

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

Fábio de Melo Chaves Indá

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
NA POPULAÇÃO CANINA EM SEIS LOCALIDADES DO
MUNICÍPIO DE FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA**

Dissertação de Mestrado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia e Biociências
Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Indá, Fábio de Melo Chaves
Estudo epidemiológico de leishmaniose visceral na
população em seis localidades do município de Florianópolis,
Santa Catarina / Fábio de Melo Chaves Indá ; orientador,
Mário Steindel - Florianópolis, SC, 2016.
95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação Multidisciplinar em Saúde.

Inclui referências

1. Saúde. 2. Leishmaniose visceral canina. 3.
Florianópolis. 4. Zoonose. 5. Saúde pública. I. Steindel,
Mário. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Saúde. III.
Título.

"Estudo epidemiológico de leishmaniose visceral na população canina em seis localidades do município de Florianópolis, Santa Catarina"

Por

Fabio de Melo Chaves Indá

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (21/PPGBT/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Mário Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dr(a) Mario Steindel (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Glauber Wagner (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Deolinda Maria Vieira Filha Carneiro (Instituto Federal Catarinense)



Dr(a) Carlos José de Carvalho Pinto (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 03 de Agosto de 2016.

Este trabalho é dedicado a todos os amigos e familiares que sempre me incentivaram a seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Mário Steindel, por apoiar esse projeto, pela paciência em entender as dificuldades de conciliar as atividades profissionais e acadêmicas e por compartilhar os anseios de vislumbrar a ciência como ferramenta para melhoria da gestão pública.

A minha amiga e colega de trabalho Eva Ota, por sempre me ajudar quando precisei, por me representar muitas vezes frente à direção do CCZ, principalmente no primeiro ano de mestrado quando cursei as disciplinas do curso, e por me incentivar a seguir adiante com meus objetivos.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, especialmente ao grande mestre Wilmar, pelas sábias palavras e experiências compartilhadas que, muitas vezes, orientaram-me a tomar difíceis decisões e ao Evandro, não só pela grande ajuda na reta final desse trabalho, mas também pela disposição constante em colaborar durante todo o tempo.

Aos meus colegas do CCZ, por serem pilares fundamentais nesse projeto, principalmente às médicas veterinárias Caroline, Fernanda e Isis e aos auxiliares veterinários Marcelo e Rafael. Sem eles nada disso seria possível.

Aos meus amigos e colegas do LAMUF, em especial à Roniele, por dedicar tempo e atenção na realização das análises laboratoriais, pela parceria nos estudos e pela paciência em escutar os desabafos nos dias menos favoráveis.

Aos colegas do Laboratório de Protozoologia da UFSC, por contribuírem na execução da parte final desse projeto, principalmente à Tati e ao Alexandre, que foram pacientes ao ensinar e auxiliar no desenvolvimento das técnicas moleculares.

Aos meus pais, Dayse e Reinaldo e aos meus irmãos, Thaís e Maurício, por sempre acreditarem em mim, por me incentivarem a enfrentar os obstáculos e, acima de tudo, por todo amor e carinho.

Aos meus familiares, em especial as minhas tias Cleide e Célia e à minha prima Fernanda, pelo apoio na dedicação desse projeto.

Ao Pedro, por estar sempre ao meu lado, por me ajudar e ser companheiro.

Ao Felipe Faccini, pela ajuda providencial de última hora.

Ao Moa, à Joana e ao Júnior, pela preocupação, dedicação e incentivo.

A todos os meus amigos, pela compreensão nos momentos em que não pude estar tão presente, pelo suporte quando me deparei com momentos difíceis e pelo incentivo em vencer os desafios enfrentados.

*“What we know is a drop, what we don't know
is an ocean”*

Isaac Newton, 1687.

RESUMO

No contexto das doenças negligenciadas no Brasil, a Leishmaniose Visceral (LV) é responsável pela redução da expectativa de vida, especialmente em populações socialmente marginalizadas e imunologicamente comprometidas. O avanço da urbanização da LV e o aumento da coinfeção com HIV, tornou essa antroponose uma doença emergente. Com a confirmação dos primeiros casos autóctones de leishmaniose visceral canina (LVC) no distrito da Lagoa da Conceição em Florianópolis, Santa Catarina, em 2010, o município passou a integrar o mapa de transmissão da doença. Sendo assim, o presente trabalho objetivou um estudo soroepidemiológico de leishmaniose visceral na população canina de 6 localidades de Florianópolis (Itacorubi, Córrego Grande, Barra da Lagoa, Saco Grande, Ratoões e Rio Tavares), adjacentes à área do foco inicial. O protocolo oficial TR-DPP[®]/ELISA Biomanguinhos/FIOCRUZ foi utilizado para detecção da infecção por *Leishmania infantum* em amostras de soro de 567 cães. A análise dos dados foi feita mediante estatística descritiva a partir das informações armazenadas em planilhas de Excel[®] e os dados gerados foram integrados ao banco de dados do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) e da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A reatividade sorológica foi comprovada por ambas as técnicas em 3,35% dos cães (19/567). 42% (8/19) dos cães soropositivos foram eutanasiados e destes foi realizada a coleta de material biológico para isolamento do parasito em cultura e confirmação do diagnóstico parasitológico e/ou molecular. As amostras isoladas foram identificadas por meio de PCR-RFLP e hibridização com sondas espécie-específica. Dos 8 cães eutanasiados, 50% (4/8) eram assintomáticos do ponto de vista clínico. Todos os animais tiveram a confirmação do diagnóstico pelos métodos parasitológico e molecular, sendo identificado *L. infantum* como o agente infectante pela técnica de hibridização. A confirmação de casos autóctones de LVC em localidades que extrapolam as áreas anteriormente investigadas mostra a expansão da doença no município de Florianópolis e requer o desenvolvimento e adoção de políticas públicas mais ostensivas para a prevenção e controle da doença.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*. Cães. Doença tropical negligenciada. Doença emergente, Zoonoses.

ABSTRACT

Among the neglected diseases in Brazil, Visceral Leishmaniasis (VL) is responsible for the reduction in life expectancy, especially for socially marginalized populations and immunologically compromised patients. The increasingly urbanization of VL and the co-infection with HIV turns this anthroponosis an emerging infectious disease. Upon the first autochthonous cases of canine visceral leishmaniasis (CVL) at Lagoa da Conceição district in the city of Florianópolis, Santa Catarina state, in 2010, the city was considered as a new area of transmission of the disease. The present study carried out a seroepidemiological survey of CVL in six districts of Florianópolis (Itacorubi, Córrego Grande, Barra da Lagoa, Saco Grande, Ratoles and Rio Tavares), that are contiguous to Lagoa da Conceição. The official protocol using TR-DPP® and ELISA for detection of *Leishmania infantum* infection was applied to 567 serum samples. Data analysis was performed via descriptive statistics that was then integrated to the Zoonosis Control Center (CCZ) and Federal University of Santa Catarina (UFSC) databases. Positive reactions confirmed by both techniques were obtained for 3.35% of the dogs (19/567), among which, eight were euthanized and submitted to diagnostic confirmation via parasitological and/or molecular techniques. Molecular identification of isolated *Leishmania* sp. samples was performed by PCR-RFLP following hybridization with species-specific probes. Infection of all dogs by *L. infantum* was confirmed by parasitological and molecular methods, among which, four (50%) were clinically asymptomatic. The seroprevalence and the confirmation of these autochthonous cases of LVC in the studied districts indicates the spreading potential of the disease in the city of Florianópolis, indicating the needs to implement and adoption of effective public policies for the prevention and control of disease.

Keywords: *Leishmania infantum*. Dogs. Neglected Tropical Disease. Emerging disease. Zoonoses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de transmissão da leishmaniose.....	25
Figura 2. Diferentes manifestações clínicas das leishmanioses.	27
Figura 3. Distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral no mundo em 2013.....	29
Figura 4. Fluxograma do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) de Florianópolis, SC	39
Figura 5. Localização geográfica das localidades de Florianópolis, SC investigadas no estudo.....	46
Figura 6. Amostras de sangue de cães investigados em inquérito sorológico, por meio do teste de triagem DPP® LVC.	49
Figura 7. Necropsia e coleta de material biológico de cão com LVC realizadas no CCZ, após confirmação por diagnóstico sorológico e eutanásia.....	51
Figura 8. <i>Imprinting</i> de linfonodo, baço, medula óssea e fígado de cão com LVC.....	51
Figura 9. Análise quantitativa do total de cães soro reagentes e não soro reagentes nas localidades investigadas no município de Florianópolis, SC, no período de julho de 2014 a julho de 2015.	58
Figura 10. Distribuição dos casos de LVC por localidade no município de Florianópolis, SC, no período de julho de 2014 a julho de 2015.	59
Figura 11. Número de cães soro reagentes para Leishmaniose Visceral vivos e eutanasiados no período de julho de 2014 a julho de 2015, em Florianópolis, SC.....	60
Figura 12. Quantidade por localidade de cães com LVC submetidos ao procedimento de eutanásia, em Florianópolis, SC, no período de julho de 2014 a julho de 2015.	61
Figura 13. Comparação dos cães com LVC eutanasiados de acordo com a classificação de sintomatologia e achados de necropsia, em Florianópolis, SC, no período de julho de 2014 a julho de 2015.	62
Figura 14. Esplenomegalia e lesões no baço observadas durante necropsia realizada em cão assintomático com diagnóstico sorológico positivo para LVC, em Florianópolis, SC, no período de julho de 2014 a julho de 2015.	63
Figura 15. <i>Imprinting</i> de fígado corado pelo Giemsa de cão assintomático com diagnóstico sorológico positivo para LVC.	64

Figura 16. Gel de poliacrilamida 10% corado pelo brometo de etídio, representativo da PCR-RFLP do fragmento de 120 pb de *Leishmania* isoladas de 8 cães com diagnóstico sorológico positivo para LVC no período de julho de 2014 a julho de 2015.....65

Figura 17. Técnica molecular de Hibridização espécie específica para confirmar a presença de *L. infantum* nas amostras isoladas de 8 cães com diagnóstico sorológico positivo para LVC no período de julho de 2014 a julho de 2015.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantitativo de amostras coletadas e cães positivos, a partir de inquéritos sorológicos realizados pelo CCZ no município de Florianópolis para diagnóstico da LVC, no período de 2010 a 2015.	31
Tabela 2. Estimativa da população canina baseada na população humana de cada localidade envolvida no estudo.	47
Tabela 3. Amostragem de cães por localidade investigada.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCZ: Centro de Controle de Zoonoses
CDC: Centro de Controle de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*)
CFMV: Conselho Federal de Medicina Veterinária
CRMV: Conselho Regional de Medicina Veterinária
DIVE: Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina
DPP®: Plataforma de Duplo Percurso (*Dual Path Platform*)
DTN: Doenças Tropicais Negligenciadas
ELISA: Ensaio Imunoenzimático
OIE: Organização Mundial da Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health*)
LC: leishmaniose cutânea
LMC: leishmaniose mucocutânea
LTA: leishmaniose tegumentar americana
LV: leishmaniose visceral
LVC: leishmaniose visceral canina
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS: Ministério da Saúde
pb – pares de base
PCR – Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
RFLP – Polimorfismo de tamanho de fragmentos obtidos por restrição
TR – Teste rápido
WHO- Organização Mundial de Saúde (*World Health and Organization*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES	24
1.2	EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL E CICLO DE TRANSMISSÃO EM SANTA CATARINA, BRASIL	28
1.3	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	32
1.4	DIAGNÓSTICO DA LVC	34
1.5	PROGRAMA DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM FLORIANÓPOLIS	37
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	41
3	OBJETIVO GERAL.....	43
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	MATERIAIS E METÓDOS	45
4.1	ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM ESPACIAL.....	45
4.2	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	47
4.2.1	Diagnóstico sorológico	47
4.2.1.1	Coleta de sangue total	47
4.2.1.2	Teste Rápido DPP® LVC.....	48
4.2.1.3	Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	49
4.2.2	Diagnóstico parasitológico e molecular.....	50
4.2.2.1	Coleta de tecidos e sangue	50
4.2.2.2	Exame parasitológico direto	51
4.2.2.3	Isolamento e cultivo <i>in vitro</i>	52
4.2.2.4	Identificação de <i>Leishmania</i> por PCR-RFLP do fragmento de minicírculo de kDNA.....	52
4.2.2.5	Hibridização.....	53
4.3	ASPECTOS ÉTICOS E MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA.....	54
4.4	TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	54
5	RESULTADOS	57
5.1	CONFIRMAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM NOVAS LOCALIDADES DO MUNICÍPIO DE FLORIANÓPOLIS, SC.....	57

5.2	DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E TÉCNICAS MOLECULARES DE PCR-RFLP E HIBRIDIZAÇÃO RATIFICAM O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO.....	63
6	DISCUSSÃO.....	67
7	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS.....	79
	ANEXO A – Formulário de Coleta de Amostra Biológica para Diagnóstico da LVC.	93
	ANEXO B – Termo de Responsabilidade para autorização de eutanásia.....	94
	ANEXO C – Termo de Responsabilidade para recusa de eutanásia.....	95

1 INTRODUÇÃO

A origem das civilizações humanas foi desencadeada pela fixação das tribos nômades em um determinado local, onde se iniciou a domesticação de plantas e animais, resultando no desenvolvimento da agricultura e na criação animal para alimentação e trabalho. A transição da condição de caçadores coletores para produtores de alimentos transformou definitivamente a relação do homem com os animais e com o ambiente (DIAMOND, 2007).

Essa convivência milenar entre a espécie humana e os animais domésticos ou silvestres proporcionou o conhecimento de doenças naturalmente transmitidas deles ao homem, as zoonoses (MELLO, 2011). O maior risco de transmissão de doenças zoonóticas ocorre na interface entre humanos e animais, mediante a exposição direta ou indireta com os animais, com seus produtos derivados (por exemplo, carne, leite, ovos) ou com o ambiente (WHO, 2016).

Abordando-se o tema saúde, atualmente não se admite mais a visão do indivíduo, mas sim a sua interligação com o coletivo, ou seja, os animais e o ambiente no qual está inserido (CFMV, 2014). A saúde não só contempla a assistência, mas especialmente a prevenção e a promoção. Nesse contexto surgiu o conceito de Saúde Única (*One Health*) para evidenciar a união indissociável entre a saúde animal, humana e ambiental (CFMV, 2016b), que requer cada vez mais a integração entre as áreas de medicina veterinária e humana e a participação de uma equipe multiprofissional de saúde, englobando as ações ambientais de forma sustentável (OIE, 2016; GIBBS, 2014).

As zoonoses são um grande problema de saúde pública, pois constituem 75% das doenças infecciosas emergentes no mundo (ÁVILA-PIRES, 1989; MS, 2010b). Dados da Organização Mundial de Saúde indicam que dos 1.415 patógenos humanos mundialmente conhecidos, 61% são zoonóticos e cerca de 70% dos agentes etiológicos humanos emergentes são de origem animal (WHO, 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2016), as enfermidades emergentes podem ser uma nova infecção decorrente da evolução ou modificação de um agente etiológico, uma infecção conhecida que se disseminou em uma nova área geográfica ou para uma população que era indene, um patógeno não identificado anteriormente ou uma enfermidade diagnosticada pela primeira vez. Já as enfermidades reemergentes são aquelas que eram consideradas erradicadas ou controladas e reapareceram em um período de tempo em um local definido. Tanto as doenças emergentes quanto as reemergentes

constituem em impacto significativo para a saúde pública (ASHFORD, 2000).

No contexto das doenças tropicais negligenciadas (DTN), as zoonoses apresentam relevância significativa. As DTN são enfermidades causadas por agentes infecciosos e parasitários que acometem populações de baixa renda em países em desenvolvimento, dificultando os avanços nos indicadores de saúde e contribuem na manutenção no quadro de desigualdade social (SOUZA, 2010). Nesse cenário de iniquidade, a dengue, a doença de Chagas, a esquistossomose, a hanseníase, a tuberculose e as leishmanioses ocorrem de forma endêmica no Brasil (MS, 2010a). Conforme a OMS, mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa aproximadamente um sexto da população mundial (OMS, 2016).

1.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

As Leishmanioses formam um grupo heterogêneo de síndromes clínicas causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania*. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Essas doenças negligenciadas, de transmissão vetorial e caráter antroponótico ou antropozoonótico estão presentes em 98 nações e três territórios em cinco continentes (WHO, 2015). Predominam em países tropicais e subtropicais, onde afetam principalmente as populações mais pobres do mundo. Estão associadas à desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de moradia, alterações ambientais, sistema imunológico enfraquecido e falta de recursos (CDC, 2016).

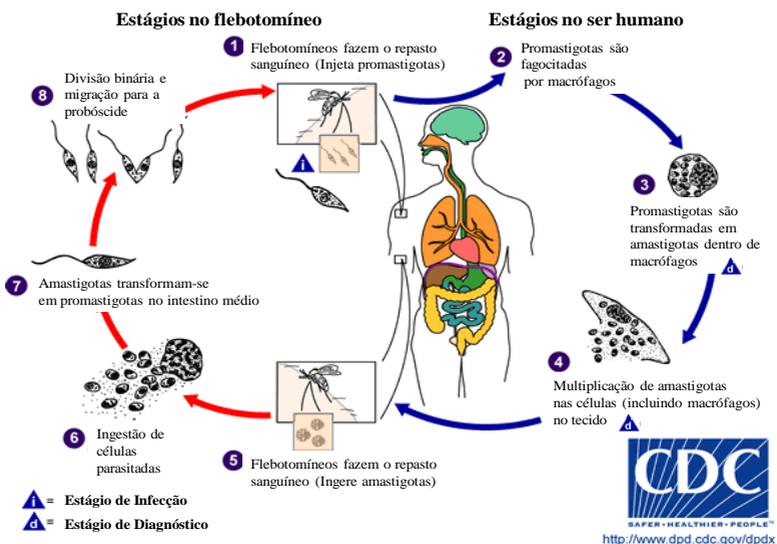
Os integrantes da ordem Kinetoplastida, a qual pertencem esses protozoários, caracterizam-se pela existência de uma mitocôndria modificada, distribuída por toda a célula de *Leishmania* spp., com a presença de uma estrutura denominada cinetoplasto (do inglês *kinetoplast*), de onde origina o nome da ordem (LAINSON; SHAW, 1979). O cinetoplasto consiste em uma região especializada no interior da mitocôndria, situado na base do flagelo do parasito, rico em uma rede de DNA circular característica desses microorganismos (VARGAS-PARADA, 2010; FIOCRUZ, 2016).

As leishmanias apresentam reprodução clonal e ciclo de vida heteroxênico, que ocorre parte no inseto vetor e parte em diversas espécies de hospedeiros mamíferos (LAINSON; SHAW, 1979), estabelecendo duas formas evolutivas distintas. No tubo digestório do vetor, o parasito é encontrado sob a forma flagelada, promastigota, que é

infectante para o hospedeiro definitivo. Neste, é identificada a forma amastigota, intracelular obrigatória, que alberga o interior das células do sistema monocítico fagocitário dos mamíferos e ocasiona a doença.

A transmissão de diferentes espécies de *Leishmania* ocorre pela picada das fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) que atuam como vetor do parasito (MARCONDES, 2005). Conforme observado abaixo (Figura 1), no momento do repasto sanguíneo há a ingestão pela fêmea do flebótomo das formas amastigotas, que se convertem em formas promastigotas e se multiplicam por divisão binária no aparelho digestório do vetor. Em seguida há a diferenciação para as formas promastigotas metacíclicas, consideradas infectantes para o hospedeiro mamífero (LAINSON; SHAW, 1979; MARCONDES, et al., 2009; LAINSON, 2010).

Figura 1. Ciclo de transmissão da leishmaniose.



Fonte: *Centers for Disease Control and Prevention*. Adaptado por Marlow (2013).

Atualmente mais de 20 espécies distintas de *Leishmania* spp. estão envolvidas na etiologia das leishmanioses e passa de 90 o número de espécies conhecidas de flebotomíneos suspeitas de estarem envolvidas na transmissão destes parasitos (LAINSON, 2010; WHO, 2015).

As diversas manifestações clínicas dependem majoritariamente da espécie do parasito, embora também sejam relevantes a resposta imune do hospedeiro frente à infecção e as características do vetor (GRISARD, et al., 2000; PEREIRA, 2015). As formas clínicas mais comuns são Leishmaniose Cutânea (LC), Muco-Cutânea (LMC), causadas por diferentes espécies de leishmanias dermatrópicas, e a Leishmaniose Visceral (LV), causada pela *Leishmania infantum* ou *Leishmania donovani* (HERWALDT, 1999; ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012).

Nas Américas (Novo Mundo), as formas cutâneas e mucocutâneas são conjuntamente referenciadas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), sendo *L. (V.) braziliensis* a principal espécie incriminada. Popularmente conhecida no Brasil como Úlcera de Bauru, a apresentação clínica da doença consiste em lesões indolores, únicas ou múltiplas, de aspecto arredondado e bem delimitadas com uma crosta central sobre a área exposta da pele (LIMA FILHO, STEINDEL, 1998; MS, 2007; MARLOW, 2013; WHO, 2015). Em determinados casos pode haver regressão espontânea das lesões cutâneas (autocura), permanecendo uma cicatriz hipopigmentada, lisa e fina (GOTO, LINDOSO, 2010).

No espectro de manifestações clínicas das leishmanioses (Figura 2), a Leishmaniose Visceral ou Calazar é a de maior gravidade. A forma visceral causada por *L. infantum*, sinônimo de *Leishmania (Leishmania) chagasi* no Novo Mundo é zoonótica, enquanto que em países do Velho Mundo, como Índia e Sudão, assume característica antroponótica, sendo *Leishmania (Leishmania) donovani* a espécie envolvida (ASHFORD, 1996; FARIA, 2012; MARLOW, 2013; CDC, 2016). A partir do local de inoculação dos parasitos há a migração destes para órgãos do sistema hematopoiético do hospedeiro vertebrado. Em seguida multiplicam-se no fígado, baço e medula óssea, provocando imunossupressão e óbito, na ausência de tratamento (MS, 2006; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Figura 2. Diferentes manifestações clínicas das leishmanioses. (A). Lesão ulcerada característica de Leishmaniose Cutânea (LTA) em criança do Afeganistão, sob tratamento; (B). Paciente da Etiópia com lesão dérmica pós calazar; (C). Caso avançado de Leishmaniose Visceral (LV) em criança etíope, apresentando hepatomegalia e esplenomegalia.



Fonte: WHO, 2016.

A epidemiologia das leishmanioses nas Américas é bastante complexa em decorrência da participação de várias espécies de leishmanias, de vetores e de reservatórios (SILVA; GONTIJO; MELO, 2005; REITHINGER, 1999). Os mamíferos silvestres e domésticos incriminados como hospedeiros contemplam as ordens Rodentia, Marsupialia, Carnivora, Artiodactyla, Xenarthra e Primates (LAINSON, SHAW, 1979; LAINSON, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2016) cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas com risco de transmissão e a cada ano surgem 1,3 milhão de novos casos de leishmanioses no mundo, sendo 0,2 a 0,5 milhão de casos de LV e 0,7 a 1,2 milhão de casos de LTA (ALVAR, et al., 2012; WHO, 2016). O número de mortes registradas é entre 20000 a 50000 e quase a totalidade é decorrente da forma visceral da doença (WHO, 2016).

Indivíduos coinfectados com HIV e *Leishmania* são mais propensos a desenvolver a LV, o que reflete em altas taxas de recorrência e mortalidade (HOTEZ, et al., 2006; WHO, 2010). Além de provocar óbitos, as leishmanioses afetam a expectativa de vida das populações residentes de áreas endêmicas. Estima-se a perda de 2,4 milhões de anos de vida ajustados pela incapacidade (DALYs), gerando impacto socioeconômico significativo (BARRETO, et al., 2011).

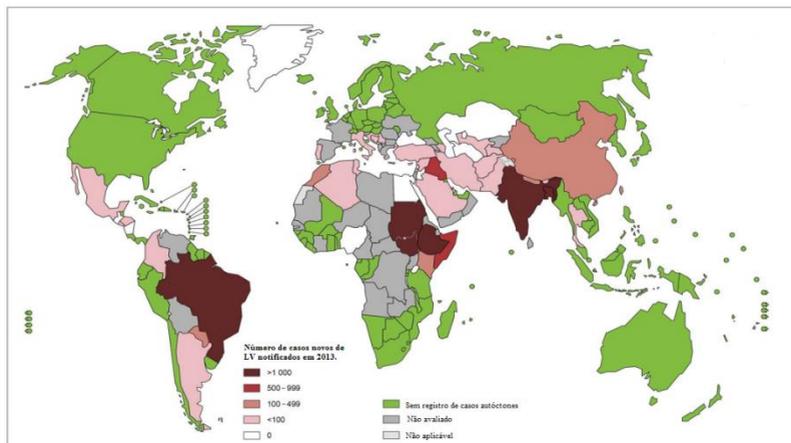
Embora fique evidente a incidência crescente dessa enfermidade e as consequências negativas decorrentes, tanto no aspecto da vida e saúde dos indivíduos, quanto nas questões socioeconômicas das populações

acometidas, as leishmanioses continuam na categoria das doenças negligenciadas (REITHINGER; DUJARDIN, 2007; MS, 2010a; ALVAR et al., 2012). A deficiência de políticas públicas para prevenção e controle da doença e a falta de interesse econômico da iniciativa privada para investir em medicamentos e vacinas refletem esse cenário adverso (HOTEZ, et al., 2006; GARCIA, et al., 2011). Essa falta de atenção por parte do poder público e das organizações da sociedade civil pode ser influenciado por diversos fatores, dentre os quais se destacam a complexidade da doença, ausência de ferramentas para gestão de casos, falta de informações confiáveis sobre a incidência e escassez de métodos de controle comprovadamente eficazes (DESJEUX, 1996; BERN; MAGUIRE; ALVAR, 2008; GARCIA, et al., 2011). Programas e projetos de relevância global estão direcionados ao desenvolvimento de métodos alternativos de diagnóstico e de tratamento, controle de vetores e prevenção da infecção dos reservatórios (DAVIES et al., 2000; WHO, 2016).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL E CICLO DE TRANSMISSÃO EM SANTA CATARINA, BRASIL

A distribuição mundial da leishmaniose visceral concentra mais de 90% dos casos em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (Figura 3). O número total de novos casos humanos de LV é estimado em cerca de 500.000 com 50.000 óbitos a cada ano (GOTO, LINDOSO, 2010; WHO, 2016).

Figura 3. Distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral no mundo em 2013.



Fonte: Adaptado de WHO, 2016.

Na América Latina, 90% dos casos de LV são registrados no Brasil. Dados obtidos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) mostram que foram notificados 51.811 casos de LV no período de 2000 a 2014, com média anual de 3540 novos casos nos últimos 10 anos (MS, 2016). O número total de óbitos por LV entre os anos 2000 a 2014 foi de 3.418, sendo 50,1% somente na região Nordeste. Em seguida aparecem as regiões Sudeste (22,5%), Norte (12,0%), Centro-Oeste (10,4%) e Sul (0,1%). Em 4,9% dos óbitos não houve a confirmação do local da autoctonia.

Entretanto, esses resultados podem ser considerados subestimados devido à subnotificação de casos em todo o país, especialmente pela dificuldade de diagnóstico, deficiências no sistema de vigilância epidemiológica e políticas públicas insuficientes, no que tange às ações de educação em saúde para conscientização da problemática da leishmaniose visceral no território nacional.

A LV foi considerada uma enfermidade endêmica de áreas rurais, ocorrendo majoritariamente nos estados do Nordeste do país até os anos 90. Na década de 2000, com o avanço da urbanização da doença, esta passou a ter características periurbanas e urbanas, e 21 dos 27 estados atualmente são considerados endêmicos para LV, com taxas de transmissão variáveis para os seres humanos. Além da região nordeste,

nas duas últimas décadas houve inclusão de novas áreas com registro recorrente de casos no Sudeste, Norte e Centro-Oeste (MS, 2016).

Até 2007, a região Sul do Brasil era considerada sem risco de transmissão para LV e apenas poucos casos humanos importados tinham sido relatados (MS, 2010a). No entanto, em 2008, um surto de leishmaniose visceral canina (LVC) ocorreu no município de São Borja, Rio Grande do Sul (SOUZA; SANTOS; ANDRADE FILHO, 2009; DEBONI; BARBOSA; RAMOS, 2011). Em relação à infecção humana, nos dois anos seguintes do surto de LVC, foram notificados oito casos autóctones de leishmaniose visceral humana, incluindo seis adultos e duas crianças os quais resultaram em um óbito (DEBONI; BARBOSA; RAMOS, 2011).

Em Santa Catarina, no período entre os anos de 2001 e 2011, seis casos humanos importados de LV foram atendidos em hospitais de Florianópolis (NASCIMENTO et al., 2013). Em 2010 foram comprovados os primeiros casos autóctones de LVC na Ilha de Santa Catarina (FIGUEIREDO et al., 2012; STEINDEL et al., 2013). No período de julho de 2010 a dezembro de 2015 o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Florianópolis, através dos inquéritos sorológicos caninos realizados no município, identificou 197 cães positivos entre os 8257 caninos examinados, o que representa uma prevalência de 2,38%. (CCZ, 2015) (Tabela 1).

Tabela 1. Quantitativo de amostras coletadas e cães positivos, a partir de inquéritos sorológicos realizados pelo CCZ no município de Florianópolis para diagnóstico da LVC, no período de 2010 a 2015.

Ano	Amostras coletadas	Cães positivos	Cães positivos (%)
2010	764	23	3
2011	1360	8	0,6
2012	411	10	2,4
2013	2185	45	2,1
2014	2121	57	2,7
2015	1416	54	3,8
Total	8257	197	2,4

Fonte: Adaptado de CCZ, 2015.

No Brasil a LV é causada por *L. infantum* e *L. chagasi*, que foram consideradas a mesma espécie após o desenvolvimento de estudos de caracterização molecular (CUPOLILLO; GRIMALDI; MOMEN, 1994; CUPOLILLO; MOMEN; GRIMALDI, 1998; TESH, 1995; MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000; FERREIRA et al., 2012; MOTOIE et al., 2013).

Os mais relevantes vetores da LV no país são insetos pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae e Gênero *Lutzomyia* (LAINSON; SHAW, 1979; GONTIJO; MELO, 2004), além de outros gêneros (SARAIVA et al., 2009). O Ministério da Saúde considera *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* como as principais espécies envolvidas no ciclo de transmissão da LV no território nacional (MS, 2006).

Apesar da ocorrência de casos autóctones de LVC na capital catarinense, a presença de *Lu. longipalpis*, o principal vetor da LV, não foi comprovada no Estado. No levantamento entomológico realizado entre 2010 e 2012, no foco de LVC, foram identificadas 12 espécies de flebotomíneos: *Brumptomyia mangabeirai*, *Br. nitzulescui*, *Evandromyia edwardsi*, *Pintomyia fischeri*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia neivai*,

Expapillata firmatoi, *Psathyromyia lanei*, *Ps. pascalei*, *Evandromyia tupynambaie* *Lutzomyia* spp. Em um estudo entomológico subsequente desenvolvido em Florianópolis, nas localidades com casos de LVC, foi observada a infecção por *L. infantum* em *Lutzomyia neivai*, espécie de flebotomíneo frequentemente encontrada no monitoramento vetorial realizado pela Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina (DIVE-SC) (DIAS et al., 2013).

A característica antrozoonótica da LV é evidenciada no ciclo doméstico da doença, onde o cão comporta-se como o reservatório e contribui para a manutenção da enfermidade em ambientes urbanos e periurbanos (GONTIJO; MELO, 2004; MS, 2006). No ciclo silvestre os reservatórios mais importantes são os canídeos, como o cachorro-do-mato ou graxaim (*Cerdocyon thous*), e os marsupiais, como os gambás (*Didelphis albiventris*) (LAINSON; SHAW, 1979; GONTIJO; MELO, 2004; FALQUETO et al., 2003). Alguns desses animais têm hábitos sinantrópicos, o que pode consistir em uma possível correlação entre os ciclos doméstico e silvestre (GONTIJO; MELO, 2004).

Em Florianópolis, logo após a confirmação dos casos autóctones de LV entre os cães, foi desenvolvido um estudo para avaliar a transmissão de *Leishmania* spp. entre pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos e a importância na manutenção do parasito na localidade Canto dos Araçás, onde se originou o surto de LVC (JANSEN et al., 2010). Os resultados encontrados demonstraram, na época, a ausência de um ciclo de transmissão de *Leishmania* spp. bem estabelecido entre os animais silvestres. Os achados anteriores de cães infectados, com altas cargas parasitárias e potencial de infectividade ao vetor apontaram o protagonismo da espécie canina como reservatório da doença na região (JANSEN et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2012).

1.3 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A descrição na literatura dos agentes etiológicos causadores da leishmaniose visceral em cães contempla as espécies *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. brasiliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana* e *L. peruviana*, entretanto a relevância como reservatório doméstico da doença está relacionada ao ciclo de transmissão de *L. infantum* (DEREURE, 1999).

A espécie canina é incriminada como o mais relevante reservatório urbano da LV em decorrência da elevada prevalência da doença (COURA-VITAL et al., 2011) e pela alta carga parasitária na pele,

tornando-a importante fonte de infecção para o vetor (MOLINA et al. 1994).

Estima-se que milhões de cães estejam infectados por *L. infantum* na América do Sul, contribuindo para elevar o risco de transmissão de LV à população humana residente de áreas endêmicas (HARHAY; OLLIARO; COSTA, 2011). Essa situação adversa tem chamado a atenção das autoridades de saúde pública em buscar a identificação precoce de casos caninos, com o objetivo de intervir no ciclo epidemiológico em determinado local, mediante a adoção das medidas de prevenção e controle.

O período de incubação na espécie canina varia de 1 mês a 4 anos e a patologia desencadeada pela LV apresenta caráter crônico e multissistêmico, visto que o parasito pode ser identificado em diversos tecidos e órgãos do sistema mononuclear fagocitário, ocasionando um amplo espectro de manifestações clínicas e imunológicas (ALVAR, 2004).

Cerca de 60% dos cães são assintomáticos, ou seja, não desenvolvem qualquer manifestação de sinais clínicos sugestivos da infecção por *L. infantum* (FARIA; DE ANDRADE, 2012; CRMV-PR, 2015), entretanto mantêm a condição de reservatórios, sendo fontes de infecção para o inseto vetor (ALVAR et al., 1994). Nestes casos pode haver autocura ou evoluir para a forma grave, podendo levar o animal a óbito (GRIMALDI et al., 2012b). Quando há o aparecimento de sinais clínicos, o cão pode ser oligossintomático ou sintomático. No primeiro caso, a sintomatologia pode iniciar com moderada perda de peso, lesões de pele e/ou pelos opacos. Em relação aos sintomáticos, observa-se a evolução sistêmica da enfermidade podendo apresentar todos ou alguns sinais mais comuns da doença como linfadenomegalia, dermatite periorbital e nasal, pelagem opaca, emagrecimento, onicogribose e edema das patas (REIS et al., 2009; MS, 2006). Outros sinais, como febre, apatia, ceratoconjuntivite, diarreia, hepatomegalia, esplenomegalia, ulceração cutânea (nariz, orelhas e cauda) e paresia são frequentes, contudo não prevalecem em todos os cães sintomáticos (REIS et al., 2009).

A suspeita ou ocorrência de LVC deve ser reportada imediatamente às autoridades de saúde pública, conforme preconizado na Instrução Normativa nº 50 (MAPA, 2013), que lista as doenças de notificação compulsória. É obrigatória a notificação por qualquer cidadão que tome ciência do caso, bem como todo profissional que atue na área de diagnóstico, ensino ou pesquisa em saúde animal. A partir do conhecimento do caso a notificação deve ocorrer no máximo em 24 horas (MAPA, 2013).

Apesar de ser uma doença de notificação compulsória, poucos clínicos veterinários notificam casos suspeitos ou confirmados ao órgão oficial. Em Florianópolis, desde a confirmação da transmissão da LVC, apenas 35 notificações foram feitas ao CCZ, o que corresponde a apenas 17% dos casos de LVC confirmados oficialmente no município (CCZ, 2015).

A complexidade da doença sob diferentes aspectos, muitas vezes, reflete na divergência de opiniões dos médicos veterinários, principalmente os que atuam em clínica médica. Muitos desses profissionais defendem o tratamento dos cães com LVC e são contra a eutanásia. Todavia, tanto o Ministério da Saúde quanto o Conselho Federal de Medicina Veterinária ressaltam a posição contrária ao tratamento canino com produtos de uso humano ou de medicamentos não registrados pelo MAPA (MS, 2008; CFMV, 2016a). O posicionamento dessas instituições é baseado na ausência de estudos científicos comprobatórios da cura parasitária em cães, prevalecendo a condição permanente de reservatório, o que implica em risco à saúde pública, sendo recomendada a eutanásia dos animais infectados por *L. infantum* (IKEDA-GARCIA et al., 2010; FIGUEIREDO, et al., 2012; DONATO, et al., 2013). A determinação do tratamento dos cães com LVC pelo médico veterinário é enquadrada como conduta indevida, estando sujeito a penalidades éticas perante o CRMV, que variam desde advertência até cassação do exercício profissional (CFMV, 1968; CFMV, 2016a).

A OMS reitera que somente a promoção de medidas integradas, como o diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, a identificação e eutanásia de sororreagentes, o controle vetorial e a educação em saúde, garantirá a segurança e a saúde da população humana. A adoção dessas ações isoladamente, não tem apresentado efetividade para redução da incidência da doença (LEMONS et al., 2008), sendo necessária a reavaliação da política pública de controle da LV no Brasil (COSTA; VIEIRA, 2001).

1.4 DIAGNÓSTICO DA LVC

A precisão do diagnóstico da LVC constitui numa ferramenta fundamental para detecção precoce de cães positivos e, conseqüentemente, permite a rápida adoção das medidas preconizadas pelos órgãos de saúde pública, com o propósito de evitar o surgimento de casos humanos da doença e controlar a enzootia canina. Associado ao diagnóstico clínico-epidemiológico, o médico veterinário pode recorrer principalmente aos exames parasitológicos, aos diagnósticos

imunológicos e aos métodos moleculares para identificar cães com LV (CHAPPUIS et al., 2007).

O diagnóstico clínico da LVC caracteriza-se pela complexidade, tendo em vista a ausência de sinais patognomônicos da doença e o elevado número de cães assintomáticos. Ainda, a maioria dos sinais observados é encontrada em outras patologias caninas, como por exemplo, a babesiose e a erliquiose, o que dificulta o diagnóstico diferencial por parte do profissional (FARIA; DE ANDRADE, 2012). Geralmente, a suspeita clínica recai sobre a LV quando há a correlação com parâmetros epidemiológicos que indiquem a ocorrência de casos da doença em determinado local num dado período de tempo (GRIMALDI et al., 2012b).

Nesse sentido, a confirmação do diagnóstico pode ser feita mediante o uso de outras ferramentas, como os métodos parasitológicos, que representam uma especificidade de 100%. Estes consistem em técnicas que envolvem a punção de órgãos, como medula óssea e linfonodos para observação das formas amastigotas de *Leishmania* sp. O material obtido é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório. Entretanto, além de invasiva, essa técnica tem uma sensibilidade variável, podendo gerar resultados falsos negativos em decorrência do baixo número de parasitos presentes nas amostras, principalmente em cães assintomáticos (GOMES et al., 2008). Mesmo assim, o diagnóstico parasitológico prevalece como padrão ouro quanto às leishmanioses em virtude de sua elevada especificidade (ROMERO et al., 2009).

O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) do Ministério da Saúde adota o diagnóstico sorológico como o padrão nacional, pelas características de baixo custo, rapidez e alta confiabilidade. Essa metodologia é aplicada aos inquiridos no campo, voltados à investigação de cães suspeitos, quando é feita a coleta de sangue periférico, para proceder ao diagnóstico por teste rápido, ou sangue venoso, para a realização da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA), em laboratório (FARIA; DE ANDRADE, 2012).

Até a publicação da Nota Técnica Conjunta 01/2011 pelo MS, que substituiu o protocolo de diagnóstico da LVC, o teste de ELISA era recomendado para a triagem de cães e a RIFI para a confirmação dos cães reagentes ao teste de ELISA. Desde 2011, o teste rápido em plataforma de duplo percurso para LVC (TR-DPP® -LVC) é aplicado na triagem e o ELISA como teste confirmatório. A mudança de protocolo foi

fundamentada na avaliação dos fatores complicadores relacionados a RIFI, como ocorrência de reações cruzadas pela baixa especificidade, exigência elevada de técnicos treinados na sua execução, alto custo, retardo no diagnóstico e ineficácia para estudos epidemiológicos em larga escala (GONTIJO; MELO, 2004). Ambos os insumos diagnósticos são distribuídos pelo MS e estão disponíveis em kits específicos produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e autorizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

O TR-DPP®-LVC consiste em um ensaio de triagem imunocromatográfico, que utiliza uma combinação de antígenos recombinantes (proteínas K28 de *L. chagasi*) para detecção de anticorpos específicos para *Leishmania* sp. Além de poder ser utilizado com sangue, soro ou plasma de cães, esse teste confere maior praticidade, agilidade e confiabilidade no diagnóstico. Já o ELISA Bio-Manguinhos/FIOCRUZ caracteriza-se por ser um teste imunoenzimático baseado na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasmas de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major-like*, obtidos a partir de cultura *in vitro*. Essa é uma ferramenta diagnóstica rápida, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível, o que favorece a detecção de baixos títulos de anticorpos, e um pouco menos específico que a RIFI (GONTIJO; MELO, 2004). A adoção da metodologia TR-DPP® -LVC / ELISA trouxe mais confiabilidade e rapidez na identificação de cães positivos para LVC durante a avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos recomendados em programas de saúde pública.

Os métodos moleculares vêm sendo cada vez mais utilizados, tendo em vista a evolução e aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular para o diagnóstico da LVC (FARIA; DE ANDRADE, 2012). A detecção e a identificação de parasitos do gênero *Leishmania*, a partir de diversas amostras de material biológico e sem a necessidade de isolamento em meio de cultura, facilitam significativamente o diagnóstico. São inúmeras as técnicas inovadoras e que estão em constante aprimoramento, tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variantes (GOMES, et al., 2008). A PCR é fundamentada na amplificação de oligonucleotídeos que formam uma sequência.

Para identificar e determinar as espécies de *Leishmania*, grande parte dos estudos de epidemiologia molecular sobre LVC utiliza a técnica de análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição do produto amplificado (PCR-RFLP), que se caracteriza pela aplicabilidade às amostras clínicas, sensibilidade elevada, simplicidade e reprodutibilidade (SCHÖNIAN et al., 2003). A PCR-RFLP amplifica um

fragmento específico do kDNA, que em seguida é submetido à restrição com enzimas que clivam esta molécula em sítios específicos de reconhecimento, denominados sítios de restrição. A formação desses perfis de restrição torna possível a diferenciação das espécies de *Leishmania* spp. (VOLPINI et al., 2004; ROMERO et al., 2009), entretanto não permite a caracterização ao nível populacional ou subpopulacional dentro das espécies (MARLOW, 2013).

1.5 PROGRAMA DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM FLORIANÓPOLIS

Santa Catarina era considerado um estado indene para leishmaniose visceral até a notificação e confirmação dos primeiros cinco casos autóctones de leishmaniose visceral canina na região da Lagoa da Conceição, no município de Florianópolis, no ano de 2010 (FIGUEIREDO et al., 2012).

Após a confirmação de autoctonia, a Secretaria Municipal de Saúde de Florianópolis, por meio do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) e Diretoria de Vigilância em Saúde (DVS), e, em conjunto com a Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina (DIVE-SC) e com o Ministério da Saúde (MS), elaborou um Plano de Contingência para nortear as estratégias de ações, em consonância com as diretrizes preconizadas no Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral (MS, 2006).

A partir desse documento designou-se inicialmente ao município a execução da vigilância e controle dos reservatórios domésticos, a intensificação da vigilância e assistência a casos humanos da doença e a promoção de atividades de educação em saúde, voltadas à população residente nas áreas vulneráveis. A DIVE-SC, em parceria com o CCZ ficou responsável por realizar o monitoramento entomológico, incluindo a coleta, identificação laboratorial e o mapeamento dos vetores dessa zoonose nas áreas de foco (INDÁ et al., 2012).

No primeiro inquérito sorológico realizado na população canina no município a prevalência foi de 6,86% (CORRÊA et al., 2010), o que ratificou a ocorrência da transmissão de LVC na localidade da Lagoa da Conceição. Em consequência, a área de foco inicial era ampliada, à medida que se identificavam novos cães positivos, incorrendo na necessidade de reforçar as medidas de vigilância e controle.

A estratégia de monitoramento do reservatório canino tem por objetivos a identificação precoce de cães infectados por *Leishmania* sp., a eliminação dos animais positivos e a conscientização da população

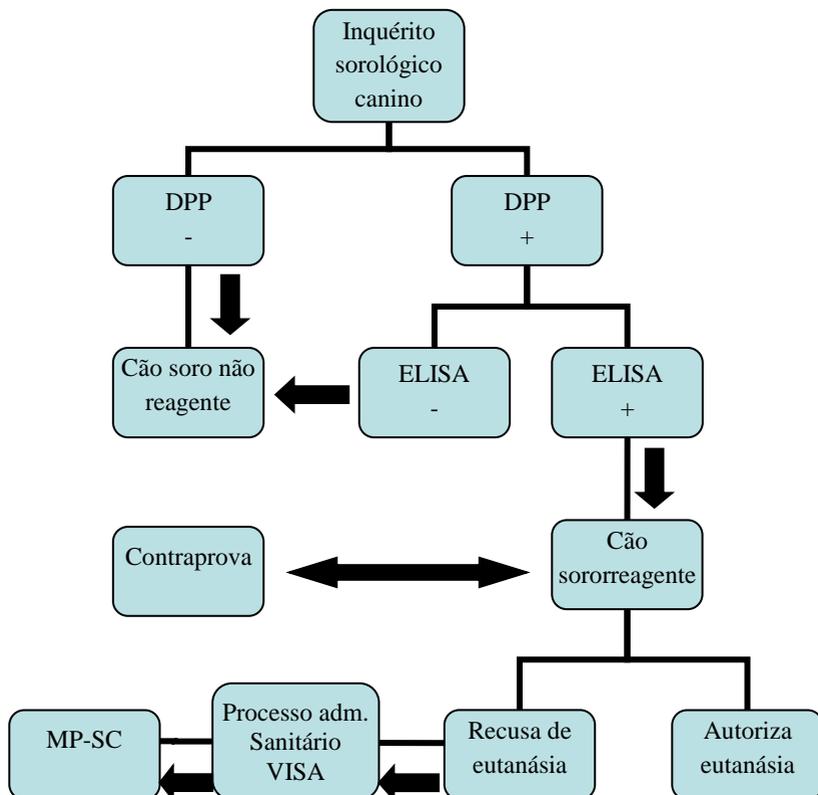
sobre a prevenção da LV. Os inquéritos sorológicos são amostrais e consistem na busca ativa de cães suspeitos, residentes das localidades com registro de casos de LVC ou em locais sob investigação. O trabalho é executado pela equipe do CCZ, composta por médico veterinário, auxiliar veterinário e motorista, ocasionalmente com o auxílio dos agentes comunitários de saúde que atuam nas microáreas investigadas, onde são feitas as visitas casa a casa. Ao concordarem em participar do inquérito, os proprietários dos cães assinam o termo de autorização para liberar a coleta de sangue de seus respectivos animais. O sangue coletado é acondicionado em caixa isotérmica e encaminhado ao Laboratório do CCZ, onde primeiramente são feitos os testes de triagem, com o kit DPP® LVC. Caso o resultado neste teste seja positivo, o material biológico (soro) é analisado pelo Laboratório Municipal de Florianópolis (LAMUF), que realiza o teste confirmatório com o kit ELISA Bio-Manguinhos/Fiocruz. O resultado é disponibilizado online aos proprietários, no portal da Secretaria Municipal de Saúde, com uso de CPF e senha.

Conforme fluxograma abaixo (Figura 4), cães não reagentes podem ser apenas DPP® LVC negativo ou DPP® LVC positivo/ELISA negativo. Cães reagentes tanto ao teste de triagem quanto ao confirmatório são considerados positivos para LVC, sendo recomendada a eutanásia, segundo preconiza o PVC-LV. Nessa situação, o proprietário do animal sororreagente é informado pessoalmente sobre o resultado, tendo direito a realização de exame de contraprova, na presença do médico veterinário do CCZ. Na persistência do resultado, o proprietário assina os termos específicos sobre autorização ou recusa de eutanásia. Para a realização de eutanásia são adotados os procedimentos e métodos previstos na Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do CFMV. Em caso de recusa, o CCZ reporta o caso à Vigilância Sanitária e Ambiental de Florianópolis, que irá lavrar o auto de infração, baseado no relatório técnico do CCZ e substanciado no Código de Vigilância em Saúde e demais legislações específicas. O auto de infração abre o processo administrativo sanitário e, a partir do momento do recebimento da notificação, o responsável pelo cão soro reagente tem 15 dias para apresentar defesa. Após o rito processual ocorrerá o julgamento do processo podendo caber a aplicação da penalidade de apreensão, que ocorrerá em conjunto com médico veterinário do CCZ. Somente após a recusa do proprietário em cumprir essa obrigação esses autos serão encaminhados ao Ministério Público de Santa Catarina (MP-SC).

Paralelamente ao monitoramento do reservatório canino, as ações de educação em saúde são desenvolvidas nas comunidades onde houve o

registro de cães com LVC. Nesta etapa há o envolvimento da Vigilância Epidemiológica e das equipes de Saúde da Família, vinculadas a Unidade Local de Saúde da área de abrangência do foco de LVC. O CCZ encaminha relatório mensal a DIVE-SC, para que as respectivas ações de monitoramento vetorial sejam implementadas.

Figura 4. Fluxograma do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) de Florianópolis, SC



2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O Brasil tem o revés de ser um dos países com maior número de indivíduos acometidos por Leishmaniose Visceral no mundo. No contexto da América Latina, lidera o ranking com aproximadamente 90% de casos autóctones registrados em seu território. Considerada uma doença emergente, devido a sua urbanização e coinfeção *Leishmania*/HIV, tem se propagado gradativamente para áreas até então indenes. Nos últimos anos atingiu também a região Sul, onde foram reportados casos humanos de LV, precedidos de enzootia canina, em algumas cidades do Rio Grande do Sul. Em 2010, no município de Florianópolis, na localidade da Lagoa da Conceição, foram identificados os primeiros casos autóctones de LVC do estado de Santa Catarina.

Apesar de não haver notificação de casos humanos originados na capital catarinense, o aumento da frequência de cães infectados por *L. infantum*, no decorrer do recente histórico dessa zoonose, tem preocupado as autoridades de saúde pública e a comunidade científica, com relação a uma possível epidemia humana. A estruturação, em 2010, do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, da Secretaria Municipal de Saúde de Florianópolis, conduzido pelo Centro de Controle de Zoonoses, permitiu o desenvolvimento de estratégias para identificar os reservatórios domésticos e promover as ações sanitárias e educativas recomendadas pelo Ministério da Saúde.

Por outro lado, o controle vetorial tem representado um desafio ao poder público, frente ao complexo ciclo da LV. A ausência das espécies incriminadas como transmissoras da doença nas Américas, *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*, no monitoramento do vetor realizado frequentemente pelo Estado de Santa Catarina e o indicativo do envolvimento de outras espécies de flebotomíneos, com características silvestres (DIAS, et al., 2013) suscitam a necessidade de repensar políticas públicas integradas, de forma a contemplar a organização do espaço urbano, em detrimento do desmatamento e da desordem na ocupação do solo.

A existência de residências dentro ou próximo à mata, associada à presença do reservatório canino favorecem a manutenção do ciclo epidemiológico da LV no habitat dos prováveis vetores, o que implica em prevalência da enzootia canina e risco à saúde pública. Outros fatores como a rápida reposição de cães nas localidades com casos de LVC e a circulação de animais nas áreas contíguas maximizam o potencial de disseminação da doença no território da Ilha de Santa Catarina.

Em decorrência do baixo número de notificações de suspeita de LVC por parte dos estabelecimentos veterinários privados e das limitações de infraestrutura, no tocante a recursos humanos e financeiros por parte do município, as atividades rotineiras executadas pelo CCZ restringem-se majoritariamente às áreas de foco. Por conseguinte, há defasagem na investigação epidemiológica em novas localidades e na promoção de ações mais ostensivas voltadas à prevenção e controle da LV.

Nesse sentido, torna-se evidente a necessidade de investigação epidemiológica em outras localidades da Ilha de Santa Catarina, de forma a contribuir para o real mapeamento da distribuição da ocorrência de casos em cães, indicando as áreas de maior risco e, com isso, sensibilizar os gestores municipais em unir esforços no enfrentamento dessa negligenciada zoonose.

O presente estudo comprova que a LVC está em expansão no município de Florianópolis, SC, extrapolando as áreas de foco iniciais, limítrofes à bacia hidrográfica da Lagoa da Conceição. A incidência de casos caninos da doença em novas localidades demonstra que, apesar da mobilização do poder público em intensificar a vigilância ativa, por meio de inquéritos sorológicos em cães residentes das áreas focais e eliminação dos reservatórios caninos, há insuficiência na detecção precoce de novos casos e, conseqüentemente, na contenção da enzootia canina.

3 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo epidemiológico da infecção por *Leishmania* sp. na população canina de 6 localidades do município de Florianópolis, Santa Catarina.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Realizar inquérito sorológico amostral em cães de 6 localidades no município de Florianópolis, buscando o diagnóstico de Leishmaniose;
- II. Fazer o isolamento de *Leishmania* sp. através de cultura de medula óssea, fígado, baço e linfonodo poplíteo;
- III. Identificar as amostras isoladas através de PCR-RFLP e hibridização.

4 MATERIAIS E METÓDOS

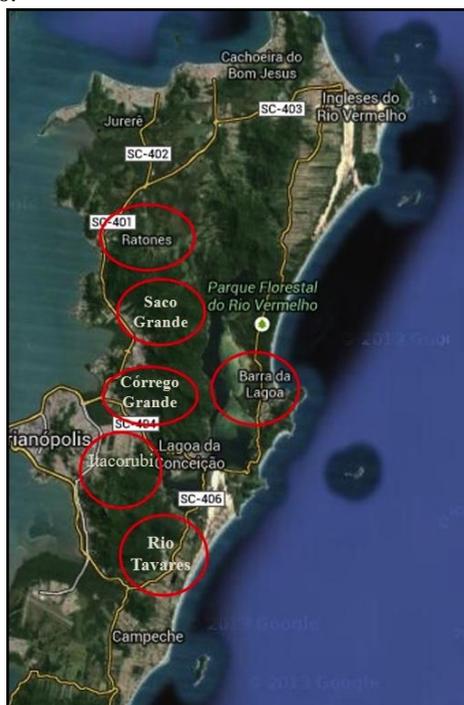
4.1 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM ESPACIAL

A investigação epidemiológica foi realizada no município de Florianópolis, capital do Estado de Santa Catarina, o qual possui uma população estimada de aproximadamente 470.000 habitantes e densidade demográfica de 623,68 habitantes/km² (IBGE, 2010).

Florianópolis está localizado na região litorânea, com altitudes mínima e máxima, respectivamente, de 8 metros e de 529 metros, próximo aos paralelos de 27° 25' e 27° 50' de Latitude Sul e entre os meridianos de 48° 20' e 48° 31' de Longitude Oeste (BUENO, 2003). A área geográfica do município é de 436 km², sendo a maior parte (424 km²) constituída pela Ilha de Santa Catarina, e o restante (12 km²) situado no continente (MEYER; SILVA, 2006).

As amostras coletadas foram provenientes de 6 localidades distintas, da porção insular de Florianópolis: Itacorubi, Córrego Grande, Barra da Lagoa, Saco Grande, Ratoles e Rio Tavares (Figura 5). As áreas delimitadas nesse estudo foram selecionadas com base na tendência de dispersão da leishmaniose visceral canina, na proximidade da mata atlântica e habitat de flebotomíneos.

Figura 5. Localização geográfica das localidades de Florianópolis, SC investigadas no estudo.



Fonte: Adaptado do Google Maps®, 2014.

A estimativa da população canina dos bairros investigados foi calculada a partir das recomendações feitas pela Organização Mundial da Saúde e pelo Instituto Pasteur de São Paulo, Brasil (INSTITUTO PASTEUR, 2013; WHO, 2015).

O percentual aplicado como referência de cálculo para estimar o quantitativo de cães em determinado local é definido pelas unidades federadas, considerando as características distintas de cada estado e região, podendo variar entre 12 a 20% em relação à população humana de cada estado (DIAS et al., 2004).

Conforme observado na Tabela 2, a estimativa da população de cães em Florianópolis baseou-se no percentual de 20% da população humana (MS, 2013). Os números de habitantes por localidade foram extraídos da base de dados do último censo do IBGE, em 2010.

Tabela 2. Estimativa da população canina baseada na população humana de cada localidade envolvida no estudo.

Localidade	População humana	População canina estimada
Itacorubi	15665	3133
Córrego Grande	10563	2112
Barra da Lagoa	4925	985
Saco Grande	7607	1521
Ratones	3671	734
Rio Tavares	4322	864

Considerando a amostragem total pré-estabelecida, foi adotado o percentual de 5% da população canina estimada para definir a quantidade de cães investigados por localidade.

A estimativa de cães por localidade e a avaliação da capacidade estrutural do CCZ para a consecução das ações subsidiaram o planejamento em equipe do quantitativo de cães investigados nesse estudo. Ficou definido o total de 465 cães, sendo, no máximo, 40 cães amostrados por mês. O período destinado à realização do inquérito sorológico foi de 1 ano, com início no mês de julho de 2014 e término em julho de 2015.

Dentro de cada localidade foram selecionados cães domiciliados e semidomiciliados. Os procedimentos foram divididos em 3 etapas: etapa 1- coleta de informações, através da abordagem dos proprietários e esclarecimentos; etapa 2- captura do cão, contenção e imobilização e etapa 3- coleta de sangue e acondicionamento do material biológico em caixa isotérmica para encaminhamento ao laboratório.

4.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

4.2.1 Diagnóstico sorológico

4.2.1.1 Coleta de sangue total

Foram coletados 5 mL de sangue venoso da veia cefálica do membro torácico, direito ou esquerdo, dos 567 cães, com auxílio de

agulha 25 x 0,8 mm e seringa de 5 mL ou de 10 mL. Em alguns cães, quando não foi possível a coleta a partir desta veia, a coleta foi realizada na veia femoral do membro pélvico, direito ou esquerdo do cão. O sangue coletado foi acondicionado em tubos de vidro com dimensão 16 x 100 mm (tubo e tampa siliconizados). As amostras foram identificadas com o número de protocolo da ficha de coleta e encaminhadas ao laboratório do CCZ para realização do Teste Rápido (TR) DPP® Leishmaniose Visceral Canina (LVC) Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. As amostras positivas nesta metodologia de triagem foram remetidas ao Laboratório Municipal de Florianópolis (LAMUF) para realização do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, técnica confirmatória. Para a realização dessa técnica as amostras foram centrifugadas para a obtenção do soro.

4.2.1.2 Teste Rápido DPP® LVC

O teste rápido imunocromatográfico DPP® LVC Bio-Manguinhos/FIOCRUZ (Figura 6), foi realizado segundo as instruções contidas no kit. Os dispositivos do teste (igual número de soros) foram removidos de suas respectivas embalagens e dispostos sobre a bancada do laboratório do CCZ. Procedeu-se à identificação dos dispositivos, conforme identificação dada às amostras no momento da coleta.

Inicialmente, foram aplicados 5 µL do soro e duas gotas do tampão no poço sample+buffer #1 do dispositivo, em seguida, aguardou-se 5 minutos. Continuando a reação, foram adicionados, no poço buffer well #2, 4 gotas do tampão. Após o período de 10 a 15 minutos, a leitura do resultado era feita visualmente, a partir da observação do aparecimento de linhas avermelhadas na janela definida do dispositivo. Nos soros positivos era possível observar duas linhas, ao passo que nos soros negativos, apenas uma linha era observada. É importante ressaltar ainda que o fabricante recomendou não ler o resultado do teste após 15 minutos do último procedimento. Os resultados obtidos com os soros dos animais foram anotados em planilhas do Microsoft Excel® e armazenadas no banco de dados do CCZ.

Figura 6. Amostras de sangue de cães investigados em inquérito sorológico, por meio do teste de triagem DPP® LVC. À esquerda, cão não reagente e à direita cão sororreagente.



4.2.1.3 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para a realização do Ensaio Imunoenzimático foi utilizado o Kit Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. Seguindo as orientações do fabricante, realizou-se as diluições dos soros (1:100), bem como dos controles positivos e negativos.

Os controles, positivo e negativo, assim como o conjugado e as placas de 96 poços já sensibilizados, foram mantidos a -20°C . Já o diluente de amostra/conjugado, a lecitina de leite, o tampão de lavagem, o diluente do substrato, o cromógeno (TMB), o substrato (H_2O_2) e o ácido sulfúrico 2 M foram mantidos entre 2°C e 8°C .

Os controles, positivo, negativo e amostras foram distribuídos em triplicata nas placas de ELISA de 96 poços. A placa foi incubada a 37°C durante 30 minutos. Na sequência, o conteúdo foi aspirado e lavado seis vezes com 200 μL de tampão de lavagem. Foi adicionado 100 μL de conjugado previamente diluído/preparado a cada poço. Procedeu-se nova incubação a 37°C durante 30 minutos e nova lavagem, conforme descrito anteriormente. Em seguida, adicionou-se 100 μL /poço de substrato já preparado. Nova incubação foi realizada durante 30 minutos ao abrigo da luz. Para bloquear a reação, foram adicionados 50 μL de ácido sulfúrico 2 M em todos os orifícios. A leitura foi realizada no leitor de ELISA (BIO-RAD Benchmark) para microplacas equipado com filtro de 450 nm, sem

a utilização de filtro de referência. O cálculo do ponto de corte obedeceu às orientações do fabricante: dobro da média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo multiplicado por 1,2 (faixa cinza). Sendo assim, as amostras consideradas reagentes foram àquelas que apresentaram densidade ótica igual ou superior ao ponto de corte; enquanto as amostras não reagentes apresentaram densidade ótica inferior ao ponto de corte. O teste foi considerado válido, uma vez que atendeu aos critérios de validação determinados pelo fabricante, isto é, os valores da densidade ótica do controle positivo foram iguais ou superiores a 0,500, assim como os valores da densidade ótica do controle negativo estavam compreendidos entre 0,050, inclusive, e 0,120, inclusive também.

4.2.2 Diagnóstico parasitológico e molecular

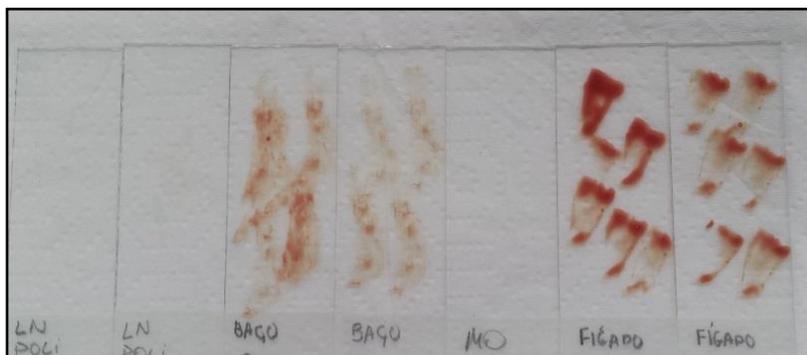
4.2.2.1 Coleta de tecidos e sangue

Após a confirmação do diagnóstico sorológico para LVC, os cães cujos proprietários assinaram o termo de responsabilidade foram submetidos ao procedimento de eutanásia, de acordo com os princípios de ética, bioética e bem-estar animal (CFMV, 2002). O protocolo adotado no CCZ consistiu na contenção física dos animais, seguida de anestesia com administração de 10 mg/kg de cloridrato de cetamina associado a xilazina na dose de 1mg/kg por via intramuscular. Após a avaliação de status anestésico profundo, com perda de consciência, reflexo muscular e de estímulos nocivos, foi administrado 0,3 mg/kg de T61[®] por via intravenosa e confirmação do óbito pela ausência de sinais vitais na auscultação. Após a eutanásia, foi feita a necropsia desses cães e a coleta de material biológico (linfonodos, fígado, baço e medula óssea) (Figura 7). Durante a necropsia, amostras de fígado, baço, linfonodo e medula óssea foram utilizadas para a realização de *imprinting* (Figura 8). O material coletado foi enviado ao laboratório de Protozoologia da UFSC visando à preparação de esfregaços e fixação de material em formol 10% tamponado para exame parasitológico direto, para o cultivo e isolamento do parasito em meio Schneider e para realização da PCR. O sangue total foi coletado com auxílio de agulha 25 x 0,8 mm e seringa de mL ou de 10 mL e transferidos para tubos enriquecidos com EDTA.

Figura 7. Necropsia e coleta de material biológico de cão com LVC realizadas no CCZ, após confirmação por diagnóstico sorológico e eutanásia.



Figura 8. *Imprinting* de linfonodo, baço, medula óssea e fígado de cão com LVC.



4.2.2.2 Exame parasitológico direto

As lâminas feitas com o *imprinting* dos tecidos (medula óssea, baço, fígado e linfonodo) foram identificadas e, em seguida, fixadas com metanol e posteriormente secas à temperatura de 28°C, para serem encaminhadas ao laboratório de Protozoologia da UFSC, onde foram coradas por Giemsa. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico em objetiva de 100X (imersão) para procura do parasito. O

resultado positivo indicava a presença de formas amastigotas arredondadas, com presença de núcleo e cinetoplasto, livres e/ou inclusas em células do sistema fagocítico mononuclear. Quando no exame de 1.000 campos microscópicos não eram detectados parasitos a lâmina era considerada negativa.

4.2.2.3 Isolamento e cultivo *in vitro*

Aspirado de medula óssea, linfonodo, baço e fígado de animais com sorologia positiva para LVC foi semeado em tubos de cultura contendo meio Schneider suplementado com estreptomicina (20 µg/mL) e penicilina (200 UI/mL) e mantido em estufa biológica à temperatura de 26°C, e examinadas semanalmente para o acompanhamento do crescimento de *Leishmania* sp. Os cultivos negativos foram mantidos por até quatro semanas. As amostras isoladas foram mantidas por passagens semanais regulares em 5 mL de meio e, após a cultura atingir a densidade de 3.10⁷/mL, as amostras foram criopreservadas em nitrogênio líquido e 1 mL da cultura foi lavada por centrifugação 1.500 xg em PBS e o sedimento armazenado a -20°C para identificação da amostra por PCR-RFLP.

4.2.2.4 Identificação de *Leishmania* por PCR-RFLP do fragmento de minicírculo de kDNA

O DNA das amostras de *Leishmania* isoladas foi extraído pelo método fenol-clorofórmio como descrito por SAMBROOK e RUSSELL, 2001. Após precipitação com isopropanol, o DNA foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% gelado, reconstituído em 50 µL de água ultrapura, contendo RNase A (10 mg/mL), incubado a 37°C por 1 hora e, em seguida, armazenado a -20°C até sua utilização. A avaliação da pureza e da concentração ocorreu em espectrofotômetro.

A amplificação da região conservada de minicírculos de kDNA seguida da técnica de análise de polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição do produto amplificado (PCR-RFLP) foi utilizada para diagnóstico e determinação das espécies de *Leishmania*, empregando a metodologia descrita por Volpini et al. (2004). Resumidamente, a banda de 120 pb, correspondente do fragmento de minicírculo k-DNA de *Leishmania* foi amplificado por PCR usando os iniciadores 150 [5'-GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA -3'] e 152 [5'- (G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C -3']. A reação foi realizada

em um volume final de 20 μ L, contendo 10 ng de DNA, 2 μ L de tampão de reação 10 X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 0,25 μ M de iniciadores, 0,2 μ M de dNTPs e 1U de *Taq* polimerase. Após uma desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos a amplificação foi feita com 5 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 30 s e 72°C por 10 s, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 30 s e 72°C por 10 s, e extensão final de 72°C por 5 minutos. DNA de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M-2904), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75), foram utilizados como controles positivos. Como controle negativo a reação de amplificação foi realizada sem adição de DNA. Cinco microlitros de cada produto amplificado foram resolvidos em gel de agarose a 1,5%, corado por brometo de etídio, visualizado em transiluminador e registrado digitalmente. Quinze microlitros do produto amplificado de cada isolado foram precipitados com isopropanol, lavados duas vezes em etanol 70% gelado e suspensos em 15 μ L de água ultrapura. Para digestão, 5 μ L de produto amplificado foi incubado com 1U da enzima de restrição de *Hae*III (New England Biolabs) em tampão apropriado a 37°C por 3 horas. O mesmo procedimento foi feito com a enzima de restrição *Ava*I (New England Biolabs). Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e corados pelo brometo de etídio. As amostras que correspondiam a *L. (L.) infantum* apresentaram fragmentos de 120, 80 e 40 pb ou 60 pb.

4.2.2.5 Hibridização

As amostras de DNA foram amplificadas como descrito no item 4.2.2.4 e os produtos da reação submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e transferidos por capilaridade para membrana de nylon (Sigma) e fixado por exposição à luz UV em UVC 500 *Crosslinker* (GE Healthcare) com energia de 1200 x 100 μ J/cm². Os fragmentos de 120 pb obtidos a partir da amplificação de amostras controle de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* foram submetidos a precipitação com isopropanol 75%, lavado com etanol 70% e desnaturados a 100°C / 5 minutos e mantidos em banho de gelo / 5 minutos. A seguir os fragmentos foram conjugados com peroxidase utilizando o Kit *ECL Direct Nucleid Acid Labelling and Detection System* (GE Healthcare) e utilizados como sonda. As membranas foram hibridizadas com as respectivas sondas em tampão de hibridização (GE Healthcare), por 14 horas a 42°C, lavadas três vezes em tampão SSC 0,5 x contendo 0,4% SDS e 6 M ureia e duas vezes em tampão SSC 2x a 42°C. O sinal positivo foi detectado por

quimioluminescência a partir da adição a membrana do reagente de detecção ECL (GE Healthcare) por um minuto, seguido da exposição do filme (Hyper film TM ECL – GE Healthcare) por quinze minutos à temperatura ambiente, conforme recomendação do fabricante.

4.3 ASPECTOS ÉTICOS E MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA

O presente estudo foi realizado em consonância com as diretrizes do SUS, buscando a melhoria do acesso e a promoção da saúde da população. No que tange aos procedimentos realizados em cães, incluída a coleta de sangue, eutanásia, necropsia e coleta de tecidos, todos os experimentos foram executados por profissional médico veterinário, oficial, de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 1968).

Os proprietários dos cães foram informados sobre cada etapa do estudo e orientados em relação aos procedimentos desenvolvidos. Também assinaram os termos de autorização para coleta de amostra biológica (ANEXO A), responsabilidade para a autorização de eutanásia (ANEXO B) ou responsabilidade para a recusa de eutanásia (ANEXO C), conforme previsto no Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (MS, 2006). Procedimentos adequados de confidencialidade foram observados para proteger a privacidade das informações do proprietário.

Durante todas as etapas de coleta de material biológico e análise laboratorial, no intuito de manter a integridade física da equipe de trabalho e dos usuários, foram adotadas medidas de biossegurança, que incluíram o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) e equipamentos de proteção coletiva (EPC).

4.4 ANÁLISE DOS DADOS

Este estudo está configurado como qualitativo transversal, visto que as aferições foram executadas em um único momento, dispensando a necessidade de um período de acompanhamento. Somente o delineamento transversal fornece a prevalência de uma doença ou de um fator de risco. Desse modo, a análise dos dados foi feita mediante estatística descritiva, que é característica de estudos de prevalência (transversais) (HULLEY et al., 2008).

Os dados deste trabalho foram compilados e organizados em frequências absolutas e relativas, apresentados e dispostos em forma de

tabelas e/ou gráficos. Foi utilizada a planilha do Microsoft Excel® como suporte na realização dos cálculos, organização, análise e interpretação dos dados.

5 RESULTADOS

5.1 CONFIRMAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM NOVAS LOCALIDADES DO MUNICÍPIO DE FLORIANÓPOLIS, SC

Considerando a amostragem total pré-estabelecida, foi adotado o percentual de 5% da população canina estimada para definir a quantidade de cães investigados por localidade. A Tabela 3 retrata o número amostral de cães por localidade investigada.

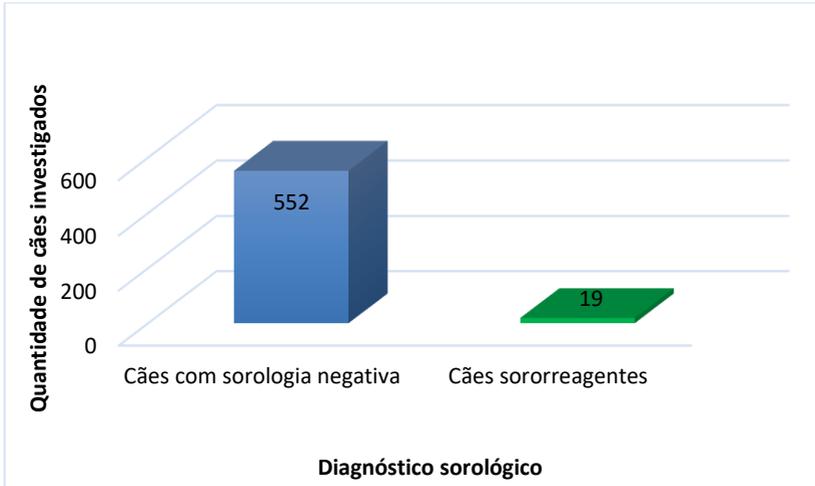
Entretanto, no decorrer da pesquisa o serviço de vigilância de zoonoses detectou novos focos de LVC nas localidades da Barra da Lagoa e Rio Tavares, sendo necessária a realização de inquéritos sorológicos amostrais, à princípio, não previstos nesta pesquisa. Optou-se por utilizar todas as amostras excedentes da estimativa inicial de 5% para evitar um viés amostral (Tabela 3).

Tabela 3. Amostragem de cães por localidade investigada.

Localidade	Amostragem estimada para o inquérito	Amostra coletada
Itacorubi	156	156
Córrego Grande	105	105
Barra da Lagoa*	49	63
Saco Grande	76	76
Ratones	36	36
Rio Tavares*	43	131
Total	465	567

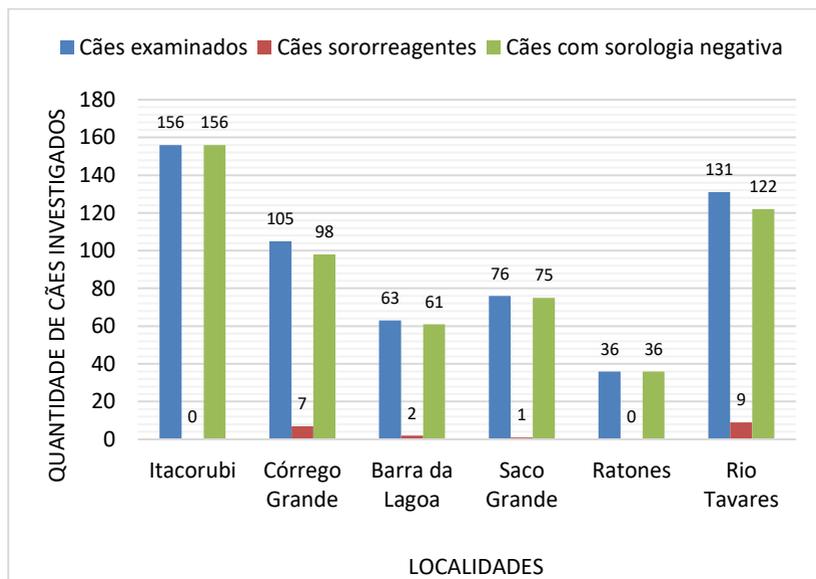
Dos 567 cães avaliados no inquérito sorológico neste estudo, realizado em conjunto com o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Florianópolis, SC, 19 cães apresentaram diagnóstico sorológico positivo para leishmaniose visceral canina (LVC) (Figura 9).

Figura 9. Análise quantitativa do total de cães soro reagentes e não soro reagentes nas localidades investigadas no município de Florianópolis, SC, no período de julho de 2014 a julho de 2015.



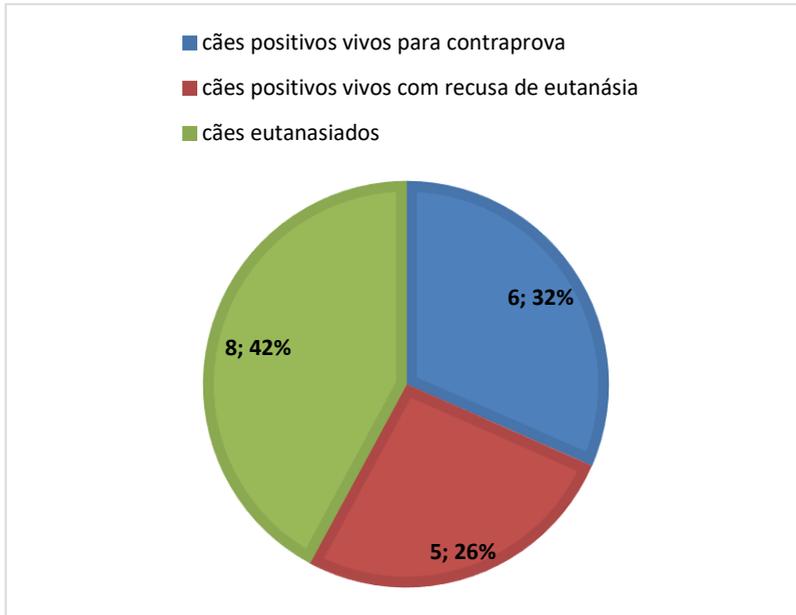
Das 6 localidades investigadas, foi confirmada a ocorrência de casos autóctones de LVC no Saco Grande (1), Barra da Lagoa (2), Córrego Grande (7) e Rio Tavares (9), conforme Figura 10. Nas localidades do Itacorubi e Ratoões não foram identificados cães sororreagentes para LVC no presente estudo.

Figura 10. Distribuição dos casos de LVC por localidade no município de Florianópolis, SC, no período de julho de 2014 a julho de 2015.



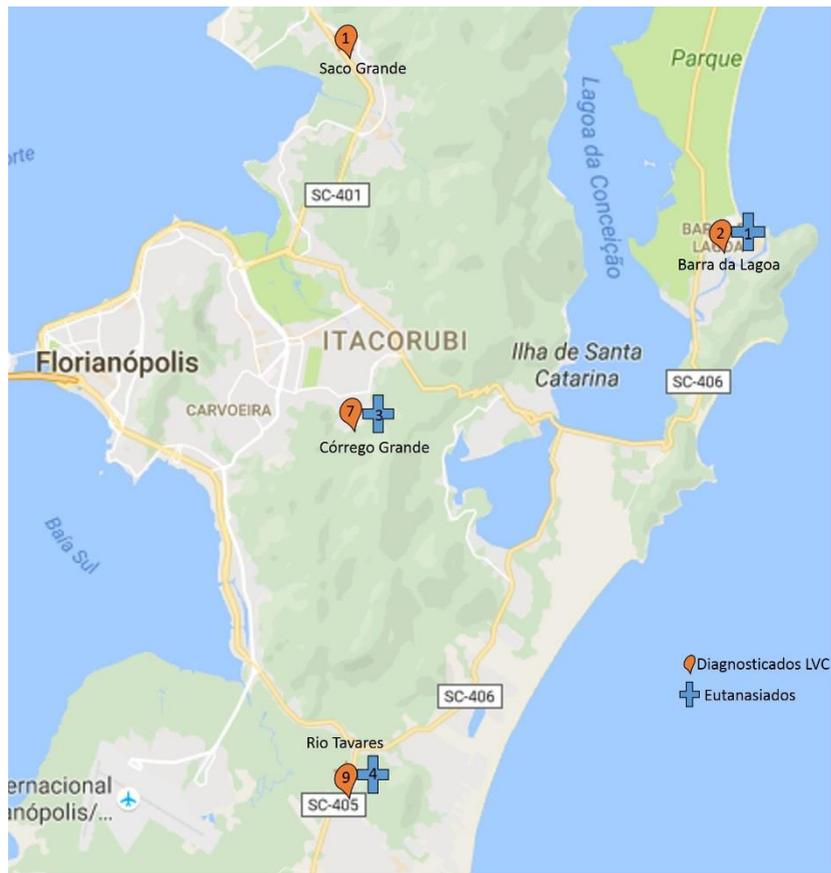
Durante o desenvolvimento deste trabalho, apenas 8 cães de 19 com diagnóstico sorológico positivo para LVC foram submetidos aos procedimentos de eutanásia e necropsia, sendo o material biológico desses animais encaminhado ao Laboratório de Protozoologia da UFSC. Até o fechamento dos dados para este estudo (Figura 11), os respectivos proprietários dos demais cães vivos aguardavam a tramitação do exame de contraprova ou haviam assinado o Termo de Responsabilidade para a Recusa de Eutanásia, por não concordarem com as medidas sanitárias recomendadas pelo órgão oficial de saúde pública, o que desencadeou a abertura de um processo administrativo sanitário no âmbito da Vigilância Sanitária e Ambiental do município de Florianópolis, SC.

Figura 11. Número de cães sororreagentes para Leishmaniose Visceral vivos e eutanasiados no período de julho de 2014 a julho de 2015, em Florianópolis, SC.



Conforme a Figura 12, dos 8 cães com diagnóstico sorológico positivo para LVC, cujos proprietários autorizaram os procedimentos de eutanásia e necropsia, 4 animais eram oriundos das localidades do Rio Tavares, 3 do Córrego Grande e 1 da Barra da Lagoa.

Figura 12. Quantidade por localidade de cães diagnosticados com LVC e submetidos ao procedimento de eutanásia, em Florianópolis, SC, no período de julho de 2014 a julho de 2015.



Dos 8 cães positivos eutanasiados, 4 eram assintomáticos, 3 foram considerados oligossintomáticos e apenas 1 tinha os sintomas clínicos característicos da LVC (Figura 13). Durante os procedimentos de necropsia e coleta de material biológico foi observado que 100% dos animais eutanasiados apresentavam hepatomegalia e esplenomegalia (Figura 14).

Figura 13. Comparação dos cães com LVC eutanasiados de acordo com a classificação de sintomatologia e achados de necropsia, em Florianópolis, SC, no período de julho de 2014 a julho de 2015.

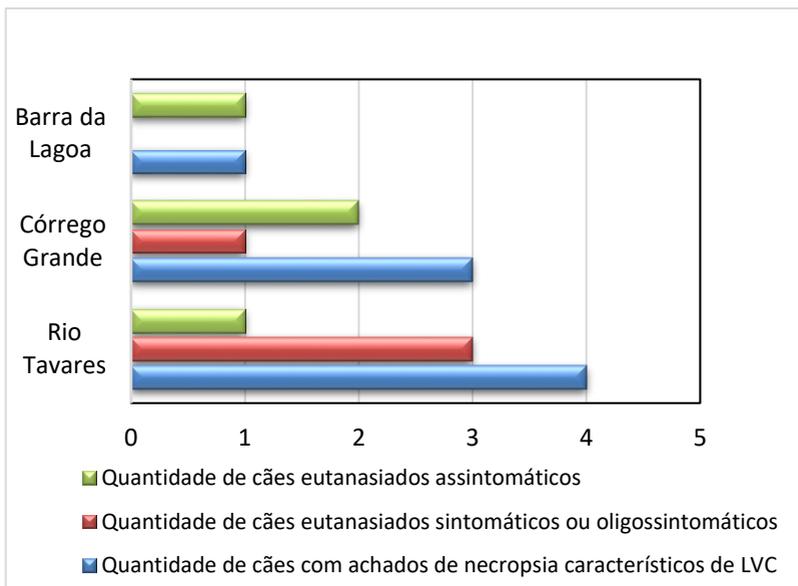


Figura 14. Esplenomegalia e lesões no baço observadas durante necropsia realizada em cão assintomático com diagnóstico sorológico positivo para LVC, em Florianópolis, SC, no período de julho de 2014 a julho de 2015.

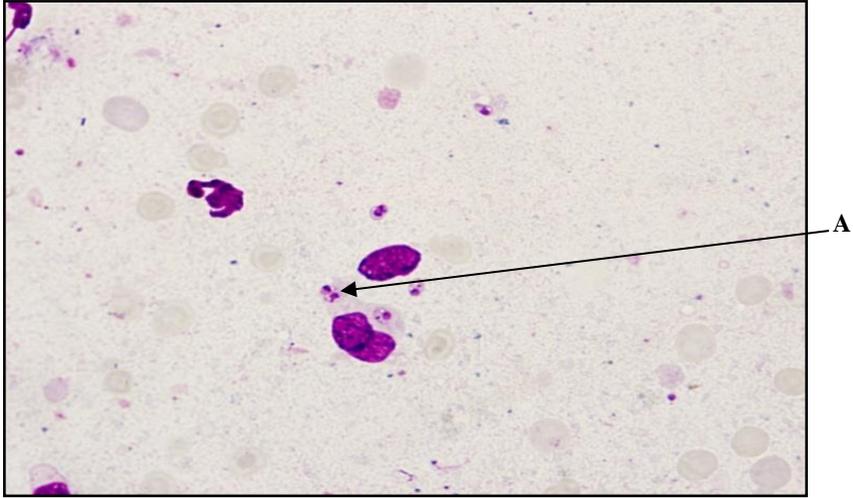


5.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E TÉCNICAS MOLECULARES DE PCR-RFLP E HIBRIDIZAÇÃO RATIFICAM O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO.

Dos 8 cães positivos no diagnóstico sorológico, 100% apresentaram a confirmação nos métodos parasitológico e molecular.

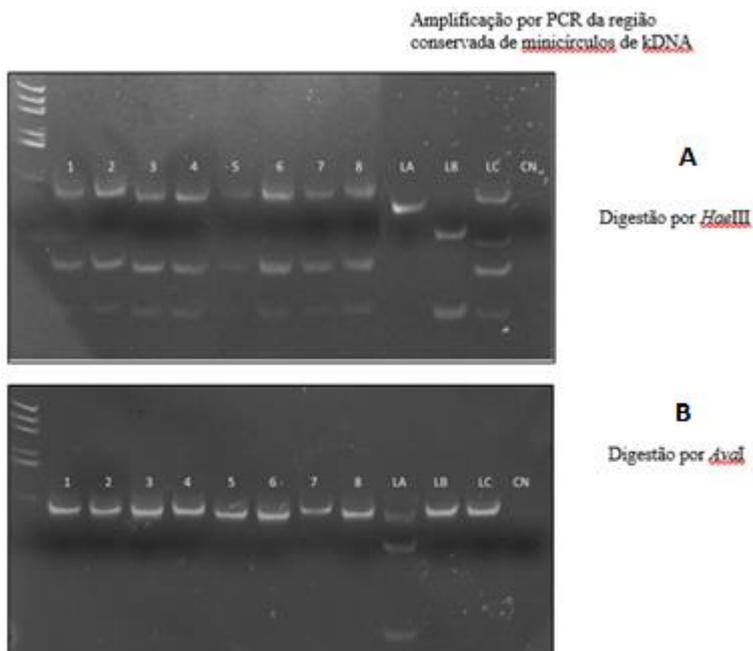
A Figura 15 evidencia a confirmação de LVC no exame parasitológico direto sob microscopia, em *imprinting* de fígado de um cão assintomático com diagnóstico sorológico positivo. Observa-se a presença de formas amastigotas arredondadas, com núcleo e cinetoplasto, inclusas em células do sistema fagocítico mononuclear.

Figura 15. *Imprinting* de fígado corado pelo Giemsa de cão assintomático com diagnóstico sorológico positivo para LVC. (A) Presença de formas amastigotas arredondadas, com núcleo e cinetoplasto, livres e no interior de células do sistema fagocítico mononuclear. Dimensão do corte histológico de 10 μ m.



A Figura 16 representa os resultados de PCR-RFLP do fragmento de 120 pb da região repetitiva do minicírculo de k-DNA de *Leishmania* digerido com as enzimas de restrição *Hae*III e *Ava*I. As amostras que correspondem a *L. (L.) infantum* apresentaram fragmentos de 120, 80 e 40 pb ou 60 pb.

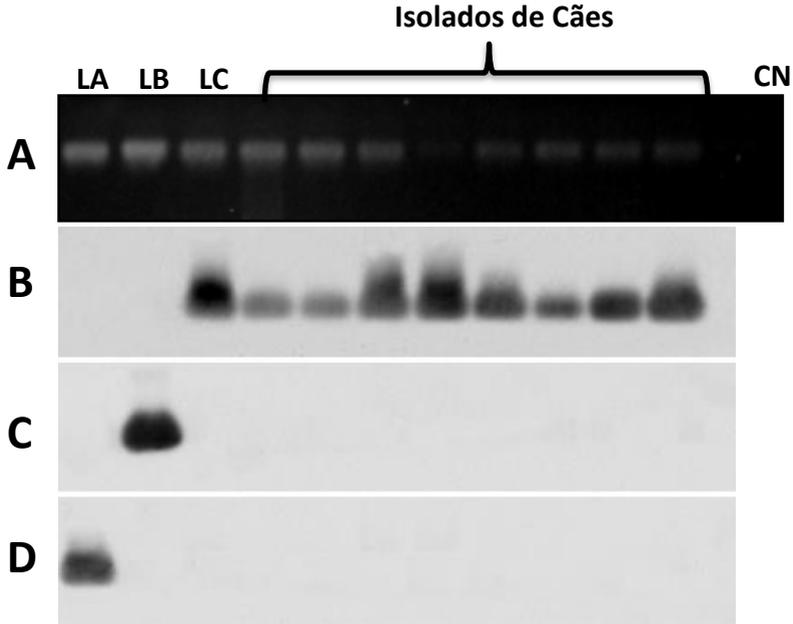
Figura 16. Gel de poliacrilamida 10% corado pelo brometo de etídio, representativo da PCR-RFLP do fragmento de 120 pb de *Leishmania* isoladas de 8 cães com diagnóstico sorológico positivo para LVC no período de julho de 2014 a julho de 2015.



A - As amostras isoladas de cães estão representadas pelos números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e as amostras controle por LA= *L. amazonensis*; LB= *L. braziliensis*; LC= *L. infantum* e CN= controle negativo. Digestão pela enzima de restrição *Hae* III;
B - As mesmas amostras digeridas com a enzima *Ava*I.

Para confirmação específica, os produtos amplificados de 120 pb da região repetitiva do minicírculo foram hibridizados com sondas espécie-específica e todas as amostras isoladas de cães no presente estudo apresentaram hibridização com a sonda de *L. infantum* (Fig. 17).

Figura 17. Técnica molecular de Hibridização espécie específica para confirmar a presença de *L. infantum* nas amostras isoladas de 8 cães com diagnóstico sorológico positivo para LVC no período de julho de 2014 a julho de 2015.



A = Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio, representativo da amplificação do fragmento de 120 pb de *Leishmania amazonensis* (LA), *L. braziliensis* (LB), *L. infantum* (LI), 8 isolados de cães Controle Negativo (CN); **B** = Hibridização do fragmento amplificado com a sonda de *L. infantum*. **C** = Hibridização do fragmento amplificado com a sonda de *L. braziliensis*. **D** = Hibridização do fragmento amplificado com a sonda de *L. amazonensis*.

6 DISCUSSÃO

Este estudo surgiu a partir da necessidade de investigação epidemiológica de leishmaniose visceral canina (LVC) em novas localidades no município de Florianópolis, SC, adjacentes às áreas com registros oficiais de casos dessa zoonose e que não estavam incluídas no monitoramento realizado no Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV), coordenado pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da capital do estado de Santa Catarina. Após a consolidação dos resultados deste trabalho, os dados foram compartilhados com o CCZ e integrados ao banco de dados informatizado da instituição, permitindo assim o monitoramento de animais nestas áreas e a recuperação de informações para estudos futuros.

Os resultados encontrados demonstram claramente a expansão da enzootia canina em Florianópolis, onde a confirmação de 19 animais positivos dentre os 567 cães submetidos ao inquérito sorológico revelou uma incidência de 3,35%.

A prevalência global da LVC foi 2,38% no período de 2010 a 2015, incluindo os resultados deste estudo (CCZ, 2015). Apesar do aumento do registro de casos autóctones de LVC, a prevalência dessa zoonose em Florianópolis ainda é baixa quando comparada aos indicadores em áreas historicamente endêmicas. Em Dourados, Mato Grosso do Sul, Marcondes et al. (2012) encontraram uma prevalência de 5,94% de LVC entre 505 amostras submetidas ao diagnóstico sorológico.

Em Cuiabá, capital do estado de Mato Grosso, De Almeida, Mendonça e Franco (2010) identificaram, em 2010, a prevalência de 37,3% para LVC dentre 150 cães investigados em inquérito sorológico, e alertaram sobre a importância de realizar inquéritos epidemiológicos mais abrangentes para mensurar a dispersão da doença pelo município e subsidiar ações de prevenção e controle mais efetivas.

Em estudo retrospectivo descritivo com base nos dados do CCZ de Brasília/DF, no período de outubro a novembro de 2013 a prevalência de LVC foi 9,19%, sendo a maior parte dos casos registrados nas cidades de Sobradinho e Lago Norte, onde o desmatamento foi considerado um fator de risco para o aumento de casos da doença (HERENIO; FORTES; RINCON, 2014).

Em Juatuba, cidade mineira localizada a 50 km da capital Belo Horizonte, Borges et al. (2014) mensuraram a prevalência para LVC para auxiliar nas ações de vigilância e controle da LV no município e o

resultado encontrado foi de 10,6%, considerado elevado, porém esperado, tendo em vista o progressivo processo de urbanização na cidade.

No estado do Rio Grande do Sul, que era considerado indene para LV até 2008, a prevalência entre os anos de 2009 e 2010 foi de 22,5% no município de São Borja, área de fronteira com a Argentina e onde foram registrados os primeiros casos autóctones de LVC da região Sul (TARTAROTTI et al., 2011).

No extremo oeste de Santa Catarina, nas divisas com a Argentina e com o estado do Paraná, nas cidades de São Miguel do Oeste e Descanso, Maziero et al. (2014) relatou um estudo desenvolvido com cães residentes tanto na área rural como na área urbana das cidades citadas, onde 48 cães (19%) foram diagnosticados positivos para leishmaniose visceral por técnicas sorológicas e moleculares, dentre 252 cães avaliados.

A identificação de cães positivos para LVC em novas localidades de Florianópolis aponta que a vigilância ativa, por meio de inquéritos sorológicos realizados em áreas de foco, não tem sido suficiente para detectar precocemente animais positivos na cidade. Um dos fatores que pode estar associado a essa condição é o baixo índice de notificações da suspeita clínica de LVC em cães atendidos nos estabelecimentos veterinários de Florianópolis. Dados obtidos a partir de relatórios elaborados pelo CCZ (2015) demonstram que apenas 17% dos casos de LVC confirmados oficialmente no município foram provenientes de notificações de médicos veterinários da iniciativa privada. No período de 2010 a 2015 foram apenas 35 notificações, um número considerado muito baixo e que não reflete a atual situação epidemiológica da LVC em Florianópolis (CCZ, 2015).

Um dos motivos do baixo número de notificações de suspeita de LVC em Florianópolis pode estar relacionado ao déficit de conhecimento dos profissionais médicos veterinários em identificar os sintomas da doença nos cães. Em um estudo desenvolvido por Camargo e Bondan (2015), com o objetivo de avaliar o conhecimento dos médicos veterinários sobre LVC e as orientações repassadas por estes à população, foi aplicado um questionário de forma voluntária a 40 médicos veterinários que prestavam atendimento em 36 clínicas veterinárias do município de Cotia, SP, no período de março a julho de 2010. Após a análise das informações obtidas, observou-se que os principais sinais clínicos de LVC eram conhecidos por apenas 37,5% (15/40) dos profissionais entrevistados e 62,5% (25/40) orientavam sistematicamente acerca das medidas de prevenção da LV a todos os seus clientes. Apesar da maioria dos entrevistados ter conhecimento sobre as medidas de

prevenção, a minoria dos profissionais soube identificar corretamente os sintomas de um cão com LVC, o que dificulta a suspeita clínica dessa zoonose e consequentemente na notificação aos órgãos de saúde pública.

Em Florianópolis, SC, Meditsch (2006) constatou na última década que a maior parte dos médicos veterinários informa ao cliente sobre zoonoses apenas em situações específicas e não percebe as zoonoses como um problema de saúde pública, mas sim como uma enfermidade, em todos os seus aspectos clínicos. A visão restrita dos profissionais relacionada à saúde animal, em detrimento da coletividade compromete a efetividade dos programas de saúde pública, em decorrência da falta de conexão entre iniciativa privada e poder público na promoção de ações integradas para vigilância e controle da leishmaniose visceral.

Nesse sentido, é fundamental a proatividade dos médicos veterinários na atenção aos casos suspeitos de LVC, sendo necessária a constante atualização sobre a doença, a observância na legislação sobre a obrigatoriedade da notificação e as recomendações sanitárias, de forma a atender aos preceitos de saúde pública (FOGANHOLI; ZAPPA, 2011). Ainda, cabe aos médicos veterinários o protagonismo na promoção da Saúde Única, orientando e esclarecendo à população para garantir a compreensão e a mobilização da comunidade no desenvolvimento de ações de vigilância e controle dessa complexa zoonose, nos seus diversos aspectos.

O protocolo oficial de diagnóstico adotado pelo Ministério da Saúde (MS) busca rapidez, praticidade e qualidade, com o objetivo de detectar com precocidade a presença de reservatórios caninos em áreas de transmissão de leishmaniose visceral. O diagnóstico rápido e preciso em cães com LVC é fundamental para retirar animais infectados da área e interromper o ciclo de transmissão dessa zoonose, de forma a prevenir casos humanos da doença (SILVA et al., 2004).

A aplicação das técnicas imunocromatográficas contribuiu significativamente na melhoria e praticidade do diagnóstico realizado em campo. O teste rápido DPP®-LVC, imunocromatográfico, como opção de triagem, associado ao ensaio imunoenzimático (ELISA), como exame confirmatório, reduziu a quantidade de resultados indeterminados quando comparado ao protocolo anterior. Até 2011, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) era a metodologia empregada pelo MS na confirmação de casos positivos de LVC, após triagem pelo ELISA. Contudo, a RIFI apresentava reações cruzadas principalmente com leishmaniose tegumentar americana (LTA) e tripanossomíase americana (FARIA, 2012), o que gerava grandes desconfianças por parte dos

médicos veterinários e dos proprietários dos animais (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

A efetividade do TR DPP® LVC Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, que associa dois antígenos recombinantes (rK39 e rK26) é satisfatória, mas ainda necessita ser aperfeiçoada. Apresenta elevada sensibilidade apenas em cães sintomáticos (98%), visto que é menor (47%) nos assintomáticos (GRIMALDI et al., 2012a), sendo recomendada a inserção de mais antígenos no teste imunocromatográfico para que a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* seja mais eficaz na fase inicial ou assintomática da doença. Não obstante, bons resultados nos parâmetros de especificidade e sensibilidade do TR DPP® LVC foram encontrados por Leandro Junior (2014) no diagnóstico da zoonose tanto para cães sintomáticos quanto assintomáticos, quando as especificidades apresentadas foram, respectivamente, de 89,58% e 92,31% e, especificidade de 95,06% para ambos os grupos.

A confirmação do diagnóstico sorológico por ELISA Bio-manguinhos/Fiocruz confere melhor sensibilidade e especificidade, pela utilização de antígenos recombinantes ou purificados, específicos do gênero *Leishmania* e pela sua metodologia automatizada (EDRISSIAN et al., 2003).

As proteínas recombinantes e os peptídeos sintéticos baseados em genes de *Leishmania* surgiram como alvos promissores para o diagnóstico sorológico, em decorrência da sensibilidade e especificidade elevadas e do potencial de padronização do diagnóstico. Estudos têm demonstrado elevada antigenicidade em relação a proteína recombinante Cathepsin-L e um epitopo linear de célula B predito nesta proteína (MENEZES-SOUZA et al., 2015) e na expressão de peptídeos sintéticos em bacteriófagos M13 (TOLEDO-MACHADO et al., 2015), demonstrando perspectivas no uso desses antígenos no sorodiagnóstico da LVC.

Neste estudo, os métodos parasitológicos e moleculares confirmaram em 100% o diagnóstico sorológico dos cães positivos submetidos ao procedimento de eutanásia, o que demonstra claramente a efetividade das técnicas sorológicas propostas pelo MS. Na rotina da prática clínica nos estabelecimentos veterinários, o diagnóstico parasitológico pode ser utilizado como uma ferramenta importante na detecção de casos de LVC, a partir da punção de medula óssea, por exemplo. Entretanto, por ser um procedimento invasivo e que requer experiência na sua aplicação, nem sempre é utilizado pelos profissionais. Embora, o padrão adotado pelo MS seja a sorologia, o diagnóstico parasitológico permanece como padrão ouro quanto às leishmanioses em virtude de sua elevada especificidade (ROMERO et al., 2009).

Contudo ressalta-se que, apesar da especificidade de 100%, o diagnóstico parasitológico confere uma sensibilidade que varia segundo o tipo de tecido, podendo gerar resultados falsos negativos. Esse *gap* no diagnóstico geralmente acontece quando há um número reduzido de parasitos nas amostras, principalmente em cães assintomáticos (FARIA; DE ANDRADE, 2012). Outro fator que condiciona o resultado é a qualidade da amostra (*imprinting*), a coloração, a qualidade do microscópio e sobretudo a experiência do examinador. Em estudo anterior realizado em 11 cães do município de Florianópolis, o exame parasitológico foi positivo em todas as amostras de medula óssea, em 54% das amostras de fígado e baço, em 45% amostras de linfonodo e em 91% das amostras de pele (STEINDEL et al., 2013). Estes resultados mostram que a distribuição do parasito nos órgãos é heterogênea e que para o diagnóstico parasitológico diferentes tecidos devem ser incluídos para reduzir a taxa de resultados falso negativos.

Nos últimos anos diversas técnicas de biologia molecular fundamentadas na PCR têm sido desenvolvidas e têm como alvo o DNA do cinetoplasto (kDNA), microssatélites, sequências genômicas repetitivas ou RNA ribossomal (FLOETER-WINTER; SHAW, 2004). A PCR-RFLP tem sido amplamente utilizada no diagnóstico da LVC pela elevada sensibilidade e reprodutibilidade. Essa metodologia consiste na clivagem por endonucleases em sítios específicos da molécula de kDNA, formando perfis de restrição característicos para detecção e identificação de *Leishmania* (VOLPINI et al., 2004; ROMERO et al., 2009).

Os métodos moleculares não só contribuem para o diagnóstico da Leishmaniose como têm otimizado a compreensão do complexo ciclo da doença, tanto nos aspectos relacionados à infecção nos reservatórios silvestres e domésticos, quanto na detecção e identificação do parasito em hospedeiros invertebrados (SILVA; GONTIJO; MELO, 2005). Entretanto, as técnicas de biologia molecular ainda são relativamente demoradas e de alto custo e, o que inviabiliza a propagação desse método para inquéritos sorológicos em áreas endêmicas (FARIA; DE ANDRADE, 2012).

Em Florianópolis, quando foram confirmados os primeiros casos autóctones de LVC, estudos específicos contribuíram para a identificação de *L. infantum* / *L. chagasi* nos cães infectados. Figueiredo et al. (2012) confirmaram a presença de *L. chagasi* em 2 cães residentes do distrito da Lagoa da Conceição, por meio do perfil eletroforético de isoenzimas. Também no primeiro surto autóctone de LVC, após o cultivo e o isolamento de culturas de *Leishmania* sp., obtidas a partir de amostras de medula óssea, fígado, baço e linfonodos de cães sorologicamente

reagentes para LVC em Florianópolis, Steindel et al. (2013) confirmaram a infecção por *L. infantum* utilizando as técnicas de PCR-RFLP e Hibridização.

No presente trabalho, as 8 amostras, provenientes dos cães positivos submetidos aos procedimentos de eutanásia e necropsia, foram identificadas como *L. infantum*, mediante as técnicas de PCR-RFLP e Hibridização. A confirmação de *L. infantum* em amostras biológicas de cães infectados e residentes de localidades que até então não haviam sido investigadas torna evidente a persistência do ciclo biológico da LV em Florianópolis, bem como mostra a expansão da enzootia canina no município.

Novas pesquisas para investigar as características genéticas das amostras de *L. infantum* identificadas nesse estudo epidemiológico são recomendadas, com o propósito de obter informações sobre a possível origem dos parasitos em Florianópolis e facilitar a compreensão do complexo ciclo biológico da LVC estabelecido no município, principalmente no que se refere aos hospedeiros invertebrados, haja vista que o conhecimento sobre os vetores responsáveis pela transmissão da LVC ainda não está consolidado.

No monitoramento entomológico coordenado pela Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina (DIVE-SC) não foram encontradas as espécies de vetores incriminadas como transmissoras clássicas da LV no Brasil, *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi* (MS, 2006). Dias et al. (2013) identificaram em Florianópolis, a infecção de *L. infantum* em *Lu. neivai*, flebotomíneo com características silvestres, associado frequentemente à transmissão de casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA). Saraiva et al. (2009) também encontrou resultado semelhante em uma área urbana de Minas Gerais, onde não havia registro de casos de leishmaniose visceral humana, nem dados sobre LVC. Estudo anterior em um foco de leishmaniose tegumentar no município de Balneário Piçarras na região litoral norte do estado de Santa Catarina, mostrou a infecção natural de *Lu. neivai* por *L. braziliensis* (MARCONDES et al. 2009).

Os casos de leishmaniose visceral canina identificados neste trabalho estão relacionados a animais domiciliados ou semidomiciliados, residentes em áreas urbanizadas, porém no interior ou próximas à vegetação de mata atlântica, contíguas a região hidrográfica da Lagoa da Conceição, onde a enzootia canina está bem estabelecida. A existência de moradias dentro ou próximas à mata, e presença do reservatório canino contribuem para a manutenção do ciclo epidemiológico da LV no habitat dos prováveis vetores, o que implica em prevalência da LVC e iminente

risco à saúde pública. A ocupação desordenada do solo, associada ao desmatamento levantam a questão da necessidade de repensar políticas públicas integradas, que contemplem um processo de urbanização conduzido de forma sustentável e alinhado ao Plano Diretor do município.

No Brasil, o PVC-LV é fundamentado em três pilares: precocidade no diagnóstico e tratamento de casos humanos, controle vetorial em áreas de transmissão e eliminação do reservatório canino (MS, 2006). O impacto da eutanásia de cães diagnosticados com LVC tem sido discutido por se mostrar laborioso e de efetividade duvidosa (GONTIJO; MELO, 2004). A eliminação dos reservatórios caninos como única forma de combate é ineficaz, sendo necessária a adoção de medidas integradas de prevenção e controle da enfermidade (DESJEUX, 2004). Ainda, a rápida reposição de cães em áreas de transmissão denota a ineficácia das ações de educação em saúde para controle da zoonose. (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Por outro lado, a ausência de estudos de relevância que comprovem a cura parasitária em cães com LVC corroboram a ausência de medicamentos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para essa finalidade. A utilização de drogas sem registro no MAPA ou de uso humano para tratar cães com LVC é proibido (MS, 2008; CFMV, 2016). A OMS recomenda que os medicamentos destinados ao tratamento de doenças humanas não devem ser usados para tratar cães com leishmaniose, em decorrência da baixa eficácia leishmanicida neste hospedeiro e o potencial para promover a resistência do parasito (WHO, 2009).

Em um estudo desenvolvido por Manna et al. (2008) com o objetivo de avaliar a eficácia dos medicamentos miltefosina e alopurinol para o controle da LV humana, utilizando o cão como um modelo, os resultados obtidos mostraram a ineficácia do protocolo terapêutico em promover a cura parasitária de cães com LVC, que embora tenham apresentado redução da carga parasitária, permaneceram na condição de reservatório, como fonte de infecção para o vetor.

Ikeda-Garcia et al. (2010) desenvolveram um estudo similar para verificar a ocorrência de recidivas da LVC e a persistência da infecção após a terapia com medicamentos leishmanicidas. Os resultados obtidos permitiram concluir que o tratamento promove a cura clínica, todavia não elimina completamente os parasitos e, assim, os cães permanecem como potenciais fontes de infecção para os flebotomíneos.

As divergências sobre a autorização do tratamento dos cães com LVC na Europa e a eutanásia dos animais no Brasil são pautas constantes de debates. Donato et al. (2013) afirmam que no continente europeu a LVC é um problema veterinário e não de saúde pública e o

recrudescimento da enfermidade no mediterrâneo está relacionado majoritariamente ao acréscimo no número de indivíduos com coinfeção HIV/*Leishmania* e à transmissão por compartilhamento de agulhas entre usuários de drogas (READY et al., 2010).

Segundo a análise desenvolvida pelo MS, 50% dos municípios que eram considerados como transmissão intensa ou moderada em 2004, tornaram-se sem transmissão ou de transmissão esporádica, no ano de 2012. Tal fato mostra que ocorreu uma redução significativa na quantidade de casos da doença em municípios onde são preconizadas as ações de controle químico de vetores, eutanásia de cães por meio de inquéritos sorológicos, manejo ambiental e educação em saúde. (DONATO, et al., 2013).

Neste estudo, o percentual de cães sororreagentes para LVC que foram submetidos ao procedimento de eutanásia correspondeu a apenas 42% (8/19). A manutenção de reservatórios domésticos em áreas de transmissão provoca dispersão da LVC e compromete a efetividade das ações referentes ao PVC-LV que são desenvolvidas no município. As dificuldades relacionadas ao cumprimento da recomendação sanitária de eliminação de cães sororreagentes podem estar relacionadas ao descrédito na eficácia dessa medida como forma de controle, à falta de conscientização da maioria da população sobre os impactos na saúde pública, à deficiência de padronização no diagnóstico, à intensidade dos esforços necessários para eliminação dos cães, à rápida reposição de animais, ao tratamento clandestino de cães infectados, ou a simples recusa dos proprietários em entregar seus animais, que são estimados em muitos lares como membros da família (COSTA, 2011).

Donato et al. (2013) destaca que outro aspecto importante que provoca dispersão da LVC refere-se à prática adotada por alguns proprietários de transferir seus cães infectados por *L. infantum* para áreas não endêmicas, com o intuito de burlar a metodologia de controle e evitar a eutanásia de seus animais. Com isso, a inserção de cães com LVC em áreas até então indenes e que tenham a presença do vetor coloca em risco a população residente.

Nesse sentido, a adoção de estratégias específicas por parte do poder público poderia impedir esse tipo de dispersão, como: a intensificação do controle do trânsito de cães de áreas endêmicas, implementação e padronização do diagnóstico sorológico obrigatório e a reiteração da notificação compulsória de casos caninos positivos, especialmente em relação aos laboratórios privados, que recebem e analisam as amostras de cães suspeitos atendidos nos estabelecimentos veterinários do município. Somado a isso, a promoção constante de ações

de educação em saúde para sensibilizar proprietários de cães e médicos veterinários da rede pública e privada contribuiria significativamente na mitigação desse problema (WHO, 2010; COSTA, 2011; FIGUEIREDO et al., 2012; DONATO et al., 2013).

Embora a enzootia canina em Florianópolis esteja bem estabelecida e em expansão, não houve ainda o registro de casos humanos autóctones de LV. Há a preocupação de estar ocorrendo subnotificação de casos, em decorrência da baixa sensibilização da rede municipal de saúde na suspeita e confirmação de casos de leishmaniose visceral humana, tendo em vista o desconhecimento do ponto de vista clínico entre os profissionais da Secretaria Municipal de Saúde (SMS) para estabelecer o diagnóstico e o tratamento da leishmaniose e o baixo o nível de conhecimento a respeito da situação epidemiológica atual da leishmaniose em Santa Catarina e em Florianópolis (FERNANDES, 2013). Nesse sentido, cabe aos gestores da rede a implementação de estratégias de educação em saúde, com o objetivo de nivelar o conhecimento sobre leishmaniose entre os profissionais médicos e enfermeiros da SMS de Florianópolis (FERNANDES, 2013).

Considerando que a doença nos cães precede a infecção em humanos (ALVES; BEVILACQUA, 2004; MS, 2006), torna-se imprescindível não só a adoção de estratégias de controle, mas principalmente a aplicação de medidas preventivas para evitar a transmissão da doença à população humana. A característica reprodutiva das fêmeas dos flebotomíneos de fazer a oviposição em matéria orgânica em decomposição (MARCONDES et al., 2005) requer a implementação de ações de manejo ambiental, que incluem limpeza de terrenos baldios, acondicionamento adequado de resíduos orgânicos e limpeza periódica dos abrigos dos animais domésticos, devendo-se evitar a criação de animais de produção, como galinhas e suínos em áreas onde há transmissão da LV (MS, 2006). Ainda, é importante adaptar as residências situadas no habitat do vetor, por meio da proteção com telas milimetradas e colocação de plantas com poder repelente, como a citronela.

Por ser uma doença negligenciada, são escassos os estudos voltados à prevenção e ao controle da LV, especialmente os que são relacionados ao desenvolvimento de medicamentos, vacinas e outros insumos, visto que preveem baixo lucro comercial ao investimento em pesquisa e inovação tecnológica, além da própria complexidade biológica da infecção (ASSIS et al., 2008).

Atualmente encontra-se disponível no mercado uma vacina para prevenção da Leishmaniose Visceral Canina, a Leish-Tec[®], que embora

não esteja ainda aprovada pelo Ministério da Saúde e indicada em programas de saúde pública, é recomendada como uma ferramenta preventiva individual para os cães, desde que apresentem sorologia negativa para LVC. A comercialização no Brasil de vacinas antileishmaniose visceral canina para fins de saúde pública ainda não é viável, haja vista que são necessários estudos que comprovem o custo-efetividade do uso dessas ferramentas na redução de casos humanos de leishmaniose visceral (DONATO et al., 2013).

As coleiras impregnadas com deltametrina a 4% ou o uso de formulações tópicas à base de permetrina são uma alternativa promissora e adicional em proteger os cães da hematofagia das fêmeas dos flebotomíneos. Alguns estudos têm demonstrado a efetividade do uso das coleiras impregnadas com inseticidas para o controle da leishmaniose visceral (FOGLIA MANZILLO et al., 2006; COURTENAY et al., 2009).

As estratégias de prevenção e controle da leishmaniose visceral no Brasil devem ocorrer de forma integrada para que a efetividade esperada seja alcançada e estão direcionadas ao diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos, vigilância do reservatório doméstico e eutanásia de cães sororreagentes, redução da população de flebotomíneos por meio de medidas preventivas e de controle químico e atividades de educação em saúde (OPS, 2006).

Um dos grandes desafios para o PVC-LV é o controle da leishmaniose visceral em áreas urbanas, em decorrência dos fatores complicadores na implementação destas ações, o que suscita a necessidade de investimentos na área técnico-científico, com o objetivo de aprimorar as medidas de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Um aspecto adicional que contribui para a manutenção dessa situação diz respeito à baixa prioridade recebida por essas doenças no âmbito das políticas e dos serviços de saúde (WHO, 2009).

Espera-se que os resultados obtidos neste estudo possam auxiliar o CCZ de Florianópolis no real mapeamento da distribuição da ocorrência de casos em cães, indicando as áreas de maior risco e, com isso, sensibilizar os gestores municipais em unir esforços no enfrentamento dessa negligenciada zoonose.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados do presente estudo nos permite concluir que:

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma antroponose endêmica, recente e emergente no município de Florianópolis, Santa Catarina, Sul do Brasil, e a identificação continuada de casos autóctones em cães fornece evidências de um ciclo de transmissão estabelecido;

A confirmação de casos caninos autóctones em localidades que extrapolam as áreas de focos investigadas previamente pelo CCZ de Florianópolis evidencia a expansão da LVC no território da Ilha de Santa Catarina.

A possibilidade de subnotificação aos órgãos de saúde pública da suspeita de novos casos dessa enfermidade, por parte dos estabelecimentos veterinários tem dificultado a identificação precoce em localidades sem vigilância ativa.

A vigilância ativa e a eliminação dos reservatórios caninos possivelmente têm sido insuficientes para conter a expansão da LVC em Florianópolis.

As técnicas sorológicas propostas pelo MS apresentaram elevada efetividade, pois 100% dos cães soropositivos encaminhados a UFSC foram positivos no exame parasitológico e na técnica de PCR-RFLP.

A hibridização com sondas espécie-específicas identificou como espécie circulante a *L. infantum*.

Foi possível ampliar o banco de dados informatizado que permita a identificação da frequência de *Leishmania* sp. na população de cães em Florianópolis e o rastreamento de informações por dados cadastrais.

A tipificação das espécies realizada junto ao laboratório de Protozoologia da UFSC é fundamental para a ampliação do banco de dados. A cooperação entre o poder executivo e a universidade poderá contribuir para o desenvolvimento de novas pesquisas que elucidem a complexidade do ciclo epidemiológico e subsidiem a proposição de estratégias de prevenção e controle mais efetivas.

REFERÊNCIAS

- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Ann Trop Med Parasitol**, v.88, p.37-38, 1994.
- ALVAR, J. Canine Leishmaniasis. **Adv Parasitol**, v.57, p.1-88, 2004.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVES, A. W.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993 - 1997. **Cadernos Saúde Pública**, v. 20, n. 1. p. 259-265, 2004.
- ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.31, p.109-118, 2012.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin Dermatol**, v. 14, p. 523-32, 1996.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.
- ASSIS, T.S.M., et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH[®] para diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v.17, n.2, p. 107-116, 2008.
- ÁVILA-PIRES, F.D. Zoonoses: Hospedeiros e Reservatórios. **Cad. Saúde Pública**, v.5, n.1, p. 82-97, 1989.
- BARRETO, M.L. et al. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **The Lancet**, v. 377, n. 9780, p. 1877-1889, 2011.

BERN, C.; MAGUIRE, J.H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 10, p. e313, 2008.

BORGES, L. F. N. M., et al. Prevalência e distribuição espacial da leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v.44, n.2, p.352-357, 2014.

BUENO, L. S. **Zoneamento territorial para fins do uso e ocupação do solo visando a elaboração e atualização de planos diretores**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). 2003.

CAMARGO, T. C.; BONDAN, E. F. Conhecimento sobre leishmaniose visceral canina na população do município de Cotia (SP), Brasil, e participação dos clínicos veterinários locais na propagação de medidas preventivas. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**. v. 22, n. 1, p. 28-33, 2015.

CCZ. Centro de Controle de Zoonoses. Florianópolis, Santa Catarina. **Relatório de Leishmaniose Visceral no período 2010-2015**. Disponível em: <http://portal.pmf.sc.gov.br/entidades/saude/>. Acesso em dezembro de 2015.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis>. Acesso em 21 de abril de 2016.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Lei nº 5.517, de 23 de outubro de 1968**. Dispõe sobre o exercício da profissão de Médico Veterinário e cria os Conselhos Federal e Regionais de Medicina Veterinária.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002**. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. Brasília, 2002.

CFMV. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária** v. 63. p. 2-14, 2014.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Saúde Única**. 2016b Disponível em <http://portal.cfmv.gov.br/portal/site/pagina/index/artigo/86/secao/8> . Acesso em janeiro de 2016.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Perguntas e respostas sobre a leishmaniose visceral canina (LVC), questões técnicas e legais**. 2016a Disponível em: <http://portal.cfmv.gov.br/uploads/files/Perguntas%20e%20Respostas%20LVC.pdf>. Acesso em junho de 2016.

CHAPPUIS, F., et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 873-882, 2007.

CORRÊA, G.L.B, et al. **Inquérito canino censitário de leishmaniose visceral no município de Florianópolis, SC, em 2010**. Disponível em: http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/PDF/16_11_2011_10.24.22.2871ae70a3883368f5fb35793a3b4b00.PDF. Acesso em março, 2015. Florianópolis, SC.

COSTA, C. H.; VIEIRA, J. B. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 223–8, 2001.

COSTA, C.H.N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.2, p.232-242, 2011.

COURA-VITAL, W., et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 8, p. e1291, 2011.

COURTENAY, O., et al. A long-lasting topical deltamethrin treatment to protect dogs against visceral leishmaniasis. **Medical and veterinary entomology**, v. 23, n. 3, p. 245–56, 2009.

CRMV-PR. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná. **Leishmanioses Caninas**. Manual Técnico. 2015.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H. A General Classification of New-World *Leishmania* Using Numerical Zymotaxonomy. **Am J Trop Med Hyg**, v.50, p. 296–311, 1994.

CUPOLILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G.J.R. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 5, p.663-668,1998.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.48, n.3, p.151-156, 2006.

DAVIES, C.R. et al. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cad Saúde Pública**, v. 16, p. 925-950, 2000.

DE ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; FRANCO, V. R. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v.40, n.7, 2010.

DEBONI, S.C.; BARBOSA M.; RAMOS R.R. Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul. **Boletim Epidemiológico**, v.13, p.1-3, 2011.

DEREURE J. Reservoirs des leishmanies. In: Les Leishmanioses Collection. **Medicine Tropicale de PAUPELF-UREF, Marketing/Elipses, Parts**, p. 109-127, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **ClinDermatol.**, v. 14, n. 5, p. 417-23, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immun Microbiol Infect Dis**, v. 27, p.305-18, 2004.

DIAS, E. S.; MICHALSKY, E. M.; DO NASCIMENTO, J. C.; FERREIRA, E. C., LOPES, J. V.; FORTES-DIAS, C. L. Detection of *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*, a putative vector of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Vector Ecology**, v. 38, p. 193-196, 2013.

DIAS, R.A., et al. Estimativa de populações canina e felina domiciliadas em zona urbana do Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 565-570, 2004.

DIAMOND, J. **Armas, Germes e Aço, os destinos das sociedades humanas**. 9a edição. Editora Record. Rio de Janeiro, RJ. 2007.

DONATO, L.R., et al. Vigilância e controle de reservatórios da leishmaniose visceral no Brasil: aspectos técnicos e jurídicos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 11, n. 2, p. 18 – 23, 2013.

EDRISSIAN, G. H., et al. Evaluation of rapid Dipstick rK39 test in diagnosis and serological survey of visceral leishmaniasis in humans and dogs in Iran. **Archives of Iranian Medicine**, Theran, v. 6, p. 29-31, 2003.

FALQUETO A. et al. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1003–1010, 2003.

FARIA, A. R.; DE ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, p.47-57, 2012.

FERNANDES, A. **Análise das informações a respeito das leishmanioses, obtidas através dos enfermeiros e médicos das Unidades Básicas de Saúde (UBS) no município de Florianópolis**. Dissertação de mestrado. UFSC, 2013.

FERREIRA G.E., et al. The genetic structure of *Leishmania infantum* populations in Brazil and its possible association with the transmission cycle of visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v.7, e36242, 2012.

FIGUEIREDO, F.B. et al. Leishmaniose Visceral Canina: Dois Casos Autóctones no Município de Florianópolis, Estado de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, p.1026, 2012.

FIOCRUZ. Fundação Osvaldo Cruz. **As Leishmanioses**. Disponível em <http://www.dbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm>. Acesso em abril de 2016.

FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J J. New horizons in the identification and taxonomy of the *Leishmania* and the diagnoses of the leishmaniasis: the expansion of molecular techniques. **Research Advanced in Microbiology**, v. 4, p. 63-79, 2004.

FOGLIA MANZILLO, V., et al. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. **Veterinary parasitology**, v. 142, n. 1-2, p. 142–145, 2006.

FOGANHOLI, J.N.; ZAPPA, V. Importância da leishmaniose na saúde pública. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 17, 2011.

GARCIA, L. P. et al. **Epidemiologia das Doenças Negligenciadas no Brasil e Gastos Federais com Medicamentos**. Texto para discussão (TD). Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA. ISSN 1415-4765. Brasília, 2011.

GIBBS, E.P.J. The evolution of one health: a decade of progress and challenges for the future. **Veterinary Record**. V. 174, p. 85-91, 2014.

GOMES, Y.N., et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Vet J**, v.175, p. 45-52, 2008.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338 – 349, 2004.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Ver Anti Infect Ther**, v. 8, p. 419-433, 2010.

GRIMALDI, G. 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. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54–9, 2012a.

GRIMALDI, G., et al. The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 6, p. 966–71, 2012b.

GRISARD, E.C. et al. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. **ActaTropica**, v. 74, p. 89-93, 2000.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, C.H. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, v. 27, p. 403-409, 2011.

HERENIO, E. M.; FORTES, R. C. RINCON, G. Prevalência da Leishmaniose visceral em cães do Distrito Federal, segundo dados do centro de zoonoses de Brasília. **J Health Sci Inst**, v.32 p. 126-129, 2014.

HERWALDT, L. B. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HOTEZ, P.J. et al. Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria. **PLoS Med**, v. 3, n. 5, p. e102, 2006.

HULLEY, S. B., et al. **Delineando a Pesquisa Clínica: Uma Abordagem Epidemiológica**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEGRAFIA E ESTATÍSTICA.
Cidades: Florianópolis. 2010.

Disponível em:

<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=420540&search=santa-catarina|florianopolis>.

Acesso em: 19 de abril de 2016.

IKEDA-GARCIA, F. A., LOPES R. S., MARQUES, F. J., CIARLINI, P. C., LIMA V. M. F., MORINISHI, C. K., ZANETTE, M. F., PERRI, S. H. V., MARCONDES, M. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with and allopurinol. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 47, n. 3, p. 218-223, 2010.

INDÁ, F.M.C., et al. Relato de uma experiência de sucesso: descrição da metodologia de controle e monitoramento da leishmaniose visceral traçada de forma integrativa no Plano de Contingência. **Revista de Saúde Pública de Florianópolis.** Ano I, número I, 2013.

INSTITUTO PASTEUR. **NOTA TÉCNICA 02 - IP/CCD/SES-SP – 07/10/2013.** Populações de Cães e gatos. Readequação para 2013.

JANSEN, A.M. et al. **Estudo da prevalência e perfis de infecção por *Leishmania* sp. em mamíferos silvestres e sinantrópicos na localidade Canto dos Araçás, município de Florianópolis/SC.** Relatório do Laboratório de Referência em Taxonomia e Diagnóstico de Reservatórios Silvestres das Leishmanioses, Florianópolis, Santa Catarina, 26 de set a 01 de out 2010.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 1, n. 2, p. 13-38, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. **Biology of Kinetoplastida.** LUMSDEN WRH; EVANS DA (Eds). London. Academic Press, p. 1-116, 1979.

LEANDRO JUNIOR, M. V. S. **Análise comparativa do teste imunocromatográfico DPP-Biomanguinhos com ELISA e RIFI no**

diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2014.

LEMONS, E. M., et al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. **Acta tropica**, v. 107, n. 2, p. 205–7, 2008.

LIMA FILHO, J.H.C.; STEINDEL, M. Aspectos clínicos e epidemiológicos da Leishmaniose Cutânea no Estado de Santa Catarina. **Arq Cat Med**, v. 27, p. 25-31, 1998.

MANNA, L., et al. A.E. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. **Vet J**, v.182, p.441-445, 2008.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lista de doenças de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial. **Diário Oficial da União**. Instrução Normativa nº 50, de 24 de setembro de 2013.

MARCONDES, C.B. **Entomologia médica e veterinária**. 2ª edição. São Paulo, Editora Atheneu, 2011.

MARCONDES, C.B. et al. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia)* spp. in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 103, n. 11, p. 1093-1097, 2009.

MARCONDES, E. A. **Prevalência, características clínicas e ambientais dos casos de leishmaniose visceral canina no município de Dourados-MS**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Grande Dourados, 2012.

MARLOW, M. A. **Epidemiologia Molecular da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Santa Catarina**, Brasil. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2013.

MAURÍCIO I.L.; STOTHARD J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, v. 16, p.188–189, 2000.

MEDITSCH, R. G. M. O médico veterinário na construção da saúde pública: um estudo sobre o papel do profissional da clínica de pequenos animais em Florianópolis, Santa Catarina. **Revista CFMV**, n. 38, p. 45-57, 2006.

MELLO, M. T. **A Profissão Veterinária Brasileira no Limiar do Futuro**. Editora Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária. 2ª edição. Brasília, DF. 2011.

MENEZES-SOUZA, D., et al. Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, e3426, 2015.

MEYER, F. A. F.; SILVA, E. **Atlas Ambiental Municipal – Florianópolis – SC – Brasil**. UFSC – Grupo de Pesquisa – Grupo Gestão do Espaço (GGE) – Projeto Funcitec. 35 págs. Outubro de 2006.

Disponível em:

<http://www.grupoge.ufsc.br/publica/aam.pdf> .

Acesso em 20 de abril de 2016.

MOLINA, R., et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 491–3, 1994.

MOTOIE, G., et al. Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. **Infect Genet Evol**, v. 18, p. 48-59, 2013.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF. Editora MS. 1ª Edição. Brasília, 2006.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Editora MS. 2ª Edição. Brasília, 2007.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Interministerial - MS e MAPA 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. **Diário Oficial da União**. Brasília, 11 de julho de 2008.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Neglected diseases: the strategies of the Brazilian Ministry of Health. **Rev. Saúde Pública**, v.44, n.1, p. 200-202, 2010a.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, n. 2, p. 11-13, 2010b.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação Epidemiológica – Dados sobre Leishmaniose Visceral (LV)**. Disponível em:
<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-visceral-lv>.
Acesso em março de 2016.

NASCIMENTO et al. Leishmaniose Visceral Humana importada em Santa Catarina: relato de seis casos no período de 2001 a 2011. **XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul**, Florianópolis, 22 a 26 de outubro, 2013.

OIE-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE ANIMAL. **Recomendaciones de la OIE sobre las competencias mínimas que se esperan de los veterinários recién licenciados para garantizar Servicios Veterinarios Nacionales de calidad**.

Disponível em:
http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Support_to_OIE_Members/Edu_Vet_AHG/day_1/DAYONE-B-esp-VC.pdf
Acesso em 16 de abril de 2016.

OIE-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE ANIMAL. **One World, One Health**.

Disponível em:
<http://www.oie.int/en/for-the-media/editorials/detail/article/one-world-one-health/>
Acesso em: 14 de abril de 2016.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Leishmanioses.**

Disponível em:

<http://www.who.int/eportuguese/countries/bra/pt/>

Acesso em 16 abril de 2016.

OPS. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas.** Rio de Janeiro, 2006. 152p.

PEREIRA, A.A.S. **Avaliação da infecção por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos de áreas endêmicas de Minas Gerais, Brasil.** Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da FIOCRUZ. Belo Horizonte, MG, 2015.

READY, P. D., et al. Leishmaniasis emergence in Europe. **Euro Surveill**, v. 15, n. 10, p. 19505, 2010.

REIS, A. B., et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 87–95, 2009.

REITHINGER, R.; DAVIES, C.R. Is the dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American Cutaneous Leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, p. 530-41,1999.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **J ClinMicrobiol**, v. 45, n. 1, p. 21-5, 2007.

ROMERO, G.A.S., et al. Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. **ActaTropica**, v.109, p.74-77, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 999, 2001.

SARAIVA, L. et al., Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **J Med Entomol**, v. 46, p.1159-1163, 2009.

SCHÖNIAN, G., et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 47, n. 1, p. 349–58, 2003.

SILVA, E.S., GONTIJO, C.M.F., MELO, M.N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. **Trends in Parasitol**, v.21, p.550-552, 2005.

SILVA, E.S., et al. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 2, p.251-257, 2004.

SOUZA, G.D.; SANTOS, E.; ANDRADE FILHO, J.D. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p.1181-1182, 2009.

SOUZA, W. **Doenças negligenciadas**. Academia Brasileira de Ciências e tecnologia para o desenvolvimento nacional. Estudos estratégicos. Rio de Janeiro: 56 p., 2010

STEINDEL, M. et al. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.33, p. 490-496, 2013.

TARTAROTTI, A. L., et al. **Boletim epidemiológico**. Equipe de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, v. 13, p. 5-6, 2011.

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

TOLEDO-MACHADO, C. M., et al. Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis Using Mimotope Peptides Selected from Phage Displayed Combinatorial Libraries. **BioMed Research International**, v. 2015, ID 401509, 2015.

VARGAS-PARADA, L. Kinetoplastids and Their Networks of Interlocked DNA. **Nature Education**, v. 3, p.63, 2010

VOLPINI, A.C. et al. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **ActaTropica**, v. 90, p. 31-37, 2004.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. **WHO technical report series**, n. 949, mar 2010.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **Third WHO report on neglected tropical diseases**. 2015.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**.

Disponível em:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>

Acesso em 19 de abril de 2016.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Visceral leishmaniasis therapy: statement on the outcome of a meeting**; 2009.

Disponível em:

[http://www.who.int/leishmaniasis/](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leish_VL_Therapy_statement.pdf)

[resources/Leish_VL_Therapy_statement.pdf](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leish_VL_Therapy_statement.pdf).

Acesso em 19 de abril de 2016.

ANEXO A – Formulário de Coleta de Amostra Biológica para Diagnóstico da LVC. Fonte: CCZ de Florianópolis, 2015.

	PREFEITURA MUNICIPAL DE FLORIANÓPOLIS SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE CENTRO DE CONTROLE DE ZOOSE 	ETIQUETA DE IDENTIFICAÇÃO
Formulário de Coleta de Amostra Biológica para Diagnóstico da LVC		
Data da coleta: ____/____/____ Nº da Amostra: _____ Nº ficha CCZ (opcional): _____ Cód. Chip (opcional): _____		
Identificação do Animal		
1. Nome do Animal: _____ 2. Raça: _____ 3. Idade: _____ 4. Sexo: Macho () Fêmea () 5. Porte: Pequeno () Médio () Grande () 6. Pelagem: Curta () Média () Longa () 7. Cor Pelagem: _____ 8. Informações Físicas Adicionais: _____ 9. Tomou vacina para LVC? () Sim. () Não. () Sem informação 10. Se Sim: Quando? _____ Quantas Doses? _____		
Identificação do Proprietário e Termo de Consentimento para Coleta e Análise da Amostra Canina		
Declaro que fui informado (a) e que recebi de forma clara e objetiva, todas as explicações pertinentes ao Inquérito Sorológico para o Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) conduzido pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura Municipal de Florianópolis (PMF). Declaro também, ter conhecimento e compreensão sobre as implicações relacionadas a, um possível, resultado positivo para LVC. Sendo assim, autorizo a coleta e análise do sangue do animal _____ que se encontra sob minha responsabilidade e propriedade. 11. Nome do Proprietário: _____ 12. RG: _____ 13. Endereço: _____ 14. Bairro: _____ 15. Telefone(s) para contato: _____ 16. Local e Data: _____ 17. Assinatura: _____ Baseado em: Termo de Consentimento Livre Esclarecido, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2005.		
Situação da Amostra		
Primeira Amostra () Segunda Amostra () Contra Prova () Outro: _____		
Identificação da Equipe de Coleta		
Coletador: _____ Anotador: _____		
Local de Coleta (caso a coleta ocorra em clínica particular): _____		
Para uso do Laboratório		
Data de Entrada: ____/____/____ Resultado: DPP () Não Reagente () Não Reagente () Indeterminado () Indeterminado () Reagente () Reagente Imunocromatografia: _____ D.O.: _____ Situação Final da Amostra: _____ Situação Final do Cão: _____ Médico Veterinário Responsável: _____ Bioquímico Responsável: _____		

ANEXO B – Termo de Responsabilidade para autorização de eutanásia. Fonte: CCZ de Florianópolis, 2015.



PREFEITURA DE FLORIANÓPOLIS
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
CENTRO DE CONTROLE DE ZOOSESES

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE EUTANÁSIA

Venho por meio desta **DECLARAR** que, por minha livre e espontânea iniciativa, autorizo a EUTANÁSIA DO ANIMAL DE MINHA PROPRIEDADE abaixo especificado, a ser realizada por Médico Veterinário conforme a Resolução nº. 174 de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), nada havendo o que possa reclamar em qualquer oportunidade.

Igualmente, declaro as especificações do animal de minha propriedade, dato e assino o presente Termo de Responsabilidade de acordo com meu documento de identificação.

Espécie: _____

Raça: _____

Sexo: _____

Pelagem: _____

Idade: _____

Nome: _____

Proprietário: _____

Endereço: _____

R.G.: _____

CPF: _____

Telefones: _____

_____ de _____ de _____

(assinatura do proprietário do animal)

TESTEMUNHAS:

1º: _____

2º: _____

ANEXO C – Termo de Responsabilidade para recusa de eutanásia.
 Fonte: CCZ de Florianópolis, 2015.



PREFEITURA DE FLORIANÓPOLIS
 SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
 CENTRO DE CONTROLE DE ZOOSE

TERMO DE RESPONSABILIDADE PARA RECUSA DE EUTANÁSIA

Venho por meio desta **DECLARAR** que, **RECUSO** a entregar o animal de minha propriedade para realização de eutanásia, sendo que o mesmo apresentou diagnóstico laboratorial positivo para Leishmaniose Visceral Canina (LVC).

Estou ciente das consequências que esta decisão implica em termos de Saúde Pública e assumo os riscos das sanções legais que sobre mim possam ser impostas, caso não reconsidere a minha decisão em 72 horas.

Igualmente, declaro as especificações do animal de minha propriedade, dato e assino o presente Termo de Responsabilidade de acordo com meu documento de identificação.

Espécie: _____

Raça: _____

Sexo: _____

Pelagem: _____

Nome: _____

Idade: _____

Proprietário: _____

Endereço: _____

R.G.: _____

CPF: _____

Telefones: _____

_____, de _____ de _____

 (assinatura do proprietário do animal)

TESTEMUNHAS:

1º: _____

2º: _____