foram registrados casos humanos e caninos da doença em Nova Venécia, último município identificado como endêmico na sequência cronológica de notificações iniciada com o trabalho de Martins e colaboradores (1968).

Nos últimos anos não foram registrados no estado do Espírito Santo desastres naturais, obras de grande impacto ambiental ou eventos outros que motivassem fluxo migratório intenso de pessoas e animais para as áreas receptivas à LVA. Soma-se a isto o fato de que as áreas receptivas compreendem localidades rurais que estão fora dos principais corredores de migração do estado e que, pelas características locais, podem ser classificadas como áreas de baixo fluxo de pessoas.

Segundo informação pessoal de profissionais que atendem nos hospitais onde funcionam os centros de referência para pacientes com LVA em Vitória, nos últimos anos têm sido registrados poucos casos humanos da doença no estado e alguns municípios endêmicos estão silenciosos há muitos anos. Ações de vigilância e controle da LVA, centradas na eliminação de cães infectados, foram adotadas ao longo dos anos 80 e 90 nas áreas endêmicas do estado do Espírito Santo. Tais medidas podem ter sido efetivas na redução do número de casos humanos da doença e na contenção de sua expansão geográfica para outros municípios receptivos. De modo geral os municípios endêmicos não estão realizando o inquérito sorológico canino rotineiramente e sim a busca de cães infectados quando diagnosticado algum caso humano da doença, conforme dados da SESA.

Acredita-se que a amostragem de cães testada neste inquérito tenha sido representativa, já que foram examinados mais de 50% dos cães nas localidades com presença do vetor *Lu. Longipalpis*. Na maioria das áreas investigadas, o inquérito sorológico foi realizado na quase totalidade dos cães. A metodologia laboratorial empregada atendeu ao preconizado pelo PCLV. Na triagem sorológica pelo teste rápido DPP LVC<sup>®</sup>, foi empregado o leitor óptico, com limiar de reatividade padronizado, para evitar erros decorrentes da subjetividade na leitura visual do teste.

Vale salientar que o leitor óptico ainda não está disponível para utilização pelos serviços municipais de vigilância da doença.

A maioria dos cães investigados apresentou-se assintomática, sendo que somente em 7,9% dos animais foram identificados alguns sinais clínicos, como alopecia, anemia, baixo peso e crescimento das unhas, achados que podem ser justificados pelo fato de que a maioria dos cães pertencia a famílias de baixa renda, que demonstravam poucos cuidados com os animais. Por outro lado, Falqueto e colaboradores (2009) relatam que a sintomatologia decorrente da infecção pela *L. infantum chagasi* em cães é altamente variável, dependendo do estado nutricional do animal, tempo de evolução da infecção, além de fatores genéticos influenciando na susceptibilidade à doença.

Quanto à origem dos cães analisados neste inquérito, a maioria era nativa do próprio local investigado e com mais de um ano de idade. Somente 5,58% dos animais procediam de outras localidades, incluindo áreas endêmicas já conhecidas, como São Roque do Canaã. No entanto, é importante lembrar que os limites geopolíticos de todos os municípios receptivos à doença confrontam-se com limites dos municípios endêmicos de Nova Venécia, Águia Branca, Pancas, Governador Lindemberg, São Roque do Canaã, Itaguaçu e Itarana. Assim, apesar das áreas receptivas serem limítrofes aos municípios endêmicos, não foi observado um fluxo migratório intenso de cães. Este fato não exclui o risco de introdução do parasito nestas localidades.

Diferentemente do cenário que observamos na área investigada, pesquisas de outros autores revelam que a migração provavelmente compreendeu o fator mais importante envolvido na urbanização da LVA no país (GONTIJO & MELO, 2004; CARDIM et al., 2013). O fluxo de pessoas e cães migrando do interior para as grandes cidades muitas vezes decorre da seca, desastres naturais, grandes construções com impacto ambiental, acarretando a evasão do campo. Como consequência, há concentração de pessoas na periferia das metrópoles, onde as condições de saneamento e moradia são precárias, favorecendo o surgimento de doenças, entre elas a LVA.

Maia-Elkhoury e colaboradores (2008) reiteram que a expansão geográfica e a urbanização da LVA estão relacionadas ao rápido processo migratório e à mobilização de cães infectados para áreas sem transmissão, além de modificações ambientais causadas por ações antrópicas.

Marzochi e colaboradores (2009) também salientam a importância do reservatório canino quando se estabelece o contato próximo entre homens e animais, em ambientes propícios para a proliferação do vetor, representados pelos aglomerados populacionais na periferia das metrópoles.

Por outro lado, a questão social não pode ser vista como único fator preponderante na dispersão da LVA para os grandes centros urbanos. No estado do Espírito Santo, não há registro de casos autóctones da doença humana nas principais concentrações urbanas como Região Metropolitana da Grande Vitória, São Mateus, Colatina, Linhares e Cachoeiro de Itapemirim, não obstante o intenso fluxo migratório do campo para estes centros urbanos, observado principalmente nas últimas quatro décadas. Reforçam a tese da migração intensa entre as grandes metrópoles, fatos documentados por profissionais veterinários da cidade de Vitória, que por diversas vezes diagnosticaram casos de LVA em cães procedentes de Belo Horizonte e outras áreas endêmicas do estado de Minas Gerais (informações pessoais de clínicas veterinárias).

Portanto, em muitas cidades brasileiras a urbanização da LVA está associada à migração de pessoas e animais, introduzindo a *L. infantum chagasi* em novas áreas receptivas. No estado do Espírito Santo, o perfil epidemiológico é bem diverso, uma vez que as áreas receptivas não correspondem aos grandes centros urbanos, pois estão situados em regiões geoclimáticas distintas.

Conceição-Silva & Alves (2014) admitem que a expansão geográfica da LVA esteja associada a fatores diversos como a destruição de habitats naturais, o aquecimento global, a popularização do ecoturismo e a expansão de fronteiras agrícolas. Costa e colaboradores (2011) também salientam que os fatores envolvidos na expansão da endemia diferem de uma região para outra. Mesmo assim, apontam como principais determinantes para a urbanização da LVA a migração humana, a grande população urbana de cães e o potencial adaptativo do inseto vetor.

Em que pesem todos esses fatores como determinantes primários no processo de expansão da LVA no país, é importante lembrar que, dentre todas as variáveis que influenciam o ciclo de transmissão da doença, as mais independentes são as características geográficas e climáticas de cada região. Em todo o território brasileiro, a endemia prevalece em regiões mais secas, geralmente representadas por vegetação nativa do tipo cerrado e caatinga, além de variantes como as savanas e os pampas. Mesmo nas regiões de floresta Atlântica, a moléstia aparece nas

áreas mais distantes da costa, com clima bem mais seco que o da faixa litorânea, como é o caso do estado do Espírito Santo. É possível que nessas áreas, outrora cobertas por florestas densas, a devastação da cobertura vegetal tenha tornado o clima mais próximo ao do cerrado, facilitando a procriação do inseto vetor.

Segundo Falqueto e colaboradores (2001), fatores geoclimáticos como relevo acidentado, altitudes de até 450 metros acima do nível do mar, clima seco e afloramentos rochosos seriam propícios à ocorrência de *Lu. longipalpis* no estado do Espírito Santo. Este é justamente o perfil geoclimático observado em todos os municípios endêmicos de LVA no território estadual (PINTO, 2009). Já os seis municípios receptivos aqui investigados estão situados nos limites da área propícia à ocorrência do vetor. Por se tratar de uma faixa territorial situada na zona de transição, é bem provável que já não apresente as condições climáticas ideais para a adaptação do inseto vetor, cuja densidade mais baixa reduziria a chance de implantação da endemia.

Na maioria das regiões brasileiras onde a LVA se expandiu geograficamente, atingindo grandes centros urbanos, o fator mais importante para a adaptação do inseto vetor está representado pelo conjunto de variáveis geográficas e climáticas existente em cada área. Em seguida, sobrevêm os demais fatores amplamente discutidos pelos estudiosos do assunto. Nessa linha de raciocínio, Costa e colaboradores (1995) admitem que a adaptação de *Lu. longipalpis* ao ambiente urbano se deve à destruição de ecossistemas naturais, acúmulo de lixo, oferta de fonte alimentar humana e animal, e a presença de abrigos de animais silvestres na área urbana.

O processo de adaptação progressiva do vetor da LVA ao ambiente urbano também foi relatado por Botelho & Natal (2009) no município de Campo Grande, onde esses autores verificaram o aumento da densidade de *Lu. longipalpis* ao longo dos anos. É importante lembrar que a cidade de Campo Grande apresenta um Índice de Desenvolvimento Humano superior ao de várias outras cidades brasileiras que, por sua vez, não tiveram problema com a urbanização da LVA. A título de exemplo, em nenhuma das 10 maiores cidades do estado do Espírito Santo se registrou, até o momento, transmissão autóctone da LVA. Tal fato reforça a tese de que as variáveis ambientais representam o fator mais importante para a adaptação do inseto vetor e, conseqüentemente, implantação da endemia no espaço urbano. Mais que isto, as cidades de Pancas e Baixo Guandu, as únicas com transmissão urbana de LVA, estão situadas em área com as características geoclimáticas propícias à proliferação de *Lu. longipalpis*.

O problema da expansão geográfica da LVA no território brasileiro tem sido objeto de amplos debates envolvendo estudiosos do assunto, seja em reuniões científicas no âmbito acadêmico, como também em órgãos responsáveis pelo planejamento das ações de controle, em nível de Ministério e Secretarias Estaduais de Saúde. Um dos pontos mais polêmicos tem sido a questão da eutanásia de cães infectados, especialmente quando não apresentam sinais e sintomas da doença.

Quanto a isso, o Ministério da Saúde tem sido enfático na adoção de medidas visando ao monitoramento do reservatório canino, considerado como linha-mestre dentre as ações de vigilância da leishmaniose (BRASIL, 2014). No entanto, as ações de controle adotadas no país não têm sido efetivas para conter a expansão da endemia. Muitas vezes, as ações são descontínuas, há problemas orçamentários e escassez de recursos humanos adequadamente treinados, além da necessidade de investimento em mais pesquisas para o desenvolvimento de ferramentas inovadoras e alternativas a serem implementadas (CONTIJO & MELO, 2004; MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Em que pese os possíveis benefícios do monitoramento canino como medida de controle da LVA, tal ação só se justifica se realizada dentro de critérios científicos, como demonstramos no presente inquérito conduzido em áreas receptivas no estado do Espírito Santo. Inquéritos caninos realizados sem o conhecimento prévio da distribuição do vetor, além de não contribuírem com qualquer informação epidemiológica útil, implicam desperdício de recursos financeiros e empenho da força de trabalho em ações injustificáveis.

## 7 CONCLUSÃO

- Não houve presença de infecção canina para LVA nos 215 animais investigados no período de 2013 e 2014 nas áreas receptivas à ocorrência da doença, municípios de Afonso Cláudio, João Neiva, Mantenópolis, Rio Bananal, Santa Teresa e Vila Pavão, no estado do Espírito Santo.
- Não há evidências de expansão geográfica da doença para as áreas investigadas. Apesar de a LVA ter se expandido geograficamente no estado do Espírito Santo nas décadas de 80 e 90.
- Há um discreto fluxo migratório de indivíduos e cães para as áreas receptivas à doença no estado, com baixa probabilidade de introdução da *L. infantum chagasi* nos municípios investigados. As áreas receptivas estão situadas fora dos corredores de migração do estado, apesar de serem limítrofes de municípios endêmicos. Os grandes centros urbanos do estado não possuem as características geoclimáticas propícias à ocorrência do vetor *Lu. longipalpis*.
- O panorama epidemiológico da doença no estado do Espírito Santo difere dos demais estados brasileiros. Enquanto que nas demais regiões do país houve uma intensa urbanização da doença, no Espírito Santo a expansão geográfica da endemia se limitou a áreas rurais, parecendo estável há pelo menos 14 anos.
- As ações de vigilância e monitoramento do reservatório canino parecem ser efetivas para controle da doença e deveriam ser realizadas continuamente nos municípios receptivos à LVA. O inquérito canino só se justifica se realizado em áreas de risco para transmissão da doença, identificadas a partir de levantamento prévio da fauna flebotômica.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho fomentam a história da LVA no estado do Espírito Santo, além de contribuir com informações sobre a expansão geográfica da doença no Brasil.

A partir da década de 50, a LVA demonstrou um movimento de expansão geográfica no Brasil com a característica marcante de urbanização da doença, atingindo grandes cidades nas regiões Nordeste, Norte, Centro-Oeste e Sudeste.

De encontro a esse fato, a expansão geográfica da doença no estado do Espírito Santo se deu nos anos 80 e 90, porém mantendo-se limitada à área rural.

O conhecimento dos fatores geoclimáticos que propiciam a ocorrência do inseto transmissor da LVA orientaram o direcionamento do inquérito canino nas áreas receptivas à doença facilitando sobremaneira o alcance dos objetivos propostos neste trabalho. Acredita-se que esses conhecimentos possam ser aplicados às áreas de Mata Atlântica do vale do Rio Doce, no estado vizinho de Minas Gerais, com características geoclimáticas semelhantes às da área estudada.

O trabalho desenvolvido no estado do Espírito Santo é de grande importância para orientar outros estados, seguindo a lógica de monitorar o reservatório canino somente em áreas receptivas, definidas previamente a partir do mapeamento da distribuição do vetor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, J. E. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Luís**, v. 3: 175-180, 1961.

\_\_\_\_\_. Expansão do Calazar no Brasil. **Revista Ceará Méd**, v. 5: 86-102, 1983.

\_\_\_\_\_; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: **VERONESI, R. Doenças Infeciosas e parasitárias**. 8. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 706-17, 1991.

ALMEIDA, P. S.; SCIAMARELLI, A.; BATISTA, P. M.; FERREIRA, A. D.; NASCIMENTO, J.; RAIZER, J.; FILHO, J. D. A.; GURGET-GONÇALVES, R. Predicting the geographic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108 (8): 992-996, dez, 2013.

ANTONIALLI, S. A. C.; TORRES, G. T.; FILHO, A. C. P.; TOLEZANO, J. E. Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central, Brazil. **Journal of Infection**, v. 54: 509-514, 2007.

ARAGÃO, L. V. O.; DOURADO, J. C. L.; PACHECO, J. J. Leishmaniose visceral em Teresina, PI. 1995-2006. Avaliação da eliminação de cães soropositivos como medida de controle. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Gramado, Brasil, 2008. Disponível em: [www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0587-1.pdf](http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0587-1.pdf).

BARATA, R. B. Cem anos de endemias e epidemias. **Ciência Saúde Coletiva**, v. 5 (2): 333-45, 2000.

BIGELI, J. G.; JUNIOR, W. P. O.; TELES, N. M. M. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, State of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(1): 18-23, jan-fev, 2012.

BOTELHO, A. C. A.; NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42 (5): 503-508, set-out, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Técnica Conjunta nº 01/2011: Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2011.



\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. 7. ed. – Brasília: **Ministério da Saúde**, cad. 11, p. 31-64, 2009.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1. ed. – Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2006.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância em saúde – Brasília: **Ministério da Saúde**, p. 548-569, 2014.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; KATZ, G. RODAS, L. A. C., POLETTO, D. W.; LAGE, L. C.; SPÍNOLA, R. M. F.; et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17 (5): 1263-7, 2001.

CARDIM, M. F. M.; RODAS, L.A.C.; DIBO, M. R.; GUIRADO, M. M.; OLIVEIRA, A.M.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Introduction and expansion of human american visceral leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil, 1999-2011. **Revista de Saúde Pública**, v. 47 (4): 691-700, 2013.

CHAGAS, E.; GHAGAS, A. W. Notas sobre a epidemiologia da leishmaniose visceral americana no Mato Grosso. **O Hospital**, v. 13: 471-80, 1938.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R.. Leishmanioses do continente americano. Rio de Janeiro: **Ed. Fiocruz**, 2014.

CONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, 2004.

COSTA, I. A. P.; CASANOVA, C.; RODAS, L.; GALATI, E. A. B. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31 (6): 632-3, 1997.

COSTA, C. H. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24 (12): 2959-2963, dez, 2008.

\_\_\_\_\_; HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, September, 2011.

\_\_\_\_\_; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de Leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24: 361-371, 1990.

COSTA, J. M. L.; VIANA, G. M. C.; SALDANHA, A. C. R.; NASCIMENTO, M. D. S. B.; ALVIM, A. C.; BURATTINI, M. N.; SILVA, A. R. Visceral Leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil: Evolution of the Epidemic. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 11 (2): 321-324, Abril/junho, 1995.

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. L. Forty years of visceral leishmaniasis in the state of Piauí: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53(1): 3-11, jan-fev, 2011.

FALQUETO, A., FEITOZA, L. R.; STOCKING, M.; FRAGA, P. RESENDE, M.; CASTRO, L. L. F.; BOREL, R. M. A. Information for specific use – case studies (p. 97 – 107). In: Natural resources information systems for rural development – Approches for Espírito Santo State, Brazil. 1ª Ed., **Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER**, 223p, ISBN-85-88024-01-2, Vitória, Espírito Santo, 2001.

FALQUETO, A., FERREIRA, A. L., SANTOS, C. B., PORROZZI, R., COSTA, M. V. S., TEVA, A. CUPOLILLO, E., NETO, A. C., GRIMALDI, G. J. Cross-sectional and Longitudinal Epidemiologic Surveys of Human and Canine *Leishmania infantum* Visceral Infections in an Endemic Rural Area of Southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80(4): 559-565, 2009.

GRIMALDI, G. J., TEVA, A., FERREIRA, A. L., SANTOS, C. B., PINTO, I. S., AZEVEDO, C. T., FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106: 54– 59, 2012.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100 (8): 811-827, dez, 2005.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 4: 84-95, 1912.

LUZ, Z. M. P.; PIMENTAL, D. N.; CABRAL, A. L. L. V.; FIUZA, V. O. P.; RABELLO, A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34 (3): 249-54, 2001.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S., ALVES, W. A., SOUSA-GOMES, M. L., SENA, J. M., LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24 (12): 2941-2947, dez, 2008.

MARTINS, J., SOUZA, J. C., SILVA, E. Primeiros casos autóctones de calazar no Espírito Santo. **O hospital**, v. 73: 69-97, 1968.

MARZOCHI, M. C. A.; FAGUNDES, A.; ANDRADE, M. V.; SOUZA, M. B.; MADEIRA, M. F.; MOUTA-CONFORT, E.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42 (5): 570-580, set-out, 2009.

MESTRE, G. L. C.; FONTES, C. J. F. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso, 1998-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40 (1): 42-8, 2007.

MIGONE, L. E. Um caso de kala-zar a Asunción (Paraguay). **Bulletin of the Exotic Pathology Society**, v. 6: 118-20, 1913.

OLIVEIRA, C. D. L., ASSUNÇÃO, R. M., REIS, I. A., PROIETTI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17 (5): 1231-1239, set-out, 2001.

PALATNIK-DE-SOUZA, C. B., SANTOS, W. R., FRANÇA-SILVA, J. C., COSTA, R. T., REIS, A. B., PALATNIK, M., MAYRINK, W., GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65 (5): 510-517, 2001.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil-Médico**, v. 48, p. 949-950, 1934.

PINTO, Israel de Souza. Associação entre variáveis geográficas e climáticas e a ocorrência de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) no estado do Espírito Santo, Brasil. 52 f. **Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo**, Brasil, 2009.

PINTO, I. S., SANTOS, C. B., GRIMALDI, G. J., FERREIRA, A. L., FALQUETO, A. American visceral leishmaniasis dissociated from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) in the State of Espírito Santo, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26 (2): 365-372, fev, 2010.

PINTO, I. S.; FERREIRA, A. L.; VALIM, V.; CARVALHO, F. S.; SILVA, G. M.; FALCÃO, A. L.; DIETZE, R.; FALQUETO, A. Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, State of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 37 (1): 90-96, junho, 2012.

PROFETA DA LUZ, Z. M.; PIMENTA, D. N.; CABRAL, A. L.; FIUZA, V. O.; RABELLO, A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 34: 249-54, 2001.

SESA - Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo. Série histórica dos casos notificados do período 1986-2004. Vitória: Programa de Controle das Leishmanioses. **Secretaria do Estado do Espírito Santo**, 2004.

SANGENIS, L. H. C.; LIMA, S. E. A.; MELLO, C. X.; CARDOSO, D. T.; MELLO, J. N.; ESPIRITO SANTO, M. C. C.; TAVARES, W. Expansion of visceral leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil: Report of the first autochthonous case in the municipality of Volta Redonda and the difficulty of diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56 (3): 271-274, maio-jun, 2014.

SILVA, A. R. Leishmaniose visceral americana. Evolução de uma Endemia de 1982 a 1985. **Jornada de Parasitologia e Medicina Tropical**. São Luís, Resumos, 9, 1986.

TORRES, F. D. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101(1): 117-118, fev, 2006.

World Health Organization – WHO. **The world health report 2001**. Geneva, 2001.

VILELA, M. L.; AZEVEDO, C. G.; CARVALHO, B. M.; RANGEL, E. F. Phlebotomine Fauna (Diptera: Psychodidae) and Putative Vectors of Leishmaniasis in Impacted Area by Hydroelectric Plant, State of Tocantins, Brazil. **PLoS ONE** 6(12): e27721. doi:10.1371/journal.pone.0027721, 2011.