

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Estudo da leishmaniose visceral canina e dos
vetores de leishmanioses no município de
Mirandópolis, região noroeste do Estado de São
Paulo.**

Rosa Maria Ferreira Nogueira Odorizzi

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação, para obtenção do título de
Mestre em Saúde Pública.

Área de concentração: Epidemiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Aparecida
Bianchi Galati

**São Paulo
2006**

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Estudo da leishmaniose visceral canina e dos
vetores de leishmanioses no município de
Mirandópolis, região noroeste do Estado de São
Paulo.**

Rosa Maria Ferreira Noguerol Odorizzi

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em saúde pública da
Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de concentração: Epidemiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Aparecida
Bianchi Galati



**São Paulo
2006**

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

47352/2006 doc

DEDICATÓRIA

“... E a vida vai tecendo laços
Quase impossíveis de romper:
Tudo o que amamos são pedaços
Vivos do nosso próprio ser...”

Manuel Bandeira

À minha para sempre adorada mãe Dina.

Ao Adans meu amado marido e companheiro nessa jornada.

A Andréa, Lucas e Pedro Paulo meus filhos queridos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati, do Departamento de Epidemiologia da FSP/USP, pelo incentivo, confiança, amizade e orientação para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Noryuki Kaneto, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal do Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, pelo auxílio e confiança por permitir a utilização de instalações sob sua responsabilidade para a realização dos trabalhos de identificação dos flebotomíneos e preparação dos materiais coletados.

A Profa. Dra. Kátia Denise Saraiva Brescian, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal do Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, por permitir a utilização de instalações sob sua responsabilidade para a realização dos trabalhos de identificação dos flebotomíneos e preparação dos materiais coletados.

À Profa. Dra. Marcia D Laurentti do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da FM/USP pelo incentivo, amizade e colaboração na realização dos testes ELISA.

A Profa. Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola, do Instituto Adolfo Lutz pela realização das PCR.

À Daniela Larangeira, Thaise do Laboratório da FM/USP pelo auxílio na realização dos testes ELISA.

Ao Médico Veterinário Nilton Moraes Gonçalves diretor do Centro de Controle de Zoonoses do Município de Mirandópolis pelo auxílio na coleta de material.

Aos senhores José Dias, José Pardo e Nilton, funcionários do Centro de Controle de Zoonoses de Mirandópolis pela colaboração nas coletas de sangue e na manipulação dos animais.

Ao senhor Nogueira funcionário do Centro de Controle de Vetores do município de Mirandópolis pelas informações a cerca das aspersões de inseticida no município.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido.

Aos colegas da Pós-graduação pelos momentos de descontração sem os quais essa jornada teria sido mais difícil.

Aos meus Tios Lena e Floriano pelo carinho, apoio e abrigo.

A minha amiga Mirna pelo carinho e abrigo.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Odorizzi, RMFN. **Estudo da leishmaniose visceral canina e de vetores de leishmanioses no município de Mirandópolis, região noroeste do Estado de São Paulo**. São Paulo; 2005, [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Objetivos - Identificar a soro-prevalência da leishmaniose canina atual e realizar estudo da bio-ecologia de vetores de leishmanioses em área urbana e rural e em áreas de várzea do rio Feio do município de Mirandópolis. **Métodos** - Os flebotomíneos foram capturados com armadilhas automáticas luminosas, instaladas das 18:00 às 7:00 horas, durante um ano, em 10 peridomicílios distribuídos nas zonas urbana e rural e em dois locais (varanda e mata) localizados às margens do rio Feio no município de Mirandópolis. As capturas nas zonas urbana e rural foram realizadas duas vezes por mês e no rio Feio foram mensais. Amostras de sangue de 240 cães foram coletadas e acondicionadas em tubo seco e em tubo contendo EDTA e mantidas a -20°C até o processamento por teste imunoenzimático (ELISA) e reação em cadeia pela polimerase (PCR). Apenas 24 amostras de creme leucocitário, das 240 mencionadas anteriormente, foram testadas por PCR. **Resultados** - Nas áreas urbana e rural, um total de 84 espécimes de flebotomíneos foram capturados, destes apenas 55 foram identificados como *Lutzomyia longipalpis*, sendo estes mais freqüente no verão e apresentou correlação positiva (Pearson) para o índice pluviométrico ($r = 0,51$) e temperatura ($r = 0,56$), respectivamente. Um total de 35.995 espécimes foram capturados na várzea do rio Feio, representado quase que exclusivamente por *Nyssomyia neivai*, que apresentou a média

de Williams mais elevada no inverno. Neste local, capturou-se também um espécime de *Psathyromyia (Xiphomyia) hermelenti*, sendo este o primeiro registro dessa espécie no Estado de São Paulo. O teste ELISA revelou um alto índice de animais soro reagentes (60,8%) e a grande maioria destes 73,9% eram assintomáticos. *Leishmania (Leishmania) chagasi* foi identificada por PCR em creme leucocitário de quatro cães. **Conclusões** - Embora no presente estudo a soro-prevalência canina tenha sido trinta e cinco vezes maior do que a obtida em 2000, a densidade de *Lutzomyia longipalpis* durante o período de mostrou-se bastante reduzida, sugerindo que outros mecanismos de transmissão possam estar envolvidos. Além disto, a alta densidade de *Nyssomyia neivai*, um dos vetores suspeitos de transmitir a leishmaniose tegumentar americana nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, na várzea do rio Feio apontam para o risco de transmissão noturna dessa doença, para humanos, principalmente nos períodos mais secos do ano.

Descritores: Leishmaniose visceral americana. Leishmaniose tegumentar americana. *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Lutzomyia longipalpis*. *Nyssomyia neivai*. Soro prevalência canina.

Abstract

Odorizzi, RMFN. A study of canine visceral leishmaniasis and vectors of leishmaniasis in Mirandópolis county, at north-west region of São Paulo State, Brazil (Estudo da leishmaniose visceral canina e de vetores de leishmanioses no município de Mirandópolis, região noroeste do Estado de São Paulo). [Master Dissertation. Faculdade de Saúde Pública da USP].

Objective -To identify the canine leishmaniasis sero-prevalence and study the bioecology of phlebotomine sandflies in urban and rural areas as well as on the Feio river flood-plain of in Mirandópolis county. **Methodology** - The sandflies were captured with automatic light traps, installed between 18:00 and 07:00 hours, over a period of one year at 10 peridomiciles distributed in the urban and rural areas and two sites (veranda of a domicile and forest) on the Feio river's in Mirandópolis county. The captures in the urban and rural areas were undertaken twice monthly and once a month on the Feio river. Blood samples were collected from 240 dogs and stored in dry tubes and tubes with EDTA at -20°C until enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the polymerase chain reaction (PCR) could be performed. Of this latter just 24 of the above mentioned 240 samples were tested, using buffy coat. **Results** - In the urban and rural areas, a total of 84 sand fly specimens were collected, 55 of them belonging to *Lutzomyia longipalpis*, that presented its highest frequency during the summer and showed a positive correlation (Pearson's correlation Index) with the rainfall index (0.51) and temperature (0.56), respectively. A total of 35,995 specimens were captured on the Feio river flood-plain, almost exclusively of *Nyssomyia neivai* which presented the highest

Williams' average in the winter. In this area, one specimen of *Psathyromyia* (*Xiphomyia*) *hermanlenti* was captured, this being the first record of this species in São Paulo State. The Elisa test showed a high prevalence of sero-reactive dogs (60.8%) the large majority (73,9%) were asymptomatic. *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* was identified by PCR using the buffy coat of four dogs. **Conclusions** - Although in the present study the canine sero-prevalence of the *Leishmania* infection was 35 times higher than that obtained in 2000, the densities of *Lutzomyia longipalpis* during this study period were greatly reduced, suggesting that other transmission mechanisms may be involved. Further, the high density of *Nyssomyia neivai*, one of the suspect vectors of Cutaneous Leishmaniasis in the Southeastern and Southern regions of Brazil, on the Feio river flood-plain points to the possible risk of nocturnal transmission of this disease, especially in the drier periods of the year to humans in the area.

Descritores: American Visceral Leishmaniasis. Cutaneous Leishmaniasis. *Leishmania chagasi*. *Lutzomyia longipalpis*. *Nyssomyia neivai*. Vector. Canine sero-prevalence.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)	13
1.2	LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA (LVA)	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	MÉTODO	18
3.1	ÁREA DE ESTUDO	18
3.2	DADOS CLIMATOLÓGICOS	18
3.3	ESTUDOS ENTOMOLÓGICOS	19
3.4	RESERVATÓRIOS	20
3.5	TESTES ESTATÍSTICOS	24
4	RESULTADOS	25
4.1	DADOS ENTOMOLÓGICOS	25
4.2	DADOS DOS RESERVATÓRIOS	31

5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÕES	43
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
8. REFERÊNCIAS	45
ANEXO	
Anexo I - Localização do município de Mirandópolis, no Estado de São Paulo.	55
Anexo II - Dados Climatológicos	56
Anexo III - Localização dos pontos de captura dos flebotomíneos nas áreas urbana e rural	58
Anexo IV – Localização dos setores de coleta de sangue dos cães	59
Anexo V – Localização do rio feio em relação à sede do município	60
Anexo VI – Ficha para identificação dos cães	61

1 INTRODUÇÃO

Leishmanioses são agravos à saúde, provocados por cerca de 20 espécies de protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* Ross, 1903. São importantes zoonoses parasitárias, largamente difundidas em 88 países, dos quais 72 deles em desenvolvimento. Noventa por cento dos casos de Leishmaniose Visceral (LV) estão concentrados em cinco países: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2004).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de adquirir leishmaniose de forma geral, com cerca de 12 milhões infectadas. Globalmente ocorrem 1,5 a 2 milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar e 500 mil novos casos de leishmaniose visceral anualmente (WHO, 1990; 2004).

A importância dessas zoonoses no Brasil está baseada na sua ampla distribuição geográfica, na gravidade das manifestações clínicas da leishmaniose visceral americana (LVA), principalmente em crianças desnutridas e em adultos imunodeprimidos (co-infecção HIV/LV) e na morbidade das formas clínicas das leishmanioses tegumentares (LT) que envolvem lesões cutâneas e destruição ou mutilação de mucosas. Com o aumento da incidência e da disseminação de algumas formas de leishmaniose para novas áreas geográficas e a tendência à urbanização, essa importância vem crescendo nos últimos anos (NUNES, 2001).

A maioria das leishmânias é considerada parasita de animais silvestres: roedores, canídeos, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados e primatas, apenas uma pequena parcela delas são parasitas dos animais domésticos (LAINSON, 1983; MELLO, 1988).

Na América, atuam como agentes etiológicos na forma tegumentar, pelo menos, dez espécies. No Brasil, compreendem sete: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972, de ocorrência na região amazônica, Nordeste, Sul e Centro-Oeste do país; *Leishmania (Viannia) guyanensis* Floch, 1954; *Leishmania (Viannia) lainsoni* Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa, 1987; *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson & Shaw, 1989 e *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, Braga, Souza, Pova & Ishikawa, 1989, *Leishmania (Viannia) lindembergi* Silveira, Ishikawa, Souza, Lainson, 2002 as

cinco encontradas na região amazônica e *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911, com a mais ampla distribuição no Brasil (DEDET, 1993; SILVEIRA et al., 2002; DORVAL, 2006).

Atribui-se a *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 a maioria dos casos da forma visceral na América. Entretanto, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 foi isolada de medula óssea de caso humano na Bahia (BARRAL et al., 1986).

Análises de DNA indicaram que a *Leishmania (Leishmania) infantum*, espécie responsável pela leishmaniose visceral na Europa, e a *Leishmania (Leishmania) chagasi* apresentam tanta semelhança, que só poderiam ser separadas em nível sub-específico (MAURÍCIO et al., 1999). Conseqüentemente, são adotadas agora por alguns autores as subespécies *Leishmania. (Leishmania) infantum infantum* e *Leishmania. (Leishmania) infantum chagasi*. (LAINSON e RANGEL, 2003).

Seus vetores compreendem insetos hematófagos, nematóceros, de diferentes gêneros e várias espécies, conhecidos como flebotomíneos (DEDET, 1993) e pertencem à família Psychodidae. Apresentam portes reduzidos, cujo comprimento raramente ultrapassa 0,5 cm. São densamente pilosos e esse aspecto constitui característica geral do grupo (FORATTINI, 1973).

O habitat das formas imaturas dos flebotomíneos é terrestre desenvolvendo-se estas em locais ricos em matéria orgânica em decomposição, especialmente de natureza vegetal (AGUIAR e MEDEIROS, 2003).

Algumas espécies de flebotomíneos alimentam-se somente em determinadas espécies de vertebrados, porém, outras têm hábitos ecléticos, picando indiferentemente várias espécies de mamíferos (SHERLOCK, 2003).

Nas Américas, são conhecidas cerca de 470 espécies de flebotomíneos (GALATI 2003), das quais aproximadamente 40 foram relatadas como possíveis vetores das leishmanioses (PIMENTA et al., 2003).

Entre os inúmeros flebotomíneos que têm sido incriminados e/ou comprovados como vetores de leishmânia no Brasil, destaca-se para a leishmaniose visceral a espécie *Lutzomyia longipalpis*, como a mais importante; seguida da espécie *Lutzomyia cruzi*

(GALATI et al., 1997; SANTOS et al., 1998) e em Corumbá, suspeita-se de *Lutzomyia forattinii* (GALATI et al., 1997). E para as leishmanioses tegumentares, espécies que de acordo com a nomenclatura de GALATI (2003) pertencem aos gêneros *Bichromomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psychodopygus* e *Trichophoromyia* (RANGEL e LAINSON, 2003).

1.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

A modalidade clássica da transmissão da LTA é a silvestre, na qual o homem adquire a infecção ao adentrar nas matas, onde interage com seus reservatórios naturais e vetores (PESSÔA e BARRETTO, 1948; LAINSON e SHAW, 1987). Nesta circunstância, a doença atinge predominantemente o sexo masculino e em faixa etária produtiva. Manifesta-se na forma endêmica em quase todos os estados brasileiros. Ocasionalmente na forma de surtos epidêmicos (JONES et al., 1987; GOMES, 1992). No entanto, em regiões do país com maior influência antrópica, sobretudo na Sudeste e na Nordeste, a *Leishmania (Leishmania) braziliensis* encontra-se adaptada a ecossistemas alterados e a sua transmissão vem ocorrendo em áreas há muito colonizadas (GOMES, 1992; MARZOCHI, 1992).

1.1.1. LTA no Estado de São Paulo

No Estado de São Paulo, a transmissão da LTA seguia as principais estradas de ferro, a Alta Paulista, a Noroeste e a Alta Sorocabana, em nível endêmico elevado, até meados do século XX. Nas demais áreas, a ocorrência se dava em casos esporádicos ou era inexistente (PESSÔA e BARRETTO 1948).

Atualmente a doença encontra-se em expansão, porém os níveis de incidência mostram-se distintos em diferentes áreas. A região sudoeste do Estado, na margem esquerda do rio Tietê, responsável na década de 30 por 91,6% dos casos segundo PESSÔA e PESTANA (1940) (*apud* TOLEZZANO, 1994), no período de 1979-1992, registrou apenas 16,2% dos casos. Por sua vez, a região sul do Estado, compreendida pelas regiões de Sorocaba e do Vale do Ribeira (consideradas como não endêmicas até meados do século XX) no período compreendido entre 1979-1992, foi responsável por 60,2% dos casos autóctones do Estado (TOLEZZANO, 1994).

De 1999 até a presente data, o Estado de São Paulo contabilizou 2.932 casos notificados de LTA (CVE, 2006), atingindo ambos os sexos e as várias faixas etárias. No município de Mirandópolis, ocorreram dois casos (CVE, 2006).

Os conhecimentos sobre os seus vetores no Estado de São Paulo alicerçam-se em áreas de transmissão da LTA e ainda estão em estreita dependência de matas.

A ocorrência da LTA, até os meados do século XX, se associava às matas primitivas, com os seus vetores numa estreita dependência das mesmas. Com o extensivo desmatamento que o Estado vinha sofrendo julgava-se que o fim das florestas levaria à eliminação da doença (SAMPAIO, 1951). Até esta época, destacavam-se como espécies de flebotomíneos predominantes e antropofílicas nas áreas de ocorrência da doença a *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho 1939) *Pintomyia pessoai* (Coutinho & Barretto 1940) e *Pintomyia fischeri* e, embora a *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) não se apresentasse em abundância, chamava a atenção a sua grande dispersão (BARRETTO, 1943).

Recentemente, se identificou que o táxon *Nyssomyia intermedia*, na realidade, compreende duas espécies crípticas: *Nyssomyia intermedia*, s. str. distribuída na área litorânea do Estado e *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926), até então considerada na sinonímia da primeira, em área do Planalto Paulista, com ocorrência em simpatria em municípios não litorâneos do Vale do Ribeira e Vale do Paraíba (MARCONDES, 1997). Embora em níveis inferiores ao de *Nyssomyia intermedia* s. lat., a espécie *Migonemyia migonei* (França 1920) vem assumindo importância na transmissão da LTA por todo o Estado (NEVES 1999).

1.2. LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA (LVA)

Segundo o Ministério da Saúde no período de 1984 a 2002 foram notificados 48.455 casos de LVA, destes 66% ocorreram nos Estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos 10 anos a média anual de casos no Brasil foi de 3156 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). O município de Mirandópolis contabilizou trinta e sete casos de LV com dois óbitos, entre 2001 até 9/01/2006 (CVE, 2006).

Na leishmaniose visceral americana, o cão tem sido apontado como o mais importante reservatório doméstico, principalmente por sua proximidade com o homem (DEANE, 1955).

Pesquisas realizadas por Chagas e colaboradores em 1938, no município de Abaeté (PA), já relatavam uma incidência de 1,48% no homem; 4,49% no cão e 2,63% no gato. Há citações também de que *Rattus rattus* e *R. norvegicus* foram encontrados naturalmente infectados por *L.(L.) infantum* no Mediterrâneo e no Oriente Médio, em áreas endêmicas (SHERLOCK, 1996). ALENCAR (1974/1975) encontrou a forma amastigota em *Rattus rattus* no Estado do Ceará (SHERLOCK, 1996).

Lutzomyia longipalpis, o principal vetor da LVA tem a capacidade de adaptar-se facilmente ao peridomicílio, residências e abrigos de animais. É considerada uma espécie com características antrozoofílicas e a prática da criação de animais domésticos no peridomicílio parece ter influenciado, favoravelmente, a manutenção de sua relação biológica com esses animais (KANETO, 2001).

A densidade populacional de *L. longipalpis* parece aumentar logo após a estação chuvosa (FORATTINI, 1973). Os indivíduos desta espécie tendem a não se afastar muito de seus abrigos, como se deduz através de pesquisa realizada por MORRISON et al. (1993) sobre captura, marcação, soltura e recaptura, sendo esta obtida, na grande maioria das vezes, até 250m do ponto de soltura. Porém, nesta mesma pesquisa, observou-se que alguns indivíduos foram recapturados a 1000 m do local de soltura.

1.2.1. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo

No Estado de São Paulo, a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) vem se apresentando como grave problema de saúde pública na região noroeste, desde o final da década de 90 e nas áreas de transmissão para a população humana, apenas *Lutzomyia longipalpis* tem sido pontada como vetor (SUCEN 2006).

1.2.1.1. As Leishmanioses no município de Mirandópolis

Mirandópolis, município localizado na região noroeste do Estado de São Paulo, foi alvo de estudo no ano de 2001. Naquela ocasião, identificaram-se todos os elos da cadeia de transmissão da LVA, mas sem registro de casos humanos da doença. Todavia,

no período de 2001 a presente data o município contabilizou 37 casos humanos de LVA, com dois óbitos e dois casos de LTA (CVE, 2006).

Segundo a classificação adotada pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003), o município de Mirandópolis estaria classificado como área de transmissão intensa para a LVA, com média igual a 7,4 casos por ano no período de 2001 a 2005.

Diante destes fatos, julgou-se oportuna uma nova pesquisa para identificar a situação epidemiológica das leishmanioses no município, considerando-se os reservatórios domésticos, vetores e agentes em ambiente urbano e rural e, também, em resquício de mata às margens do rio Feio, dado que é muito freqüentado para atividade de pesca e lazer pela população local.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a atual soro prevalência da leishmaniose canina nas áreas urbana e rural e realizar estudo da bio-ecologia de vetores de *Leishmania* nas mesmas áreas, bem como na várzea do Rio Feio do município de Mirandópolis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Identificar a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* em cães.

2.2.2 Identificar os possíveis focos de incidência de leishmaniose a partir dos casos confirmados da doença em cães.

2.2.3 Identificar a presença de flebotomíneos em peridomicílios de área urbana, rural e área de várzea do Rio Feio.

2.2.4 Identificar a sazonalidade dos flebotomíneos.

2.2.5 Identificar as espécies de *Leishmania* circulantes na população canina do município de Mirandópolis.

3. MÉTODO

3.1 ÁREA DE ESTUDO

Os trabalhos foram realizados no município de Mirandópolis, localizado na região noroeste do Estado de São Paulo, distante 608 km da capital e 80 km de Araçatuba (Anexo I). O município faz divisa ao norte com o município de Irapuru, Pacaembu, Flórida Paulista e Junqueirópolis; ao Sul com Lavínia, a leste com Guaraçaí e a oeste com Pereira Barreto (KANETO, 2001; PREFEITURA MUNICIPAL DE MIRANDÓPOLIS, 2006).

O município de Mirandópolis ocupa uma área de 918 km², cujo relevo varia de suave ondulado a ondulado, com solo podzolizado Lins-Marília. Situa-se a 21°12'LS e 51°1' LW, com altitude de 430 m acima do nível do mar (KANETO, 2001; IBGE, 2006). O clima é do tipo Aw₁, segundo classificação de Koeppen, com inverno seco e o mês mais frio com temperatura média superior a 18°C e precipitação inferior a 60mm. Geralmente, a estação chuvosa e quente inicia-se em outubro e vai até abril. O período seco e frio inicia-se em maio, tornando-se mais acentuado nos meses de junho a agosto. (CEPAGRI, METEOROLOGIA UNICAMP, 2006).

A população atual do município é de 25.928 habitantes, dos quais 22.279 vivem na área urbana e 3.649 na área rural (PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE MIRANDÓPOLIS, 2006). Apresenta ainda uma população carcerária de aproximadamente 2.000 detentos instalada no complexo penitenciário na periferia da cidade (comunicação pessoal).

A economia do município está baseada na agricultura e pecuária, tendo a cana-de-açúcar, pecuária de corte e de leite, avicultura de postura e fruticultura como as principais explorações, além de um pequeno comércio, indústrias e prestação de serviço (IBGE, 2006).

3.2 DADOS CLIMATOLÓGICOS (Anexo II)

Os dados climatológicos foram obtidos “on line” do Instituto Agrônomo de Campinas IAC (CIIAGRO, 2006).

3.3 ESTUDOS ENTOMOLÓGICOS

3.3.1 Captura de flebotomíneos

As capturas dos flebotomíneos foram realizadas com armadilhas automáticas luminosas em miniatura, tipo CDC modificada (NATAL et al., 1991) instaladas a 1,5m do solo, em áreas urbana, rural e em uma área de preservação ambiental distando 30 km da cidade, localizada às margens do rio Feio (Anexos III e V).

Na área urbana, foram instaladas em ambiente peridomiciliar de cinco moradias selecionadas seguindo o critério de alta, média e baixa prevalência de leishmaniose visceral em cães, de acordo com informações do Centro de Controle de Zoonoses do município de Mirandópolis (Anexo II).

Na área rural, as armadilhas foram instaladas próximas a abrigo de animais domésticos (curral, chiqueiro, galinheiro ou poleiro) e embaixo de árvores, de quatro pequenas propriedades típicas da região, as quais foram escolhidas de maneira que distassem aproximadamente 3 km do centro da cidade de Mirandópolis (Anexo III). Além destas, amostrou-se um ponto representado por um clube de lazer, escolhido devido à sua proximidade (500m) do complexo penitenciário. A armadilha foi instalada embaixo de uma árvore.

No rio Feio, inicialmente, a armadilha foi instalada na varanda de um rancho de pesca. Posteriormente, uma outra armadilha foi instalada no interior da mata ciliar, distante cerca de 500m do rancho.

Todas as capturas foram realizadas das 18:00 às 07:00 horas, não obedecendo ao horário de verão. Nas zonas urbana e rural, as capturas foram feitas duas vezes por mês, durante o período de junho de 2004 a maio de 2005. No rio Feio, as armadilhas foram instaladas uma vez por mês. No rancho, durante o período de junho de 2004 a setembro de 2005 e na mata, de outubro de 2004 a setembro de 2005.

Os flebotomíneos capturados após serem mortos em atmosfera com clorofórmio, foram acondicionados em caixas entomológicas devidamente identificadas. Em seguida, foram encaminhados ao Laboratório de Phlebotominae da FSP/USP ou ao Laboratório de Entomologia da UNESP – Araçatuba. Após serem submetidos ao processo de

clarificação, foram identificados adotando-se a nomenclatura para as espécies de acordo com a classificação de GALATI (2003).

3.3.2 Investigação da infecção natural de flebotomíneos por flagelados

Algumas fêmeas de flebotomíneos capturadas no rio Feio foram separadas para, futuramente, desenvolver análise por reação em cadeia pela polimerase (PCR) para investigação de infecção natural por leishmânias.

3.4 RESERVATÓRIOS

3.4.1 Inquérito sorológico canino

Amostras de sangue foram obtidas de animais acima de três meses de idade, das áreas urbana e rural, cujos proprietários consentiram com a pesquisa e de animais que foram enviados ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) para eutanásia. As coletas foram efetuadas entre setembro e outubro de 2005 e processadas em novembro do mesmo ano.

A área urbana do município foi dividida por setores (Anexo IV), o cálculo da amostra foi realizado levando-se em consideração a densidade populacional dos cães, nestes setores e na zona rural, com base em informação obtida junto ao CCZ de Mirandópolis, durante as campanhas de vacinação. Os cães foram escolhidos de forma aleatória para coleta de sangue e uma ficha de identificação foi preenchida, com dados dos animais e sinais ou sintomas mais comuns para a leishmaniose visceral (Anexo VI).

As amostras de sangue foram obtidas através de punção da veia cefálica ou da jugular, dependendo do porte do animal, e foram acondicionadas em dois tubos, um contendo EDTA, para obtenção do creme leucocitário e o outro, seco, para obtenção do soro.

O tubo contendo EDTA foi centrifugado em centrífuga tipo Baby II a 4000rpm por 10 minutos e a retirada do creme foi realizada com pipeta automática.

Do tubo seco, obteve-se o soro após a coagulação do sangue e centrifugação. Foi então, retirada a parte líquida com o auxílio de pipetas automáticas.

As amostras de soro e creme leucocitário foram estocadas a -20°C até o seu processamento.

Para o diagnóstico sorológico utilizou-se o teste imunoenzimático ELISA padronizado no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da USP, onde as amostras foram processadas em duplicata segundo protocolo transcrito abaixo.

O antígeno utilizado foi promastigota de *L. (L.) chagasi*, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Márcia D. Laurenti.

3.4.2 ELISA para pesquisa de IgG anti-*Leishmania* em soro de cão

Determinação de IgG nos soros testes

1. Microplacas de poliestireno de fundo plano de 96 poços foram sensibilizadas com um volume de $100\mu\text{L}$ de antígeno solúvel de promastigotas de *L. (L.) chagasi*, na concentração de $10\mu\text{g/mL}$ de proteína, em tampão carbonato-bicarbonato $0,1\text{M}$, pH 9,5, e incubadas em câmara úmida durante a noite a 4°C .
2. As placas foram lavadas três vezes com $200\mu\text{L}$ por poço de Solução Tampão Fosfato $0,15\text{M}$, pH 7,2, contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T).
3. Bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com solução de leite em pó desnatado (MOLICO®) a 10% em PBS-T ($200\mu\text{L}$ por poço) e as placas incubadas em câmara úmida durante 2 horas a 37°C .
4. As placas foram lavadas novamente três vezes com PBS-T.
5. Amostras de soros teste e de controles positivos e negativos foram adicionadas à placa, em duplicata, no volume de $100\mu\text{L}$ por poço, na diluição de 1:400 em PBS-T e incubadas a 37°C durante 1 hora em câmara úmida.
6. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T.
7. Conjugado anti-IgG de cão ligado a fosfatase alcalina (BETHIL, USA) foi adicionado no volume de $100\mu\text{L}$ por poço, na diluição de 1:2000 em PBS-T, sendo as placas incubadas a 37°C , durante 45 minutos em câmara úmida.
8. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T.

9. O revelador contendo o substrato e o cromógeno (1,0 mg/mL de PNPP em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,5) foi adicionado no volume de 100µL por poço e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos.
10. A reação foi interrompida com 50µL de NaOH 3M por poço, sendo a leitura da absorbância feita em filtro de 405nm (Multiskan EX da Labsystems®).

3.4.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Das amostras de creme leucocitário obtido de sangue, apenas 24 foram submetidas à PCR para identificação das espécies de *Leishmania* circulante no município.

O critério de escolha dessas amostras foi o que se segue: 3 amostras cuja absorbância relativa no teste ELISA foi maior do que 6,000; 4 amostras (absorbância relativa > 4,000); 6 amostras (absorbância relativa > 2,000); 3 amostras (absorbância relativa >1,500), 5 amostras consideradas “border line” (1,500 < absorbância relativa > 1,000) e 4 amostras (absorbância relativa < 1,000) que são consideradas não reagentes ao teste ELISA.

O teste foi realizado no Instituto Adolfo Lutz, segundo protocolo utilizado pela pesquisadora Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola.

3.4.3.1 Extração de DNA a partir do creme leucocitário:

1. O creme leucocitário foi digerido com 300µl de proteinase K em 10Mm Tris_HCl pH 8,0, 10mM EDTA, 0,5% SDS, 0,01% Sarcosil e foi incubado a 56°C até a completa lise das células.
2. Após a incubação, foi centrifugado por 5 minutos a 10.000rpm.
3. Retirado o sobrenadante e acondicionado em outro microtubo, foi a ele adicionado 300µl de fenol. Centrifugou-se por 10 minutos a 10.000rpm transferindo a fase aquosa.
4. Em outro microtubo, à fase aquosa foram adicionados 200µl de solução de clorofórmio + isopropanol e centrifugou-se por 10 minutos a 10.000rpm. A seguir foi transferida a fase aquosa.

5. O produto da fase anterior foi acondicionado em um novo microtubo, sendo a ele adicionado 3 vezes o volume de isopropanol e centrifugou-se por 10 minutos a 10.000rpm.
6. Descartado o sobrenadante, os sedimentos foram lavados com 200µl de etanol 70% e centrifugados a 14.000rpm por 10 minutos.
7. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos foram secos a 4°C em câmara científica (INDREL® RC 330 – ED).
8. Os sedimentos foram hidrolisados com 50µl de H₂O + RNase e estocados a -20°C.

3.4.3.2. PCR

As reações de amplificação foram realizadas com o auxílio de um kit puRe Taq® Ready-To-Go® PCR Beads (Amersham-Pharmacia-Biotech) que contém quando reconstituído com 25µl de volume final, em temperatura ambiente: 1,5 unidades de Taq DNA polimerase, 200µM de cada dNTP, 10mM Tris-HCl pH 9.0, 50mM KCL e 1,5 mM MgCl₂.

L.(L.) chagasi é determinada pelo par de primers (RV1/RV2) que amplifica uma seqüência de 145 pares de base de uma região específica do minicírculo do kDNA de *L.(L.) donovani* a uma temperatura de anelamento de 60°C.

1µl do primer RV1, 1µl do primer RV2, 5µl de DNA teste, 18µl de H₂O PCR, totalizando 25µl por microtubo.

No termociclador (Techne Progene®) a amplificação se deu nos ciclos que se seguem:

- Desnaturação: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C
- Anelamento: 30 ciclos com 3 fases, a saber: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C.
- Extração: 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

Então, 5µl do produto resultante da PCR foi corado e disposto em gel de agarose a 2%, juntamente com o controle positivo e o peso molecular (PM) de 100 pb. A seguir, o gel foi levado a cuba de eletroforese por 40 minutos a 100v e 400Ω.

Os géis foram então visualizados em um transiluminador de ultravioleta a uma longitude de onda de 302nm (Syngene®).

Os “primers” utilizados na PCR para a identificação do gênero *Leishmania* foram Leish150 e Leish 152 que amplificam um seqüência conservada do minicírculo kDNA 120pb em temperatura de anelamento de 55°C.

3.5 TESTES ESTATÍSTICOS

Utilizou-se o teste de Correlação de Pearson com a finalidade de avaliar a correlação entre o número de insetos e temperatura, e numero de insetos e precipitação pluviométrica na planilha EXCEL.

A média geométrica de Williams (Haddow 1960) foi utilizada para o cálculo da sazonalidade dos flebotomíneos capturados no rio Feio.

Na comparação entre os resultados obtidos no teste de Elisa, segundo procedência, sexo e animais amostrados da população ou enviados à eutanásia, utilizou-se o teste do χ^2 (SIEGEL 1975).

Foi calculada a absorvância relativa para poder comparar os valores obtidos dos 240 soros examinados. Essa absorvância foi calculada dividindo-se a média das absorvâncias observadas em duplicata por animal pelo “cut off” da placa. Consideraram-se soro reagentes aqueles soros cuja absorvância relativa foi maior do que 1,0, sendo esse o valor do novo “cut off”.

$$\text{Absorvância relativa} = \frac{\text{média da absorvância do soro do animal}}{\text{“Cut off” da placa}}$$

4. RESULTADOS

4.1 DADOS ENTOMOLÓGICOS

Os rendimentos mensais das capturas de flebotomíneos, com armadilha luminosa automática tipo CDC em 5 pontos fixos de captura na zona urbana, estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1- Número e espécies de flebotomíneos capturados, duas vezes por mês, com armadilha automática luminosa, segundo local e sexo, no município de Mirandópolis (área urbana) de junho de 2004 a maio de 2005.

Local	Rua Pedro II		Rua Macoto Ono		Rua Bahia		Rua Antônio Nozela		Rua São João		Total		
	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m/f
<i>L. longipalpis</i>	16	5	4	-	-	1	-	2	2	1	22	9	31
<i>N. neivai</i>	-	1	2	2	-	-	-	-	-	-	2	3	5
<i>E. cortelezzii</i>	-	2	-	3	-	-	-	-	-	-	-	5	5
<i>B. avellari</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Total	17	8	6	5	-	1	-	2	2	1	25	17	42

m= macho; f = fêmea

B. Brumptomyia; *E. = Evandromyia*; *L. = Lutzomyia*; *N. = Nyssomyia*.

Do total de flebotomíneos capturados na zona urbana, houve um predomínio da espécie *Lutzomyia longipalpis* com 73,8% dos espécimes, seguido de 11,9% de *Nyssomyia neivai*, 11,9% de *Evandromyia (Barrettomyia) cortelezzii* e 2,4% de *Brumptomyia avellari*.

Os rendimentos mensais das capturas de flebotomíneos, com armadilha luminosa automática luminosa em 5 pontos fixos de captura na zona rural, estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Número de espécimes de flebotomíneos capturados, duas vezes por mês com armadilha automática luminosa, segundo local e sexo, no município de Mirandópolis (área rural) de junho de 2004 a maio de 2005.

Local	Chácara		Sítio Sr		Sítio Santa		Clube do		Rancho		Total		
	Madri		Paulo		Rosa		Hospital		Alegre				
Espécie	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m/f
<i>L. longipalpis</i>	-	-	-	1	19	3	-	-	-	1	19	5	24
<i>B. avellari</i>	-	-	1	-	3	-	1	-	1	-	6	-	6
<i>N. neivai</i>	1	-	1	1	1	-	-	-	-	-	3	1	4
<i>B. sp</i>	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	2	2
<i>N. whitmani</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	2	-	2
<i>E. lenti</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
<i>E. cortelezzii</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	2	2
Total	2	-	3	4	23	3	2	1	2	2	32	10	42

m = macho; f = fêmea

B. = *Brumptomyia*, *E.* = *Evandromyia*; *L.* *Lutzomyia*; *N.* = *Nyssomyia*.

Na zona rural, do total de flebotomíneos capturados, houve também um predomínio de *L. longipalpis* com 57,1%, porém ocorreu uma maior riqueza de espécies do que a observada na zona urbana. As demais espécies que ocorreram foram: *B. avellari* (14,3%), *N. neivai* (9,5%) e *B. sp.*, *N. whitmani* (4,8%), *E. (Aldamyia) lenti* (4,8%) e *E. cortelezzii* (4,8%).

A relação macho/fêmea nas zonas urbana e rural foi de 2:1 (Figura 1)

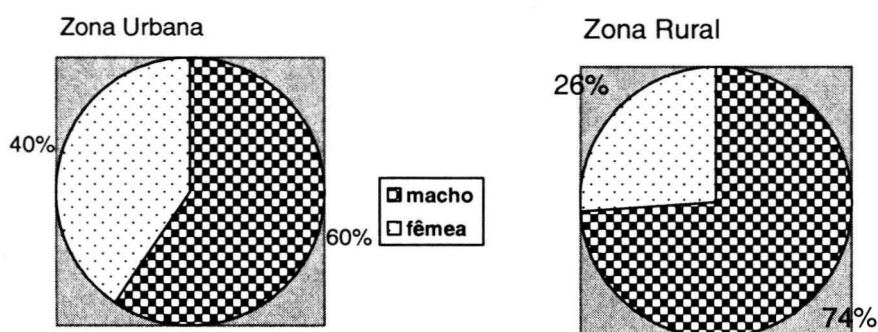


Figura 1 – Distribuição de flebotomíneos segundo sexo nas zonas urbana e rural do município de Mirandópolis de junho de 2004 a maio de 2005.

Do conjunto de dados obtidos das capturas de flebotomíneos nos meios, urbano e rural no município, os rendimentos mais expressivos ocorreram entre os meses de novembro de 2004 e fevereiro de 2005.

O Coeficiente de correlação de Pearson entre n° de insetos obtidos do conjunto de dados urbano e rural e as variáveis temperatura e índice pluviométrico encontra-se na tabela 5.

As Figuras 2 e 3 ilustram a distribuição do número de flebotomíneos (soma dos ambientes urbano e rural) e do índice pluviométrico e da temperatura média do município de Mirandópolis.

Tabela 3 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis.

Variável	Coeficiente de correlação
N° de insetos e temperatura do ar	0,563298
N° de insetos e precipitação pluviométrica	0,514721

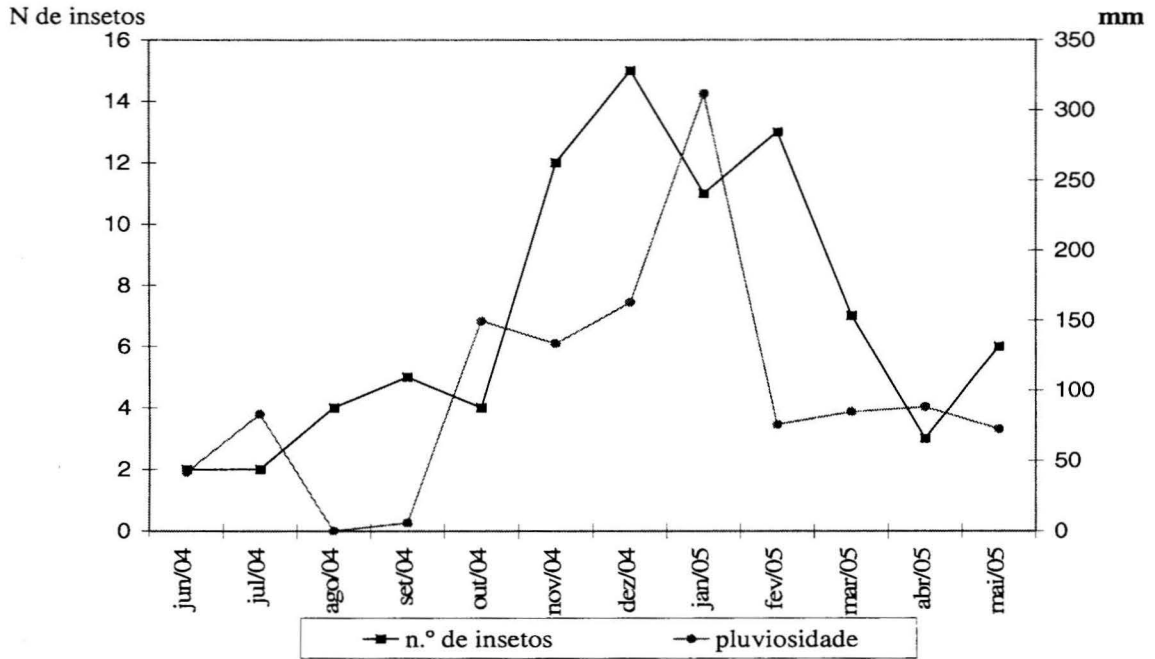


Figura - 2. Distribuição mensal de flebotomíneos e precipitação pluviométrica nas zonas urbana e rural do município de Mirandópolis no período de junho de 2004 a maio de 2005.

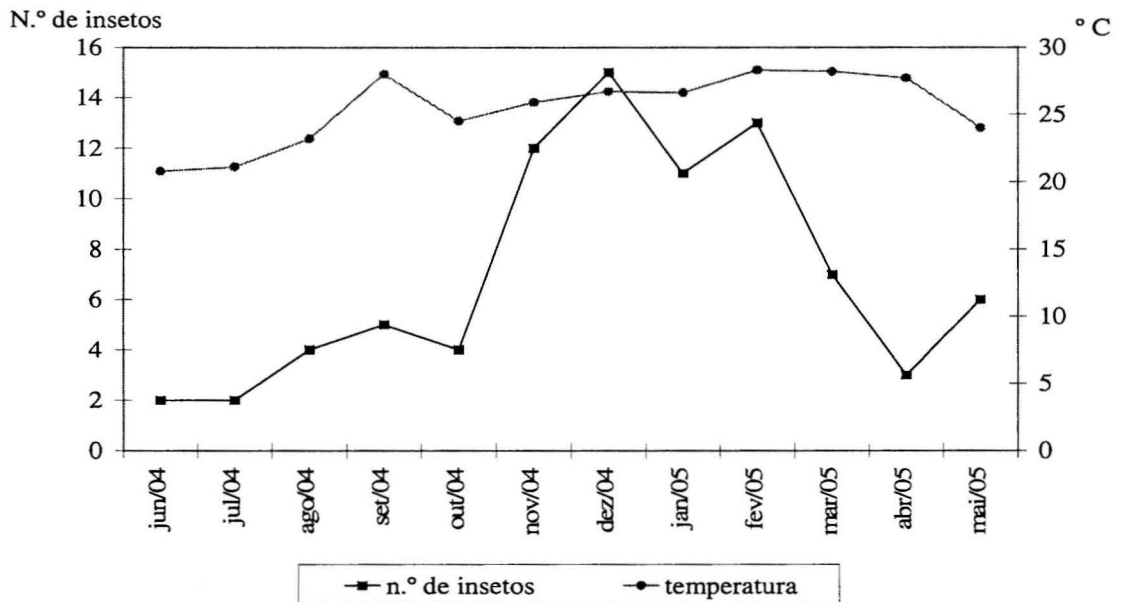


Figura 3 - Distribuição mensal de flebotomíneos e temperatura nas zonas urbana e rural do município de Mirandópolis no período de junho de 2004 a maio de 2005.

O número de insetos capturados no rio Feio no período de junho de 2004 a setembro de 2005 está exposto na Tabela 4.

Tabela 4. Número de espécimes de flebotomíneos capturados uma vez por mês com armadilhas automáticas luminosas, segundo local e sexo, no município de Mirandópolis, às margens do Rio Feio, de junho de 2004 a setembro de 2005.

Local Mês/ Sexo	Varanda		Mata		Total		
	m	f	m	f	m	f	m/f
Jun/04	2934	5286	2934	5286	8220
jul/04	5	6	5	6	11
ago/04	1602	9619	1602	9619	11221
Set/04	4424	9279	4424	9279	13703
Out/04	158	445	-	8	158	453	611
nov/04	10	42	8	28	18	70	88
dez/04	17	53	-	4	17	57	74
Jan/05	-	5	10	36	10	41	51
Fev/05	-	-	12	15	12	15	27
mar/05	-	-	-	-	-	-	-
Abr/05	10	38	1	4	11	42	53
mai/05	18	298	3	9	21	307	328
Jun/05	7	14	0	3	7	17	24
jul/05	33	305	2	9	35	314	349
ago/05	65	260	0	3	65	263	328
Set/05	57	836	5	9	62	845	907
Total	9340	26486	41	128	9381	26614	35995

... capturas não realizadas; - capturas negativas

Dos 35.995 espécimes de flebotomíneos capturados no Rio Feio, um macho pertence a *Psathyromyia(Xiphomyia) hermanlenti*; cinco exemplares, sendo três machos e duas fêmeas, são de *Brumptomyia avellari*; o restante, ou seja, 35.989 são de *N. neivai*.

A relação macho/fêmea foi 1: 2,8 diferente da observada nas capturas da zona urbana e rural.

O espécime de *P. (X.) hermanlenti* foi coletado em junho de 2004 na varanda e os de *B. avellari* (machos e fêmeas) também na varanda, em setembro de 2004.

A distribuição da média de Williams dos flebotomíneos por estação do ano está representada na tabela 5.

Na figura 4, pode-se observar a distribuição de insetos capturados por mês no rio Feio entre junho de 2004 e setembro de 2005

Tabela 5 – Média de Williams do número de flebotomíneos capturados por estação do ano no rio Feio, no município de Mirandópolis, entre outubro de 2004 e setembro de 2005.

Estações	Média de Williams
Primavera	159,85
Verão	11,33
Outono	76,29
Inverno	471,10

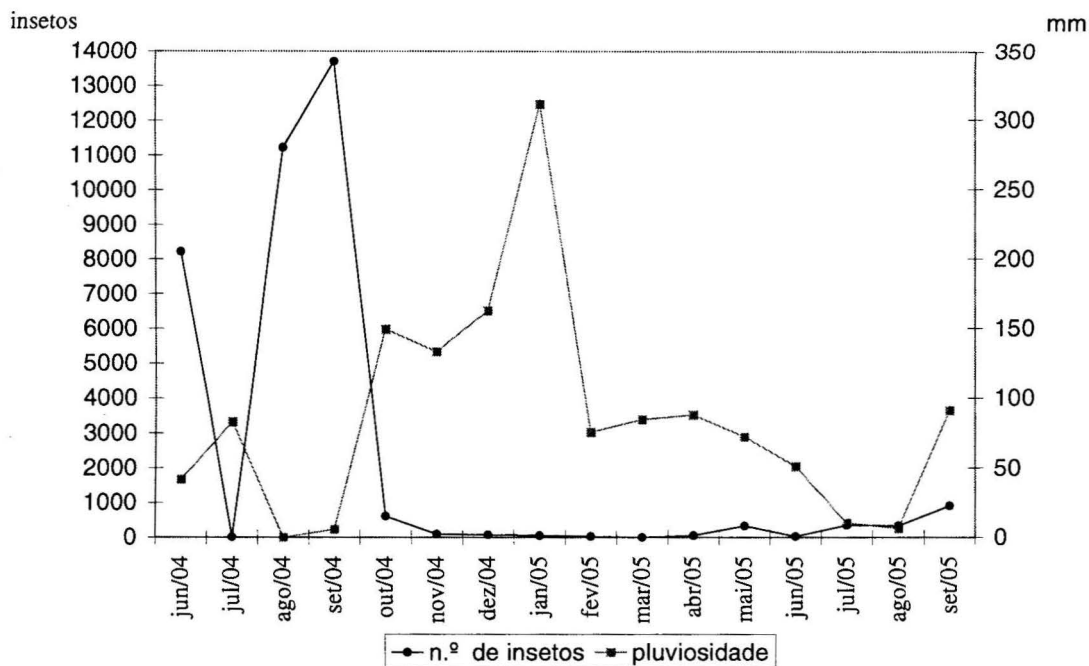


Figura 4 - Distribuição de insetos por mês, de junho de 2004 a setembro de 2005, no rio Feio, Mirandópolis - SP.

4.2 DADOS DOS RESERVATÓRIOS

4.2.1 Teste ELISA

A prevalência de animais soro-reagentes para *Leishmania* pelo teste ELISA na amostra obtida em 2005 no município de Mirandópolis foi de 60,8% (147/240). Destes, 68,5% eram da zona urbana e 31,5% da rural.

Na figura 5 observa-se a distribuição do percentual de animais soro-reagentes por setor na área urbana do município.

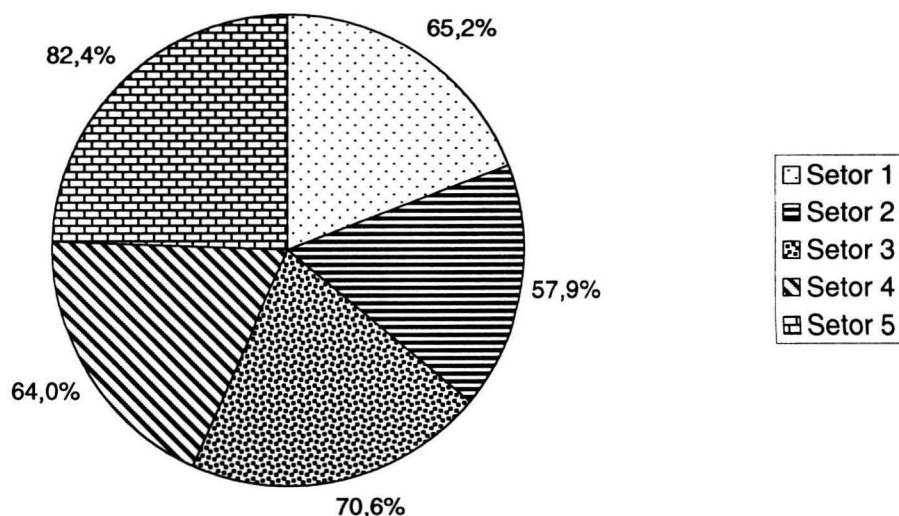


Figura -5. Percentual de cães soro-reagentes por setor na área urbana do município de Mirandópolis, 2005.

Na Tabela 6 observa-se a distribuição de número e percentual de cães examinados pelo teste ELISA segundo local de procedência.

Tabela 6. Número e percentual de cães examinados pelo teste ELISA segundo procedência urbana ou rural do município de Mirandópolis, no ano de 2005.

Procedência	Reagente		Não reagente		Total	
	N	%	N	%	N	%
Urbano	136	68	64	32	200	100,0
Rural	10	25	30	75	40	100,0
Total	146	60,8	94	39,2	240	100,0

$\chi^2 = 25,87$; $P \leq 0,001$.

A absorvância relativa entre os valores obtidos dos 240 soros examinados das zonas urbana e rural estão demonstrados nas Figuras 6 e 7 respectivamente.

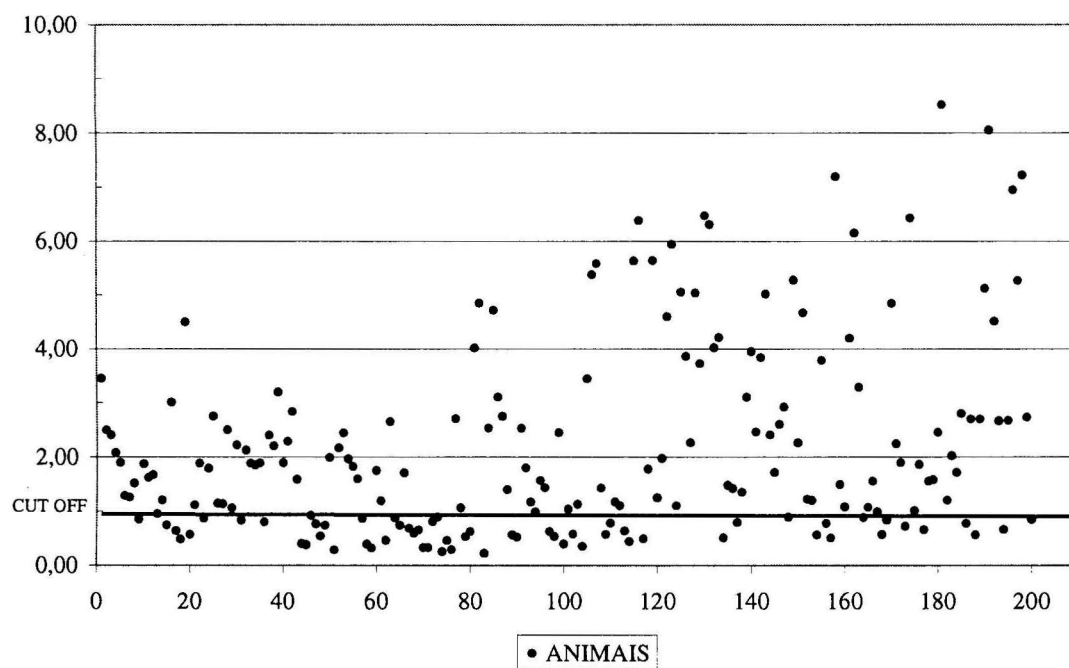


Figura –6. Absorbância relativa por animal na zona urbana de Mirandópolis 2005

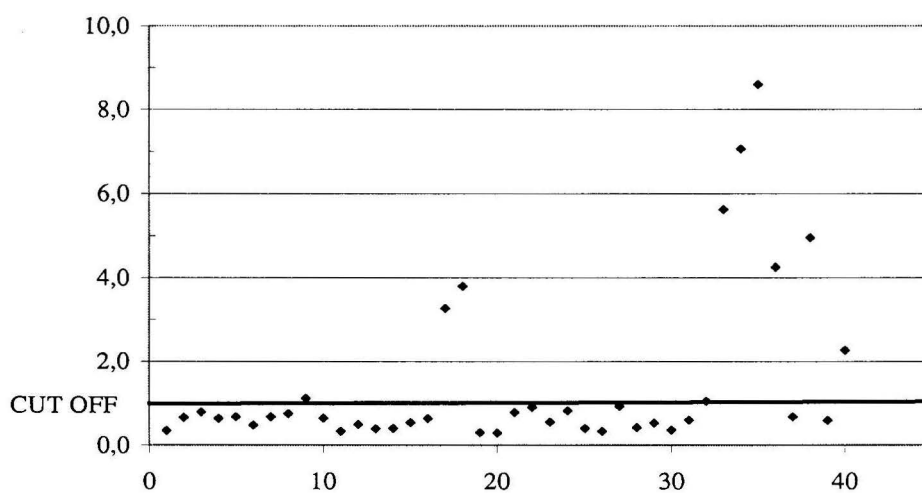


Figura 7 - Absorbância relativa por animais e na zona rural, Mirandópolis 2005.

Na tabela 5, pode-se observar o número e percentual de animais nos quais foram realizados testes sorológicos e sua classificação quanto a sintomas.

Tabela 5. Número e percentual de animais nos quais foram realizados testes sorológicos, e suas condições clínicas, em outubro e novembro 2005, no município de Mirandópolis.

Sintomas	Sintomáticos*		Assintomáticos		Total	
	N	%	N	%	N	%
Reagentes	41	28,1	105	71,9	146	100,0
Não reagentes	11	11,7	83	88,3	94	100,0
Total	52	21,7	188	78,3	240	100,0

* Animais que apresentavam pelo menos um sintoma dos descritos a seguir: emagrecimento, perda de pelos, feridas, conjuntivite e unhas crescidas.

$$\chi^2 = 9,03 \text{ (} P \leq 0,01 \text{)}$$

4.2.2 PCR

Das 240 amostras de creme leucocitário obtidas, apenas 10% (24 amostras) foram analisadas por PCR e o resultado encontra-se na tabela 6.

Tabela 6. Resultados do PCR para identificação do gênero *Leishmania* e de *Leishmania (L.) chagasi* nas 24 amostras de creme leucocitário dos cães, segundo a absorvância relativa.

Animal	Absorvância Relativa ELISA*	PCR Gênero <i>Leishmania</i>	PCR <i>L (L.) chagasi</i>	Sinais e Sintomas
1	3,453	Negativo	Negativo	Sintom. E, QP, C
11	1,619	Negativo	Negativo	assintomático
19	4,449	Positivo	Positivo	Sintom: E, QP, U, F
37	2,403	Negativo	Negativo	Assintomático
43	2,836	Negativo	Negativo	Assintomático
55	1,825	Negativo	Negativo	Assintomático
56	1,597	Negativo	Negativo	Assintomático
63	2,655	Negativo	Negativo	Sintom: E, QP
77	2,707	Positivo	Positivo	Sintom: E, QP, U, F C
83	0,788	Negativo	Negativo	Assintomático
95	4,019	Positivo	Positivo	Assintomático
100	4,846	Negativo	Negativo	Sintom: E QP U F C
103	4,718	Negativo	Negativo	Assintomático
116	0,302	Negativo	Negativo	Assintomático
118	0,779	Negativo	Negativo	Assintomático
120	0,550	Negativo	Negativo	Assintomático
139	1,106	Negativo	Negativo	Assintomático
151	1,047	Negativo	Negativo	Assintomático
163	6,469	Negativo	Negativo	Sintom E QP U F
164	6,306	Positivo	Positivo	Sintom: E QP U F C
169	1,421	Negativo	Negativo	Assintomático
191	7,196	Negativo	Negativo	Assintomático
192	1,495	Negativo	Negativo	Assintomático
196	3,289	Negativo	Negativo	Sintom QP, U.

*Absorvância relativa acima de 1,0 foi considerada soro-reagente.

Sintom.= Sintomático; E = emagrecimento; QP = queda de pelo; U = unhas crescidas; F = feridas; C = conjuntivite.

5. DISCUSSÃO

A política de controle da LVA no Brasil tem como base o controle dos reservatórios urbanos, com a identificação e sacrifício de cães soro positivos. Essa política esbarra em alguns problemas, tais como, a demora entre a coleta do soro dos animais e a execução dos testes sorológicos e o retorno desses resultados para os municípios. Esse tempo é muito longo e os animais permanecem no ambiente infectando flebotomíneos e disseminando o problema (REITHINGER, et al. 2002).

Outro ponto importante do controle da LVA no Brasil consiste no tratamento das pessoas acometidas e o uso de inseticidas para o controle das formas adultas do vetor, em área de transmissão, focando principalmente o domicílio e o peridomicílio de residências onde há a confirmação de casos de LVA em humanos. Essas medidas, no entanto, não foram suficientes para impedir o avanço da LVA no país (COSTA et al., 2001).

Em 2001, o Ministério da Saúde convocou um grupo de consultores para avaliar as medidas de controle que estavam sendo utilizadas e propor modificações. A recomendação principal foi dar maior ênfase ao controle e identificação de vetores ao invés do controle de reservatórios (COSTA et al., 2001).

Atualmente, o Ministério da Saúde preconiza a vigilância epidemiológica que compreende a vigilância entomológica, de casos humanos e casos caninos. A análise da situação epidemiológica indicará as ações de prevenção e controle a serem adotadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

A situação de Mirandópolis, segundo a classificação proposta pelo Ministério da Saúde, é de área com transmissão intensa, média de 7,4 casos por ano entre 2001 e 2005.

Em estudo realizado por KANETO (2001), o município de Mirandópolis apresentava todos os elos da cadeia de transmissão da LVA, não havendo ainda registro de caso humano.

Naquela ocasião KANETO contabilizou um total de 549 espécimes de *L. longipalpis* que foram capturados durante um ano de coleta nas zonas urbana e rural.

No presente estudo, observamos apenas 84 flebotomíneos nas zonas urbana e rural, destes 55 eram da espécie *L. longipalpis*, considerado o vetor da LVA. Essa baixa

densidade de flebotomíneos pode ser atribuída a diversos fatores dentre eles o climatológico. Durante o período de coleta de flebotomíneos, a precipitação pluviométrica apresentou um comportamento atípico. No verão que antecedeu o início das capturas, as chuvas foram menos intensas do que a média histórica do período e o outono foi mais chuvoso.

No presente estudo, as capturas iniciaram-se no inverno de 2004 que apresentou precipitação pluviométrica maior do que a esperada, seguida de uma seca intensa. A primavera foi também mais chuvosa e no verão de 2005, a chuva se concentrou no primeiro mês, seguido de uma menor precipitação nos demais meses do período (ANEXO II). Talvez esse índice pluviométrico atípico tenha influenciado de forma desfavorável o desenvolvimento das formas imaturas dos flebotomíneos e por isso, foi baixo o rendimento observado nas capturas.

Outro fator que pode ter influenciado desfavoravelmente o rendimento das capturas dos flebotomíneos foi que, durante os meses de novembro de 2004 a março de 2005, a Secretaria municipal de Saúde promoveu aspersão de permetrinas (Alfacypermetrina, Fersol 400 pó molhável, Fersol 300 líquido), em 937 domicílios (comunicação pessoal).

Apesar da baixa densidade, os flebotomíneos em geral, e em particular, o *Lutzomyia longipalpis*, capturados nas zonas urbana e rural foram constantes durante todo o ano e segundo o teste de correlação de Pearson, a temperatura e a precipitação pluviométrica influenciaram positivamente na densidade desses insetos ($r = 0,563298$ e $r = 0,514721$ respectivamente). Há muito se conhece o comportamento do *Lutzomyia longipalpis* que tende a apresentar uma maior densidade nos períodos mais quentes e úmidos. Isso tem sido constatado em diversas áreas endêmicas, como no Ceará (DEANE, 1956), na Bahia (SHERLOCK e GUITTON, 1969), no Maranhão (REBELO, 2001), no Mato Grosso do Sul (GALATI et al., 1997) e no Rio de Janeiro (AGUIAR e SOUCASAUX, 1984).

Observou-se no presente estudo que a razão sexual macho/fêmea de flebotomíneos nas zonas urbana e rural foi menor do que a observada por KANETO em 2001, contabilizando 2:1 e 4:1, respectivamente.

No rio Feio, ocorreu uma acentuada densidade de *N. neivai*, sendo essa espécie quase absoluta nas coletas. Observou-se também um melhor rendimento das armadilhas que foram colocadas no rancho de pesca sobre as colocadas na mata, demonstrando assim sua predileção por ambiente antrópico, sobretudo domicílio. Resultado semelhante foi observado em Itupeva, região sudeste do Estado de São Paulo, por MAYO et al. (1998) que à época era denominada de *L. intermedia*.

Recentemente, assumiu-se que a *N. intermedia s. lat.* é a mais importante vetora da *L.(V) braziliensis* no Estado de São Paulo. Devido, principalmente, à sua predominância e capacidade de adaptação em áreas antrópicas e no peridomicílio (TOLEZANO, 1994).

Entre dezembro de 1950 e outubro de 1953, Forattini empreendeu estudo da fauna flebotomínica no Estado de São Paulo, na região que se estende entre 21° e 24° latitude sul e 51° e 53° longitude. Naquela ocasião, o pesquisador observou diversas espécies, porém, chamou-lhe a atenção *N. intermedia s. lat.*, por ter sido a mais comumente encontrada nas capturas, com 63,39% da totalidade do material coletado e esteve presente em 13 dos 15 municípios pesquisados (FORATTINI, 1954).

BARRETTO (1943) assinala que *N. intermedia s. lat.* parece ser a espécie de maior dispersão no Estado de São Paulo, estando presente em 44 municípios dos 68 cuja fauna foi estudada.

No presente estudo, ocorreram explosões de população de *Nyssomyia neivai* nos meses de junho, agosto e setembro de 2004 que correspondem aos meses mais frios e secos do ano. No ano seguinte, os melhores rendimentos das armadilhas também foram nos meses correspondentes ao inverno, mostrando assim a preferência dessa espécie pelos meses mais secos e frios. Resultados semelhantes foram observados por CONSOLIN et al. (1990), MAYO et al. (1998) e CONDINO et al. (1998). Essa sazonalidade apresentada por *N. neivai* se assemelha também à de *N. whitmani* na Região Centro-Oeste (GALATI et al., 1996; 2006).

Apenas um indivíduo macho da espécie *P. (X.) hermanlenti* foi observado durante as capturas, sendo esse o primeiro registro dessa espécie no Estado de São Paulo.

O número de indivíduos de *Nyssomyia neivai* (13.703) capturados em uma única armadilha automática luminosa durante uma noite de coleta também chama atenção, não sendo encontrado outro registro de tamanha densidade. Possivelmente, esta espécie esteja transmitindo a leishmaniose tegumentar nesta área, pois em 2004, um colega pesquisador adquiriu leishmaniose tegumentar às margens do rio Feio no município de Castilho, que fica a aproximadamente 60 km de Mirandópolis (informação pessoal).

A importância do cão como reservatório doméstico da leishmaniose visceral americana no Brasil tem sido redimensionada. Além do homem, principalmente crianças desnutridas, canídeos silvestres e marsupiais têm sido demonstrados como fonte de infecção de *Leishmania (Leishmania) chagasi* para os flebotomíneos, o que faz ressaltar a necessidade de se desenvolver pesquisas para esclarecer quais são de fato as principais fontes de *Leishmania (Leishmania) chagasi* para a população humana (COSTA, 1997; COSTA et al., 1999).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) que utiliza como antígeno promastigota de *Leishmania (Leishmania) chagasi* tem se mostrado um bom teste para ser utilizado em estudo de prevalência canina, identificando animais infectados, por sua alta sensibilidade (98%) e especificidade (100%). Porém, alguns autores relatam a ocorrência de reação cruzada com outras enfermidades parasitárias comuns nos cães (ROSARIO et al., 2005)

ROSARIO et al (2005) analisaram 74 soros de animais com diferentes enfermidades para testar a reação cruzada do ELISA. Naquela ocasião foram testados os antígenos *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*. Ocorreram reações cruzadas do antígeno de *L. (L.) amazonensis* com *Trypanosoma cruzi* (25/40) e *Dirofilaria immitis* (6/10) e do antígeno de *L. (L.) chagasi* com *Trypanosoma cruzi* (34/40) e *Dirofilaria immitis* (4/10) e *Babesia canis* (1/24).

No presente estudo, a taxa de cães soro reagentes observada foi de 60,8% (146 animais soro reagentes em 240 examinados), estimada pelo teste ELISA. Essa taxa pode ser considerada alta, quando comparada com a taxa de positividade encontrada por KANETO, em 2001. Naquela ocasião, o pesquisador observou uma taxa de 1,7% de animais positivos estimada pela imunofluorescência indireta (IFI). Fato semelhante foi observado por SILVA et al. (2001), na região metropolitana de Belo Horizonte, onde

observou 64,6% de positividade contra 3,6% estimada pela Secretaria de Saúde de Belo Horizonte entre 1994 e 1998.

Em relação à infecção de cães por *Leishmania (Leishmania) chagasi* não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os animais quanto ao sexo, idade e raça, fato também observado por outros pesquisadores (NOLI, 1999; BANDEIRA, 1999; KANETO, 2001). Mas quanto ao local de procedência dos cães, observou-se um maior percentual de cães soro reagentes procedentes de área urbana em relação aos da área rural, diferença esta, estatisticamente significativa ($\chi^2 = 25,87$; $P \leq 0,001$). Isso pode ter ocorrido devido à maior disponibilidade de outras fontes de alimentação para os flebotomíneos da zona rural e do ecletismo alimentar da espécie *Lutzomyia longipalpis*.

Na área urbana também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os setores para a prevalência da infecção canina pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Dos animais soro reagentes observados, no presente estudo, 71,9% eram assintomáticos (105 assintomáticos em 146 animais soro reagentes) similar ao observado em Belo Horizonte por SILVA et al. em 2001 (68%) e no Rio de Janeiro, por MARZOCHI et al. em 1985 (63,2%). Essa elevada prevalência de assintomáticos e por outro lado, a alta taxa de animais soro reagentes é preocupante, uma vez que esses animais podem servir de fonte de infecção para os flebotomíneos.

É ainda importante ressaltar que das amostras submetidas ao PCR que apresentavam o resultado do ELISA acima do ponto de corte, apenas 20% (4/20) foram positivas, isso pode ter acontecido devido a menor sensibilidade do teste quando realizado a partir de creme leucocitário. REITHINGER et al. (2000; 2003), em pesquisa realizada em área endêmica para leishmaniose tegumentar americana (LTA), detectaram taxas de positividade de 8,5 a 9% em creme leucocitário e 16,7 a 17,4% em aspirado de medula óssea. Outra explicação seria a de que no momento da coleta da amostra, o animal não estivesse em parasitemia; ou ainda, é possível que alguns animais apresentem sorologia positiva, mas devido a sua competência imunológica obtiveram cura e estão livres do parasito (MORENO et al., 2002).

Assim, seria necessário um acompanhamento destes animais para melhor avaliar sua real condição. Para manter este animal no ambiente, seria recomendável utilizar coleiras impregnadas com deltametrina a 4% como medida individual de controle, tendo em vista que se mostrou eficiente e conferiu prolongada proteção aos cães contra a picada de flebotomíneos (KILLICK-KENDRICK et al., 1997).

CAMARGO NEVES (2004) promoveu em Andradina um estudo de coorte com a finalidade de verificar a eficiência da utilização desta coleira em nível populacional. Os resultados obtidos na pesquisa convergem para uma efetividade da utilização da coleira associada a outras medidas de controle.

Embora a transmissão da *L. (L.) chagasi* ocorra principalmente por meio da picada de *L. longipalpis*, outros mecanismos podem estar envolvidos, tendo em vista o baixo índice de infecção natural pelo agente observado nesses dípteros em alguns países da América do Sul, como na Venezuela (0,28%) (FELICIANGELI et al., 1999) e Colômbia (0,29 – 0,9%) (CORREDOR et al., 1989; FERRO et al., 1995). No Brasil, excepcionalmente, LAINSON (1985) encontrou uma taxa de infecção natural de 7,1% em Santarém no Para. Porém, outros pesquisadores encontraram apenas valores entre 0,2 e 0,5% (SHERLOCK, 1999; RYAN et al., 1984).

Em Mirandópolis, pudemos observar, com frequência, carrapatos em cães, os quais foram identificados como *Rhipicephalus sanguineus*. Segundo relato de funcionários do serviço de controle de vetores do município, tem sido observado grande quantidade de carrapatos em cães e em paredes das casas na cidade, com diversas reclamações de moradores. Vale ainda ressaltar que o *Rhipicephalus sanguineus* é o hospedeiro invertebrado da *Babesia canis* (FORTES, 1997).

Na ausência dos flebotomíneos, a transmissão da LVA poderia ser mantida por outros ectoparasitos de cães, particularmente a pulga *Ctenocephalides felis felis* e o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* devido à frequência e intensidade com que ambos ocorrem em cães (COUTINHO et al., 2005).

Segundo COUTINHO et al. (2005), em 1930, Blanc e Caminopetros demonstraram experimentalmente a capacidade do *Rhipicephalus sanguineus* de se infectar e manter a *Leishmania*. Nesse experimento os pesquisadores inocularam ratos

com macerado de carrapatos e os animais desenvolveram a leishmaniose. No Brasil, SHERLOCK (1964), encontrou formas morfológicamente semelhantes a *Leptomonas* em carrapatos, mas não pôde observar o desenvolvimento das formas flageladas no interior do intestino desses artrópodes. COUTINHO et al. (2005), em experimento, conseguiram infectar hamsters com a inoculação por via intraperitoneal e por via oral de macerado de carrapatos provenientes de cães sintomáticos para LVA.

Outro fator que leva a suspeitar de outros mecanismos de transmissão é a alta prevalência de cães soro-reagentes e o baixo índice de infecção humana como foi observado no presente estudo e em Belo Horizonte em 2001 (SILVA et al. 2001).

O objetivo da pesquisa por PCR, no creme leucocitário dos cães, no presente estudo foi identificar a espécie de *Leishmania* circulante em Mirandópolis, este objetivo foi alcançado com a identificação da *Leishmania*. (*Leishmania*) *chagasi*, fato que está de acordo com o observado por KANETO em 2001. Mas não se pode descartar a presença de outras espécies de *Leishmania* no município, tendo em vista a elevada frequência nas margens do rio Feio de *Nyssomyia. neivai*, suspeito vetor da *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. Além disso, TOLEZANO et al. (1999), em estudo conduzido em Araçatuba, identificou, por PCR, a presença de duas espécies de *Leishmania* circulando no município *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* e *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. A proximidade de Mirandópolis com Araçatuba e o constante trânsito de animais e pessoas entre os municípios, talvez, possa favorecer a presença de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, no município estudado. Por outro lado, o encontro de *Lutzomyia longipalpis* com infecção natural por esta *Leishmania* por SAVANI et al. (2005) no Mato Grosso do Sul, Estado vizinho ao de São Paulo reforça este ponto de vista.

6. CONCLUSÕES

Considerando:

- A presença de *Lutzomyia longipalpis*, mesmo em baixa densidade, durante todo o ano;
- A alta prevalência de cães soro reagentes (60,8%);
- A alta prevalência de cães assintomáticos (71,9%);
- A circulação no município de *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Podemos concluir que, elos da cadeia de transmissão da LVA se mantêm no município, tanto em área urbana como rural, apesar da diminuição do número de casos humanos observada entre os anos de 2004 (12 casos) e 2005 (5 casos).

A elevada densidade de *Nyssomyia neivai* no rio Feio, espécie considerada como suspeita de transmitir a leishmaniose tegumentar na região do Planalto do Estado de São Paulo, aponta para o risco de transmissão da doença na área entre seus freqüentadores noturnos, sobretudo nos períodos mais secos do ano, quando coincide com a abertura do período de pesca.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aparentemente as aspersões de inseticida que foram realizadas no município podem ter influenciado na redução da densidade de *Lutzomyia longipalpis*. Porém seria importante um constante monitoramento entomológico para melhor utilização dos recursos disponíveis.

A baixa freqüência de *Lutzomyia longipalpis* durante o período de estudo e por outro lado, a prevalência elevada da infecção canina no município, sugere que a maciça infecção na população canina antecedeu ao período deste estudo ou outros mecanismos de transmissão possam estar atuando. Nesse sentido, o relato pelos funcionários do Centro de Controle de Vetores do município da elevada infestação nos cães pelo *Rhipicephalus sanguineus*, associado à capacidade destes carrapatos de se infectarem experimentalmente pela *Leishmania*, suscitam a necessidade de investigações sobre o possível envolvimento desses artrópodes na epidemiologia da LVA. O *Rhipicephalus*

sanguineus pode estar atuando como vetor mecânico na transmissão da *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* entre os cães ou influenciando nos resultados dos testes sorológicos, uma vez que este carrapato é o hospedeiro intermediário da *Babesia. canis*, agente da babesiose em cães, que pode apresentar reação cruzada no ELISA para *Leishmania*.

8. REFERÊNCIAS

Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In Rangel EF e Lainson R, Coordenadores **Flebotomíneos do Brasil** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.p. 207 - 255.

Aguiar GM, Soucasaux T. Ecological aspects of *Phlebotomus* of the Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. I. Monthly frequency in human baits (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1984, 79(2):197-209.

Alencar JE, Almeida YM, Silva ZF, Paiva AS, da Fonseca MF. Current aspects of kala-azar in Ceara. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**. 1974/1975. 26-27:27.

Bandeira GG, Tellez CCC, Nascimento EG, Carvalho LCP, Moreira Junior ED. Estudo de corte transversal de fatores de risco para leishmaniose visceral canina numa área endêmica em Jequié, Bahia, Brasil. **Rev Soc Bras Méd Trop** 1999; 32:9.

Barral A, Badaro R, Barral-Netto M, Grimaldi G Jr., Momem H, Carvalho EM. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**. 1986. 35(4):732-4.

Barretto MP. **Observações sobre a biologia, em condições naturais dos flebótomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae)**. São Paulo 1943 [Tese de Concurso de docência-Livre – Faculdade de Medicina/Universidade de São Paulo].

Camargo Neves VLF, Rodas LAC, Pauliquévis C Jr. Avaliação da efetividade da utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para o controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: Resultados preliminares. **BEPA** 2004.13: 7-14.

CEPAGRI Meteorologia UNICAMP - Centro de Pesquisa Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura . **Clima dos municípios paulistas**. Disponível em : < URL : <http://orion.cpa.unicamp.br/portal/modules.php?name=clima&file=descricao>> [2006 fev 07].

CIIAGRO Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas **Monitoramento climatológico do município de Mirandópolis**. Disponível em: < URL: <http://ciiagro.iac.sp.gov.br> > [2006 fev 07].

Condino MLF, Sampaio SMP, Henriques LF, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região sudoeste, do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Soc Bras Méd Trop** 1998. 31 (4): 355 – 360.

Consolin J, Luz E, Torres PB. Flebotomos da área do reservatório da hidrelétrica de Itaipu, estado do Paraná, Brasil (Diptera Psychodidae). **Cad.Saúde Publ.**1990 6(1):86-89.

Costa CHN . Are dogs important reservoirs of visceral leishmaniasis in Brazil? **Rev Soc Bras Med Trop** 1997; 30(Supl I): 155-57.

Costa CHN, Pereira HF, Pereira FCA, Tavares JP, Araújo MV, Gonçalves MJO. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1999; 93: 464

Costa CHN et al. Mudanças no controle da leishmaniose visceral. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.** 2001. 34(2): 223-228

Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Morales A, Carrasquilla CF, Young DG, Kreutzer RD, Boshell J, Palau MT, Cáceres E, Pelaez D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colômbia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1989. 40: 480–486.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, Genaro O, Linardi PM. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis **Veterinary Parasitology** 2005. 128: 148-155

CVE, **Detecção* de LTA por faixa etária no Estado de São Paulo e Ano de Notificação- 1998 a 2004.** Disponível em: < URL: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lta>. >[2004 nov 20]

CVE, **Leishmaniose Visceral Americana Humana - casos autóctones e óbitos de Leishmaniose Visceral Americana, segundo município de residência 1999 – 2005.** Disponível em :< URL: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_auto9904.htm. > [2006 fev 15]

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

Dedet JP. *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. **Ann Inst Pasteur/ actual** 1993; 4 (1): 3-25.

Dorval MEMC; Oshiro ET; Cupollilo E; Castro ACC; Alves TP. Ocorrência de leishmaniose legumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada aa infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.** 2006. 39(1) 43-46.

Feliciangeli MD; Rodriguez N; de Guglielmo Z; Rodriguez A. The re-emergence of American visceral leishmaniasis in old focus in Venezuela. II Vectors and Parasite. **Parasite** 1999. 6: 113-120.

Ferro C; Morrison AC; Torres M; Prado R; Wilson ML; Tech RB. Age structure, blood-feeding behaviors, and *Leishmania chagasi* infection in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia 1995. **J. Med. Entomol.** 32: 618-625.

Forattini OP. **Algumas observações sobre biologia de flebótomos (díptera, Psychodidae) em região da bacia do rio Paraná (Brasil).** São Paulo -1954. [Tese de Livre –Docência – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Forattini OP. **Entomologia Médica. Phlebotominae. Psychodidae. Leishmanioses. Bartonelose.** São Paulo: Edgard Blücher/EDUSP 1973, 658p

Fortes E. **Parasitologia Veterinária** 3ª ed.1997 São Paulo: Cone; 1997.

Galati EAB. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. 1997. **Rev Saude Publica.** 31(4):378-90.

Galati EAB Classificação de Phlebotominae. In Rangel EF e Lainson R coordenadores. **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro, 2003, Fiocruz, p. 23-52.

Galati EAB; Nunes VLB; Boggiani PC; Dorval MEC; Cristaldo G; Rocha HC; Oshiro ET; Damasceno GAJr. Phlebotomines (Díptera: Psychodidae) in forested áreas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2006. 101 (2): 175-193.

Gomes AC. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**,1992. 67:55-60.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. **Cidades @.** Disponível em: < URL: <http://www.ibge.gov.br/> > [2006 fev 16].

Jones TC; Johnson WD; Barreto AC; Lago EL; Badaró R; Cerf B; Reed SG; Netto EM; Tada MS; França F; Wiese K; Golightly L; Fikrig E; Costa JML; Cuba CC & Marsden PD. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **J. Infect. Dis.** 1987. 156: 73-83

Kaneto CN. **Aspectos da transmissão da leishmaniose visceral no município de Mirandópolis, região noroeste do Estado de São Paulo.** São Paulo, 2001. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].

Killick-Kendrick R; Killick-Kendrick M; et al., Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis.. **Med Vet Entomol.** 1997. 11: 105 – 11.

Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1983. 77(5):569-96.

Lainson R; Shaw JJ; Ryan L; Ribeiro RMS; Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil: XXI Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) as the vector **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1985. 79: 223-226

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, Classification and geographical distribution. In: Peter W, Kellick-Kendrick R, editors. **The leishmaniasis in biology and medicine.** London: Academic Press; 1987.

Mello DA; Rego Jr; Oshiro E ;Nunes VLB. *Cerdocyon thous* (L.) (Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) in Corumbá (Mato Grosso do Sul State, Brazil). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1988. 83(2): 259.

Marcondes CB; Day JC; Ready PD. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu. neivai* and *Lu. whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania braziliensis*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1997. 91(6):725-6.

Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. **JBM**, 63 1992 (5/6):82-104.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza MA, Souza PP, Toledo LM, Rangel FB Filho. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro, Brasil. **Cad Saúde Publica** 1985. 1 (4): 432-446.

Maurício IL; Horward MK; Stothard JR; Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology** 1999. 119 (Pt 3):237-46.

Mayo RC; Casanova C; Mascarini LM; Pignatti MG; Rangel O; Galati EAB; Wanderley DMV; Correa FM. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de area de transmissão de leishmaniose tegumentar americana, no município de Itupeva região sudeste do Estado de São Paulo, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** 1998. 31(4): 339-45.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** 2003 Brasília.

Moreno J; Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol.** 2002 Sep; 18(9):399-405.

Morrison AC; Ferro C; Morales A; Tesh R & Wilson ML. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at na endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **J. Med. Ent.** 1993. 30(2):427-35.

Natal D, Marucci D, Reis IM, Galati EAB. Modificação da armadilha CDC com testes para coletas de flebotomíneos (Diptera). **Rev. Bras. Ent.** 1991. 35(4): 697-700.

Neves VLFC. **Características da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. São Paulo.** 1999 [Dissertação. Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo].

Noli C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**; 1999. 9(2): 16-24.

Nunes VLB, **Condicionantes para a transmissão de leishmanioses em assentamento agrícola do INCRA e adjacências, Planalto da Bodoquena, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, 1998-1999.**São Paulo 2001.[Tese Doutorado – Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo].

Pessôa SB & Barretto MP. Leishmaniose tegumentar americana. **Imprensa Nacional**, 1948 Rio de Janeiro, Brasil.

Pimenta P, Secundino NFC, Nieves-Blanco E. Interação vetor hospedeiro. In Rangel EF e Laison R, Coordenadores **Flebotomíneos do Brasil** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

Prefeitura de Mirandópolis Disponível em <
URL:<http://www.assessorpublico.com.br/pmmirandopolis/>>

Rangel E, Lainson R Ecologia das Leishmanioses. In Rangel EF e Laison R, Coordenadores **Flebotomíneos do Brasil** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p 291-311.

Ryan L; Silveira FT; Lainson R; Shaw JJ, Leishmanial infections in *Lu. longipalpis* and *L. antunesi* (Diptera: Psychodidae) on the island of Marajó, Pará State, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1984. 78: 547–548.

Reithinger R; Lambson BE; Barker DC; Davies CR. Use of PCR to detect *Leishmania* (Viannia) spp. in dog blood and bone marrow. **J Clin Microbiol.** 2000. 38(8):3141.

Reithinger R; Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology** July, 2002. 40(7) p.2352 – 2356.

ReithingerR; Espinoza JC; Courtenay O; Davies CR. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*).**J Clin Microbiol.** 2003. Apr; 41(4):1486-93.

Rebelo JM. [Hourly frequency and seasonality of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) on Sao Luis Island, Maranhao, Brazil.] **Cad Saúde Publica.** 2001 17(1):221-7.

Rosário EY; Genaro O; França-Silva JC; Costa RT; Mayrink W; Reis AB; Carneiro M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis.. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 2005.100(2): 197 – 203.

Sampaio LF. O aparecimento, a expansão e o fim da leishmaniose no Estado de São Paulo. **Rev. Bras. Med.** 1951 8:717-21.

Santos SO; Arias J; Ribeiro AA; de Paiva Hoffmann M; de Freitas RA; Mallaco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol.** 1998. 12(3):315-7.

Savani ESMM, Galati EAB, Nunes VLB, Castilho TM, Camargo MCO, D'Ária SRN, Floeter-Winter LM Natural infection in sand fly vectors in cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Proceedings of ISOPS V, Arch Inst Pasteur Tunis* 2005.82(1): 48-49.

Sherlock IA. Nota sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Brasil **Rev. Brasil. Malariol. D. Trop.** 1964 16: 19-26

Sherlock IA; Guitton N. Findings on kala-zar in Jacobina, Bahia. IV. Seasonal and hourly variations of *Phlebotomus longipalpis*. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**. 1969 Oct-Dec;21(4):715-27.

Sherlock, IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1996, 91(6), 671-684.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil.. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1999 91: 671–683.

Sherlock IA, Importância Médico Veterinária. Flebotomíneos do Brasil. In Rangel EF e Laison R, Coordenadores **Flebotomíneos do Brasil** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p.15-21.

Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil.. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2001Abr: 96(3):285-91.

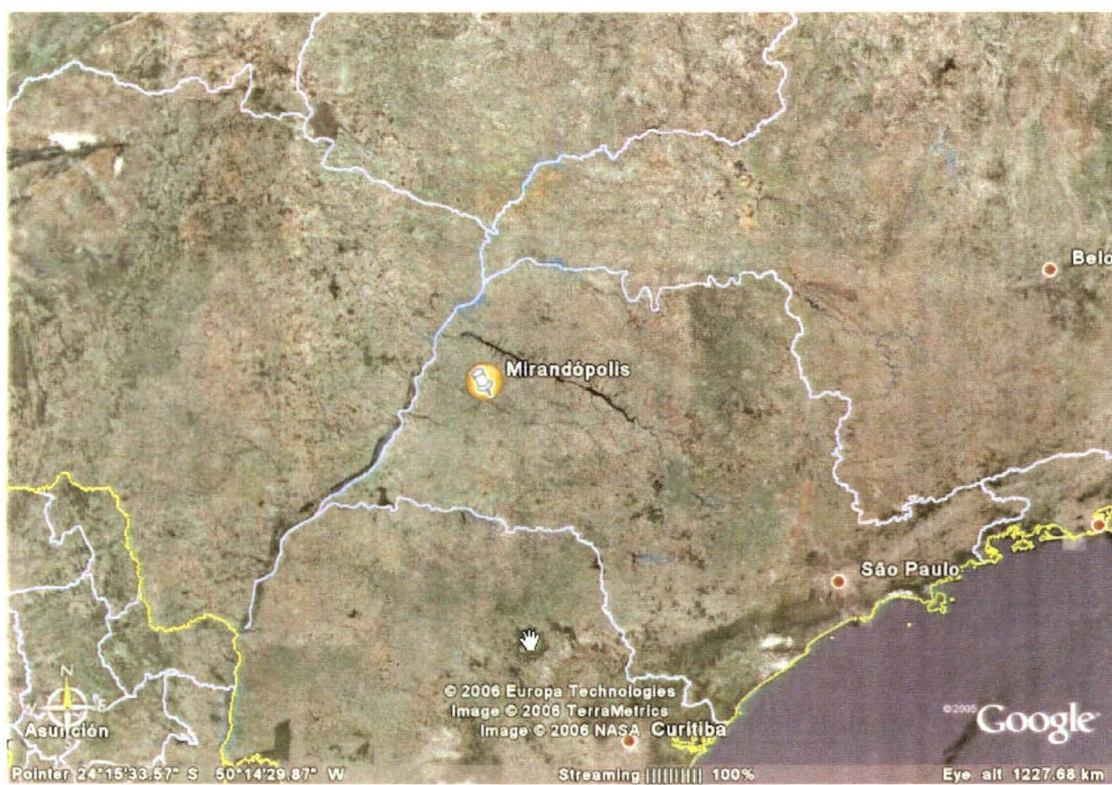
Silveira FT, Ishikawa EA, de Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belem, Para State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi*. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region.. **Parasite**. 2002 9(1):43-50.

Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of American Cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, 1994 89(3):427-34.

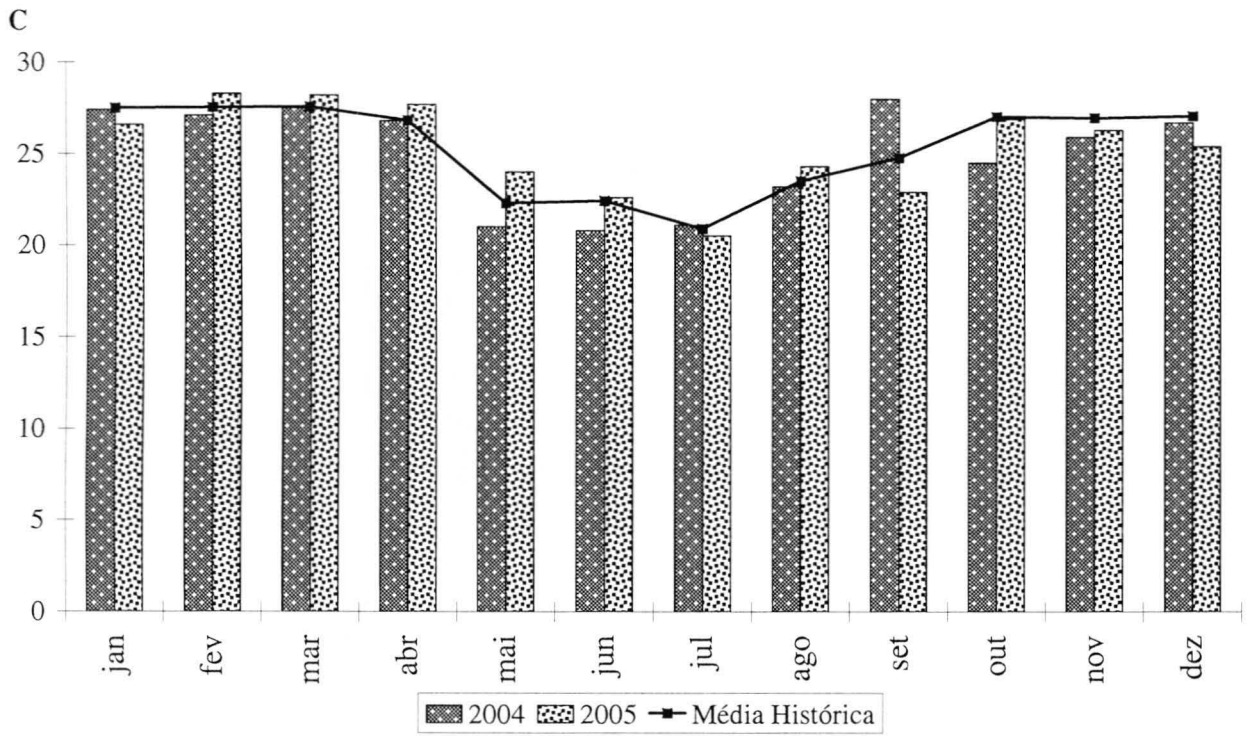
Tolezano JE, Luvizotto MCR, Uliana SRB, Araújo MFL, Taniguchi HH, Barbosa JAR, Pinto PLS, Floeter-Winter LM& Shaw JJ. Leishmaniose visceral americana (LVA) em Araçatuba, região oeste do Estado de São Paulo. Investigações laboratoriais e diagnóstico etiológico de uma doença emergente em terras paulistas. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop**. 1999; 32 (Suplemento I): 218.

WHO. Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization . **Technical Report Series**, 1990. 793.

WHO, **The disease and its epidemiology**. Disponível em:< URL:
http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/ .> [2004 nov 15]

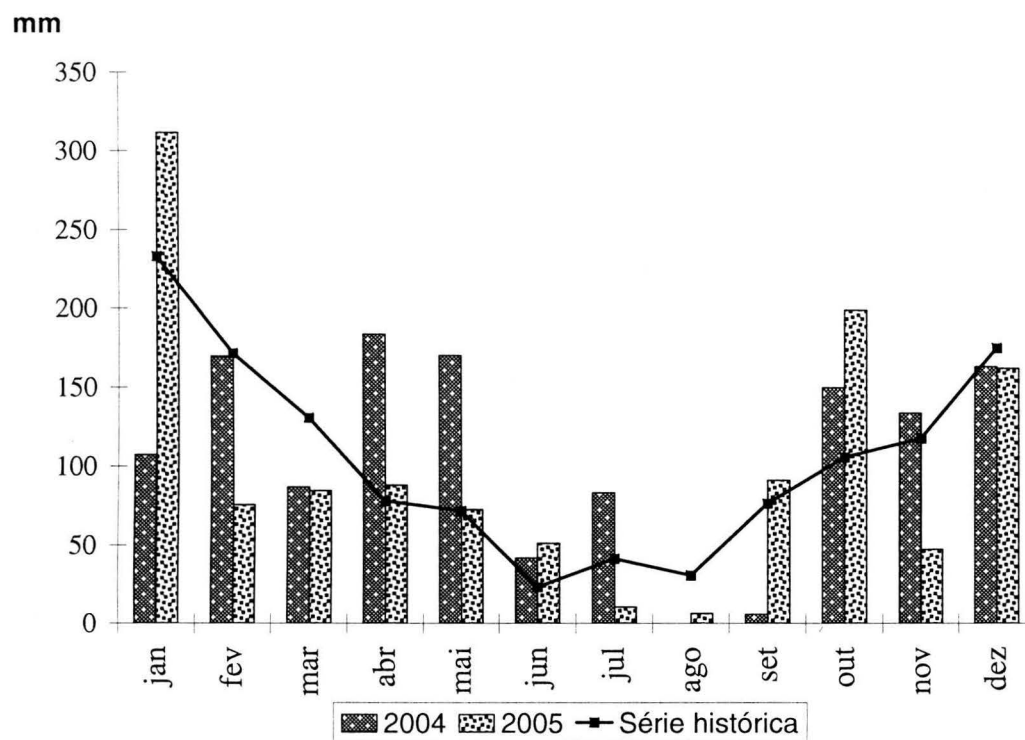
Anexo I - Localização do município de Mirandópolis, no Estado de São Paulo.

Anexo II - Dados Climatológicos



Fonte: CIIAGRO, 2006

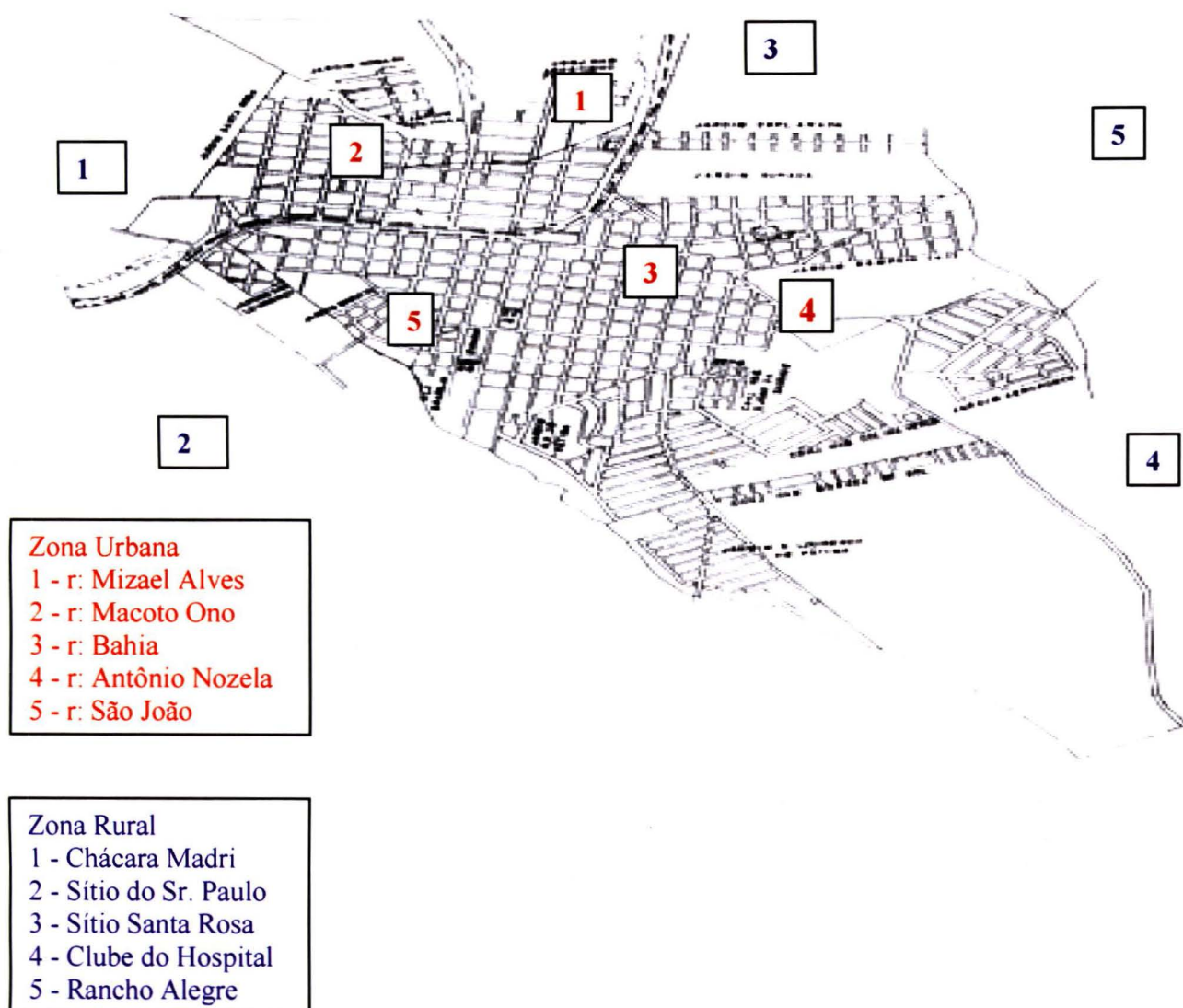
Gráfico 1 – Temperatura média nos anos de 2004, 2005 e média histórica dos últimos 5 anos.



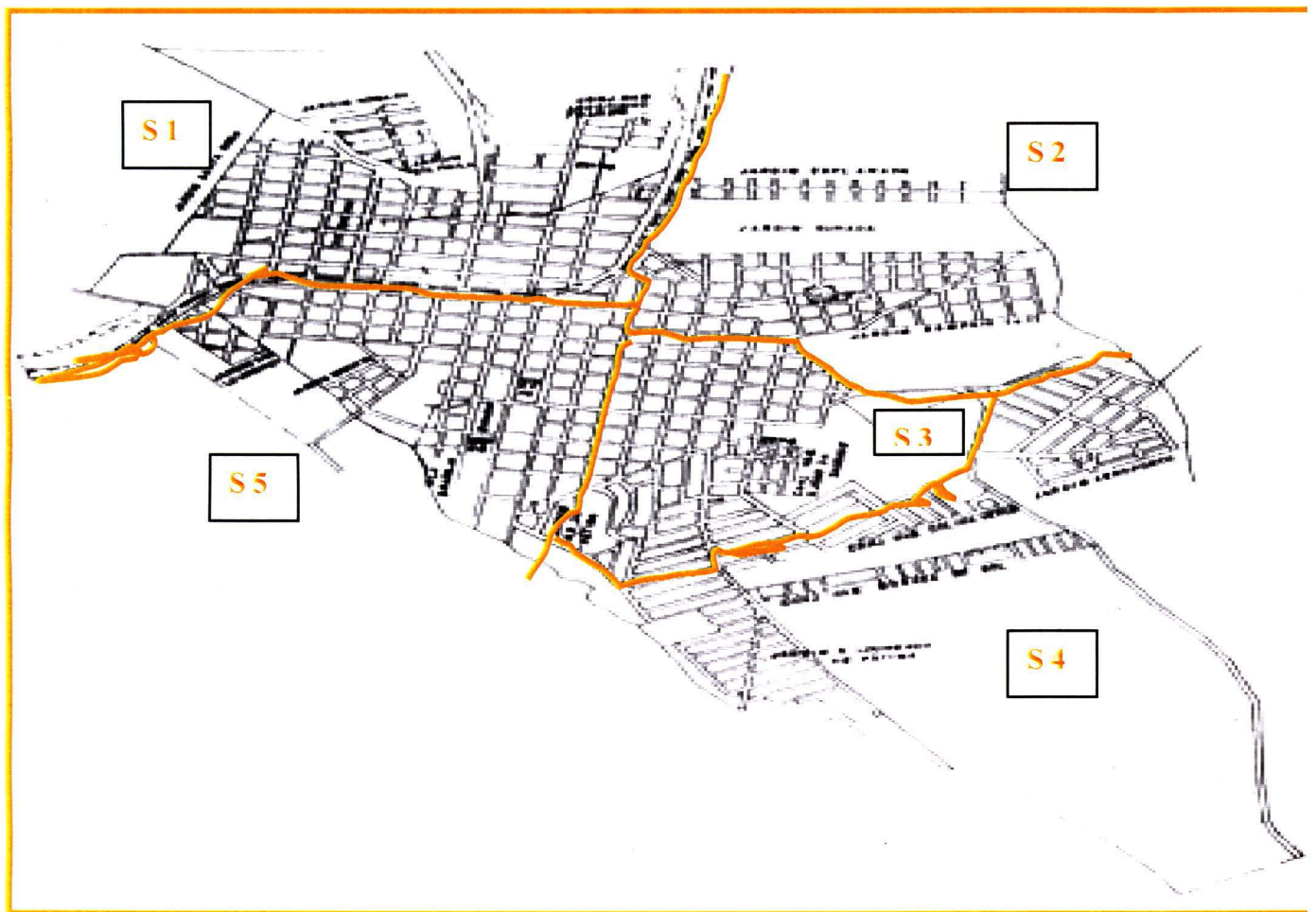
Fonte: CIIAGRO, 2006

Gráfico 2 . Precipitação pluviométrica série histórica, janeiro de 2000 a dezembro de 2005 e os anos de 2004 e 2005, Mirandópolis SP.

Anexo III - Localização dos pontos de captura de flebotomíneos nas áreas urbana e rural do município de Mirandópolis.



Anexo IV - Localização por setores dos pontos de coleta de sangue dos cães no município de Mirandópolis SP.



Anexo V - Localização do rio Feio em relação à sede do município de Mirandópolis.



Fonte: Google Earth, 2006

Anexo VI - Ficha para identificação dos cães.

Proprietário: _____

Endereço: _____

Animal: _____ **Idade:** _____ **Sexo:** _____

Raça: _____

Sintomas	Sim	Não
Emagrecimento		
Perda de pelo		
Unhas crescidas		
Feridas		
Conjuntivite		