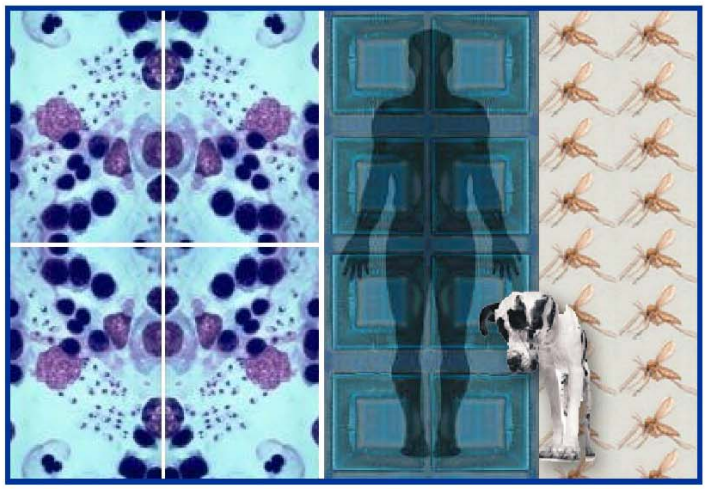
CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS

Informe Final

Brasília, Brasil - 23 al 25 de noviembre de 2005



Documento de Trabajo

Organización Panamericana de la Salud
Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud

Ministerio de Salud de Brasil

CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS
SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS

Brasilia, Brasil - 23 al 25 de noviembre de 2005

Informe Final

OPS/OMS

Ministerio de Salud de Brasil

Organización Panamericana de la Salud
Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
Unidad de Salud Pública Veterinaria – OPS/OMS

CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS
SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS

Brasilia, Brasil - 23 al 25 de noviembre de 2005

Informe Final

OPS/OMS

Ministerio de Salud de Brasil

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
Unidad de Salud Pública Veterinaria – OPS/OMS

Este documento no es una publicación formal de la Organización Panamericana de la Salud y se reservan todos los derechos. El documento puede citarse, resumirse, reproducirse o traducirse, en parte o en todo, siempre que se mencione la fuente y no para la venta ni con fines comerciales. Las opiniones cuyos autores se mencionan son de exclusiva responsabilidad de dichos autores.

Catalogación en la fuente
Organización Panamericana de la Salud
Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas
Río de Janeiro, PANAFTOSA, © 2006.
152p.

ISBN 000-00000-0-0
I. Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas

CONTENIDO

1. Prefacio 5

2. Antecedentes 7

2. Objetivos 7
2.1 Generales 7
2.2 Específicos 7

3. Agenda 8

4. Participantes 10

5. Desarrollo de la reunión 11
5.1 Apertura y marco de referencia 11
5.2 Presentación de temas específicos 12

6. Conclusiones y Recomendaciones 13
6.1. Conclusiones y recomendaciones generales 13
6.2. Conclusiones y recomendaciones específicas 14

ANEXO 1 – Artículos presentados 19
- Visceral Leishmaniasis and *Lutzomyia longipalpis* in Argentina, *Oscar Daniel Salomón* 21
- Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil, *Ana Nilce Silveira Maia Elkhoury* 24
- Análisis de Leishmaniasis en México, *Ingeborg Becker, Georgina Carrada Figueroa, Marco Gudiño Zayas, Camila González* 27
- Vigilancia y Control de la Leishmaniasis en el Paraguay, *Blanca Cousiño* 34
- Situación de Leishmaniosis Visceral en España, *Javier Encinas Aragón; Javier Fernández Gómez; Mª Dolores de las Heras Carbajo; José Barbas del Buey* 37
- Desarrollo de un diagnóstico por PCR que permite diferenciar entre especies del complejo *Leishmania (L.) mexicana* y *Leishmania (V.) braziliensis; Berzunza-Cruz Miriam, Padilla Alejandro, Pérez-Montfort Ruy, Becker Ingeborg* 45
- Avanços dos Estudos Moleculares de *Leishmania (Leishmania) Chagasi* Aplicados ao Diagnóstico de LV no Brasil, *Elisa Cupolillo* 58

- Diagnóstico Sorológico e Parasitológico da Leishmaniose Visceral, *Reynaldo Dietze* 63
- Técnicas Diagnósticas Utilizadas na Rotina dos Serviços de Saúde do Brasil, *Geane Maria de Oliveira* 66
- Desafios para Estruturar uma Política de Medicamentos para o Tratamento da Leishmaniose Visceral nas Américas, *Christina Zackiewicz* 68
- Present Situation and New Perspectives for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in the New World, *Carlos H. N. Costa, MD, DSc.* 72
- Recommendations for the Treatment of Visceral Leishmaniasis, *Dorcas Lamounier Costa* 78
- Flebótomos Transmissores de *Leishmania (L.) Infantum Chagasi* nas Américas e Técnicas Disponíveis de Captura para Vigilância Entomológica, *Elizabeth Ferreira Rangel* 83
- Vigilância entomológica e controle de vetores da leishmaniose visceral americana, *Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves* 85
- Estudo para a Adequação de Doses de Inseticidas de Efeito Residual, para o Controle de *Lutzomyia Longipalpis*, *Laura Ney Marcelino Passerat de Silans* 89
- Controle da Leishmaniose Visceral Baseado no Reservatório Canino, *Waneska Alexandra Alves* 94
- Utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para o controle da leishmaniose visceral americana. Resultados preliminares de um estudo conduzido no Estado de São Paulo, *Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves* 99
- Tratamento da LV Canina e seu Impacto na Incidência de LV Humana e na Prevalência da LV em Cães. Uma Experiência em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; *Victor Márcio Ribeiro* 104
- Leishmaniose visceral em meio urbano: avaliação das estratégias de controle utilizando uma abordagem espacial, *Guilherme Loureiro Werneck* 111
- Critérios para registro de produtos veterinários, *Marcos Vinícius de S. Leandro Jr.* 113
- Leishmaniose visceral: situação atual da vacinação canina, *Luis Jacintho da Silva* 117
- Papel do cão na transmissão da leishmaniose visceral em centros urbanos, *Luciana Hardt Gomes* 119
- O papel das ongs de proteção animal e perspectivas para o controle da Leishmaniose Visceral, *Marcos Ciampi* 121
- Surveillance of Visceral Leishmaniasis, *Bruno Chomel* 124
- Vigilância da Co-infecção *Leishmania*/HIV, *Ana Rabello* 129
- Vigilância da Leishmaniose Visceral nas Américas a partir da Caracterizaçao de Unidades Territoriais de Relevância Epidemiológica, *Paulo Sabroza* 132
- O uso da informação geo-referenciada para a vigilância da leishmaniose visceral. Experiência do município de Jequié-Bahia-Brasil, *Eliane Góes Nascimento* 137

ANEXO 2 – Listado de participantes 143

PREFACIO

Los servicios de salud de los países de las Américas, con el apoyo de la OPS/OMS, están realizando importantes esfuerzos para disminuir la carga de las Leishmaniasis para la salud pública. Sin embargo, las condiciones asociadas con la pobreza y la migración humana agravaron la transmisión y arraigo de focos epidémicos de Leishmaniasis Visceral (LV) cuya incidencia aumentó de forma preocupante en algunas áreas de Latinoamérica.

Para fortalecer los sistemas de prevención de la LV en la Región, un grupo de expertos revisó y analizó el estado del conocimiento, la situación epidemiológica y las acciones de vigilancia y control de la LV. Fundamentado rigurosamente, el grupo de expertos generó recomendaciones y documentos de trabajo que constituyen un incentivo y un aporte concreto para que los gobiernos de los países miembros de la OPS promuevan acciones multidisciplinarias que reduzcan la incidencia y la fatalidad de la LV. Sirviendo al mismo propósito la red de expertos en disciplinas ligadas a la prevención de las Leishmaniasis, quedó consolidada y fortalecida como instrumento imprescindible para acciones más eficaces y eficientes científicamente fundamentadas.

La OPS/OMS desea agradecer a los expertos participantes y a la Secretaría de Vigilancia de Salud del Ministerio de Salud de Brasil por el generoso apoyo prestado.

Albino Belotto
Jefe de la Unidad de Salud Pública Veterinaria
Organización Panamericana de la Salud

CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS
SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS

Informe Final

1. ANTECEDENTES

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias de distribución mundial transmitidas al hombre por picaduras de alrededor de 30 especies de flebótomos infectados por protozoos flagelados del género *Leishmania*.

Se estima que ocurren cada año 2 millones de nuevos casos en todo el mundo (1.5 millón de casos de leishmaniasis cutánea y 500.000 casos de leishmaniasis visceral). La prevalencia estimada total es de 12 millones de personas infectadas. El impacto de las leishmaniasis en la salud pública probablemente esté subestimado.

La leishmaniasis visceral (LV), también llamada kala azar, es la más severa de todas, se caracteriza por accesos irregulares de fiebre, pérdida de peso, hinchazón de hígado y bazo y anemia. Es fatal si no se trata adecuadamente.

En América Latina, la LV es endémica o se han detectado factores de riesgo en áreas de Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Venezuela. La mayoría de los casos se reportan en Brasil, que tiene un adecuado programa y sistema de vigilancia.

La enfermedad tenía una característica típicamente rural. Recientemente se comenzó a reportar en áreas urbanas de grandes ciudades de la región. Probablemente estos cambios están asociados a problemas socioeconómicos que aumentan la migración de las áreas rurales a las urbanas y a cambios en el medio ambiente que favorecen la multiplicación del agente y del vector.

Si no se asocia a otros problemas de salud, el hombre no es reservorio de LV y los animales, particularmente los perros, son el principal reservorio por lo que la transmisión es fundamentalmente zoonótica. Las personas co-infectadas por los agentes de Leishmania y SIDA pueden detentar cargas altas de *Leishmanias* en sangre y convertirse en reservorios. Esto implica dificultades específicas en el diagnóstico y tratamiento de pacientes co-infectados y riesgo de brotes antroponóticos.

La identificación y mitigación de los factores de riesgo de las Leishmaniasis son vitales para minimizar su impacto en la salud pública. Estos requieren de una eficiente coordinación multidisciplinaria para el control de vectores; la disminución de la infección en las poblaciones animales que actúan como reservorios y el diagnóstico y tratamiento eficaz y oportuno.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GENERALES

- Fortalecer los sistemas de prevención de la leishmaniasis visceral en los países de las Américas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar y analizar el estado del conocimiento, la situación epidemiológica, y las acciones de vigilancia y control de la leishmaniasis visceral en las Américas.
- Generar recomendaciones para la mitigación de riesgos de leishmaniasis en los países del Continente Americano y, juntamente con los gobiernos de los países miembros de la OPS, incentivar acciones multidisciplinarias de vigilancia, prevención y control de la leishmaniasis visceral.

3. AGENDA

Día 23/11/05

08:30 - 09:00 ***Apertura de la Reunión***

Palabras del Dr. Miguel Malo, Representante de OPS/OMS en Brasil
Dr. Albino Belotto, Coordinador Salud Pública Veterinaria OPS/OMS Washington
Palabras del Dr. Expedito Luna, Director del Departamento de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Vigilancia en Salud del Ministerio de Salud de Brasil

09:15 - 11:20 - *PANEL 1: Experiencia de los países en vigilancia y control*

1.1. Situación de la LV en los países de las Américas
Celsa Sampson, OPS/OMS, Brasil.
1.2. Experiencia de países de Latinoamérica en la vigilancia y control de la LV
Daniel Salomon (Argentina), Ana Nilce Maia Elkhoury (Brasil), Ingeborg Becker (México) y Blanca Cousiño (Paraguay).
1.3. Situación de la Leishmaniasis Visceral en España
Javier Encinas Aragón, España.
1.4. Preguntas y discusión.
Coordinadora: Celsa Sampson, OPS/OMS, Brasil.

11:20 - 11:35 Receso

11:35 - 12:45 - *PANEL 2: Diagnóstico de laboratorio*

2.1. Avances en los estudios moleculares de *Leishmania spp* aplicados al diagnóstico en México
Ingeborg Becker, México.
2.2. Avances en los estudios moleculares de *Leishmania chagasi* aplicados al diagnóstico en Brasil
Elisa Cupolilo, Brasil.
2.3. Diagnóstico serológico y parasitológico de LV
Reynaldo Dietze, Brasil.

12:45 - 14:00 Almuerzo

14:00 - 15:00 - (cont. PANEL 3)

2.4. Técnicas de diagnóstico utilizadas en los servicios de salud de los países: Brasil y Paraguay
Geane Maria de Oliveira (Brasil) y Andrés Canese (Paraguay).
2.5. Preguntas y discusión.
Coordinador: Gustavo Adolfo Sierra Romero, Brasil.

15:00 - 16:00 - *PANEL 3: Tratamiento de la LV humana*

3.1. Desafíos para estructurar una política de medicamentos para el tratamiento de la LV en las Américas
Cristina Zackiewicz, Brasil.
3.2. Situación actual y nuevas perspectivas en tratamientos para las LV
Carlos Henrique Nery Costa , Brasil.

16:00 - 16:15 - Receso

16:15 - 17:45 - (cont. PANEL 3)

3.3. LV grave, normas y conductas
Dorcas Lamounier Costa, Brasil.
3.4. Uso de miltefosine en pacientes con LV en Brasil
Reynaldo Dietze, Brasil.
3.5. Preguntas y discusión.
Coordinador: Gustavo Adolfo Sierra Romero, Brasil.

Día 24/11/05

08:30 - 09:45 - *PANEL 4: Entomología: acciones de vigilancia, prevención y control vectorial*

4.1. Flebótomos transmisores de *Leishmania chagasi* en las Américas y técnicas disponibles de captura para vigilancia entomológica
Elizabeth Rangel , Brasil.

4.2. Vigilancia y control vectorial de LV
Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves, Brasil.

4.3. Estudio para la adecuación de dosis insecticidas de efecto residual para el control de *Lutzomyia longipalpis*
Laura Ney Marcelino Passerat de Silans, Brasil.

4.4. Preguntas y discusión.
Coordinador: Blanca Cousino, Paraguay

09:45 - 10:00 Receso

10:00 - 13:00 - *PANEL 5: Control de la LV canina como estrategia para la reducción de la LV humana.*

5.1. Control de la LV en el reservorio canino
Waneska Alexandra Alves, Brasil.

5.2. Impacto del uso de collares impregnados de insecticida
Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves, Brasil.

5.3. Tratamiento de la LV canina y su impacto en la incidencia de LV humana y en la prevalencia de LV en perros: Una experiencia en Belo Horizonte-MG.
Victor Márcio Ribeiro, Brasil.

5.4. LV en áreas urbanas: evaluación de estrategias de control utilizando un abordaje espacial
Guilherme Werneck, Brasil.

5.5. Criterios para el registro de vacunas anti-LV canina: Situación actual y nuevas perspectivas
Dr. Marcos Vinicus de S. Leandro Júnior, Brasil.

5.6. Vacunación de perros contra LV y reducción de la incidencia de LV humana
Luis Jacintho da Silva, Brasil.

13:00 - 14:00 Almuerzo

14:00 - 15:00 - (Continuación del Panel 5)

5.7. Rol del perro en la transmisión de la LV en centros urbanos
Luciana Hardt, Brasil.

5.8. Rol de las ONG de protección animal en el control de LV
Marcos Ciampi, Brasil.

5.9. Preguntas y discusión.
Coordinador: Ana Nilce Silveira maia Elkhoury, Brasil.

15:00 - 16:45 - *PANEL 6: Información y vigilancia*

6.1. Información y vigilancia para el control de enfermedades
Eduardo Mota, Brasil.

6.2. Vigilancia de la LV zoonótica
Bruno Chomel, EE. UU.

6.3. Vigilancia de Co-infección *leishmania*/HIV
Ana Rabelo, Brasil.

6.4. Propuesta de un sistema de vigilancia y monitoreo de LV
Paulo Sabroza, Brasil.

6.5. Uso de información geo-referencial para la vigilancia de LV. Experiencia del Municipio de Jequié, Bahía, Brasil.
Eliane Góes do Nascimento, Brasil.

6.6. Preguntas y discusión.
Coordinador: Albino J. Belotto, OPS/OMS, Washington DC

16:45 - 17:00 Receso

17:00 - 18:30 - *GRUPOS DE TRABAJO: Elaboración de recomendaciones a los países de la región*
Se formarán tres grupos de trabajo para abordar tres temas:
Grupo 1: diagnóstico y tratamiento;
Grupo 2: vigilancia y control y
Grupo 3: fortalecimiento de los programas nacionales.

Se solicitará a cada grupo que produzca un breve resumen de lo más relevante presentado sobre el tema, un análisis de las fortalezas, debilidades y amenazas de la región y de los países con relación al tema y proponer recomendaciones específicas.

Luego del trabajo de grupo, éstos presentarían sus resultados al plenario y se discutirían los resultados en conjunto para producir las conclusiones y recomendaciones generales de la consulta.

Día 25/11/05

08:30 - 11:30 - Grupos de trabajo: Continuación del trabajo y elaboración de recomendaciones a los países de la región

11:30 - 13:30 - Grupos de trabajo: Preparar presentación

12:30 - 13:30 - Almuerzo

13:30 - 16:00 - Presentación de los informes de los Grupos de trabajo

16:00 - 16:15 - Receso

16:15 - 17:30 - Discusión, conclusiones y recomendaciones generales de la consulta #

4. PARTICIPANTES

COMITÉ ORGANIZADOR:

OPS/OMS

- Unidad de Salud Pública Veterinaria (Sede y PANAFTOSA)
- Unidad de Enfermedades Transmisibles
- Representación en Brasil
- Ministerio de Salud de Brasil – Secretaría de Vigilancia en Salud

INSTITUCIONES PARTICIPANTES:

- Asociación Humanitaria de Protección y Bienestar Animal, Brasil (ARCA-Brasil)
- Asociación Nacional de Clínicos de Pequeños Animales, Brasil (ANCLIVEPA)
- Centro Colaborador OPS/OMS para Entrenamiento e Investigación en Control de Zoonosis Urbanas. Centro de Control de Zoonosis del Municipio de São Paulo (CCZ-SP), Brasil
- Centro Colaborador de la OMS/OPS en Zoonosis Nuevas y Emergentes. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de California en Davis, (UCDavis), California, EE.UU.
- Fundación Oswaldo Cruz, Brasil (FIOCRUZ)
- Iniciativa de Medicamentos para Enfermedades Postergadas, Organización Internacional (DNDi)
- Instituto de Salud Colectiva, Universidad Federal de Bahía, Brasil (ISC/UFBA)
- Instituto de Salud Pública de Madrid, España (ISPM)
- Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento de Brasil (MAPA)
- Ministerio de Salud de Brasil (MS)

- Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social de Paraguay (MSPS)
- Ministerio de Salud de Argentina (MS)
- Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS)
- Secretaría de Estado de Salud de Paraíba, Brasil (SES-PB)
- Secretaría de Estado de Salud de São Paulo, Brasil (SES-SP)
- Secretaría de Estado de Salud de Bahia, Brasil (SES-BA)
- Secretaría de Vigilancia en Salud de Brasil (SVS)
- Sociedad Mundial de Protección de Animales, Organización Internacional (WSPA)
- Superintendência de Controle de Endemias, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Brasil (SUCEN/SES-SP)
- Universidad de Brasilia, Brasil (UNB)
- Universidad Estadual de Campinas, Brasil (UNICAMP)
- Universidad Federal do Espírito Santo, Brasil (UFES)
- Universidad Federal de Piauí, Brasil (UFPI)
- Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil (UFRJ)
- Universidad Nacional de Asunción, Paraguay (UNA)
- Universidad Nacional de México (UNAM)

El listado completo de participantes se presenta en el Anexo 2.

5. DESARROLLO DE LA REUNIÓN

5.1 APERTURA Y MARCO DE REFERENCIA

El Dr. Miguel Malo, en el nombre del representante de la OPS/OMS en Brasil, Dr. Horacio Toro, dio la bienvenida a los participantes y destacó la importancia del control de las enfermedades transmisibles en los países en desarrollo como parte de la estrategia de reducir la exclusión social y las inequidades en salud llevada adelante por la OPS/OMS y sus miembros. Asimismo, felicitó a la Secretaría de Vigilancia en Salud del Ministerio de Salud de Brasil por el trabajo pionero llevado adelante en materia de prevención de las leishmaniasis y agradeció muy especialmente la colaboración prestada en la organización conjunta de la reunión, resaltando la importancia del evento para dar respuesta al desafío de la leishmanisis visceral mediante el fortalecimiento de la cooperación horizontal.

El Dr. Albino Belotto, Jefe de la Unidad de Salud Pública Veterinaria de la OPS/OMS destacó la importancia de este tipo de eventos que dan visibilidad a problemas que, por afectar a sectores postergados de la sociedad, tienen la más alta prioridad para la OPS/OMS y para sus miembros. Presentó los términos de referencia de la reunión de trabajo y comentó que la estrategia de consulta técnica es utilizada por la OPS/OMS para revisar la situación de aquellas enfermedades que no están en los programas regionales específicos y técnicos pero son percibidas como problema por los países. Señaló que de esta manera había sido tratada en septiembre de 2005 el caso de las rickettsiosis y en esta oportunidad el caso de la leishmaniasis visceral, dos problemas de zoonosis en los que la integración de los sectores involucrados resulta determinante para asegurar la eficacia de las medidas de prevención y control. Asimismo expresó que la OPS/OMS espera que a partir de la reunión se establezcan o refuercen los vínculos de trabajo entre los participantes y se fortalezcan, a partir del intercambio de ideas y experiencias, los sistemas de prevención de los países. El Dr. Belotto, finalmente, agradeció a la Secretaría de Vigilancia en Salud del Ministerio de Salud de Brasil por la valiosa colaboración prestada y a los expertos participantes por haber aceptado la invitación y por el generoso aporte documental recibido para discutir durante la reunión y luego entregar a los países en donde, sin dudas, serán una valiosa herramienta para la toma de decisiones y la acción eficaz para prevenir y controlar la leishmaniasis visceral.

El Dr. Expedito Luna, Director del Departamento de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Vigilancia en Salud del Ministerio de Salud de Brasil saludó y agradeció la asistencia de todos los participantes y el rol aglutinador de la OPS/OMS para un evento tan trascendente. Destacó que las leishmaniasis integran el grupo de enfermedades en

expansión que generan graves repercusiones sociales por lo que la Secretaría de Vigilancia en Salud del Ministerio de Salud de Brasil trabaja para la promoción y diseminación del uso de metodologías epidemiológicas en todos los niveles del sistema único de salud (SUS), apuntando al establecimiento de sistemas de información y análisis que permitan el monitoreo del cuadro sanitario del país y fundamenten la formulación, implementación y evaluación de las acciones de prevención y control de enfermedades y agravios. En este sentido, destacó que, a partir del marco que regula el papel de cada gestor en las acciones de epidemiología, la definición de responsabilidades sigue las directrices de descentralización que permite mayor eficacia en las acciones y garantiza un mejor acceso de la población a los servicios públicos de salud. De esta forma, los municipios asumieron importantes responsabilidades en las acciones de vigilancia en salud correspondiendo a los estados el rol de coordinación y supervisión así como de ejecución de las acciones de carácter suplementario o complementario mientras que la reglamentación y coordinación nacional queda a cargo de la instancia federal. Finalmente, el Dr. Luna agradeció las palabras de reconocimiento a la labor desarrollada por Brasil en materia de vigilancia de leishmaniasis visceral y destacó en este sentido, la lógica del "Programa Nacional de Vigilancia y Control de la Leishmaniasis Visceral – PNVCLVl" así como la importancia de cada uno de sus componentes. Respecto de la vacuna contra la leishmaniasis visceral canina registrada en Brasil, el Dr. Luna, dejó sentado que se reconoce la existencia de interés, por parte de algunos sectores, para su uso pero hasta la fecha no hay ninguna evidencia científicamente sustentada de efectividad para el control de Leishmaniasis Visceral.

A continuación el Dr. Luna dio por inaugurada formalmente la reunión y por unanimidad fueron designadas las autoridades de la mesa directiva: Presidenta, Dra. Ana Nilce Silveira Maia Elkhoury (Brasil); Vicepresidente: Dr. Humberto Recalde Gamarra (Paraguay); Secretario: Dr. Oscar Daniel Salomón (Argentina); y Relatora: Dra. Ingeborg Becker (México).

5.2 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE TEMAS ESPECÍFICOS

Se procedió a la presentación de los temas técnicos específicos en 6 paneles según consta en la agenda presentada en la sección 3. Los documentos de las presentaciones se presentan en el Anexo 2.

A continuación de las presentaciones se conformaron 3 grupos de trabajo para analizar y producir conclusiones y recomendaciones sobre: 1) Diagnóstico y tratamiento; 2) Vigilancia y control y 3) Fortalecimiento de los programas nacionales. Las conclusiones y recomendaciones producidas por cada uno de los grupos se presentan en la sección 6.

5.3 LECTURA DE CONCLUSIONES Y CIERRE

A continuación de los trabajos de grupo se realizó una reunión plenaria en donde se dio lectura y se debatieron las conclusiones y recomendaciones de cada uno de los grupos, dando lugar a las recomendaciones generales presentadas en la sección 6.

Encabezaron la reunión de cierre la Dra. Rosely Cerqueira de Olveira, el Dr. Albino Belotto y la Dra. Celsa Sampson, Consultora Regional en Lepra y Leishmaniasis en el nombre de la representación de la OPS/OMS en Brasil.

La Dra. Celsa Sampson agradeció la entusiasta y efectiva participación de todos los expertos y particularmente al Ministerio de Salud de Brasil y destacó la importancia del trabajo conjunto entre los países de las Américas para poder comprender mejor la eco-epidemiología de la LV y actuar con mayor eficacia y eficiencia en el marco de la cooperación entre países auspiciado por la OPS/OMS

El Dr. Albino Belotto agradeció a los participantes y resaltó la importancia de intercambiar informaciones y experiencias en reuniones técnicas como la que se concluía y pugnó por una rápida diseminación de los resultados de la reunión a todos los países en donde se presentan las condiciones ecológicas para el mantenimiento y la ampliación de infecciones por LV.

La Dra. Ingeborg Becker agradeció en el nombre de la UNAM y de México la posibilidad de asistir a este importante evento y asumió el compromiso de llevar a las autoridades de Salud de México el saludo de los participantes de la reunión y el testimonio de la calidad de los trabajos presentados y del potencial del trabajo conjunto entre todos los países de las Américas para aliviar la carga de la LV mediante alianzas técnicas entre los países de las Américas.

La Dra. Blanca Cousinho agradeció a los participantes y en especial a la OPS y al Ministerio de Salud de Brasil por la invitación y destacó la importancia de este tipo de reunión para apoyar en la definición de acciones de vigilancia y

control de LV en Paraguay así como la posibilidad de alianzas y trabajos técnicos conjuntos entre los países de las Américas con el apoyo de la OPS.

El Dr. Oscar Daniel Salomón agradeció a los participantes, a la OPS/OMS y al MS de Brasil y reforzó la trascendencia de diseñar acciones de vigilancia para LV en áreas con presencia del vector en la Argentina mediante el intercambio de información y experiencias entre los países de las Américas como el que se dio en esta reunión auspiciada por la OPS/OMS.

La Dra. Ana Nilce Maia Elkhoury, en carácter de presidenta de la reunión, agradeció a todos los presentes por su participación y reforzó la importancia de la vigilancia para el control de la LV en Brasil y en todos los países participantes, dado que es una enfermedad que se encuentra en expansión y que produce repercusiones sociales importantes.

La Dra. Rosely Cerqueira de Oliveira procedió al cierre formal de la reunión en nombre del Ministerio de Salud de Brasil agradeciendo la participación de los presentes y bregando por una acción en salud coordinada y de apoyo mutuo entre los países de las Américas apoyados por la OPS/OMS, particularmente en el terreno de las zoonosis en donde la integración de los sectores es imprescindible.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

6.1.1. Conclusiones:

1) Se observa que las leishmaniasis son enfermedades de impacto en la región consideradas postergadas, sub-notificadas y que afectan a los sectores más vulnerables de la población. La incidencia notificada, la letalidad y las áreas geográficas involucradas se han visto incrementadas en forma preocupante en los últimos años.

2) De lo expuesto y discutido durante la reunión surge que: a) existe heterogeneidad en los procedimientos y métodos utilizados lo que dificulta la comparación de resultados y una acción homogénea en la prevención y control de la LV; b) faltan recursos humanos capacitados y existen dificultades para la obtención oportuna de medicamentos e insumos y su control de calidad uniforme.

6.1.2. Recomendaciones:

1) Que los países de las Américas vigoricen y sostengan los programas nacionales de prevención de la LV incorporando la prevención de las leishmaniasis en las agendas de los acuerdos regionales y sub-regionales (como MERCOSUR y Pacto Andino).

2) Que en los países en donde existen o se presumen factores de riesgo se desarrollen y fortalezcan los sistemas nacionales de notificación y vigilancia de LV estableciendo indicadores mínimos armonizados para el diagnóstico de situación y toma de decisiones a nivel nacional y regional así como para el tratamiento oportuno de casos de LV.

3) Que los países, con el apoyo de la OPS/OMS, acuerden la estandarización de procedimientos, métodos y criterios de diagnóstico humano y canino; actividades de vigilancia y control, medicamentos y esquemas de tratamiento.

4) Que los países junto con la OPS/OMS procuren mecanismos como el fondo rotatorio coordinado por OPS/OMS para agilizar y hacer más eficiente la adquisición de medicamentos e insumos de calidad controlada para el tratamiento, la prevención y vigilancia de las LV.

5) Que los países evalúen tratamientos alternativos para todas las especies de Leishmania, que incluyan a los medicamentos en uso en la actualidad y a los que se desarrollen o indiquen en el futuro.

6) Que los países y la OPS/OMS promuevan actividades de fortalecimiento específico de los programas nacionales de prevención de la LV incluyendo:

- Programas de cooperación técnica entre países en áreas de frontera incluyendo acciones de vigilancia y notificación armonizada.
- Capacitación de recursos humanos de todos los niveles de acción.

• Establecimiento de centros de referencia en diagnóstico, entomología y control de medicamentos.
• Evaluación técnica de programas nacionales.
• Interacción entre los distintos sectores involucrados en la prevención de la LV.
• Caracterización de riesgo local y focalización de acciones mediante la comunicación eficaz de las responsabalidades de los municipios, garantizando los medios y herramientas para la acción.
• Promoción, en la medida de lo posible, de abordajes de control de múltiples enfermedades para aprovechar los esfuerzos de programas existentes, teniendo en cuenta la preservación del medio ambiente y el bienestar animal.

6.2. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ESPECÍFICAS

6.2.1. Métodos de diagnóstico de LV

6.2.1.1. Conclusiones:

1) Ninguno de los métodos de diagnóstico disponible en la actualidad ofrece todas las características deseables de elevada sensibilidad y especificidad, simpleza, y bajo costo. La evaluación diagnóstica para la confirmación de caso y tratamiento debe siempre incluir a las manifestaciones clínicas y epidemiológicas.
2) Las técnicas de diagnóstico parasitológico siguen siendo el instrumento de confirmación de caso de LV. Estos métodos requieren de muestras tomadas por aspirado de bazo o de médula ósea que requieren de condiciones especiales para su implementación. Por el riesgo de accidentes hemorrágicos debe optarse, cuando sea posible, por el segundo. El aislamiento y caracterización de especie de *Leishmania spp* permiten obtener información estratégica en focos y en manifestaciones graves o atípicas de LV (e.g. coinfección *Leishmania*/HIV) y permiten la creación de ceparios útiles para la investigación y el desarrollo. Estas técnicas están disponibles en los centros de referencia.
3) Los métodos de diagnóstico por detección de anticuerpos específicos ofrecen la posibilidad de diagnóstico presuntivo y son de menor complejidad. Tienen utilidad específica para la fase inicial del diagnóstico y, en conjunto con las manifestaciones clínicas, pueden subsidiar la decisión de tratamiento o la derivación del paciente a centros de referencia. Como la presentación clínica no es patognomónica del LV, la definición diagnóstica a través de pruebas serológicas exige el monitoreo cuidadoso de la respuesta terapéutica.
4) En los países de América Latina se trabaja, en términos generales, con reactivos para inmunofluorescencia y ELISAs preparados "in house", no registrados ni producidos bajo buenas prácticas de fabricación.
5) Brasil dispone de reactivos para inmunofluorescencia para diagnóstico humano y canino y ELISA para diagnóstico canino en escala industrial.
6) Según publicaciones internacionales se obtendría mayor sensibilidad y especificidad usando antígenos recombinantes, en formatos de ELISA y pruebas rápidas, en especial el antígeno rK39 no validado aún en los países latinoamericanos.
7) La investigación de DNA de *Leishmania spp*. a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede realizar en diversos tipos de muestras biológicas, inclusive en sangre periférica, con elevadas sensibilidad y especificidad, prescindiendo de los procedimientos invasivos de obtención de aspirados de médula ósea y bazo. No obstante, la técnica aun requiere de normalización y validación.

6.2.1.2. Recomendaciones:

1) Considerar como condiciones mínimas para el tratamiento de LV a: a) la presencia del síndrome clínico; y b) al menos un resultado serológico positivo.
2) Establecer algoritmos para diagnóstico y decisión de tratamiento específico.
3) En situaciones excepcionales, cuando el acceso a los métodos diagnósticos no fuera posible, el tratamiento se deberá instituir tras cuidadosa valoración de la situación epidemiológica y clínica y de los resultados de laboratorio.
4) Una vez validados los métodos de diagnóstico rápido, los mismos se podrán aplicar masivamente. Donde ya se aplicaron las pruebas rápidas, se recomienda la validación.
5) No se recomienda la realización de pruebas diagnósticas en pacientes asintomáticos.

6) Los métodos diagnósticos recomendados para los laboratorios de referencia regional y nacional incluyen al diagnóstico parasitológico directo, cultivo y aislamiento, diagnóstico serológico por inmunofluorescencia, ELISA y métodos moleculares (i.e. PCR).

7) Establecer líneas de investigación para el desarrollo y validación de métodos de diagnóstico. dando prioridad al desarrollo de pruebas rápidas y PCR.

8) Establecer un grupo de trabajo para definir protocolo de valoración de blancos moleculares para PCR.

9) Evaluar el costo-efectividad de los diferentes procedimientos de diagnóstico.

6.2.2. Tratamiento

6.2.1.1. Conclusiones:

1) Los esquemas terapéuticos utilizados en las Américas fueron principalmente aplicados a partir de evidencias obtenidas en otros países, en diferentes escenarios y especies de *Leishmania spp*.

2) El perfil farmacológico de las drogas disponibles es inadecuado y no existen medicamentos que coliguen eficacia, seguridad y bajo costo.

3) Existen evidencias de la eficacia para el tratamiento de la LV de: 1) antimoniato de meglumina, 2) estibogluconato de sodio y 3) anfotericina B. Sin embargo, no hay estudios comparativos controlados y es necesario contar con datos de tratamiento a enfermos graves y coinfectados con *Leishmania*/HIV.

4) En Brasil existen directrices para el diagnóstico y el tratamiento de enfermos graves.

5) Es preocupante el hecho de que apenas un laboratorio farmacéutico produzca antimoniato de meglumina para atender a las exigencias/necesidades establecidas por el Ministerio de Salud del Brasil.

6) El costo de los antimoniatos tiene alta variabilidad en los países de las Américas en tanto que las formulaciones lipídicas de anfotericina B tienen costo prohibitivo para los países de Américas.

6.2.1.2. Recomendaciones

1) Esquema de tratamiento de rutina:

a) En Brasil, el Ministerio de Salud recomienda:

- Primera elección: antimoniato de meglumina: 20 mg/Kg/día por 20 a 40 días. Segunda elección: anfotericina B: 1mg/Kg/día por 14 a 21 días.
- En enfermos con signos de gravedad y embarazadas, la primera elección es la anfotericina B.
- En enfermos co-infectados con *Leishmania*/HIV se sigue la misma recomendación del uso de antimoniato, observándose criterios de gravedad para uso de anfotericina B.

b) Se recomienda a los demás países la valoración de los esquemas terapéuticos y la elaboración de normas nacionales específicas.

2) Necesidad de Investigación:

- Establecer estudios de eficacia y seguridad de las drogas en uso y utilizar modelos de monitoreo de efectos adversos y falla terapéutica;
- Investigar y desarrollar opciones terapéuticas para leishmaniasis visceral, con prioridad para miltefosina, aminosidina, paromomicina y formas lipídicas de anfotericina B y combinación de drogas.

6.2.3 Vigilancia y control

6.2.3.1 Conclusiones:

1) Existe capacidad de diagnóstico en los países y posibilidades de cooperación técnica para exámenes de mayor complejidad así como capacidad técnica y tecnologías informáticas para aplicar sistemas de información que apoyen los programas de prevención y control. En algunos países se han desarrollado sistemas de información consolidados, que pueden servir como base para propuesta de implantación y aplicación para los demás países;

2) Para el control de la LV canina es un aspecto positivo el que se haya avanzado en la construcción de una conciencia comunitaria hacia la valorización de la vida animal.

3) No existe un programa de vigilancia y control de la LV integrado y coordinado entre los países de Américas;

4) Es insuficiente el conocimiento de la población sobre LV así como sobre las acciones de prevención y control;

6.2.3.2 Recomendaciones:

1) Que todos los países de las Américas declaren a las leishmaniasis como enfermedad de notificación obligatoria;

2) Aplicar políticas de salud pro-activas para la vigilancia y el control de LV;

3) Estandarizar para los países de Américas: a) definición de caso humano y caso canino para LV (sospechoso y confirmado); b) obligatoriedad de notificación de casos humanos de LV; c) desarrollo de sistemas de información para la vigilancia de reservorios y para los vectores; d) estructurar física y técnicamente a los laboratorios de referencia nacionales, estatales y municipales, para diagnósticos serológicos y de mayor complejidad para LV; e) desarrollar un sistema de registro de animales infectados ligado al diagnóstico de laboratorio.

4) Estandarizar la información mínima necesaria para la vigilancia laboratorial de animales infectados; determinar flujos normalizados de obtención de muestras biológicas para los laboratorios de referencia nacionales, estatales y municipales; fortalecer y estructurar la red de laboratorios nacionales, estatales y municipales;

5) Designar centros de referencias nacionales, estatales y unidades de apoyo para diagnósticos complejos de LV humana o canina;

6) Desarrollar e implantar un subsistema de notificación y análisis de reacciones adversas;

7) Estandarizar variables obligatorias en el sistema de vigilancia y notificación de casos humanos centradas en el local probable de infección con especial atención a la clasificación epidemiológica del caso y su evolución;

8) Perfeccionar las herramientas para la divulgación de datos de forma amplia aumentando así la participación social y garantizando el acceso y la oportunidad de información;

9) Que la OPS/OMS auspicie un acuerdo de definición amplia para la localidad geográfica afectada y que apoye el desarrollo e implantación de sistemas de información geo-referenciada e integrada para LV en Américas;

10) Que los países desarrollen sistema de información de registro de vectores, que contemplen información mínima (presencia del vector y local de captura) en el nivel de localidad y que se de prioridad a las acciones de manejo ambiental fortaleciendo la capacitación técnica para la ejecución de las actividades de entomología;

11) Que la OPS/OMS fomente la realización de estudios para la valoración de costo-efectividad de diversas formas de control vectorial para las áreas urbanas y rurales y promueva la estandarización del uso de insecticidas de efecto residual y equipamientos;

12) Que los países consideren la normalización, implantación y puesta en práctica, en el nivel municipal, de un sistema de registro de población de perros y gatos, que contenga información referente a los animales y su identificación por medios idóneos;

13) Que los países desarrollen e implanten estrategias de control de poblaciones caninas y desarrollen legislación nacional o municipal específica, que estimule la tenencia responsable de mascotas en áreas urbanas y rurales mediante acciones de educación en salud;

14) Que en todos los países se apliquen exclusivamente técnicas de eutanasia humanitarias de animales infectados por LV;

15) El tratamiento canino no es una medida de control de la LV. No obstante, en situaciones especiales en que se aplique el tratamiento, se recomienda que se apliquen medidas que impidan al contacto del perro tratado con el vector de LV. Tales medidas deberán ser científicamente evaluadas y validadas, con el objeto de mitigar el riesgo de que el animal en tratamiento sea fuente de infección para el vector y para las personas;

16) En el contexto de la legislación sanitaria nacional específica de control de LV de cada país, y cuando ésta permita el tratamiento de perros sintomáticos, este tratamiento deberá estar bajo responsabilidad de un médico-veterinario y obligatoriamente notificado a los órganos competentes;

17) Mantener las medidas de vigilancia activa de LV en la población canina mediante encuestas o censos serológicos, análisis de riesgo, y verificación de animales infectados y eutanasia en áreas en donde se comprueba la transmisión;

18) Aplicar estrategias para las acciones de educación en salud para las actividades de control de LV y estimular la utilización, por la comunidad, de medidas preventivas que impidan al contacto vector-perro, científicamente validadas;

19) Desarrollar políticas de intervención que contemplen estrategias de control integradas y no sólo centradas en la eutanasia de animales infectados;

20) Registrar sólo vacunas caninas para LV de eficacia (para prevenir la infección y transmisión) demostrada científicamente;

21) Que la OPS/OMS fomente estudios científicos que evalúen medidas de control adecuadas a las realidades eco-epidemiológicas del Continente Americano y cree comités técnicos-científicos para evaluar la utilización de vacunas caninos anti-LV para su uso en Salud Pública;

22) Para la delimitación de áreas de riesgo de LV, en unidades territoriales homogéneas, deberán ser considerados: a) la presencia del vector (como indicador de receptividad); b) la ocurrencia de casos caninos (indicador de riesgo potencial); y c) el registro de casos humano, que define el riesgo real de la transmisión. Asimismo, se deben considerar como agravantes a: a) alta prevalencia de personas inmunosuprimidas o con co-morbilidades asociadas; b) desnutrición; c) movimientos migratorios y c) alteraciones ambientales.

6.2.4 Fortalecimiento de los Programas Nacionales

6.2.4.1 Conclusiones:

1) Se considera como aspecto positivo que los países de las Américas reconozcan a la LV como un problema de salud pública relevante en Américas;

2) Falta de la participación comunitaria en las acciones de control de LV. Se verifica la insuficiencia de recursos financieros para actuar sostenidamente en vigilancia y control, aunado a la falta de recursos humanos capacitados suficientes para desarrollar las actividades de vigilancia y control de LV así como la falta de una integración adecuada entre los sectores públicos y privados para la ejecución de esas acciones;

3) Hay interés y vocación de cooperación técnica entre los países en las diversas áreas que abarcan las actividades de vigilancia y control de LV.

6.2.4.2 Recomendaciones:

1) Que la OPS/OMS realice una consulta sobre la estructuración de los programas nacionales y sobre la situación epidemiológica en cada país, así como de la obligatoriedad de denuncia para obtener un diagnóstico situacional regional;

2) Que a nivel de la región se designe un laboratorio de referencia para el control de calidad de los medicamentos adquiridos por el fondo rotatorio de la OPS/OMS o por los países.

3) Que la OPS/OMS fomente la estandarización de métodos diagnósticos para LV humana y canina para las Américas;

4) Que la OPS/OMS establezca un flujo sistemático de información para análisis y diseminación a los países (sistema de vigilancia regional) y que se apoyen los proyectos de cooperación técnica entre los países mediante la promoción de eventos técnico científicos entre los países;

5) Que los países promuevan la integración y coordinación de los esfuerzos para el control de la LV con aquellos realizados para el control de otras enfermedades, de acuerdo con la realidad de cada estado o municipio, como estrategia para optimización de recursos;

6) Que los países oficialicen la utilización del Fondo Rotatorio de la OPS para la accesibilidad de medicamentos y otros insumos para el tratamiento, diagnóstico y prevención de la LV;
7) Que los países estandaricen las farmacopeas nacionales en los que se refiere al control de calidad de medicamentos, específicamente metales pesados, utilizados para el tratamiento de la LV;
8) Que los países inicien trabajos conjuntos, bi o multilaterales de intensificación de la vigilancia en áreas de frontera, según estratificación del riesgo de ocurrencia de LV;
9) Que para la prevención de la LV se estimule la descentralización de acciones, con definición de competencias y estratificación según riesgo, asegurando herramientas e insumos necesarios para la vigilancia y control de las leishmaniasis mediante la capacitación e integración de recursos humanos locales en entomología, asistencia y verificación de reservorios para los programas;
10) Que se asegure el diagnóstico precoz y tratamiento oportuno en áreas de atención primaria;
11) Que los países fomenten estudios operacionales multicéntricos para evaluar las opciones de tratamiento, buscando apoyo de organizaciones o iniciativas como DNDi y TDR;
12) Que los países estimulen la realización de estudios operacionales para evaluar eficacia y efectividad de medidas de intervención en reservorios y vectores;
13) Que los países fortalezcan la cooperación con instituciones académicas para realización de las investigaciones operacionales.

ANEXO 1

PRESENTACIONES

Visceral Leishmaniasis and *Lutzomyia longipalpis* in Argentina

Oscar Daniel Salomón

Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación en Endemo-Epidemias,
CeNDIE-ANLIS Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación

Av. Paseo Colón 568, 1263, Buenos Aires

Tel.: 54 11 4331 2536 - Fax: 54 11 4331 2536 - danielsalomon@hotmail.com

ABSTRACT

From 1923 to 2004, 17 cases of visceral leishmaniasis were reported in Argentina. The two cases which occurred in 1923 and 1931 were imported, and also the last two cases diagnosed in 2002 and 2004. The 13 autochthonous cases (1925-1989) were scattered both in time and space involving 6 different provinces (Salta, Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero, Chaco and Formosa), and at least 4 cases had cutaneous and visceral symptoms. The parasite species was not identified. Furthermore, *Lutzomyia longipalpis* up to year 2000 was only found in Misiones province (Candelaria-1950, Corpus-2000), despite the fact that Phlebotomine captures were performed in the other provinces, which are endemic for cutaneous leishmaniasis. Two hypotheses arose from the historical data: a) Visceral leishmaniasis in Argentina is due to the visceralization of parasites different from *Leishmania chagasi*, b) *L. chagasi* remains in enzootic foci where the human-infected vector contact is very unusual. However, a very different scenario appeared during 2004 when *L. longipalpis* was captured in Clorinda and Puerto Pilcomayo, Formosa province, Argentina. Clorinda is located across the branches of the Paraguay river in front of Asunción city, Paraguay. Reports of canine and human visceral leishmaniasis in Asunción have increased since 1997. However neither autochthonous leishmaniasis cases nor sand flies were ever recorded from Clorinda before. The cultural, migration and ecological patterns observed in Clorinda are prone to the establishment of Visceral Leishmaniasis transmission, and from there to other most populated areas of Argentina. Active surveillance is required immediately in the localities involved and the surrounding area.

Table 1.

Cases of human leishmaniasis with visceral involvement reported from Argentina, 1923-2005.

Year	Age	Residence[b]	Observations	Ref
1923	2 yo,6m	Italy	Imported	1
1925	Adult	Rivadavia, Salta prov.	CL, Malaria	2
1926	5 yo	Orán, Salta prov.	Ancylostomiasis, Malaria	3
1926	9 yo	Tabacal, Salta prov.	CL	3
1931	34 yo	Yugoslavia	Imported	4
1932	Child	Tabacal, Salta prov.	Same case 1926, Ref 3	5
1932	Child	Perico, Jujuy prov.		5
1936	7 yo	Est. Napenay, Chaco prov		5, 6
1936	8 yo	Campo Largo, Chaco prov		5, 6
1941	20 yo	Añatuya, Stgo. Estero prov.		7
1941	23 yo	Añatuya, Stgo. Estero prov.		8
1945	22 yo	Famaillá, Tucumán prov.	CL (scare), malaria	9
1954	23 yo	Loro Blanco, Chaco prov.		10
1956	20 m	Chaco prov.		11
1972	Child	Formosa prov		12
1989	2a,8m	Santiago del Estero prov.	MCL	13
2002	Young	Brazil	*L. mexicana*, HIV	14
2004	70 yo	Spain	*L. donovani*	15

CL: Cutaneous leishmaniasis, MCL: mucocutaneous leishmaniasis

Seventeen cases of leishmaniasis with visceral involvement were ever recorded in Argentina since 1923, 13 of them were autochthonous and 4 imported (Table 1). All the cases were diagnosed by clinical and optical observation of the parasites, but the species identification of *Leishmania* were only performed in the last two cases, both imported. The cases acquired the infection in 6 different provinces over 500.000 km^2, including 4 ecological domains. The clinical records indicate at least in 4 cases simultaneous cutaneous leishmaniasis, in the others cases compatible scares could not be discarded (Table 1). Dogs with ulcers were reported thorough the mentioned area, and Leishmania (V.) braziliensis parasites were isolated from the cutaneous lesions

On the other hand, all the human cases with visceral involvement were located in known endemic areas of cutaneous leishmaniasis, mainly due to *L.(V.) braziliensis* (19), although in Salta province *L. guyanensis* and *L. amazonensis* were also identified (20). Competent phlebotomine vector species for cutaneous leishmaniasis were also reported from the 6 provinces with cases of leishmaniasis with visceral involvement: *Lu. neivai*, *Lu migonei* and *Lu. whitmani* (21). In spite of this scarce data the current visceral leishmaniasis (VL) bibliography assumes sporadic or endemic zoonotic foci of VL in Argentina, transmitted by *Lu. longipalpis*, with the dog as reservoir (22).

Therefore, taking into account the historical data two not exclusive hypotheses arose: a) VL in Argentina is due to the visceralization of parasites different to *Leishmania chagasi*, probably in immunocompromised people (23-28). b) *L. chagasi* remains in enzootic foci where the human contact in very unusual.

However, the Argentinean VL scenario changed radically during 2004. Canine VL seroprevalence in Asunción area, Paraguay, ranged from 3.1 to 11.8% between 1997 and 1999 (29), while human VL reported cases from the same area rose from 9 in 2003 to 23 in 2004 (30). Clorinda city (25º17'S, 57º43'W, 47,000 inhabitants), in Formosa province, is located in front of Asunción City on the Pilcomayo-Paraguay river international border. Therefore, Phlebotomine sandflies captures were performed during 2004 in Clorinda in order to assess the presence of *Lu. longipalpis* and the risk of VL transmission. Phlebotomine captures were performed in Clorinda city, Puerto Pilcomayo, Laguna Blanca-Parque Pilcomayo (60 km west of Clorinda), "Km 1254" and "Km 1264" (60 and 50 km south of Clorinda respectively). Eleven sites were sampled between 7-11 June 2004, and 18 sites between 16-21 December 2004, at least for two nights at each site for both periods. Seven *Lu. longipalpis* (4 males, 3 females) were captured in peridomestic pig pens in Puerto Pilcomayo ("Km 9" and "Km 11 1/2"). Furthermore, 3 *Lu. Longipalpis* males were collected around houses in Clorinda (Libertad street 30 m from the river and Porteño Norte neighbourhood). One male of *Lu. longipalpis* was trapped in June, the remainder sand flies were caught in December. No *Lu. longipalpis* was collected in the surrounding southern and western villages. A survey in the area showed that 13/107 (12%) dogs were seroreactive to Ag K-39, 3 of them with consistent symptoms of VL. However, the area is endemic both for Chagas' disease and cutaneous leishmaniasis. At least 2 puppies bought in Paraguay and carried to Clorinda were later diagnosed in Asunción with VL and slaughtered. The retrospective analysis of hospital records of over more than 8000 patients (Clorinda and Formosa) did not reveal potential undiagnosed cases of VL. A questionnaire also indicated a great proportion of people from Clorinda who sleep sporadically in Asunción (Sosa Estani pers. comm.)

In conclusion, taking into account the experience of the south cone countries where VL started as a small located problem, there is a potential high risk of VL transmission in Clorinda and Argentina due to: i) the presence of *Lu. longipalpis* in Clorinda close to populated areas, ii) the reports of VL from the 'Great Asunción' in Paraguay, and iii) the permanent movement of individuals and dogs (purchased or stray) along the border. Thus, an active surveillance system is required immediately in the area in order to improve the local capacities for detection and diagnosis of both human and canine leishmaniasis. The transit of stray dogs at the border should be controlled as for any other dog related zoonotic scenario. Finally, a regular monitoring of Phlebotomines at strategic places should be performed in order to evaluate any changes in the space-time distribution of the risk. All the actions should be coordinated with the Program of Paraguay as a bi-national issue with hopefully a common research and surveillance protocol. The Leishmaniasis National Program of Argentina included the topic of VL in the Procedures Handbook of 2004 (31).

REFERENCES

01 - Acuña M, Casaubon A, Bettinotti SI. 1924. Estudio anatomo-clínico de un caso de Kala Azar infantil (primera observación en nuestro país). La Prensa Médica Argentina 11: 585-93.

02 - Borzone RA. 1926. Leishmaniosis tegumentaria americana vegetante con localizaciones viscerales. Bol Inst Clin Quirurg Bs As 13: 322-6.

03 - Mazza S, Cornejo Arias J. 1926. Primeros casos autóctonos de kala-azar infantil comprobados en el norte de la República. Bol Inst Clin Quirurg Bs As13: 140-4.

04 - Inda FF, Vivoli D, Vacarezza AJ. 1934. Estudio anátomo-clínico de un caso de kala-azar en el adulto (fiebre negra). Primera observación en nuestro país. La Semana Médica 8/2/34: 413-24.

05 - Mazza S. El Kala-azar en la República Argentina. 1938. VI Congreso Nacional de Medicina Vol.3: 259-64.

06 - Romaña C, Torres A, Klappenbach E. 1936. Hallazgo de un foco de kala-azar infantil en el Chaco. La Semana Médica 1/10/36: 954.

07 - Fernández Ithurrat E. 1941. Un caso de leishmaniosis visceral autóctona. El Día Médico 6/1/41: 14.

08 - Vivoli D. 1942. Anatomía Patológica de un nuevo caso de Kala-Azar americano. Arch Soc Arg Anat Norm Pat 4: 133-8.

09 - Fonso Gandolfo C, Ink J. 1947. Sobre un caso de leishmaniosis visceral - Estudio clínico experimental. Rev Med y Cienc Af 93-95: 36-43.

10 - Wilde H, Di Carlo FC, Pessat OAN. 1956. Kala- Azar (Leishmaniosis visceral) autóctono. Su tratamiento con derivados antimoniales. El Día Médico 84: 2629-36

11 - Benítez LEL. 1967. Leishmaniosis visceral. Rev Asoc Med Arg 8: 610 -2.

12 - Otharan EM, Kohan RH, Klemans M. 1972. Leishmaniasis visceral infantil: un caso autóctono. I Congr Arg Parasitol, Buenos Aires.

13 - Garaguso P, Benítez AJ, Fainboim A, Frei G, Basack FN, Sanchiz de Herrlein ME, Peñalver JA. 1989. Leishmaniosis visceral. Actualización a propósito de un caso autóctono. Rev Hosp Niños Bs As 31: 200-4.

14 - Nocito I, Serra E, Montero A. 2002. Visceral involvement due to Leishmania mexicana in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Am J Med 113: 260-2.

15 - Martín-Sánchez J, Navarro-Mari JM, Pasquau-Liaño J, Salomón OD, Morillas-Márquez F 2004. Visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum in a Spanish patient in Argentina: what is the origin of the infection? Case Report. BMC Infectious Diseases 4: 20.

16 - Duret JP. 1952. Notas sobre flebótomos argentinos. Revista Sanidad Militar Argentina 51: 534-6.

17 - Salomón OD, Rossi G, Sosa Estani S, Spinelli G 2001. Presencia de Lutzomyia longipalpis y situación de la leishmaniosis visceral en Argentina. Medicina (Buenos Aires) 61: 174-8.

18 - Salomón OD, Orellano PW. 2005. Lutzomyia longipalpis in Clorinda, Formosa rpovince, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz 100: 475-6.

19 - Córdoba-Lanús E, Piñero JE, González AC, Valladares B, Lizarralde de Grosso M, Salomón OD. 2005. Detection of Leishmania braziliensis in Human Paraffin-embedded Tissues from Tucumán, Argentina by Polymerase Chain Reaction. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100, 187-192.

20 - Marco JD, Barroso PA, Calvopina M, Kumazawa H, Furuya M, Korenaga M, Cajal, SP, Mora MC, Rea MM, Borda CE, Basombrio MA, Taranto NJ, Hashiguchi Y. 2005. Species assignation of Leishmania from human and canine american tegumentary leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in North Argentina. Am. J. Trop. Med. Hyg.72: 606-11

21 - Salomón OD, Orellano PW, Quintana MG, Pérez S, Sosa Estani S, Acardi S, Lamfri M. 2005. Brotes epidémicos de Leishmaniasis Tegumentaria y distribución de phlebotominae en Argentina. Biomédica (in press).

22 - WHO. 1990. Control of Leishmaniases. Geneva, Switzerland: WHO, Technical Report Series Nº 793.

23 - Aleixo JA, Nascimento ET, Monteiro GR, Fernandes MZ, Ramos AM, Wilson ME, Pearson RD, Jeronimo SM. 2006. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated Leishmania amazonensis infection presenting with hepatitis and adenopathy. Trans R Soc Trop Med Hyg100: 79-82.

24 - Hernández DE, Oliver M, Martínez C, Planas G. 1995. Visceral leishmaniosis with cutaneous and rectal dissemination due to Leishmania braziliensis in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Int J Dermatol 34: 114-5.

25 - Sinagra A, Riarte A, Luna C, Campanini A, Segura EL. 1997. Leishmania (Viannia) braziliensis, biological behavior in golden hamsters isolates from argentine partients. Am J Trop Med Hyg 57: 115-8.

26 - Almeida MC, Cuba-Cuba CA, Moraes MA, Miles MA. 1996. Dissemination of Leishmania (Viannia) braziliensis. J Comp Pathol 115: 311-6.

Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil

Dra. Ana Nilce Silveira Maia Elkhoury

Gerente Técnica das Leishmanioses

Secretaria de Vigilancia en Salud - Ministerio de Salud

SHS Quadra 06 Conj. A, Complexo Brasil XXI Sala 727

CEP: 70322-915 - Brasília, Brasil - Tel: (61) 2107-4435/4434 -

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose causada por parasitos pertencentes ao Gênero *Leishmania*, sendo que nas Américas, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a espécie incriminada como agente causadora da doença. É transmitida através da picada de fêmeas do inseto vetor infectado, pertencente ao Gênero *Lutzomyia*. No Brasil, a *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi*, e mais recentemente, a *Lutzomyia cruzi* foi incriminada como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul (CUNHA & CHAGAS, 1937; LAINSON & SHAW, 1987; REBÊLO et al., 1996; SANTOS et al., 1998).

Os reservatórios silvestres identificados e potencialmente envolvidos na transmissão são as raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). Os cães (*Canis familiaris*) são considerados reservatórios domésticos da *L. (L.) chagasi* e caracterizados como principal fonte de infecção para o vetor (DEANE & DEANE, 1954; DEANE, 1956; SHERLOCK, 1984; MARZOCHI, 1985; SHERLOCK, 1996; BRASIL, 2003).

A LV é endêmica em 65 países, com registro anual de mais de 90% dos 500 mil casos novos concentrados nos países da India, Nepal, Sudão, Bangladesh e Brasil. Nas Américas, cerca de 90% dos casos humanos de LV têm sido registrados no Brasil e atualmente 20 (74%) das 27 Unidades Federadas, apresentam casos autóctones (DESJEUX, 2004).

No período compreendido entre os anos de 1984 a 2004, a média anual de casos de LV foi de 3.352 registros com uma incidência de 2 casos para cada 100.000 habitantes, apresentando uma tendência ao crescimento. A letalidade média neste mesmo período é de 6,3%, entretanto observa-se um aumento de 100%, passando de 3,6% em 1994 para 7,4 em 2004.

A doença está distribuída nas diferentes faixas etárias, porém ocorre com maior freqüência em crianças de até 10 anos (59%), sendo 46% dos casos registrados em menores de cinco anos. O sexo masculino é proporcionalmente o mais atingido (60,4%). Nos últimos quatro anos, observa-se um aumento nos registros de Co-infecção *Leishmania*/HIV, passando de 25 casos no ano de 2001 para 78 casos em 2004, representando 2,3% do total de casos deste último ano.

O comportamento epidemiológico da LV é cíclico, com aumento no número de casos em períodos médios a cada cinco anos. No Brasil, a LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as Regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste. Na década de 90, aproximadamente noventa por cento (90%) dos casos registrados de LV ocorreram na região Nordeste. Inicialmente, esta endemia apresentou um padrão de transmissão eminentemente rural e na medida em que a doença se expande para as outras regiões atinge preferencialmente áreas peri-urbanas e urbanas, esta situação vem se modificando e atualmente a região Nordeste já representa 67% dos casos do país.

Admite-se que a urbanização da LV, decorra de modificações ambientais causadas por ações antrópicas, bem como pela migração de populações rurais para as periferias urbanas desprovidas de moradias e infra-estrutura sanitária adequada, dividindo ainda o pequeno espaço com animais domésticos, como cães. O vetor responsável pela transmissão da doença *L. longipalpis* tem se adaptado facilmente ao peridomicílio, favorecido por fatores ainda não esclarecidos. (DEANE & DEANE, 1955; MARZOCHI, 1985).

Tem-se observado com frequência, que em áreas urbanas com transmissão recente, a LV se apresenta de forma epidêmica para as doenças humana e canina, sendo que nestas áreas a LV canina antecede a humana, tendo sido observado associação na distribuição espacial de ambas (DI LORENZO e PROIETE, 2002; CAMARGO-NEVES e col, 2001).

Um outro aspecto verificado em algumas destas áreas, refere-se ao aumento na proporção de casos de co-infeção *Leishmania*/HIV na faixa etária de 20 a 49 anos. Este fato prenuncia que, a sobreposição de áreas de risco de leishmaniose e HIV pode contribuir para o aumento de casos de LV em adultos jovens, alterando o perfil epidemiológico em áreas urbanas.

Os objetivos da vigilância da leishmaniose visceral são reduzir as taxas de morbidade e mortalidade da doença, por meio do diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, bem como na redução do risco de transmissão mediante controle da população de reservatórios domésticos e do agente transmissor.

Em 2003, as normas técnicas do programa foram revisadas e as recomendações para a vigilância e controle da LV, passaram a ser específicas para cada situação epidemiológica e adequadas a cada área a ser trabalhada. Neste sentido a análise epidemiológica desta endemia deve ser sistemática e contínua, propiciando a classificação e identificação das recomendações a serem adotadas em cada uma das áreas de transmissão da doença (BRASIL, 2003).

Os municípios de transmissão foram classificados segundo os decis das médias de casos nos últimos 5 anos, considerando como critério de ponto de corte o "percentil 90" (P90). Os municípios com média de casos < 2,4 foram classificados como de transmissão esporádica, os que apresentaram médias ≥ 2,4 e < 4,4 como de transmissão moderada e ≥ 4,4 casos como de transmissão intensa. O novo enfoque foi o de incorporar os estados e municípios silenciosos para a doença, visando evitar ou minimizar os problemas referentes a este agravo em novas áreas (BRASIL, 2003).

Outros aspectos abordados na vigilância da LV, referem-se às ações de entomologia, cujo objetivo é levantar as informações de caráter quantitativo e qualitativo sobre os flebotomíneos transmissores da LV, por meio do levantamento, investigação e monitoramento entomológico. Destaca-se ainda a importância da vigilância dos reservatórios domésticos para conhecer, monitorar e intervir quando necessário.

As medidas preventivas de proteção individual, bem como as dirigidas ao vetor e ao reservatório doméstico devem ser estimuladas, tais como: uso de repelentes, mosquiteiros, telagem de portas, janelas e canis, manejo ambiental e o uso de coleiras impregnadas com piretróides em cães.

As estratégias de controle estão centradas no diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos, monitoramento 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, destacando que estas medidas devem ser realizadas de forma integrada para que possam ser mais efetivas. Vale ressaltar que o controle da LV em áreas urbanas tem sido um desafio para o programa, tendo em vista as dificuldades operacionais destas ações, apontando para necessidade de maiores investimentos na área técnico-científico e consequentemente no aprimoramento das medidas de vigilância e controle da leishmaniose visceral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. In prelo. Leishmaniose Visceral Grave: Normas e Condutas. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 22 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 122 p.
- CAMARGO-NEVES, V.L.F DE; KATZG; RODAS, L.A.C; POLETO, D.W; LAGE, L.C; SPNOLA, R.M.F, CRUZ, O.G. Use of spation analysis tools in he epidemiological surveillance of American visceral leishmanasis, Araçauba, São Paulo, Brazil, 1998-1999. Cadenos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001; 17 (5): 1263 – 1267.
- CUNHA, A.M. & CHAGAS. E. Estudos sobre o parasito. In: Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 32, 1937. p. 329-337.

- DEANE, L.M., DEANE, M.P. – Encontro de Leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. Ceará. O Hospital, 45, 1954. p. 419-421.
- DEANE, L.M. – Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro.1956, Tese. 162 pp.
- DEANE, L.M.; DEANE, M.P. – Observações sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Ceará. O Hospital, 48, n. 3, 1955. p. 347-364.
- DESJEUX, P., Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Imunology Microbiology & Infectious Diseases, 27, 2004. p 305-318.
- DI LORENZO ,C; PROIETTI, F.A; Leishmaniose visceral canina como fator de risco para a leishmaniose visceral humana: o que sabemos e o que não sabmos ainda. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Topical. 2002; 35 (Sul III): 75 – 81.
- LAINSON, R & SHAW, J.J, - Evolution, classificacion and geographical distribution. In PETERS & KILLICK-DENDRICK. The Leishmaniasis in Biology and Medicine; London, Academic Press, 1, 1987. p. 1-20.
- MARZOCHI, M.C.A.; SABROSA, P.C.; TOLEDO, L.M.; MARZOCHI, K.B.F.; TRAMONTANO, N.C.; RANGEL-FILHO,F.B. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Caderno de Saúde Pública, 1: 1985. p. 5-17.
- MONTEIRO, P.S.; LACERDA, M.M & ARIAS, J.R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 27: 1994. p. 67-72.
- REBÊLO, J.M.M.; MENDES, W.A.; COSTA, J.M.L.; CAVALEIRO, N. Lista preliminar das espécies do gênero *Lutzomyia* França, 1924 (*Psychodidae*, *Phlebotominae*) do Estado do Maranhão, Brasil. Caderno de Saúde Pública. 12, 1996. p. 545-549.
- SANTOS, S.O.; et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishamanasis. Medical and Veterinary Entomology. 12, 1998. p. 315-317.

Análisis de Leishmaniasis en México

Ingeborg Becker[1], Georgina Carrada Figueroa[2], Marco Gudiño Zayas[1], Camila González[3], Miriam Berzunza Cruz[1], Beatriz Rivas Sánchez[1], Oscar Velasco Castrejón[1]

[1]*Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Hospital General de México.*

[2]*Secretaría de Salud del Estado de Tabasco, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.*

[3]*Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica, Instituto de Biología, UNAM*

Autor correspondiente

Dr. Ingeborg Becker

Universidad Nacional Autónoma de México

Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, U.N.A.M.

Dirección: Dr. Balmis 148, Colonia Doctores

Mexico City, D.F., 06726, Mexico - Tel: 52 55 56232674 - becker@servidor.unam.mx

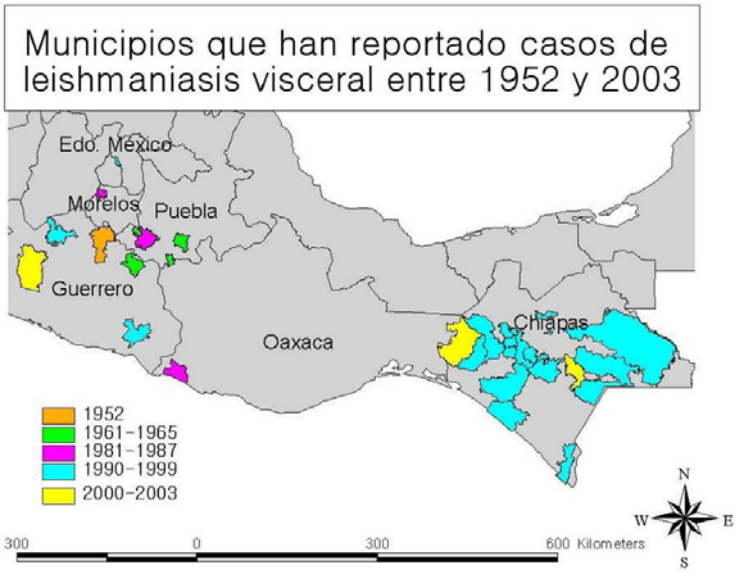
LEISHMANIASIS VISCERAL

La leishmaniasis visceral (LV) afecta primordialmente a niños entre 1 y 4 años de edad e involucra por igual ambos sexos. En México se describió el primer caso en 1952, en Huitzuco, Guerrero, en un niño de 5 años de edad. Una década más tarde se reportaron los primeros casos en los estados de Puebla (1961) y Guerrero (1963) y en la década de los ochentas, se describieron los primeros casos en los estados de Oaxaca y Morelos. En 1990, el INDRE y el Hospital General de Tuxtla Gutiérrez, descubrieron el foco más importante del país, el del estado de Chiapas, adicionalmente han seguido apareciendo nuevos casos en la Cuenca del Balsas (Puebla, Guerrero y Morelos) (1). Así como en Chiapas, ya que entre 2000 y 2005 se detectaron 33 nuevos casos y apareció un foco adicional en Guerrero (Fig.1) (2). En 1995, en un aislado obtenido por el personal del Departamento de Parasitología del INDRE, se logró tipificar por primera vez a *L. chagasi* como agente causal de LV en México (3).

Entre 1952 y 2005 se han registrado un total de 91 casos de leishmaniasis visceral en México, 78 de los cuales se registraron en Chiapas (2). Estos datos reflejan la expansión progresiva de la LV en México.

Figura 1

Mapa de México que muestra la expansión de la leishmaniasis visceral



Al analizar las características geográficas y condiciones climatológicas donde se han reportado casos de LV, encontramos que la mayoría de los focos se encuentran en regiones selváticas del trópico seco (Fig2).

Figura 2

Mapa de México que muestra el tipo de vegetación asociada a LV

En este mapa se aprecian los municipios (marcados en negro) en los cuales se han reportado casos de LV.

Al analizar las características geográficas donde se han detectado casos de LV en Chiapas, encontramos que son regiones que oscilan entre 1500 a 1800 m sobre el nivel del mar (Fig.3,4).

Figura 3

Mapa de Chiapas, mostrando las localidades donde se ha reportado LV.

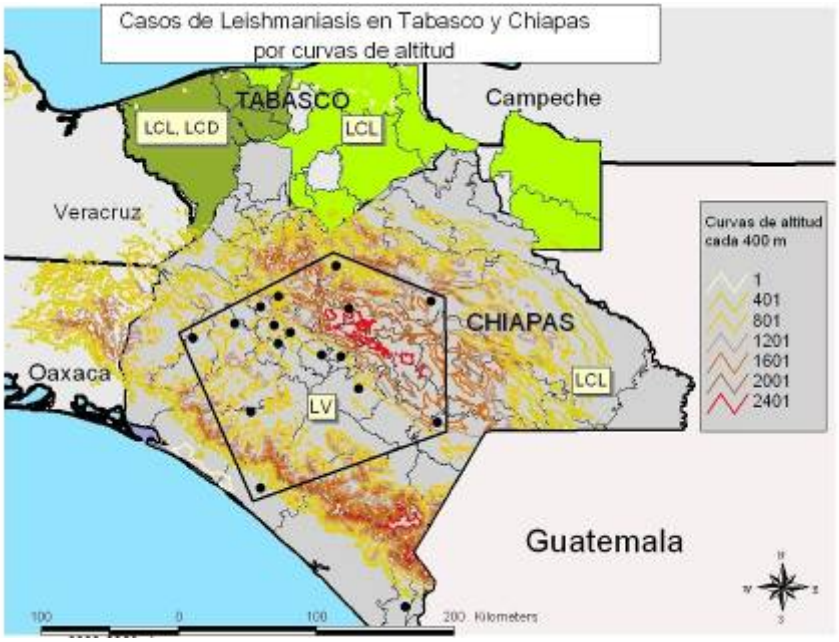
De los municipios de Chiapas con alta prevalencia de LV, destacan dos:,Tuxtla Gutierrez (donde está situada la capital del estado) y Chiapa de Corso, donde en el año 2001 se registraron 10 casos, de edades que oscilaron entre los 2 meses y los 13 años de edad (2). Esta región presenta un clima de 28-30°C y una precipitación anual que oscila entre los 800 y 900 mm^3 por año.

Un análisis de vectores en zonas endémicas de LV reveló que *Lutzomyia longipalpis* se encuentra ampliamente distribuida, siguiéndole en orden de frecuencia *Lu. cruciata* (4). En la zona endémica de Chiapas, recientemente se ha reportado también *Lu. evansi*(5). Hasta la fecha, únicamente se ha reportado a *Lutzomyia longipalpis* como vector de *L.chagasi* y responsable de la LV (4). Sin embargo, la presencia importante de *Lu. evansi* en esta región podría sugerir que este vector también pudiera estar participando en la transmisión de *L. chagasi,* como se sospecha que ocurre en Colombia y Venezuela (6,7)..

En los municipios de Chiapas, como en los otros estados de la Cuenca del Balsas donde existe LV, solamente se han encontrado casos con este tipo de leishmaniasis (Fig.4, delimitado en cuadro) (1,3)..En Chiapas, la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), que es muy abundante, se localiza en las zonas de selva tropical perennifolia. Entre 1990 y 2005 se reportaron 1310 casos de LCL en este estado, todos ellos, al igual que los casos de LV, han sido diagnosticados en forma pasiva, lo que sugiere que si se hiciese búsqueda activa de casos, estos aumentarían muy considerablemente. La presencia de *Lu. cruciata* en esta región de Chiapas posiblemente esté asociada con la transmisión de LV en los reservorios. Por otro lado, *Lu. olmeca*, que es el vector más importante de leishmaniasis cutánea en México (8), se encuentra muy importantemente distribuida en el foco de LCL chiapaneco, donde se ha aislado y tipificado *L.(L.) mexicana* (Velasco, no publicado). Desafortunadamente, Biagi y cols., cuando descubrieron el transmisor de *L. mexicana* (*Lu. olmeca*), lo confundieron con *P. flaviscutellatus* (8).

Figura 4

Mapa de Chiapas mostrando las regiones regiones endémicas de LV (dentro del marco negro) y donde únicamente se han reportado LCL. Adicionalmente muestra la zona del Estado de Tabasco, donde se reportan el mayor número de casos de LCL y LCD en México (verde fuerte).



LEISHMANIASIS CUTÁNEA

Mientras que en Chiapas los pacientes con leishmaniasis cutánea presentan el cuadro clínico de LCL, una forma más benigna de la enfermedad, en el estado colindante, Tabasco, se han reportado el mayor número de pacientes con LCL y leishmaniasis cutánea difusa (LCD) en México (Fig.4). La LCD es la forma progresiva del padecimiento, en la cual los pacientes cursan con una anergia de la respuesta inmune celular hacia el parásito (9). En México esta forma clínica es producida por *L .(L.) mexicana*, y las características clínicas de estos pacientes difieren de pacientes con LCD infectados con otras especies de *Leishmania*, ya que además de presentar nódulos en toda la piel, también presentan lesiones en genitales, palmas de las manos, plantas de los pies y es muy invasora de las mucosas orofaríngeas y nasales (1). Se ha identificado a *Leishmania (L.) mexicana* como la especie responsable de la LCL y la LCD en México (10,11).

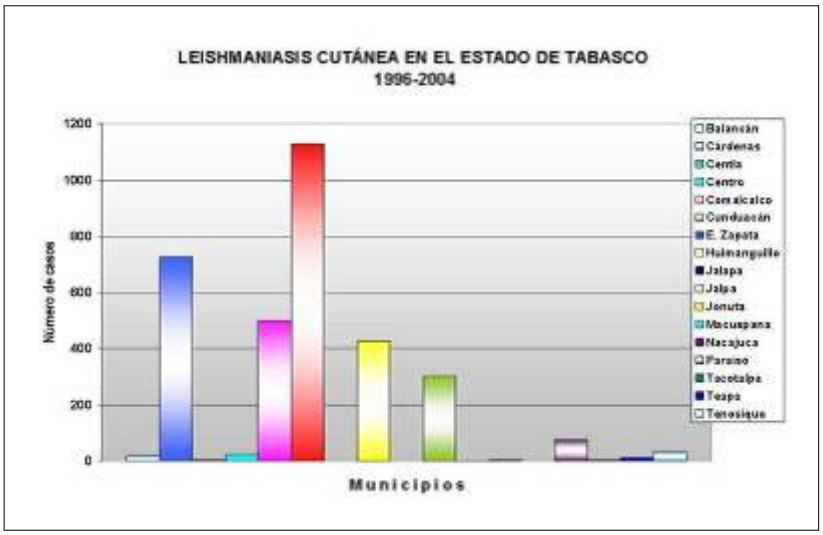
Entre las características geográficas que pudieran favorecer esta división tan marcada de la presencia de LV y LCL en Chiapas y por otro lado LCL y LCD en Tabasco, destaca que Tabasco está a la altura del nivel del mar, mientras que los casos de LV de Chiapas se registran en localidades que se encuentran a un promedio de 1500 a 1800 m por arriba del nivel del mar. Adicionalmente, Tabasco se caracteriza por tener una precipitación anual de 1500 a 2500 mm^3 por año, que contrasta con la reportada en las regiones endémicas de leishmaniasis en Chiapas, donde encontramos entre 800 y 1200 mm^3 de precipitación anual (Fig. 5). Interesantemente, la alta prevalencia del número de casos de leishmaniasis cutánea en el estado de Tabasco se restringe principalmente a los municipios Cunduacán, Cárdenas y Comalcalco, situados en la región conocida como "La Chontalpa", que se caracteriza por sus cultivos de cacao (Fig.4, Fig.6). La alta prevalencia de pacientes con LCL y LCD en regiones de cultivo de cacao en Tabasco, representa una problemática para su control, ya que la *Lutzomyia* transmisora de *L. (L.) mexicana* habita en el mismo nicho ecológico que los dípteros polinizadores del cacao, una de las fuentes de ingresos económicos mas importantes en la región. Los cacaotales proporcionan un ambiente húmedo y sombrío, con abundantes *detritus.* En los "quebraderos", los habitantes locales extraen las semillas del cacao y dejan los desechos que favorecen el desarrollo de las larvas de *Lutzomyia*. El vector responsable de la transmisión de *L. (L.) mexicana* en esta región, seguramente es *Lutzomyia olmeca*, ya que además de ser numerosa, es la única especie identificada como transmisora de LCL en México (8). Curiosamente, una de nuestras colaboradoras fue infectada de LCL al actuar como cebo humano para colectar esta especie de *Lutzomyia* en los cacaotales de "La Chontalpa".

Figura 5

Rangos de precipitación en las regiones más afectadas por leishmaniasis en Chiapas y cutánea Tabasco.

Figura 6

Distribución de pacientes con leishmaniasis cutánea en distintos municipios del estado de Tabasco.



Aunque el estado de Chiapas resalta por su número de pacientes con LV y el estado de Tabasco por su número de pacientes con LCL y LCD, no son los únicos estados de México en los cuales se han reportado casos con leishmaniasis. También Campeche, Quintana Roo y Nayarit reportan un número importante de casos de LCL (Fig.7, Fig.8). Se han reportado casos de leishmaniasis en 19 estados de la República, sin embargo, muchas de las regiones no son consideradas endémicas, ya que los pocos casos detectados en ellas, lo han sido militares y en campesinos cultivadores de estupefacientes en regiones muy apartadas de esos estados. También es posible que algunos enfermos hayan migrado a estos estados, desde otras localidades.

En los estados de Veracruz, Oaxaca, Tabasco y Chiapas se han descrito, en forma esporádica, casos típicos de leishmaniasis mucocutánea (LMC) (12) y Velasco-Castrejón y Neva detectaron desde 1998, la presencia de *L. braziliensis*, tipificada mediante zimodemos y anticuerpos monoclonales, en el estado de Oaxaca (13).

Figura 7

Número de pacientes con leishmaniasis en distintos estados de México entre 1990 y 2005

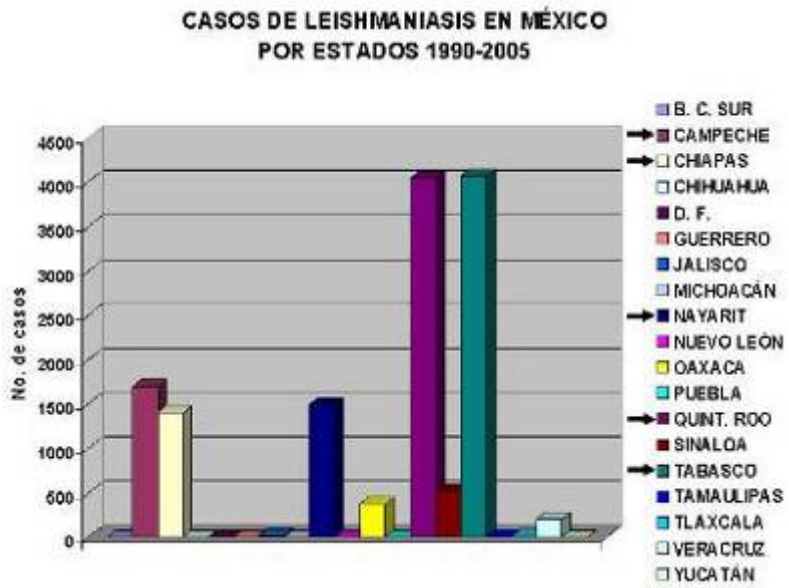


Figura 8

Estados de México en los cuales se han reportado casos de leishmaniasis

En resumen, desde 1981 hasta la semana 40 del 2005, en México se han reportado un total de 16673 casos de pacientes con leishmaniasis, de los cuales 91 corresponden a LV, 16532 a LCL y 23 a LCD. En el estado de Tabasco se reportaron 11 de los 23 pacientes con LCD, y en segundo lugar se encuentra Veracruz con 6 casos (2). Aunque en México se han reportado 27 casos con leishmaniasis mucocutánea, especialmente en los estados de Oaxaca y Veracruz, se piensa que, además de los casos reales, se han sumado casos de LCL con invasión de mucosas por contigüidad (comunicación personal, Dra. N. Treviño). Debido a que en México la leishmaniasis no es una enfermedad notificable y a que no existen campañas de detección activa, estos datos representan únicamente a una pequeña porción del número total de los pacientes con leishmaniasis existentes en México.

BIBLIOGRAFÍA

1. Velasco-Castrejón O, Guzmán-Bracho C, Rivas-Sánchez B, Aguilar-Torrentera F, Hernández-Márquez G. Las Leishmaniasis con especial referencia a México. 2ª. ed. Colección de Cuadernos Técnicos, INDRE, SSA. México, DF 2004.
2. Programa de Prevención y Control de las Leishmaniasis, Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, Subsecretaría de Prevención de Promoción a la Salud, Secretaría de Salud, 2005.
3. Velasco-Castrejón O, Beltrán S, Romero ZJL, Rivas-Sánchez B, orozco E, Pérez L, Floriani J, Rojas Y, Guzmán BC. El Kala azar en México. XXII Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 17:87, 1998.
4. Velasco O, Guzmán C, Ibanéz-Bernal S, Rivas B. Leishmaniasis. In JL Valdespino, O Velasco, A Escobar, A del Rio, S Ibánez-Bernal, C Magos (eds), Enfermedades tropicales en México. Diagnóstico, Tratamiento y Distribución Geográfica. Secretaría de Salud, INDRE, México, p.293-308, 1994.
5. Ibáñez-Bernal S, Rodríguez-Domínguez G, Gómez-Hernández CH, Ricardez-Esquinca JR. First Record of *Lutzomyia evansi* (Nuñez-Tovar 1924) in Mexico (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 99:127-129, 2004.

6. Travi BL, Velez ID, Brutus L, Segura I, Jaraillo C, Montoya J. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 84:676-677, 1990.

7. Bendezu H, Moreno G, Villegas E, Oviedo M. Bionomía de los vectores de leishmaniasis visceral en el Estado de Trujillo, Venezuela. V. Preferencias alimentarias de poblaciones silvestres de *Lutzomyia longipalpis* y *Lutzomyia evansi*. Bol Dir Malariol San Amb 35:45-52, 1995.

8. Biagi FF, Beltrán F. *Phlebotomus flaviscutelattus,* transmisor natural de *Leishmania mexicana*. Prensa Médica (Méx) 31:62-66, 1971

9. Salaiza-Suazo N, Volkow P, Pérez-Tamayo R, Moll H, Gillitzer R, Pérez-Torres A, Pérez-Montfort, R, Delgado Domínguez J, Velasco-Castrejón O, Crippa M, Becker I. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. Trop Med Internat Health 4:801-811, 1999.

10. Velasco-Castrejón O, Savarino S, Walton B, Neva AF. Diffuse leishmaniasis in Mexico. Am J Trop Med Hyg 41:280-288, 1989.

11. Berzunza-Cruz M, Bricaire G, Zuluoaga Romero S, Pérez Becker R, Saavedra-Lira E, Pérez-Montfort R, Crippa-Rossi M, Velasco-Castrejón O, Becker I. *Leishmania mexicana mexicana*: Genetic heterogeneity of Mexican Isolates Revealed by Restriction Polymorfism Análisis of Kinetoplast DNA. Exp Parasitol 95:277-284, 2000.

12. Mandujano VGM, Velasco-castrejón O, Soriano RJ. Leishmaniasis mucocutánea (Espundia) en México. Informe de 3 casos en el estado de Tabasco. Patología 28:71-78, 1990

13. Velasco-Castrejón O, Savarino S, Neva F, Guzmán-Bracho C. Los agentes etiológicos de las leishmaniasis en México. Presencia de *L. braziliensis*. Rev Latinoamer Microbiol (Méx) 31:231-234, 1989.

14. Elaboración de mapas:

Ecorregiones - Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), (1999). "Ecorregiones de México". Escala 1:1 000 000. México.

Clima - García, E. – Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), (1998). "Climas (Clasificación de Koppen, modificado por García)". Escala 1:1 000 000. México.

Precipitación - Vidal-Zepeda, R. (1990), Precipitación media anual en "Precipitación", IV.4.6. Atlas Nacional de México. Vol II. Escala 1 :4 00 000. Instituto de Geografía, UNAM. México

Altitud - Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), (1998). "Topografía de México". Escala 1:250 000. Extraído del Modelo Digital del Terreno. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). México.

Division política - INEGI, (1980). Límite Internacional en "Carta topográfica". Atlas del Medio Físico . Escala 1:1 000 000. México

AGRADECIMIENTOS

Para la obtención de los datos, agradecemos la valiosa participación de:

Dr. Oscar Velásquez
Director General
Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
Secretaría de Salud, México

Dr. Jorge Méndez Galván
Director del Programa de Enfermedades Transmitidas por Vector
Secretaría de Salud, México

Dra. Nancy Treviño Garza
Responsable de Leishmaniasis
Programa de Enfermedades Transmitidas por Vector
Secretaría de Salud, México

Vigilancia y Control de la Leishmaniasis en el Paraguay

Dra. Blanca Cousiño

Coordinadora Técnica de Programas de Control Vectorial
Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo (SENEPA-MSPBS)
Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social
Manuel Dominguez y Brazil

Asunción, Paraguay

Tel: 595 21 215169 - Fax: 595 21 215169 - blancousino@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores cada vez más producen daños a la salud pública, entre ellas la Leishmaniasis visceral (LV), denominada Kala Azar. La LV es una enfermedad zoonótica, propicia de zonas rurales en la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, además en los últimos tiempos puede desarrollarse en villas o suburbios de grandes ciudades, en donde las condiciones socioeconómicas y ambientales son las propicias para el desarrollo del vector. En América latina tiene una amplia distribución desde Centroamérica hasta varios países de Sudamérica como Colombia, Venezuela, Ecuador, Brasil, Paraguay entre otros.

Si bien el Paraguay contribuye en la Región con pocos casos, no es sinónimo absolutamente de que se esté vigilando y controlando adecuadamente, sino que el sistema de vigilancia aun es débil, con enormes subregistros aparentemente, por lo que se asume representa un problema grave de salud pública. Paradójicamente, el primer caso autóctono de la LV en América fue descrito por Luis Migone en 1911, en Paraguay; se trataba de un caso originario de Matto Grosso, Brasil. Posteriormente se diagnosticaron unos pocos casos esporádicos hasta el año 2000, con incremento en los últimos cinco años sucesivos; así, en el año 2000 se registró solamente un caso, en el año 2002 se registraron 4, en el 2003 fueron 9 y en el 2004 se alcanzó 24. Actualmente, hasta la semana epidemiológica 46, se notificaron 15 casos.

La mayoría de los casos de LV humana provienen del departamento Central (75%), probablemente debido al establecimiento del ciclo de transmisión de la enfermedad en dicha región, en la cual convergen: una alta proporción de perros con LV y vectores del parásito, además de un crecimiento urbano desordenado de la población. La LV afecta principalmente a niños pequeños y desnutridos, siendo la faja etaria más afectada menores de 4 años (74%) y personas con inmunodepresión, además presenta una alta letalidad (17%), que se puede incrementar aun más en personas no tratadas. El agente de la LV en Paraguay es *Leishmania chagasi* y el vector comprobado, como los demás países, Lutzomyia *longipalpis*. El 90 % de los casos se concentra en dos áreas, departamento Central y en la capital (distrito de Asunción), no obstante también se han detectado casos esporádicos en los departamentos de Concepción, Amambay y San Pedro.

En cuanto al reservorio, la incidencia en canes es alta, alrededor del 45% a 50%, provenientes mayoritariamente de Central y Capital, que debe ser mejor investigada debido a que en estas áreas se tiene mejor acceso al diagnóstico de canes, por lo tanto también se consideraría la existencia de subregistro para los demás departamentos del país.

VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

A partir del año 2000 se inició en forma incipiente la organización de la vigilancia epidemiológica, enfatizando la detección humana y las investigaciones en reservorios, de modo a determinar al menos las áreas de transmisión humana y canina, entre otros aspectos epidemiológicos. En esta etapa el Programa de control de las Leishmaniasis se ha abocado a la capacitación en las zonas de transmisión del personal de salud y promotores locales, con el fin de alcanzar una

detección precoz, un diagnóstico oportuno y el tratamiento efectivo. Es posible que este proceso continuo y progresivo haya permitido sincerar el número de casos en el país, por lo que aparentemente, como producto de esta estrategia, en el año 2003 se observó un inusual incremento de los casos. Por ello, ante el nuevo escenario epidemiológico, necesariamente se reorientó todo el sistema de vigilancia con la activación efectiva e intersectorial, por primera vez, de los tres componentes: vigilancia de casos humanos, vigilancia y control de reservorios y la vigilancia y control vectorial. En ese contexto, se revisaron las definiciones de casos tanto humanos como caninos, los criterios y parámetros del diagnóstico laboratorial para humanos y caninos, el flujograma de las notificaciones, la clasificación clínica y laboratorial con los distintos períodos de desarrollo de la enfermedad y el manejo clínico para cada uno de ellos, así como los criterios para la vigilancia y control vectorial.

1. VIGILANCIA EN HUMANOS

La vigilancia de los casos sospechosos está bajo la responsabilidad de la Dirección de Vigilancia Epidemiológica (DGVE) y su red a través de los servicios de salud pública, que se articula con otros subsectores como la Universidad Nacional de Asunción y el Seguro social. Se estableció como estrategia la vigilancia en centros centinelas de estos subsectores ubicados en las áreas de alta endemicidad, para la detección oportuna de los casos humanos. Actualmente se cuenta con siete centros centinelas funcionando, 3 en el Dpto. Central y 4 en Asunción.

La notificación del caso sospechoso de LV es obligatoria e inmediata, a través de la ficha epidemiológica y planillas semanales de notificación de las diferentes unidades de notificación del país direccionados a la DGVE. En todo el país existen 426 unidades notificantes para la Vigilancia Epidemiológica en general, de las cuales están en condiciones de captar y notificar casos de LV al menos unos 200, pero efectivamente notifican solamente 10, mayoritariamente proveniente de la Capital y Dpto. Central.

Definición de casos

Caso Sospechoso:

- Proveniente de área de transmisión: todo individuo con fiebre de más de dos semanas de duración y esplenomegalia asociada o no a hepatomegalia
- Proveniente de área sin transmisión: todo individuo con fiebre de más de dos semanas de duración y esplenomegalia asociada o no a hepatomegalia, una vez descartados otros diagnósticos diferenciales propios de esa región.

Caso confirmado:

- Criterio Clínico laboratorial: caso sospechoso con observación directa del parásito o cultivos positivos o PCR positiva o serología positiva por el método RK39.
- Criterio Clínico Epidemiológico y Terapéutico: caso sospechoso proveniente de área de transmisión, con manifestaciones clínicas sin confirmación laboratorial, pero con una respuesta favorable a la medicación.

2. VIGILANCIA DE RESERVORIOS

La vigilancia y el control de los reservorios está bajo la responsabilidad del Centro Antirrábico Nacional (CAN) dependiente del Ministerio de Salud, que se está reorganizando para constituir el Centro de Zoonosis que aun no se ha concretado. Esta institución está en etapa de fortalecimiento desde todo punto de vista, ya que aun es único y centralizado, funcionando en el Dpto. Central sin aun expandirse para todo el país, lo cual dificulta enormemente la operativización de este componente. En este ultimo período se inició una articulación con otros sectores como el de Ganadería que tiene incorporado al Servicio Nacional de Salud Animal, e incluso el acercamiento al sector privado relacionado al manejo de pequeños animales.

Definición de casos caninos

Caso canino sospechoso: todo perro proveniente de áreas endémicas o donde esté ocurriendo brotes, con manifestaciones clínicas compatibles con la enfermedad (fiebre irregular, apatía, adelgazamiento, descamación

furfuráceo, ulceras en la piel, orejas y extremidades, conjuntivitis, paresia de miembros posteriores, heces sanguinolentas y crecimiento exagerado de uñas).

Caso canino confirmado:

- Criterio clínico laboratorial: perros sospechosos con manifestaciones clínicas anteriormente citadas y que presentan test serológicos y/o exámenes parasitológicos positivos.
- Criterio clínico epidemiológico: Todo perro proveniente de áreas endémicas o en donde esté ocurriendo brotes y que presente cuadro clínico compatible con LV canina sin la confirmación laboratorial.

Caso Infectado (asintomático): todo perro asintomático clínicamente con serología y/o examen parasitológico positivo.

La comprobación de la presencia de reservorios caninos se realiza mediante una investigación o encuesta serológica alrededor del caso humano autóctono en un área geográfica delimitada según ciertos criterios:

a. Si el área de ocurrencia es desconocida desde el punto de vista de vectores como de canes, se muestrea un mínimo de 100 canes
b. En ausencia de vectores, se investiga la totalidad de los perros en un área de 200 m de radio en zona urbana y 1000 m en zona rural
c. En presencia de vectores, se investiga la totalidad de los perros en el área de dispersión delimitada por la investigación entomología.

Si se detectan canes con diagnóstico positivo, con cualquiera de los anteriores criterios, incluso los sintomáticos, son eutanasiados y si en el área investigada no se detectan canes positivos se mantiene la vigilancia con el mismo procedimiento cada seis meses por dos años.

3. VIGILANCIA VECTORIAL

El Servicio Nacional de Control de vectores (SENEPA) es la Institución encargada de realizar la vigilancia y el control a nivel nacional, regional y local de todos aquellos vectores de enfermedades metaxénicas prevalentes en el país, que incluye a la Leishmaniasis visceral.

Para llevar a cabo esta misión, el Servicio se encuentra geográficamente descentralizado en zonas y sectores, coincidentes en su mayoría con la división política del país, abarcando para el efecto departamentos y distritos. Actualmente existen 14 Zonas y 35 sectores. De estas, seis zonas cuentan con laboratorios de entomología para la vigilancia.

La vigilancia y control vectorial investigación entomológica se realiza para conocer primordialmente la distribución espacial de *Lu. Longipalpis*, determinar áreas vulnerables y de riesgo, caracterizar y delimitar áreas de transmisión autóctona de LV humana y/o canina y monitorear la efectividad de los insecticidas.

Actualmente se prioriza la delimitación de las áreas de transmisión autóctona de LV humana; para lo cual, una vez reportado un caso humano de LV se inicia la investigación en un área de 200 m de radio alrededor del caso utilizando trampa CDC dos por domicilio por manzana (Intra y peridomicilio) expandiendo la investigación hasta no detectar vectores. De esta manera se delimita geográficamente el área para la investigación canina y posterior control químico con rociado intra y peridomiciliar, con insecticida de acción residual, modalidad casa por casa, dependiendo siempre de algunos criterios:

- Si la investigación entomológica muestra presencia del vector, se delimita su dispersión real, se rocía en ciclos semestrales hasta dos años siempre que los controles entomológicos lo recomienden.
- Si no se observa presencia del vector, el área permanece bajo vigilancia entomológica con controles cada mes hasta tres meses inclusive.

Situación de Leishmaniosis Visceral en España

Dr. Javier Encinas Aragón; Dr. Javier Fernández Gómez;
Dra. Mª Dolores de las Heras Carbajo; Dr. José Barbas del Buey.

Correspondencia:
Dr. Javier Encinas Aragón
Jefe de Sección de Sanidad Ambiental
Dirección General de Salud Pública y Alimentación
Instituto Salud Pública de Madrid

Madrid, España
Teléfono móvil: 34 649574026 - javier.encinas@madrid.org

1. RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria, que se presenta en Europa en forma endémica, principalmente en la cuenca mediterránea, con bajas tasas de prevalencia humana, y siendo producida por LEISHMANIA infantum.

En España, el principal número de casos humanos se produce en la Comunidad Valenciana, seguida de la Madrid y Cataluña con un promedio total de unos 100 nuevos casos al año (tasa 0,40/100000hbts), de los cuales un 90% se corresponden con la forma de leishmaniosis visceral. Afecta principalmente a adultos jóvenes, asociándose en un 43% de los casos a estados de inmunosupresión. En el 27,8 % de los casos existe coinfección con VIH.

Se estima, que el 7% de la población canina esta infectada en España, aunque existen regiones donde se llega hasta un 35%, siendo P. Perniciosus y P.Ariasi, los principales vectores implicados en su transmisión.

Este artículo pretende realizar una actualización sobre la situación epidemiológica de la leishmaniosis humana y canina en España, y más específicamente en la Comunidad de Madrid. Así mismo se describen los principales habitats y características de los flebótomos, y se analizan las principales técnicas de diagnostico, tratamientos y programas de control utilizados actualmente en España.

Finalmente se consideran algunas de las acciones que podrían contemplar los programas de control.

KEY WORDS: leishmaniasis. Epidemiology. Spain. Phlebotomus. Animals. Humans. Prevention & control. Review literature. HIV.

2. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad producida por protozoos del genero LEISHMANIA que afecta en Europa, de forma endémica a la mayor parte de los países de la cuenca mediterránea, siendo el perro el principal reservorio. En el sur de Europa y en España, solo se observa la producida por LEISHMANIA infantum, y aún siendo una enfermedad de baja incidencia - muy lejos de los 60.000 casos notificados cada año en América latina –, se evidencia un lento incremento del numero de casos relacionados con personas inmunodeprimidas y en coinfección con VIH +. Los flebótomos, y mas específicamente P. perniciosus y P.Ariasi son los únicos vectores biológicos demostrados de LEISHMANIA infantum.

3. METODOS

Se ha realizado un estudio descriptivo con datos obtenidos del registro de enfermedades de declaración obligatoria de la Comunidad de Madrid (SIVE), entre los años 2000 al 2005, utilizando para su análisis el paquete estadístico SPSS 11.0.

Así mismo se ha realizado la revisión bibliográfica y actualización de datos referentes a situación epidemiológica y epizootiológica de leishmaniasis en España, entomología del vector, actualización de técnicas de diagnóstico, tratamiento y programas de control en los últimos 5 años.

4. RESULTADOS

4.1. SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LEISHMANIASIS HUMANA EN ESPAÑA

A. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA EN ESPAÑA

Desde 1982 la Leishmaniasis se consideró como enfermedad de declaración obligatoria (E.D.O) realizándose su declaración por parte de la red asistencial sólo de forma numérica. Durante esta década se contabilizaban aprox. 90 casos/año (tasa 0.3/ 100000 habitantes), siendo una enfermedad en aumento.

A partir de 1995, se consideró E.D.O. en 10 Comunidades autónomas (zonas endémicas), realizándose declaración individualizada con datos epidemiológicos básicos (edad, sexo, fecha inicio de síntomas, tipo de diagnóstico, etc.).

Así mismo se realiza la definición clínica de caso como:

– Sospechoso: solo sintomatología clínica.

– Probable: sintomatología clínica + serología.

– Confirmado: sintomatología clínica + aislamiento del parásito.

– También se determinaron los criterios de diagnóstico de laboratorio.

Desde 1995 se vienen notificando en España aproximadamente unos 100 casos/año.

En el año 2003 (último Boletín epidemiológico publicado), se notificaron 101 casos en España, con la siguiente distribución:

- 28 casos C. Valenciana
- 24 casos C. de Madrid
- 22 casos C. Catalana
- 27 restantes otras Comunidades autónomas

B. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA EN LA CC DE MADRID

- En España, la Comunidad de Madrid es una de las de mayor incidencia
- Es Enfermedad de Declaración Obligatoria/semanal/individualizada.
- En el año 2003 se notificaron 24 casos con una tasa de incidencia de 0.40/100000 habitantes.
- En el periodo 2000-2005 se notificaron 133 casos en la Comunidad de Madrid de los que 122 casos se correspondían con Leishmaniasis visceral.
- De estos 122 casos de Leishmaniasis visceral:
- El 68 % se confirmó por biopsia y el 32% por diagnóstico de laboratorio
- El 75.4% corresponde a varones.
- Edad media 35 años.
    - El principal factor de riesgo es la inmunosupresión.
    - En 53 casos (43.4%) consta inmunosupresión.
    - En 34 casos (27,8 %) existe co-infección con VIH +

En el SUR DE EUROPA, el patrón epidemiológico de Leishmaniosis también esta variando: antes afectaba principalmente a niños, pero ahora está incrementándose por afectar principalmente a personas VIH+, e inmunodeprimidas. Actualmente más del 25% de estos pacientes están co-infectados por LEISHAMANIA Infantum.

4.2. SITUACIÓN DE LEISHMANIASIS CANINA

A. EN ESPAÑA

En EUROPA, se da principalmente en la cuenca mediterránea, en las formas visceral y cutánea y ambas producidas por LEISHMANIA Infantum.

- F. ZOONÓTICA- LEISHMANIA infantum.
- F. ANTROPONÓTICA- LEISHMANIA donovani.

El principal reservorio es el perro, con un 5 al 10% de la población canina infectada.

En ESPAÑA, se estima que el 7% de la población canina (4 millones de perros) está infectada, pero existen numerosos focos endémicos donde la prevalencia llega hasta el 35% (Ej.: Málaga). Así mismo, varias Comunidades Autónomas tienen desde hace años programas de control de leishmaniasis.

B. EN LA COMUNIDAD DE MADRID

En la Comunidad de Madrid, la seroprevalencia canina de Leishmaniosis es de un 8% aproximadamente.

Es una enfermedad endémica siendo enfermedad de declaración y vigilancia obligatoria, siendo su tasa de incidencia humana de aproximadamente 0.40/ 100000 habitantes.

Existe desde 1983 un programa de vigilancia y prevención de leishmaniosis que realiza, entre otras las siguientes actividades:

- Se realizó un Estudio entomológico en 1990, 1991 y 1992 en la Comunidad de Madrid, para ver tipos de Flebótomos, hábitos, estacionalidad, etc., determinándose como principales: P. perniciosus y P. ariasi, y en menor medida P. langeroni y P. longicuspis. , siendo sus periodos de actividad de mayo a octubre.
- En 1996 se constituyó un Grupo Asesor de Expertos en Leishmaniosis.
  - Desde 1996 hasta hoy se vigila la seroprevalencia canina de L. infantum en perros vagabundos (con dos cortes en abril y noviembre de cada año) por técnica de inmunofluorescencia indirecta. Se han muestreado aproximadamente 1600 perros en 13 perreras y centros de protección animal, siendo la seroprevalencia global del 7.1%.
  - Se procede al sacrificio de perros afectados.
  - Prácticamente el100% de perros que se entregan en adopción se dan libres de Leishmaniasis.
- Así mismo se realizan actividades de Educación Sanitaria: a población general, a propietarios de perros, en Centros de Salud, a Veterinarios., en clínicas, veterinarias etc.

4.3. LOS PHLEBOTOMUS EN ESPAÑA

A. CARACTERISTICAS DEL VECTOR

• En España se han descrito 12 especies de Flebótomos, pero solo P.perniciosus y P. ariasi, son transmisores de leishmania en España.

Se desarrollan a:

• Temperaturas moderadas.
• Poca luz.
• Alta humedad relativa
• Alto contenido de materia orgánica.

En:

• Huecos de muros.
• Establos o corrales.
• Leñeras.
• Jardines
• Alcantarillas.
• Cuevas o madrigueras.

Son estacionales de mayo a octubre (marzo/diciembre).

Con actividad nocturna; las hembras entran en las viviendas, pican y regresan a su hábitat, para realizar la puesta.

Realizan vuelos cortos (pocos m) y de poca altura, en general como máximo a 500 m del lugar de reposo.

Se desarrollan mejor en poblaciones de hasta 1000 m de altura máxima sobre el nivel del mar.

B. LUCHA ANTIVECTORIAL

- Medidas estructurales: como mallas mosquiteras con trama adecuada para flebótomos, tostadores eléctricos de insectos, eliminar acumulos de basuras, restos de vegetación, mantillo, tapar agujeros y oquedades en muros, etc.
- Medidas sobre el perro: Collares con Deltametrina .y pipetas con Permetrin al 65%.
- Tratamiento entorno peridoméstico e intradomiciliario: con insecticidas piretroidees (leñeras, muros, registros y contadores eléctricos y de agua, casetas de perros. etc).

4.4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

A. DETECCIÓN DEL PARÁSITO

- Observación microscópica de aspirados de ganglio o médula ósea: Sensibilidad entre 60 y 75%.
- Cultivo de aspirados de ganglio y médula ósea. Sensibilidad aproximada 80%.
- Inmunofluorescencia directa de los tejidos.-poco utilizada.
- PCR, gran sensibilidad (90-100%) y especificidad. Permite detección de portadores asintomáticos.
- Inoculación a animales de experimentación.
- Xenodiagnóstico, de escasa utilidad práctica. Muy útil epidemiológicamente. Precisa de una colonia establecida de Flebótomos.

B. INMUNIDAD HUMORAL

- IFI, es el "Gold Standard" de la Serología. Muy útil clínicamente y muy utilizada desde hace años.
- ELISA; muy utilizado clínicamente.
- WESTERN BLOT; más sensible que IFI y ELISA. Poco utilizado por problema estandarización de antígenos.
- MÉTODOS INMUNOCROMATOGRÁFICOS; útiles para los veterinarios por su simplicidad y rapidez.

4.5. ACTUALIZACIÓN DE TRATAMIENTOS EN LEISHMANIOSIS CANINA

ANTIMONIALES PENTAVALENTES

Fármacos de 1ª elección

• GLUTAMTIME (ANTIMONIATO DE N-METILGLUCAMINA) 50 a 100 mg/Kg/12h -30 días/ IM, IV ó SC.
• PENTOSTAM (ESTIBOGLUCONATO SODICO). - 27 mg / kg /día - 30 días
• Producen mejoría clínica en el 85% de los casos pero falta de curación parasitológica.

ANFOTERICINA B

Fármacos de 2ª elección

A dosis de 0.5 a 1 mg/ Kg /día-IV ó SC.

Buenos resultados, 85% de mejoría / nefrotóxica.

SISTEMAS DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS

Prolongan la liberación y permanencia del fármaco en el organismo, por lo cual se precisan dosis más bajas.

- Actualmente se comercializan 3 formulaciones LIPÍDICAS con ANFOTERICINA B (Ambisome, Abelcet y Amphocil).
- Precio elevado.

ALOPURINOL

- Leishmaniostático. Controvertida efectividad.
- 10 – 30 mg/Kpv/día-1 semana al mes ó toda la vida.
- Bueno en combinación con Glucamtime.

PAROMICINA

- 10 A 20 mg/Kpv-IM.
- Poco efectivo, mejor combinado.

PENTAMIDINA

- 4 mg/Kpv-IM-3 días por semana – 1 mes y medio.
- Buenos resultados clínicos y parasicológicos.

MILTEFOSINA

- 2 mg/Kg/día-25 días- oral.
- Fármaco utilizado en el cáncer de mama. Toxicidad gastrointestinal.
- Eficacia similar a Glucamtime (90%).

KETOCONAZOL

- 25 mg/Kpv/día.
- Peores resultados que Glucamtime. Mejor en combinación.

TRATAMIENTOS COMBINADOS

P1- Perros enfermos con buen estado general y sin complicaciones orgánicas.

Glutamtime SC (1 mes) + Alopurinol (12 a 18 meses continuo).

P2 - Perros enfermos con riñón sano y sin complicaciones orgánicas.

Anfotericina B IV (2 meses) + Alopurinol (12 a 18 meses continuo).

P3 - Perros enfermos con insuficiencia renal.

Glucamtime SC (a ¼ de dosis) + Enalapril + Omeprazol + Fluidoterapia.

FUTUROS MEDICAMENTOS:

Existen diferentes estudios in vivo e in vitro de productos con supuesta actividad leishmanicida: omeprazol, azitromicina, enrofloxacina, marbofloxacina, metronidazol-espiramicina (Palermo, abril 2005).

VACUNAS

• Existen varias vacunas en desarrollo o pruebas de campo.

– Proteínas de secreción y excreción de cultivos de leishmania.

– Fracciones purificadas del parásito.

– Antígenos recombinantes.

– Vacunas multicomponentes de 4 antígenos (proteína Q) ofrecen protección del 90%.

• Posiblemente se registrará alguna vacuna frente a leishmania infantum antes del 2008.

5. DISCUSIÓN

La leishmaniasis afecta en Europa, de forma endémica a la mayor parte de los países de la cuenca mediterránea, siendo el perro el principal reservorio. Este hecho, unido a su condición como animal de compañía y "mejor amigo del hombre", hace inviables e ineficaces en Europa a aquellos programas de control basados en la eliminación de los animales afectados. Así mismo, no queda claro el papel que juega el perro tratado como posible riesgo en la transmisión: algunos estudios sugieren que perros tratados con una combinación de antimoniales y alopurinol al los 6 meses post-tratamiento presentaban xenodiagnósticos negativos en el 85% de los casos. En cuanto a las opciones terapéuticas en si mismas son las mismas de hace décadas, presentando como única novedad el uso de tratamientos combinados con fármacos ya conocidos.

En España, las hembras de los flebótomos, y mas específicamente de P. Perniciosus y P.Ariasi son los principales vectores biológicos de LEISHMANIA infantum hacia el hombre. La dispersión de los habitats naturales de los flebótomos, unido al la mayor sensibilización social hacia el medio ambiente, que provoca una mayor resistencia social al uso indiscriminado de insecticidas, dificultan la actuación sobre el vector. También habría que profundizar en el papel que en la interrupción de la transmisión flebótomo- perro, representan productos tópicos como las ampollas al 65% de permetrin o los collares de deltametrina que se están utilizando actualmente en población canina.

Desde la perspectiva humana no hay que obviar los cambios del patrón epidemiológico, afectando hoy en día principalmente a personas inmunodeprimidas, y con un alto grado de coinfección con VIH +, en vez de a niños .Esto se une a un deficiente diagnostico en muchos personas, ya que su baja frecuencia hace que el médico de atención primaria, la obvie en su diagnostico rutinario.

La inmunoprofilaxis e investigación de nuevas vacunas podría ser una de las soluciones a medio plazo.

Todas estas consideraciones nos deberían hacer reflexionar sobre las estrategias que deberán aplicar los futuros programas de control de leishmaniasis.

6. RECOMENDACIONES: PROGRAMAS DE CONTROL

Dependerán del ciclo de cada Leishmania y de los recursos existentes en el país. Europa y /España se caracterizan por:

- Leishmaniasis zoonóticas viscerales por LEISHMANIA Infantum (cuyo reservorio principal es el perro).
- Coinfección Leishmania VIH+ en humanos.

Medidas posibles:

1. Control de vector
   - Estudios entomológicos de Flebótomos (hábitos, periodos de actividad, etc.).
   - Medidas estructurales: mallas mosquiteras con la trama adecuada, eliminación vertederos, etc.
   - Tratamientos insecticidas peridomésticos (malation, piretroides, etc.).
   - Tratamientos insecticidas intradomiciliarios (piretroides, tostadores de insectos, etc.).

2. Control del reservorio

- Métodos de diagnóstico eficaces y precoces (PCR).
- Recomendación de realizar serologias preventivas en perros de zonas endémicas.
- Tratamiento y seguimiento de perros afectados.
- Determinación de su capacidad infectante de perros post-tratamiento: xenodiagnósticos.
- Eutanasia.
- Eliminación de perros vagabundos afectados.
- Dar todos los perros en adopción libres de Leishmania.
- Estudio del efecto y uso de collares de deltrametrina o pipetas de permetrina.
- Recomendación de que los perros duerman dentro de las casas en los periodos de actividad del vector.
- Mejorar el conocimiento sobre reservorio silvestre.

3. Medidas sobre el medio ambiente

- Impedir la proliferación de vertederos incontrolados, especialmente en zonas próximas a habitats humanos.
- Recomendar al población la eliminación de basuras, mantillos, restos de vegetación, eliminación de humedales etc. en el entorno peridomestico.

4. Educación sanitaria y vigilancia epidemiológica

- A población general (….día nacional de Leishmaniasis).
- A propietarios de perros (folletos de educación sanitaria, recomendaciones a través de veterinarios clínicos. etc.).
- A grupos de riesgo (enfermos con tratamientos inmunosupresores, drogadictos …).
- Establecer y mejorar los sistemas de vigilancia epidemiológica.

5. Tratamiento precoz de personas infectadas

- Formación de red médica asistencial.
- Tratamiento médico adecuado y periódico.
- Estudios del entorno, ante la aparición de casos humanos.

6. Apoyo a la investigación

- Desarrollo de vacunas.
- Desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico.
- Desarrollo de nuevas opciones terapéuticas baratas y eficaces.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Denerolle, P. Leishmaniose canine: dificultés du diagnostic et du traitment (125 cas). Prat. Med. Chir.Anim.Comp.; 137-145.1996
- Molina, R; Miro, G.; Fraile, C. Canine leishmaniasis convencional therapies influencing infectivity of dogs to sandflies.New challenges in tropical medicine and parasitology. 18-22. September 2000.
- Alvar J. Las leishmaniasis: de la biología al control..Junta de Castilla y León.1983.51-149.g
- Molina R. Los flebotomos:importancia sanitaria.Informacion veterinaria 2005; junio: 20-24.
- Molina R. Lohse j.m. , Nieto j.: eficacia de una solución tópica de permetrin frente a phebotomus perniciosus. Información veterinaria.2005; junio. 11-12.

- Cañabate C, Cruz I, Flores M, Alvar J. Diagnostico de Leishmaniasis canina .Información veterinaria; 2005; junio:28-32.
- Leishmaniosis canina. Alvar, J.et al.: 1994. Ann. Trop. Med. Parasitol. pp.371-378
- Leishmaniosis canina. Aspectos clínicos. Cairó, J.; Font, J.: 1991 Clínica Veterinaria de Pequeños Animales. pp.73-81.
- Alternativas al tratamiento clásico de la leishmaniosis mediante el uso de terapia oral. Crende, F.; Moragues, M.:1992. Premios Fundación Purina. pp.57-68.
- Crende-Casanegra, F.J.; Jul Bauza,S.; Llul Grimalt, J.&Moragues, Lladonet, M. Alternativa al tratamiento clásico de la leishamaniosis mediante el uso de terapia oral. Premios Fundación Purina, pp: 55-68.1992.
- Ferrer, L. The pathology of canine leishamaniosis. In Canine Leishamaniasis: moving towards a solution. 2nd Int. Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, pp. 21-24. 2002
- Gradoni, L.; Maroli, M.; Gramiccia, M.&Nocerino, A. Leishmania infantum infection rates in Phlebotomus perniciosus fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. Med. Vet. Entomol., 339-342. 1987.
- Baneth, G. y Shaw, S.E. (2002). Chemotherapy of canine leishamaniosis. Veterinay Parasitology;106: 315-324.
- Brussieras, J. (1977). Les thérapeutiques antileishmaniennes. L´animal de Compagnie 2, 137-141.
- Lamotte, J. (2001). Activity of amphotericine B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. Journal of Small Animals Practice. 42: 170-175.
- Alexander, B., Maroli M. (2003). Control of phlebotomine sandfiles. Medical and Veterinary Entomology 17, 1-18.
- Davies, C.R. Kaye, P., Croft, S.L., Sundar, S. (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. British Medical Journal 326, 377-382.
- Killick-Kendrick, R. (1999a). The biology and control of phlebotomine sandflies. Clinics in Dermatology 17, 279-289.
- Molina, R., Lohse, J.M., Nieto, J. (2001). Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (Phlebotomus perniciosus) in dogs. Veterinary Therapeutics 2, 261-267.

Sobre los autores:

Dr. Javier Encinas Aragón. Jefe de Sección de Sanidad Ambiental.

Instituto de Salud Pública. Comunidad de Madrid. España.

Dr. Javier Fernández Gómez. Veterinario. Técnico Superior de Salud Pública. Instituto de Salud Pública. Comunidad de Madrid. España.

Dra. Mª Dolores de las Heras Carbajo. Médico Epidemióloga.

Instituto de Salud Pública. Comunidad de Madrid. España.

Dr.José Barbas del Buey. Médico Epidemiólogo.

Instituto de Salud Pública. Comunidad de Madrid. España.

Desarrollo de un diagnóstico por PCR que permite diferenciar entre especies del complejo *Leishmania (L.) mexicana* y *Leishmania (V.) braziliensis*

Berzunza-Cruz Miriam[1], Padilla Alejandro[2], Pérez-Montfort Ruy[3], Becker Ingeborg[1].

[1]*Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Hospital General de México, Dr. Balmis 148, 06726 México D.F., México*

[2]*Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UNAM, México 04510 D.F., México*

[3]*Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México 04510 D.F., México*

Correspondencia:
Dr. Ingeborg Becker
Universidad Nacional Autónoma de México
Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, U.N.A.M.
Dirección: Dr. Balmis 148, Colonia Doctores - Mexico City, D.F., 06726, Mexico
Tel: 52 55 56232674 - becker@servidor.unam.mx

RESUMEN

En el Continente Americano coexisten especies de los complejos *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* y también *Leishmania (L.) chagasi* en las mismas áreas endémicas, que pueden producir cuadros clínicos muy parecidos y no todos responden bien a los tratamientos con antimoniales pentavalentes. Por esta razón es importante optimizar los métodos diagnósticos logrando alta especificidad y sensibilidad. En este trabajo desarrollamos un diagnóstico por PCR, para lograr 3 objetivos: 1) identificar el género *Leishmania;* 2) diferenciar entre los complejos *L. (L.) mexicana* y *L. (V.) braziliensis*; y 3) diferenciar entre especies pertenecientes al complejo *L. (L.) mexicana*. Diseñamos los oligonucleótidos LM9/LM12, basados en secuencias de la glicoproteína gp 63, para identificar el género *Leishmania*. Adicionalmente diseñamos los oligonucleótidos LM9/LV2, también basados en secuencias de gp 63, que permitieran diferenciar a *L. (Viannia) braziliensis*. Para la identificación de especies pertenecientes al complejo *L. (L.) mexicana,* diseñamos oligonucleótidos basados en secuencias del espaciador transcrito interno pertenecientes al rDNA (ITS). Para la identificación de *L. (L.) mexicana* se hicieron los oligonucleótidos IR1/LM17, para *L. (L.) amazonensis* los IR1/LM15 y para *L.(L.) venezuelensis* los IR1/LM13. Estos oligonucleótidos mostraron alta especificidad y sensibilidad en la identificación de *L. (L.) mexicana, L. (L.) amazonensis, L. (L.) venezuelensis, L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) chagasi* en parásitos en cultivo y en biopsias cutáneas de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y con leishmaniasis cutánea difusa, o bien, en biopsias esplénicas de pacientes con *L. (L.) chagasi*. Los oligonucleótidos amplificaron DNA de tejidos congelados, sin embargo, no se logró una amplificación de los mismos tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. En pacientes con padecimientos crónicos, que no responden bien a los tratamientos de rutina, y, en pacientes con LCL, que tienen muy pocos parásitos, es de gran importancia realizar este diagnóstico por PCR, ya que es una estrategia con alta sensibilidad y especificidad.

ANTECEDENTES

En el Continente Americano las distintas formas clínicas de leishmaniasis pueden ser producidas por distintas especies pertenecientes al complejo *Leishmania (Leishmania) mexicana* o al complejo *Leishmania (Viannia) braziliensis*, o bien por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. La localización y la severidad del cuadro clínico varían de acuerdo a la especie del parásito. Las especies del complejo *L. (L.) mexicana*, que incluyen a *L. (L.) mexicana, L. (L.) venezuelensis, L.(L.) amazonensis* y *L.(L.) pifanoi*, pueden causar leishmaniasis cutánea y, dependiendo de la especie, la lesión puede ser única y de evolución benigna, como ocurre en la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), o bien presentarse como leishmaniasis cutánea difusa (LCD), que es una enfermedad progresiva, de desenlace mortal.

La leishmaniasis mucocutánea (espundia) es producida por especies pertenecientes al complejo *L. (V.) braziliensis*, que incluyen a *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis*, y, la leishmaniasis visceral en el Continente Americano es ocasionada por *L. (L.) chagasi*. Sin embargo, los distintos cuadros clínicos pueden causarse por más de una especie en una misma región endémica, tal como ocurre en el caso de leishmaniasis cutánea, la cual puede ser producida tanto por las especies del complejo *L. (L.) mexicana* como por las especies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana, L. (V.) guyanensis* e, inclusive, *L. (L.) chagasi* [1, 2, 3].

De esta manera, algunas especies como *L. (V.) braziliensis* pueden causar formas cutáneas con metástasis a mucososas, bien producir únicamente lesiones cutáneas, como ocurre con *L. (V.) peruviana*, que causa la "Uta" en el Perú, una enfermedad que tiende a curar espontáneamente, sin causar metástasis. En México, *L. (L.) mexicana* puede producir tanto la leishmaniasis cutánea localizada "Úlcera del Chiclero", como la difusa. Asimismo, en Colombia, *L. (L.) amazonensis* también puede producir ambas formas cutáneas.

Dado que en el Continente Americano especies de *Leishmania* pertenecientes a tres complejos distintos pueden producir la misma enfermedad clínica, se generan problemas en el diagnóstico y en el tratamiento, ya que las distintas especies no responden de manera igual a los tratamientos empleados, en especial: a antimoniales pentavalentes [4]. Por dicho motivo es crucial desarrollar técnicas diagnósticas que permitan una identificación rápida y específica de las especies y de esta manera optimizar las medidas terapeúticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Parásitos

En este estudio se analizaron parásitos aislados de pacientes con LCL y LCD, de distintas regiones endémicas (Tabla 1). Todos los aislados fueron tipificados como *Leishmania (L.) mexicana* mediante anticuerpos monoclonales donados por el Dr. Farrokh Modabber (Leishmania Vaccine Steering Committee, OMS). Se utilizaron los anticuerpos: LXVIII-4D8-E3 [M8] para *L. (L.) mexicana*, 2-2F7D3 para el complejo *L. (V.) braziliensis*, G2D10 para el control positivo que amplifica todas las especies y 1H6-E3-B4 como control negativo. Los parásitos aislados de pacientes con LCL y LCD adicionalmente fueron enviados al Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, Cali, Colombia (CIDEIM) para confirmar el diagnóstico de la especie mediante isoenzimas. En este trabajo también se incluyeron especies de referencia del complejo de *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) chagasi*, donados por la Dra. Nancy Sarabia del CIDEIM (Tabla 2). Todos los parásitos se cultivaron a 26^0C en medio RPMI (GIBCO), enriquecido con suero fetal bovino al 10%.

Tabla 1.

Aislados de pacientes mexicanos con LCL y LCD, tipificados como *L. (L.) mexicana*.

AISLADOS *L.(L.)* mexicana	CUADRO CLÍNICO	ÁREA GEOGRÁFICA	*CÓDIGO INTERNACIONAL
1 68	LCL	CAMPECHE	MHOM/MX/92/UADY 68
2 527	LCL	CAMPECHE	MHOM/MX/92/UADY 527
3 RHA	LCL	TABASCO	MHOM/MX/93/INDRE RHA
4 CV	LCL	QUINTANA- ROO	MHOM/MX/83/UADY CV
5 RMH	LCL	CHIAPAS	MHOM/MX/93/INDRE RMH
6 MC	LCL	TABASCO	MHOM/MX/88/HRC MC
7 CTC	LCL	QUINTANA- ROO	MHOM/MX/94/INDRE CTC
8 GBB	LCL	CAMPECHE	MHOM/MX/98/UAC GBB
9 GS	LCD	TABASCO	MHOM/MX/84/SET GS
10 AM	LCD	VERACRUZ	MHOM/MX/92/INDRE AM
11 AG	LCD	VERACRUZ	MHOM/MX/92/INDRE AG
12 HF	LCD	VERACRUZ	MHOM/MX/85/ISET HF
13 FD	LCD	TABASCO	MHOM/MX/93/INDRE FD

* Hospedero/lugar de aislamiento/año de aislamiento/clave

Tabla 2.

Especies de referencia utilizadas en este estudio.

ESPECIE DE REFERENCIA	CODIGO INTERNACIONAL
L.(L.) mexicana	R/BZ/1962/M379
L. (L) venezuelensis	MHOM/VE/80/PMH3
L. (L.) amazonensis	IFLA/BR/67/PH8
L. (V.) panamensis,	MHOM/PA/71/LS94
L. (V.) braziliensis,	MHOM/BR/75/M2903
L. (V.) guyanensis,	MHOM/BR/75/M4147
L. (L.) chagasi	MHOM/BR/74/PP75
L. major	MHOM/SU/73/5-ASKH

Adicionalmente se analizó el tejido de lesiones de 35 pacientes con LCL y LCD, provenientes de distintas regiones endémicas. Todos los pacientes fueron diagnosticados mediante la intradermorreacción de Montenegro, ELISA e improntas de la lesión teñidas con Giemsa. Previo a la toma de biopsias, se informó a los pacientes del procedimiento, se obtuvo su consentimiento por escrito y se siguieron estrictamente los lineamientos establecidos por la Secretaría de Salud, México para la investigación clínica. El estudio fue revisado y aprobado por los comités de ética de los diferentes Servicios de Salud. Bajo condiciones estériles se realizaron pequeñas biopsias con un sacabocados (punch) de 4-6 mm.

Para este estudio también se analizaron tejidos de ratones BALB/c que habían sido infectados con $1x10^6$ promastigotes de las especies *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) venezuelensis* en los cojinetes plantares y que fueron sacrificados después de 3 meses de la infección. Se extrajo el tejido infectado del cojinete plantar.

El tejido de las biopsias se dividió en 3 partes, colocándose un fragmento en medio OCT ("Tissue Freezing Medium for Frozen Tissue Specimens", JUNG), otro en TRIZOL y el tercer fragmento en amortiguador TE (Tris-EDTA). Todos los fragmentos se congelaron a -20°C hasta su utilización para la extracción del DNA.

Purificación del DNA

Se purificó DNA de promastigotes de distintas especies de *Leishmania* en cultivo, de los tejidos de pacientes con LCL y LCD y de tejidos de ratones infectados con distintas especies de *Leishmania*.

Los promastigotes ($1x10^7$) se lavaron dos veces en amortiguador de fosfatos pH 7.5 centrifugando a 2500 x g a 4°C durante 10 min. El DNA se obtuvo mediante la técnica de TRIZOL de InVitroGen, siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA genómico extraído se utilizó para amplificación por PCR.

Para la purificación de DNA de tejidos se utilizaron aproximadamente 25 mg de tejido y se extrajo con un KIT DNeasy tissue (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de oligonucleótidos que permitieran identificar parásitos pertenecientes al género *Leishmania*, se escogieron secuencias de gp63 conservadas en todas las especies. Para el oligonucleótido "forward" se utilizó la secuencia LM9 (5'-GGA CGA GCT CAT GGC GCC-3'), y para el oligonucleótido "reverse" se utilizó la secuencia LM12 (5'- CTG GCA CAC CTC CAC GTA C-3').

Para el diseño de oligonucleótidos que permitieran diferenciar entre las especies pertenecientes al complejo *L. (L.) mexicana*, se utilizaron secuencias del espaciador transcrito interno del rDNA (ITS). Para la amplificación por PCR de la región ITS se utilizó un oligonucleótido IR1, diseñado por Cupolillo et al [5], que corresponde a los 32 nucleótidos finales de las secuencias conservadas de la región 3´de la subunidad pequeña 18S del gene ribosomal (5´-GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT-3´). Para distinguir las diferentes especies, se alinearon las secuencias de la región del ITS de las especies pertenecientes al complejo de *L. mexicana*: *L. (L.) mexicana, L. (L.) amazonensis*, *L (L.) venezuelensis* mediante el programa ClustalW, buscando regiones específicas para cada especie. Se

diseñaron los oligonucleótidos para las distintas especies, utilizando a IR1 como oligonucleótido "forward" para todas las especies del complejo *L. (L.) mexicana* y los oligonucleótidos "reverse" fueron: LM13 (5'-GTGTGTTTTGTGGGGGAGTAGAG-3') para *L. (L.) venezuelensis*, LM15 (5'-CTCTCCTCCCTCGCTTGTC-3') para *L. (L.) amazonensis* y LM17 (5'- CCCCTCTCCTCCTCCCC- 3') para *L. (L.) mexicana*.

Para el diseño de oligonucleótidos que permitieran identificar a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, se utilizaron las secuencias de la gp63 accesibles en GenBank y/o leishmolisine, que fueron alineadas usando el programa ClustalW. Se utilizaron las regiones conservadas dentro de las distintas especies de *L. Viannia*, y se diseñó el oligonucleótido "forward" LM9 (5'-GGA CGA GCT CAT GGC GCC-3'), y para el sentido "reverse" se diseñó LV2 (5'- CAA TGC AGT CAT CCT TTC-3').

Todos los oligonucleótidos utilizados en este estudio se sintetizaron en la Unidad de Biología Molecular, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

PCR de los complejos *L. (L.) mexicana* y *L. (V.) braziliensis*

La reacción de PCR se realizó en 50 µl utilizando la siguiente mezcla de reacción: Tris-HCl 20 mM, pH 8.4; KCl 50 mM, $MgCl_2$1.5 mM, dATP, dCTP, dTTP y dGTP 125 µM; 200 ng de los oligonucelótidos respectivos, 10 ng del DNA genómico, en el caso de promastigotes en cultivo, y 1 U de Taq DNA polimerasa (Gibco BRL). En el caso de DNA de tejidos, se utilizaron 20 µl de extracto de tejidos correspondientes a 50 - 100 ng/µl de DNA, y 1 U de Taq polimerasa (Gibco BRL). Unicamente en el caso de DNA de pacientes con LCL se utilizaron 2.5 U de Taq polimerasa. La amplificación se realizó en un termociclador Perkin-Elmer 2400, bajo diferentes condiciones de amplificación, de acuerdo con los oligonucleótidos usados.

Para IR1/LM13 *L. (L.) venezuelensis*, IR1/LM15 *L. (L.) amazonensis*, LM9/LM12 género *Leishmania*, e LM9/LV2 especies de *Viannia*: 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C. Para IR1/LM17 *L. (L.) mexicana*: 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 65°C y 1 min a 72°C, $MgCl_2$ 3mM. En todos los casos, los ciclos fueron precedidos por un ciclo de 5 min a 95°C.

Además del análisis de especificidad se analizó la sensibilidad de los oligonucleótidos específicos para las especies del complejo *L. (L.) mexicana*, hecha sobre DNA proveniente de promastigotes en cultivo. Para el análisis de la sensibilidad se utilizaron las cantidades de 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg y 1 fg.

Los productos del PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en TAE 1X a 80V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se fotografiaron bajo luz UV.

RESULTADOS

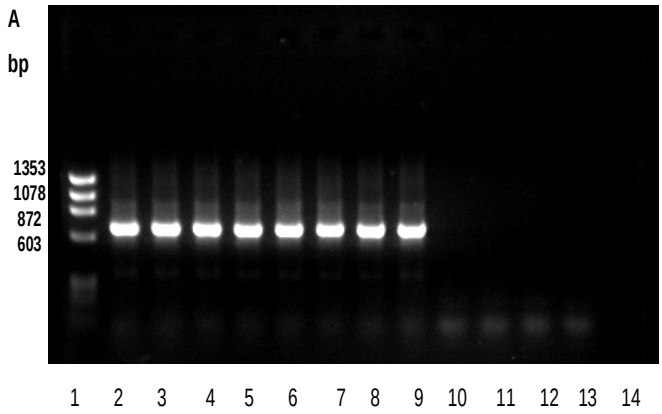
Tipificación de aislados de pacientes:

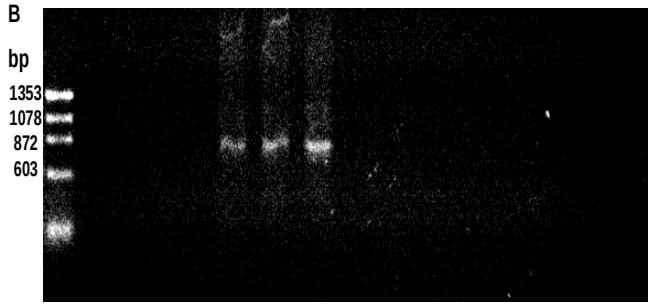
El análisis por anticuerpos monoclonales reveló que todos los aislados mexicanos provenientes de pacientes con LCL y LCD correspondían a *L. (L.) mexicana*.

El producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos LM9/LM12, diseñado para la identificación de parásitos pertenecientes al género *Leishmania*, fue de 682 pb (Fig. 1A) Se obtuvo esta banda en todas las especies de *Leishmania* estudiadas, que incluyeron: *L. (L.) mexicana* en el carril 2, *L. (L.) amazonensis* en el carril 3, *L. (L.) venezuelensis* carril 4, *L. (L.) guyanesis* carril 5, *L. (V.) panamensis* carril 6, *L. (V.) braziliensis* carril 7, *L. (L.) chagasi* carril 8 y *L. major* carril 9. Como controles negativos se utilizaron otros parásitos protozoarios y 2 micobacterias: *T. cruzi* carril 10, *M. tuberculosis* carril 11, *M. leprae* carril 12 y *E. histolytica* carril 13. Como se puede observar en la Figura 1A, únicamente parásitos del género *Leishmania* presentaron una banda correspondiente a 682 pb.

Asimismo, se analizó el producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos LM9/LV2, diseñados para *L. (V.) braziliensis*, encontrando una banda de amplificación correspondiente a 811 pb (Fig. 1B). En este gel se pudo comprobar la especificidad de los oligonucleótidos utilizados, ya que únicamente se observó una amplificación en los carriles correspondientes a *L. (V.) braziliensis*, de los carriles 5 – 7. Las especies analizadas con estos oligonucleótidos fueron las mismas y en el mismo orden que las analizadas para género *Leishmania* observadas en la Fig.1A.

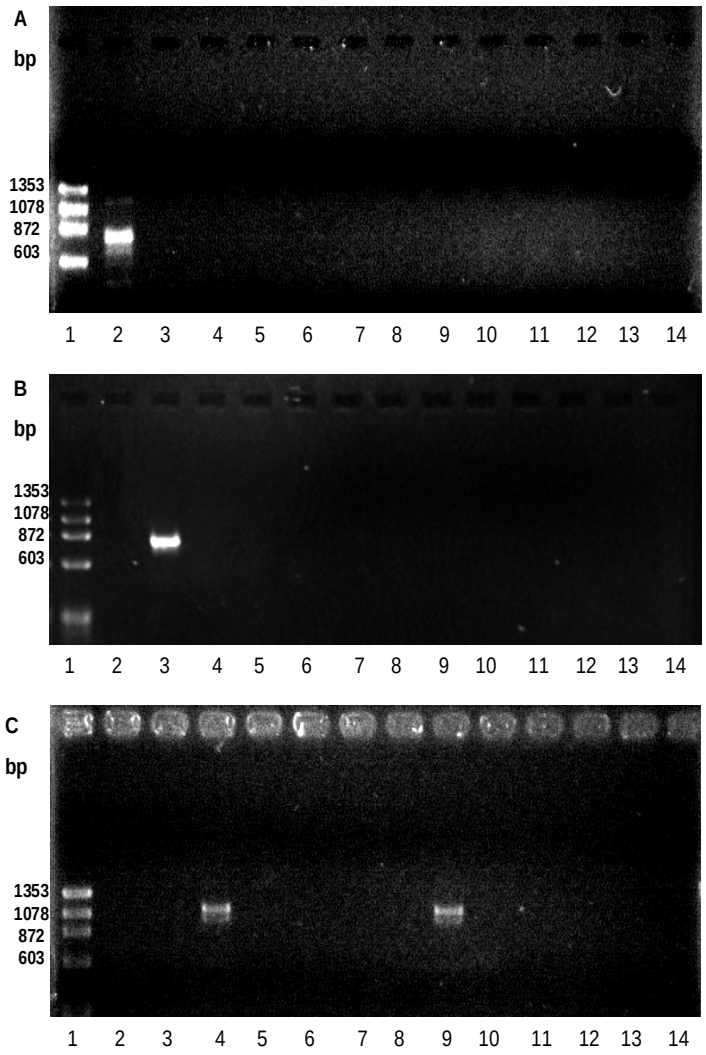
Fig. 1. Especificidad de los oligonucleótidos para:
A) Género *Leishmania* LM9/LM12, B) *Leishmania Viannia* LM9/LV2





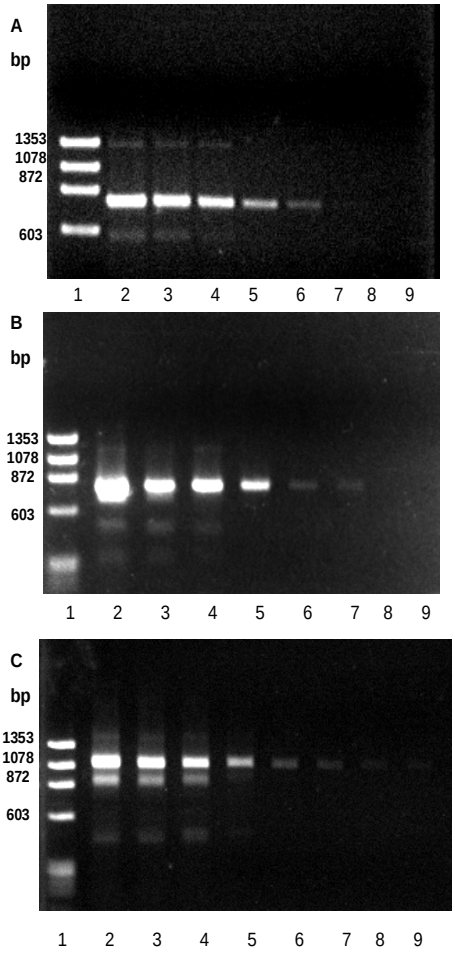
Los oligonucleótidos diseñados para identificar las especies correspondientes al complejo *L. (L.) mexicana* mostraron alta especificidad (Fig. 2). El orden y las características de las muestras analizadas en el gel correspondiente a la Figura 2, son idénticas a las referidas para la Figura 1. El análisis de los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos IR1/LM17, diseñados para *L. (L.) mexicana*, mostraron una banda de amplificación correspondiente a 835 pb, únicamente en el carril 2, correspondiente a *L. (L.) mexicana* (Fig. 2A). Por otro lado, los oligonucleótidos IR1/LM15, diseñados para *L. (L.) amazonensis*, amplificaron una banda correspondiente a 832 pb, únicamente en el carril 3, correspondiente a *L. (L.) amazonensis* (Fig. 2B). Los oligonucleótidos IR1/LM13, diseñados para *L. (L.) venezuelensis*, amplificaron una banda correspondiente a 1150 pb, en el carril 4, correspondiente a *L. (L.) venezuelensis* (Fig. 2C). Interesantemente, también amplificó una banda en el carril 9, correspondiente a L. major. Este resultado confirma la cercanía filogenética entre ambas cepas descrita por Berzunza et al [6]. La región del ITS ha sido utilizada previamente para analizar la filogenia del género *Leishmania* [7].

Fig. 2. Especificidad de los oligonucleótidos para:
A) *Leishmania (L.) mexicana* IR1/LM17, B) *Leishmania (L.) amazonensis* IR1/LM15, y
C) *Leishmania (L.) venezuelensis* IR1/LM13



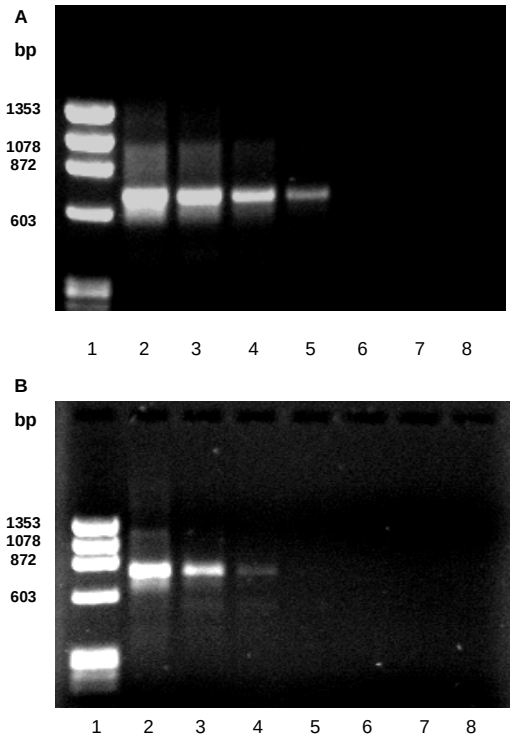
Además del análisis de especificidad se probó la capacidad de detección de los oligonucleótidos específicos para las especies del complejo *L. (L.) mexicana* en DNA obtenido de promastigotes en cultivo (Fig.3). Encontramos que los oligonucleótidos mostraron alta sensibilidad, ya que para *L. (L.) mexicana* se logró detectar hasta 1 pg de DNA (Fig. 3A), mientras que para *L. (L.) amazonensis* se logró detectar hasta 100 fg (Fig. 3B) y para *L. (L.) venezuelensis* hasta 1 fg (Fig. 3C).

Fig. 3. Sensibilidad de los oligonucleótidos para: A) *Leishmania (L.) mexicana* IR1/LM17, B) *Leishmania (L.) amazonensis* IR1/LM15, y C) *Leishmania (L.) venezuelensis* IR1/LM13



También se analizó la sensibilidad de los oligonucleótidos utilizados para la identificación de género LM9/LM12 en la Figura 4A, encontrándose que pueden detectar hasta 10 pg de DNA. Adicionalmente se examinó la sensibilidad de los oligonucleótidos LM9/LV2, encontrándose que detectan hasta 100 pg de DNA de *L. (V.) braziliensis*.

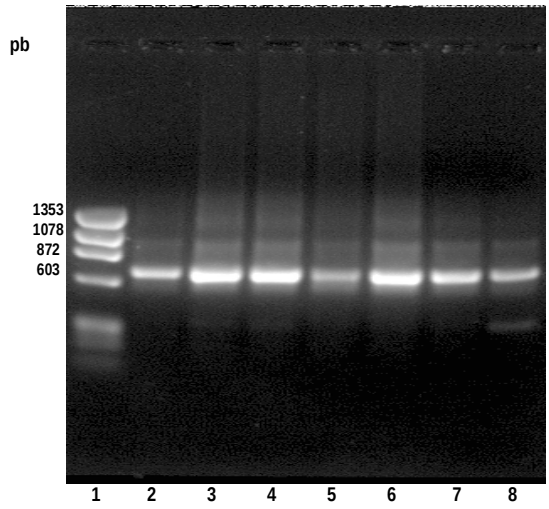
Fig. 4. Sensibilidad de los oligonucleótidos para:
A) Género *Leishmania* LM9/LM12, y B) *Leishmania Viannia* LM9/LV2



Además de analizar los oligonucleótidos en promastigotes en cultivo de distintas especies de *Leishmania*, se investigaron los oligonucleótidos específicos para género *Leishmania* en tejidos de pacientes con LCL y LCD infectados con *L. (L.) mexicana* y un paciente con LCL, proveniente de Brasil e infectado con *L. (V.) braziliensis*. Se examinaron tejidos congelados en OCT y en amortiguador TE.

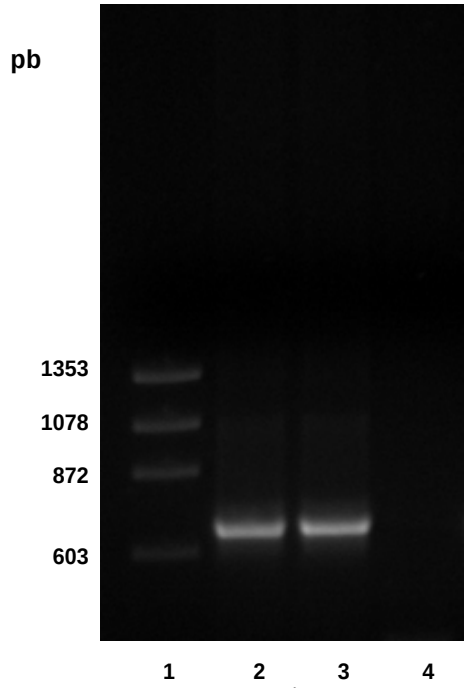
Encontramos que tanto en tejido congelado en OCT como en amortiguador TE se logra amplificar la banda de 682 pb, correspondiente al género *Leishmania* en los 3 grupos de pacientes (Fig. 5). En la Figura 5, observamos las amplificaciones correspondientes a pacientes infectados con *L. (L.) mexicana* con el cuadro clínico de LCL en los carriles 2 (tejido congelado en OCT) y 5 (tejido fijado en TE) y con el cuadro clínico de LCD en los carriles 3 (tejido fijado en OCT) y 6 (tejido fijado en TE). Adicionalmente, observamos las amplificaciones correspondiente al tejido del paciente infectado con *L. (V.) braziliensis* en los carriles 4 (fijado en OCT) y 7 (fijado en TE). El DNA del parásito *L. (L.) mexicana* se observa en el carril 8. Como se puede observar, ambos métodos de fijación son buenos para lograr la detección de DNA de parásitos del género *Leishmania*.

Fig. 5. Electroforesis de distintas muestras de DNA obtenidas de tejido congelado (OCT y TE), de pacientes infectados con *L. (L.) mexicana* y *L. Viannia*, amplificados con los oligonucleótidos para género *Leishmania*: LM9/LM12



También se analizó una biopsia de bazo de un paciente con leishmaniasis visceral, infectado con *L. (L.) chagasi*, mediante los oligonucleótidos LM9/LM12, diseñados para identificar el género *Leishmania* y que amplifican una banda de 682 pb (Fig. 6). En este caso, el tejido utilizado no estuvo congelado. Se observa que el tejido del paciente con leishmaniasis visceral (carril 3) amplifica la misma banda obtenida de un paciente infectado con *L. (L.) mexicana* (carril 2).

Fig. 6. Electroforesis de DNA de paciente con LV, amplificado con oligonucleótidos específicos para género *Leishmania*: LM9/LM12



Estudiamos si era posible utilizar los oligonucleótidos en tejido fijado en formol e incluido en parafina y encontramos que ninguno de los oligonucleótidos funcionó en tejido incluido en parafina.

En las siguientes tablas se compara la eficiencia de los oligonucleótidos utilizados en los tejidos. En la tabla 3, se muestra el análisis de los oligonucleótidos IR1/LM17, específicos para la especie *L. (L.) mexicana*. Encontramos que la eficiencia para detectar *L. (L.) mexicana* en el tejido de un paciente con LCL es menor en tejido fijado en OCT, que en tejido fijado en TE, ya que en el primer caso es de 72.7% y el segundo caso es de 100%, respectivamente.

Tabla 3.

Eficiencia del PCR con los oligonucleótidos para *L. (L.) mexicana*: IR1/LM17

	PARÁSITOS	OCT LCL	OCT LCD	OCT SANOS	TE LCL	TE LCD	TE SANO
No. DE CASOS	13 AISLADOS 1 CEPA DE REFERENCIA	8	10	13	1	4	2
EFICIENCIA %	100	72.7	100	100	100	100	100

El análisis de la eficiencia de los oligonucleótidos LM9/LM12, para el género *Leishmania* demostró que la eficiencia de detección del género es igual para ambas formas de congelamiento (Tabla 4).

Tabla 4.

Eficiencia del PCR con los oligonucleótidos para género *Leishmania*: LM9/LM12

	PARÁSITOS	OCT LCL	OCT LCD	OCT SANOS	TE LCL	TE LCD	TE SANO
No. DE CASOS	13 AISLADOS 8 CEPAS DE REFERENCIA	12	10	13	2	4	2
EFICIENCIA %	100	100	100	100	100	100	100

El análisis de la eficiencia de los oligonucelótidos LM9/LV2, específicos para *L. (V.) braziliensis*, mostró que detectan DNA del parásito al mismo grado, independientemente de la forma de congelación del tejido (Tabla 5).

DISCUSIÓN

En este trabajo diseñamos oligonucleótidos que permiten tres tipos de diagnóstico: identificar el género *Leishmania*, diferenciar entre los complejos *L. (L.) mexicana* y *L. (V.) braziliensis* y diferenciar entre especies pertenecientes al complejo *L. (L.) mexicana*. El diseño de oligonucleótidos que permitieran esta distinción es importante para México, ya que se han detectado algunos casos con *L. (V.) braziliensis* en el sureste del país. Adicionalmente es importante debido a que en algunas zonas endémicas, los pacientes presentan lesiones de difícil tratamiento. En un trabajo previo [8] analizamos la posibilidad de polimorfismos genéticos que pudieran estar relacionados con la cronicidad de las lesiones en algunos pacientes. Sin embargo, otra posibilidad es la introducción de nuevas especies al país, que no han sido detectadas por falta de herramientas diagnósticas apropiadas. Los oligonucleótidos diseñados en este estudio son altamente específicos, ya que únicamente amplificaron el DNA de las especies para las cuales fueron diseñadas.

Un hallazgo interesante fue que los oligonucleótidos diseñados para *L. (L.) venezuelensis* también amplificaron *L. major* (Fig. 2). En un trabajo previo [6] encontramos una cercanía filogenética entre ambas especies. En ese trabajo se había analizado el polimorfismo del ITS en ambas especies y la secuencia de esta región reveló una identidad casi total entre ambas cepas. Se había descartado la posibilidad de contaminación mediante el análisis del DNA de kinetoplasto de ambas cepas con distintas endonucleasas de restricción. El hecho de que los oligonucleótidos diseñados para identificar a *L. (L.) venezuelensis* también identifican a *L. major* no representa un problema diagnóstico, ya que esta última especie no existe en nuestro país.

La alta sensibilidad y especificidad de los oligonucleótidos también se conservó en el análisis de los tejidos infectados y congelados, ya que permitió detectar el DNA de parásitos tanto en tejidos de pacientes con LCL como LCD, los cuales varían importantemente en el número de parásitos que se encuentran en las lesiones. En tejidos lesionados de pacientes con LCL ocasionalmente es imposible detectar parásitos, lo cual puede llevar a falsos negativos si se realiza un diagnóstico basado únicamente en la impronta. En cambio, en pacientes con LCD, generalmente se encuentran abundantes parásitos, fácilmente identificables por la impronta. Por esta razón es particularmente importante contar con más herramientas diagnósticas de alta sensibilidad y especificidad en pacientes con LCL, ya que permite identificar pequeñas cantidades de DNA del parásito y, adicionalmente, permite identificar la especie.

Aunque estos oligonucleótidos no permiten identificar directamente a *L. (L.) chagasi*, el diagnóstico de leishmaniasis visceral sería posible mediante la combinación de los oligonucleótidos desarrollados en este trabajo. Para lograr lo anterior, sería necesario realizar dos PCRs: en el primer PCR se identificaría el género y en el segundo se descartaría la infección por *L. (L.) mexicana* y *L. (V.) braziliensis*.

El desarrollo de estos oligonucleótidos permitirá optimizar el tratamiento de los pacientes. Además permitirá realizar un estudio epidemiológico molecular, tanto de los pacientes infectados con distintas especies, como de los vectores infectados y de los reservorios de las distintas especies de Leishmania en nuestro país. Esto permitirá identificar a los vectores que transmiten las distintas especies y, posiblemente, permita optimizar el control de la leishmaniasis.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo técnico de la Dra. Norma Salaiza Suazo, la M. en C. Rocely Cervantes Sarabia, y Marco Elias Gudiño. El trabajo en modelos animales fue apoyado por el M.V.Z. Daniel Sánchez Almaraz. Agradecemos a Lucía Alvarez Trejo por su apoyo secretarial.

El trabajo fue apoyado por los donativos IN231602 de DGAPA y 47256 de CONACyT.

BIBLIOGRAFÍA

1. Herwaldt BL. Leishmaniasis. The Lancet. 1999; 354:1191-1199.
2. Sánchez-Tejeda G, Rodríguez N, Parra CI, Hernández-Montes O, Barrer DC, Monroy-Ostria A. Cutaneous leishmaniasis caused by members of Leishmania braziliensis complex in Nayarit, State of Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96:15-19.
3. Hernandez-Montes O, Monroy-Ostria A, McCann S, Barker DC. Identification of Mexican Leishmania species by analysis of PCR amplified DNA. Acta Tropica. 1998; 71:139-153.
4. Navin TR, Arana BA, Arana FE, Berman JD, Chajon JF. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Penstostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. J Infect Dis. 1992;165:528-534.
5. Cupolillo E, Grimaldi Jr GM, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania. Mol Biochem Parasitol. 1995;73:145-155.
6. Berzunza-Cruz, M, Cabrera, N, Crippa-Rossi, M, Perez-Montfort, R, Becker, I. Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of Leishmania mexicana. Parasitol Res. 2002;88:18-925.
7. Dávila AMR, Momen H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within Leishmania. Ann Trop Med Parasitol. 2000;94:651-654.
8. Berzunza-Cruz M, Bricaire G, Zuluoaga Romero S, Pérez-Becker R, Saavedra-Lira E, Pérez-Montfort R, Crippa-Rossi M, Velasco-Castrejón O, Becker I. Leishmania mexicana mexicana: genetic heterogeneity of mexican isolates using restriction length polymorphism analysis of kinetoplast DNA. Exp Parasitol. 2000;95:277-284.

Pies de Figuras

Fig. 1. Electroforesis de geles de agarosa que muestran los productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos específicos para: A) Género *Leishmania* LM9/LM12, carril 1: Marcador, ΦX174 RF DNA/Hae III; carril 2: *L. (L.) mexicana*; carril 3: *L. (L.) amazonensis*; carril 4: *L. (L.) venezuelensis*; carril 5: *L. (V.) guyanensis*; carril 6: *L. (V.) panamensis*; carril 7: *L. (V.) braziliensis*; carril 8: *L. (L.) chagasi*; carril 9: *L. major*; carril 10: *Trypanosoma cruzi*; carril 11: *M. tuberculosis*; carril 12: *M. leprae*; carril 13: *E. histolytica*; carril 14: agua. B) *Leishmania Viannia* LM9/LV2, mismo orden.

Fig.2. Electroforesis de geles de agarosa que muestran los productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos específicos para: A) *Leishmania (L.) mexicana* IR1/LM17, carril 1: Marcador, ΦX174 RF DNA/Hae III; carril 2: *L. (L.) mexicana*; carril 3: *L. (L.) amazonensis*; carril 4*: L. (L.) venezuelensis*; carril 5: *L. (V.) guyanensis*; carril 6: *L. (V.) panamensis*; carril 7: *L. (V.) braziliensis*; carril 8: *L. (L.). chagasi*; carril 9: *L. major*; carril 10: *Trypanosoma cruzi*; carril 11: *M. tuberculosis*; carril 12: *M. leprae*; carril 13: *E. histolytica*; carril 14: agua. B) *Leishmania (L.) amazonensis* IR1/LM15, mismo orden y C) *Leishmania (L.) venezuelensis* IR1/LM13, mismo orden.

Fig. 3. Geles de agarosa que muestran la sensibilidad de los oligonucleótidos para: A) *Leishmania (L.) mexicana* IR1/LM17, carril 1: Marcador, ΦX174 RF DNA/Hae III; carril 2: 10ng; carril 3: 1ng; carril 4: 100pg; carril 5: 10pg; carril 6: 1pg; carril 7: 100fg; carril 8: 10fg; carril 9: 1fg. B) *Leishmania (L.) amazonensis* IR1/LM15, mismo orden y C) *Leishmania (L.) venezuelensis* IR1/LM13, mismo orden.

Fig. 4. Geles de agarosa que muestran la sensibilidad de los oligonucleótidos para: A) Género *Leishmania* LM9/LM12, carril 1: Marcador, ΦX174 RF DNA/Hae III; carril 2: 10ng; carrril 3: 1ng; carril 4: 100pg; carril 5: 10pg; carril 6: 1pg; carril 7: 100fg; carril 8: 10fg. B) *Leishmania Viannia* LM9/LV2 mismo orden.

Fig. 5. Electroforesis de distintas muestras de DNA obtenidas de tejido y amplificados con los oligonucleótidos para género *Leishmania*: LM9/LM12. Carril 1: Marcador, ΦX174 RF DNA/Hae III; carril 2: paciente LCL infectado con *L. (L.)* mexicana/OCT; carril 3: paciente LCD infectado con *L. (L.) mexicana*/OCT; carril 4: paciente LCL infectado con *L. Viannia*/OCT; carril 5: paciente LCL infectado con *L. (L.) mexicana*/TE; carril 6: paciente LCD infectado con *L. (L.) mexicana*/TE; carril 7: paciente LCL infectado con *L. Viannia*/TE; carril 8: parásitos *L. (L.) mexicana* en cultivo.

Fig. 6. Electroforesis de DNA de paciente con LV, amplificado con oligonucleótidos específicos para género *Leishmania*: LM9/LM12. Carril 1: Marcador, ΦX174 RF DNA/Hae III; carril 2: control positivo *L. (L.) mexicana*; carril 3: paciente LV; carril 4: agua.

Sobre los autores:

Berzunza-Cruz Miriam[1], Padilla Alejandro[2], Pérez-Montfort Ruy[3], Becker Ingeborg[1].

[1]Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Hospital General de México, Dr. Balmis 148, 06726 México D.F., México

[2]Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UNAM, México 04510 D.F., México

[3]Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México 04510 D.F., México

MBC: mbcmp@servidor.unam.mx

APT: padillaj @servidor.unam.mx

RPM: ruy@ifc.unam.mx

IB: becker@servidor.unam.mx

Avanços dos Estudos Moleculares de *Leishmania* (*Leishmania*) *Chagasi* Aplicados ao Diagnóstico de LV no Brasil

Dra. Elisa Cupolillo

Pesquisadora Titular

Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Av. Brasil 4365, Pav. Leônidas Deane 5509 - Manguinhos
CEP: 21045-900 - Rio de Janeiro, RJ
Tel: (21) 3865 8177 - Fax (21) 2209 4110 - ecupoli@ioc.fiocruz.br

---

ABREVIATURAS

LV: Leishmaniose visceral, PCR: Polymerase Chain Reaction; mkDNA: minicírculo do DNA do cinetoplasto; nDNA: DNA nuclear; RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism; ITSrDNA: Espaçadores internos transcritos do lócus DNA ribosômico; RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA.

A Leishmaniose visceral (LV) é uma das formas clínicas classificadas dentro do espectro de manifestações observado nas leishmanioses, doença esta causada por parasitas classificados dentro do gênero *Leishmania*, presente em praticamente todas as regiões do globo.

A LV está presente nos quatro continentes, apresentando uma estimativa de incidência anual de 500.000 casos1. A grande maioria dos casos tem sido relatada em regiões do leste Africano, Índia e Brasil. No entanto, independente da região afetada, o parasita associado a esta manifestação clínica tem sempre sido classificado dentro do complexo Leishmania donovani, que está representado pelas espécies *L. (Leishmania) donovani*, *L. (L.) archibaldi*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, esta última sendo uma sinonímia de *L. (L.) infantum* e que representa apenas parasitas que circulam nas Américas[2].

Nas várias formas das leishmanioses, as características clínicas e epidemiológicas na maioria das vezes não são específicas, se confundindo com outras patologias. Por isso, o diagnóstico laboratorial é necessário para confirmar a suspeita clínica. Diversas ferramentas têm sido propostas como métodos laboratoriais que auxiliam no diagnóstico das leishmanioses, no entanto o método "ouro" ainda é a demonstração e o isolamento do parasito. No caso da LV a demonstração do parasito e o isolamento são geralmente feitos em aspirados do baço ou de medula óssea, tendo sido demonstrada uma maior sensibilidade quando aspirado de baço é utilizado; no entanto, esta abordagem oferece uma série de riscos. Ocasionalmente, amastigotas tem sido visualizadas em biópsias de fígado, aspirados de linfonodos e esfregaços do creme leucocitário, particularmente em casos de co-infecção *Leishmania*-HIV. No entanto, o uso destes métodos na investigação epidemiológica tem sido discutido, considerando que estes são muito invasivos e pouco sensíveis para detectar o parasito no caso de infecção oculta ou subclínica. Por isso, métodos indiretos de detecção do parasito têm sido desenvolvidos e aplicados como ferramentas auxiliares no diagnóstico da LV. Entre estes, destacamos os métodos sorológicos e moleculares, baseados na técnica de PCR.

O fato de que (i) a análise histopatológica e o isolamento/cultivo dos parasitos estão limitados pela baixa sensibilidade, além de produzirem resultados com certa demora, e de que (ii) os métodos imunológicos falham na distinção entre infecções passadas ou atuais, além de serem inapropriados para avaliar a infecção em pacientes imunocomprometidos, diversos pesquisadores começaram a desenvolver métodos moleculares visando a detecção de ácidos nucléicos. Entre estes, os métodos empregando a técnica de PCR tem demonstrado alta sensibilidade acoplada a especificidade. Estes métodos representam o ponto central desta discussão e serão abordados a seguir.

MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LV – ALGUNS COMENTÁRIOS

A biologia molecular está se tornando extremamente relevante para o diagnóstico e controle das doenças infecciosas. Informações sobre seqüências de DNA têm sido extensamente exploradas para o desenvolvimento de métodos baseados na técnica de PCR[3] para as várias aplicações no conhecimento do parasito e da doença. Diversos métodos empregando ácidos nucléicos têm sido desenvolvidos. Entretanto, entre os maiores avanços dos métodos moleculares, a amplificação por PCR deve ser destacada visto as inúmeras contribuições que os métodos baseados nesta metodologia trouxeram para o campo do diagnóstico e controle das leishmanioses. Com o desenvolvimento da PCR, inúmeras metodologias para detecção e identificação de Leishmania começaram a ser propostas[4] e bastante utilizadas como ferramenta complementar ao diagnóstico da LV humana e canina, se apresentando como uma alternativa promissora, visto que esta metodologia combina a alta sensibilidade e especificidade, com o fato de que pode ser aplicada diretamente a amostras de tecidos diversos, de uma forma bastante rápida, principalmente quando comparada com outras metodologias[5,6,7,8].

Os primers desenhados para amplificar seqüências alvos com cópias múltiplas, permitem uma maior sensibilidade na detecção da infecção. Entre estas é importante destacar as regiões do minicírculo de kDNA (mkDNA) de Leishmania[9,10]. Diferentes primers desenhados para amplificar mkDNA tem mostrado maior sensibilidade quando comparados com primers direcionados para amplificação de regiões do nDNA, mesmo quando representam seqüências repetitivas11. Além disso, primers desenhados visando a amplificação de regiões conservadas do mkDNA, específicas ou não para o complexo L. donovani, são mais sensíveis do que aqueles direcionados para amplificar especificamente fragmento da região variável de espécies do complexo L. donovani[11].

Diversos estudos demonstraram que por PCR é possível detectar parasitas algumas semanas antes de aparecerem os sintomas clínicos[12,13,14]. Recentemente, foi demonstrado que a PCR mkDNA detectou parasitas em uma proporção considerável de indivíduos assintomáticos[14]. Para o diagnóstico da LV, aspirado de medula óssea e de linfonodo, biópsia de pele, exudato de pele e amostras de sangue tem sido usadas em diversos estudos empregando PCR[15,16,17,18]. A especificidade da PCR em aspirado de medula óssea pode chegar a 100%[14] e a sensibilidade entre 80-93.3%, comparando com 50-60% quando se considera lâminas ou culturas[7]. No entanto, uma das grandes vantagens de realizar o diagnóstico laboratorial da LV empregando métodos baseados na PCR é o fato de não ser necessário utilizar métodos invasivos, como a biópsia de medula óssea, punção de baço, aspirado de linfonodo, biópsia de fígado ou mesmo grande volume de sangue, para a obtenção de material para análise. Já foi demonstrado que é possível realizar PCR usando pequeno volume de sangue adsorvido em papel de filtro[18].

A PCR tem sido mais utilizada no diagnóstico da LV canina do que na LV humana. Uma das conclusões importante destes trabalhos está relacionada com o tipo de amostra a ser testada, onde tem sido demonstrado que sangue, linfonodo e pele são apropriados para as análise de PCR direcionadas para a amplificação de mkDNA, com a sensibilidade aumentando nesta ordem. No entanto, quando animais clinicamente saudáveis são avaliados, a sensibilidade da PCR é significantemente maior quando se utiliza DNA extraído da pele do animal[19].

APLICAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LV NO BRASIL – ALGUNS COMENTÁRIOS

Em contraste com os 230 trabalhos que aparecem quando acessamos o PubMed indicando como pesquisa "visceral leishmaniasis and PCR", somente 26 são listados quando adicionamos "Brazil" ao termo de pesquisa. De forma grosseira, isto indica o número pequeno de trabalhos que estão sendo conduzidos na tentativa de entender a validade dos métodos moleculares para o diagnóstico da LV no Brasil e também para a compreensão de diversos aspectos epidemiológicos da LV nas diversas áreas endêmicas do país.

Com primers direcionados para a amplificação da região conservada do minicírculo do kDNA de Leishmania, associando com a hibridação com sonda específica para *L. (L.) chagasi*, foi possível demonstrar uma alta sensibilidade (83.5%) quando utilizou-se amostras de sangue adsorvidas em papel de filtro[18]. Uma sensibilidade de 91% já havia sido demonstrada quando a PCR foi realizada com DNA extraído de sangue de pacientes desta mesma área endêmica[20]. Foi demonstrado a positividade para *L. (L.) chagasi* por PCR quando analisou-se amostras de sangue de doadores saudáveis

vivendo em área endêmica de LV, indicando a necessidade de implementação de metodologias direcionadas para detecção de Leishmania para avaliar sangue de doadores[12]. No entanto, este estudo empregou a PCR mkDNA 120pb acoplada a hibridação com sonda específica para a *L. (L.) chagasi*, metodologia esta que ainda não possui os devidos testes de sensibilidade para detectar a infecção em casos assintomáticos, embora já tenham sido descritas PCR positivas para pacientes assintomáticos de áreas endêmicas no Brasil[21].

De fato, os estudos empregando métodos moleculares para o diagnóstico da LV precisam ser sistematizados para que a validade destes seja devidamente acessada.

IDENTIFICAÇÃO DE Leishmania (L.) chagasi

A *L. (L.) chagasi*, no Novo Mundo, é aparentemente o único agente etiológico da LV e está agrupada dentro da Seção Euleishmania, no complexo *L.donovani*[22,23], que é constituído por[22]: *L. (L.) donovani*; *L. (L.) infantum*; *L. (L.) archibaldi* e *L. (L.) chagasi*. No entanto, alguns trabalhos realizados em áreas endêmicas de LV nas Américas demonstraram que esta manifestação clínica das leishmanioses também pode ser causada, mesmo que esporadicamente, por outras espécies de Leishmania, como *L. (L.) amazonensis*[24] e *L. colombiensis*[25], indicando a necessidade da identificação do parasito associado ao quadro da LV para um melhor entendimento da epidemiologia da doença e aplicações das medidas de controle, principalmente em áreas emergentes. Da mesma forma, a identificação de *L. (L.) chagasi* associada a lesões cutâneas[26,27] indica a necessidade de identificação do parasita sempre que for possível.

Dados da literatura indicam que há uma semelhança entre os isolados de *L.(L.) chagasi* do Novo Mundo e a *L. (L.) infantum*[28,29]. Estudos anteriores realizados no nosso laboratório mostram que *L. (L.) chagasi* é idêntica, quando analisadas por eletroforese de isoenzimas, a um determinado zimodema de *L. (L.) infantum* que circula na Bacia do Mediterrâneo, sugerindo que este zimodema tenha sido importando durante a colonização das Américas e se adaptado com sucesso às condições encontradas no Novo Mundo para a transmissão deste parasita[30]. Todos os resultados divulgados na literatura têm demonstrado que estas espécies constituem um mesmo complexo e não existem dúvidas quanto a alta similaridade genética entre elas[2, 31]. Por isso, cada vez mais tem sido considerado por diferentes autores que *L. (L.) chagasi* é uma sinonímia de *L. (L.) infantum*, onde a *L. (L.) chagasi* representa parasitas relacionados a LV nas Américas.

Embora poucos estudos tenham sido realizados examinando a estrutura genética da população de *L. (L.) chagasi*, tem sido descrito que, aparentemente, não existe variação genética entre isolados desta espécie do parasita e todos têm sido caracterizados como idênticos à cepa de referência, que está classificada no zimodema 1 (IOC/Z1 = MON1). No entanto, em um estudo recente observamos que alguns isolados de *L.(L.) chagasi* examinados embora tenham apresentado o mesmo perfil da cepa de referência desta espécie para praticamente todas as enzimas ensaiadas (n=17), este perfil foi diferente no locus 6PGDH. O eletromorfo observado para a cepa de referência de *L. (L.) chagasi* apresentou uma migração eletroforética mais lenta do que o eletromorfo observado para alguns isolados, indicando que existem pelo menos dois zimodemas de *L. (L.) chagasi* circulando em áreas endêmicas do Brasil. No entanto, não foi possível correlacionar a identificação destes zimodemas com a sua origem geográfica (dados não publicados).

Observamos também que a caracterização molecular de isolados de *L. (L.) chagasi* realizadas pelos métodos de PCR-RFLP ITSrDNA e PCR-RFLP GP63 demonstram um perfil de restrição homogêneo entre as amostras, corroborando com o que já foi discutido acima sobre a similaridade genética observada neste grupo de parasitos. A análise dos perfis obtidos pela digestão dos ITSrDNA pela enzima de restrição FspI corrobora o que foi observado por isoenzimas. Os marcadores RAPD indicam a existência de polimorfismo genético entre os isolados de *L. (L.) chagasi* analisados, mas até o momento não existe correlação entre os perfis e dados clinico-epidemiológicos. As análises indicam que existe uma dispersão aleatória de diferentes clones do parasita na natureza. Os principais processos responsáveis pela variabilidade genética entre indivíduos da mesma espécie são as mutações e os fluxos gênicos. Considerando que *Leishmania* é um parasito que se reproduz principalmente de forma clonal, o mecanismo preferencialmente envolvido na produção de diversidade genética seria o das mutações. As mutações são alterações espontâneas ou induzidas no material genético de um organismo e, portanto, são herdáveis. As alterações causadas nos

genes em decorrência das mutações podem interferir na sua função, alterando a expressão ou a seqüência de aminoácidos da proteína codificada.

Resultados recentes obtidos pelo nosso grupo analisando isolados de *L.(L.)chagasi*, comprovaram a semelhança significativa que há entre esta espécie e *L.(L.) donovani*, como já evidenciado em estudos no padrão de reatividade monoclonal e até mesmo por eletroforese de enzimas ou outros marcadores moleculares[2,29,30,32,33].

COMENTÁRIOS FINAIS

Embora tenha sido discutido o uso de métodos visando a visualização e isolamento do parasito nos casos de LV, estas abordagens ainda são sem dúvida fundamentais para comprovar o diagnóstico laboratorial da doença. Provavelmente por isso, algumas pesquisas também têm sido realizadas objetivando o desenvolvimento ou aprimoramento de metodologias para estes fins. Recentemente, foi demonstrado que o cultivo em micro-capilar apresenta uma alta sensibilidade para o isolamento de parasitas de pacientes com manifestações clínicas de LV[34]. Realizando o isolamento desta forma, os parasitos podem ser identificados (determinação da espécie) e até mesmo genotipados, aplicando um dos diversos métodos moleculares disponíveis que estão descritos na literatura. Recentemente foi demonstrado que, fazendo-se o isolamento em micro-capilar, em um período de uma semana os resultados finais podem ser obtidos[35]. No entanto, desta forma os métodos de isolamento utilizando-se tecidos apropriados continua sendo necessário.

Certamente, considerando os resultados obtidos com pacientes suspeitos de LV em Belo Horizonte, Minas Gerais, o uso de papel de filtro embebido com sangue dos pacientes examinados, pode ser uma alternativa a qualquer tipo de coleta de material. É importante ressaltar que o mesmo grupo usou a mesma metodologia para identificar animais silvestres infectados com espécies de *Leishmania*, incluindo *L. (L.) chagasi*. De fato, embora promissores, um maior número de estudos se faz necessário para comprovar a eficiência da metodologia.

Embora o diagnóstico laboratorial seja realmente indicado para confirmar os casos suspeitos de LV, é importante mencionar que os testes diagnósticos devem ser avaliados quando a sua capacidade em detectar os casos assintomáticos de LV; neste caso a inclusão dos cães no inquérito epidemiológico é crucial para o controle da disseminação da doença no país. Além disso, mesmo considerando que os diversos resultados obtidos com métodos baseados na PCR indiquem o potencial desta abordagem para o diagnóstico da LV, ainda estamos distante de ter o método mais eficiente e padronizado para o uso rotineiro no diagnóstico da doença. Outro aspecto importante está relacionado ao fato de que os métodos propostos para o diagnóstico da LV, até então, indicam infecção por *Leishmania*, resultado este que associado as características clinicas-epidemiológicas finalizam o diagnóstico. Algumas metodologias conseguem determinar que a espécie de *Leishmania* associada com a infecção pertence ao complexo *L. donovani*. No entanto, os resultados com marcadores mais discriminativos são ainda insipientes, dificultando o uso destes em estudos epidemiológicos mais detalhados, onde a genotipagem do parasita se torna essencial. Neste caso, da mesma forma que devemos considerar a visualização ou isolamento do parasita como o método "ouro" no diagnóstico laboratorial da LV, a eletroforese de enzimas tem sido considerada como o método "ouro" para a caracterização da espécie de *Leishmania*[36,37], devendo esta ser realizada sempre que for possível isolar e manter o parasita em cultura.

O alto grau de similaridade genética entre as espécies classificadas dentro do complexo *L. donovani* indica que métodos moleculares desenvolvidos e aplicados no diagnóstico da LV em regiões do Velho Mundo podem ser empregados nas diversas áreas endêmicas das Américas.

Finalmente, não podemos deixar de considerar os resultados falso-positivos e a contaminação nos ensaios de PCR. Esta preocupação aumenta quando observamos que os dados da literatura indicam que as abordagens direcionadas para a amplificação de regiões do kDNA de *Leishmania* são as que apresentam maior sensibilidade, visto que esta molécula já está naturalmente amplificada (10.000 cópias/genoma). Embora a utilidade da PCR não seja discutida, a acurácia dos resultados depende da consciência do pesquisador/técnico com relação aos fatores de risco que geram contaminação e ainda do uso apropriado dos procedimentos de prevenção das possíveis contaminações[38].

Sem dúvida muitos métodos moleculares para o diagnóstico da LV vêm sendo propostos, mas os estudos ainda encontram-se na fase de pesquisa e esperam avaliações futuras em estudos epidemiológicos para poderem ser aplicados como ferramenta auxiliar ao diagnóstico clínico.

AGRADECIMENTOS

Todos os projetos de pesquisa conduzidos pelos autores recebem apoio financeiro do Instituto Oswaldo Cruz /FioCruz, CNPq e FAPERJ.

REFERÊNCIAS

1. Desjeux P. Leishmaniasis public health and control. Clin Dermatol. 1996; 14:417-423.
2. Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol Today. 2000; 16:188-189.
3. Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 1985; 230:1350-1354.
4. Degrave W, Fernandes O, Campbell D et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89:463-469.
5. Ashford DA, Bozza M, Freire M et al. Comparison of the PCR and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1990; 53:251-255.
6. Osman OF, Oskam L, Zijlstra E et al. Use of the polymerase chain reaction to assess the success of visceral leishmaniasis treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1998; 92: 397-400.
7. Tavares CAP, Fernandes AP, Melo MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. Expert Rev Mol Diagn. 2003; 3:657-667.
8. Singh S, Dey A, Sivakumar R. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. Expert Rev Mol Diagn. 2005; 5:251-265
9. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Exp Parasitol. 1990; 71:267-275.
10. Cortes S, Rolão N, Ramada J et al. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. – specific kinetoplast primers. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004; 98:12-17.
11. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2002; 40:210-215.
12. Otero AC, da Silva VO, Luz KG et al. Occurence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. Am J Trop Med Hyg. 2000; 62:128-131.
13. Gannavaram S, Ansari NA, Kataria J et al. Nested PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in slit aspirates from post-kalazar dermal leishmaniasis lesions. J Clin Microbiol. 2004; 42: 1777-1778.
14. Martin-Sanchez J, Pineda JA, Morillas-Marquez F et al. Detection of Leishmania infantum kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. Am J Trop Med Hyg. 2004; 70:545-548.
15. Chiurillo MA, Sachdeva M, Dole VS et al. Detecting of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in the Old and New Worlds by a polymerase chain reaction assay based on telomeric sequences. Am J Trop Med Hyg. 2001; 65:573-582.
16. Pizzuto M, Piazza M, Senese D, et al. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients co-infected with human immunodeficiency virus Type 1. J Clin Microbiol. 2001; 39:357-361.
17. Schallig HD, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. Trop Med Int Health. 2002; 7:641-651.

18. Da Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, et al. Diagnosis of human visceral leishmaniais by PCR using blood simples spotted on filter paper. Genet Mol Res. 2004; 3:251-257.

19. Manna L, Vitale F, Reale S et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. Vet Parasitol. 2004; 125:251-262.

20. Disch J, Maciel FC, de Oliveira MC et al. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection.Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003; 97:391-395.

21. Costa CH, Stewart JM, Gomes RB. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg. 2002; 66:334-337.

22. Lainson, R. and Shaw, J. J. Evolution, classification and geographic distribution. The Leishmaniases in Biology and Epidemiology. 1987. vol. I pp 1-120, Academic Press.

23. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes HN et al. A revised classification for *Leishmania* and Endotrypnaum. Parasitol Today. 2000; 16:142-144.

24. Barral A, Badaro R, Barral-Neto M et al. Isolation of *Leishmania mexicana* amazonensis from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1986;35:732-734.

25. Rodríguez-Bonfante C, Bonfante-Garrido R, Grimaldi G et al. Genotypically distinct *Leishmania colombiensis* isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. Infect Genet Evol. 2003;3:119-124.

26. Oliveira-Neto M, Grimaldi G, Momen H et al. Active cutaneous leishmaniasis in Brazil, induced by *Leishmania donovani chagasi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986;81:303-309.

27. Ponce C, Ponce E, Morrison A et al. *Leishmania donovani chagasi*: new clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. Lancet. 1991; 337:67-70.

28. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT et al. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987; 81:517.

29. Momen H, Grimaldi G, Deane L. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)? Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987; 82:447.

30. Momen H, Pacheco RS, Cupolillo E et al. Molecular evidence for the importation of Old World *Leishmania* into the Americas. Biol Res. 1993; 26:249-255.

31. Guerbouj S, Guizani I, Speybroek N et al. Genomic polymorphism of *Leishmania infantum*: a relationship with clinical pleomorphism? Infect Genet Evol. 2001; 1: 49-59

32. Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F et al. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. Microbes Infect. 2005;7: 1224-1234.

33. Grimaldi G, David JR, MCMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. Am J Trop Med Hyg. 1987;36:270-87. el al., 1987;

34. Allahverdiyev AM, Bagirova M, Uzun S et al. The value of new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. Am J Trop Med Hyg. 2005; 73: 276-280.

35. Serin MS, Daglioglu K, Bagirova M et al. Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of miniexon region. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005; 53:209-214.

36. Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg. 1994; 50:296-311.

37. Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93: 663-668.

38. Borst A, Box ATA, Fluit AC. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004; 23: 289-299.

Diagnóstico Sorológico e Parasitológico da Leishmaniose Visceral

Dr. Reynaldo Dietze

Núcleo de Doenças Infecciosas/Laboratório de Leishmaniose

Centro Biomédico

Universidade Federal do Espírito Santo

Av. Marechal Campos 1468 – Maruipe
CEP: 29040-091 - 29040-091 Vitória, ES
Tel: (27) 3335-7210 - Fax: (27) 3335-7204 - rdietze@ndi.ufes.br

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

O diagnóstico parasitológico da LV pode ser feito através de: a) técnicas de exame direto (esfregaço em lâminas de material obtido através de aspirado esplênico, de medula óssea e punção de linfonodos, inoculação deste material em meios de cultura e biópsias de tecido), b) exames de imunomarcação (imunoistoquímica e fluorescência direta) e c) técnicas de biologia molecular (hibridização "in situ" e PCR).

Iremos restringir nossa discussão aos aspirados de tecidos e a cultura, porque são estas as técnicas de uso mais corriqueiro entre nós.

O aspirado esplênico é o método de maior sensibilidade (96,4%) seguido do aspirado de medula óssea (70,2%) e aspiração de linfonodos (58,3%) (Zijlstra EE et al. 1992, Hialu A et. al., 2006). Na prática, devido à quase ausência de efeitos colaterais recomenda-se o aspirado de medula óssea esternal ou da crista ilíaca posterior. A punção esplênica deve ser realizada somente por pessoa treinada e em hospitais com retaguarda cirúrgica e de banco de sangue. Neste caso o tempo de sangramento deve ser normal e o número de plaquetas não deve ser inferior a 30.000mm^3.

As lâminas devem estar limpas e desengorduradas. Após secagem, o esfregaço deve ser fixado em álcool metílico e corado pelo Giemsa ou, alternativamente, Wright, Leishman ou Diff-quick todas elas essencialmente colorações de Romanovsky. O encontro das formas amastigotas do parasita é diretamente proporcional à qualidade do material do aspirado de medula, à experiência do microscopista e ao número de campos observados (da Silva MR et al., 2005). Portanto é necessário que a lâmina seja exaustivamente examinada, antes de ser considerada negativa. Em situações ideais a sensibilidade do aspirado de medula óssea pode se aproximar a 90%.

Além do exame direto, o material das punções aspirativas pode ser inoculado em meios especiais de cultura. O clássico meio de NNN, contendo agar e sangue desfibrinado de coelho, é o mais comumente empregado. A utilização de uma interface líquida sobre o NNN, como o meio LIT ou Schneider, aumenta e acelera a positividade da cultura. As culturas devem ser mantidas entre 24-26ºC e observadas em microscópio óptico invertido semanalmente, por até 4 semanas para então serem consideradas negativas.

A inoculação intraperitoneal em hamsters (*Mesocricetus auratus*), das amostras clínicas obtidas da punção aspirativa de medula óssea ou baço dos pacientes não tem valor prático no diagnóstico da doença devido ao seu longo tempo de positivação (1 a 3 meses).

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Na LV os testes sorológicos em geral apresentam uma boa sensibilidade em virtude da grande quantidade de anticorpos (principalmente IgG) presentes na doença. Este aumento dos anticorpos traduz-se laboratorialmente por uma hipergamaglobulinemia secundária à ativação policlonal de linfócitos B, uma característica fisiopatológica da doença. Os testes sorológicos entretanto são métodos indiretos de detecção do parasita e, devido à sua praticidade, devem

preceder, sempre que possível, os métodos parasitológicos podendo até em algumas situações substituí-los. Na presença de dados clínicos e laboratoriais, uma sorologia reagente praticamente confirma o diagnóstico de calazar. Entretanto, um teste reagente na ausência de manifestações clínicas sugestivas, não autoriza o início do tratamento.

No Brasil, as técnicas mais usadas são a imunofluorescência indireta (RIFI) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA, imunocromatografia). Os resultados da imunofluorescência normalmente são expressos em diluições, sendo reagentes os títulos iguais ou superiores a 1:40. A RIFI apesar de ser menos sensível que o ELISA é o método mais utilizado no Brasil por estar disponível gratuitamente na maioria das regiões endêmicas através do Programa de Leishmanioses do Ministério da Saúde. Os Kits distribuidos pelo MS são produzidos por Biomanquinhos que utiliza a *Leishmania major* em extrato bruto como antígeno. O teste imunoenzimático ELISA, mais usado na rede privada de atendimento, tem seu resultado expresso em unidades de absorbância a um raio de luz (espectrofotometria), em uma reação que pode utilizar diluições fixas (resultado quantitativo) ou apenas reagente ou não (resultado qualitativo). Apesar de ser um método sensível ele apresenta como desvantagem o fato de não estar, até o momento, disponível comercialmente para venda, o que dificulta sua padronização.

Mais recentemente surgiram no mercado outros quatro testes sorológicos, que utilizam metodologia mais simplificada, com boa sensibilidade e especificidade: dois testes de aglutinação direta (DAT™ e FAST™) que utilizam como antígeno formas promastigotas de *L. (L) donovani* e dois teste rápidos imunocromatográficos (Kalazar Detect™e Opti-leish™) que utilizam a proteina recombinante rK39 como antígeno.

O DAT™ e o FAST™ são produzidos pela KIT (Koninklijk Instituut voor de Tropen) da Holand. Eles tem a vantagem de não precisar de refrigeração para armazenagem. O FAST™ utiliza uma única diluição de soro (1:100) e uma concentração de Ag 4 vezes superior à do DAT (2 x 108 promastigotas/mL versus 5 x 107 promastigotas/mL). Sua leitura é feita em 2 a 4 horas. Ao contrário do FAST™, o teste DAT™ apresenta ponto de corte variável, as diluições utilizadas partem de 1:400 e sua leitura é feita em 12 a 18 horas. Existem vários estudos publicados sobre a performance destes dois teste com sensibilidade e especificidade variando respectivamente de 90.3% a 100% e de 50% a 100% para o DAT™ e de 90% a 100% e de 80% a 100% para o FAST™ (Garcez LM et al, 1996, Veeken H et al, 2003, Joshi AB et al, 1999, Abdallah KA et al, 2004, Schallig HD et al, 2002, Mbati PA et al, 1999, Hialu A et. al., 2006). Estes dois testes têm como vantagem sua possibilidade de utilização em áreas com pouca infra-estrutura laboratorial.

Existem disponíveis comercialmente dois testes rápidos imunocromatográficos que utilizam a técnica de "lateral flow" e a proteína recombinante rK39 como antígeno. O Kalazar Detect™, produzido pela Inbios International (Seattle, WA), é o que possui maior número de estudos. Não existem ainda estudo publicados com o teste Opti-Leish™, produzido pela DIAMED.

Nos vários estudos clínicos publicados utilizando o Kalazar-Detect os percentuais de sensibilidade e especificidade variaram respectivamente de 67% a 100% e 98% a 100%. (Carvalho SF et al, 2003, Burns JM Jr, et al, 1993, Sundar S, et al, 1998, 2002, Bern C, et al, 2000, Delgado O et al, 2001, Jelinek T et al, 1999). Estes testes imunocromatográficos tem um futuro promissor dado sua simplicidade (podem ser usados em soro, plasma ou sangue) e rapidez de resultados (aprox. 10 minutos).

Mais recentemente foi publicado um estudo diagnóstico utilizando-se a detecção de Ag na urina de pacientes com LV (KAtex™). O teste utiliza partículas de Latex recobertas anticorpos policlonais para detectção de um Ag glicoconjugado de peso molecular entre 5-20 kD, que é excretado na urina de pacientes com a doença. O teste de aglutinação é executado em lâmina de vidro fornecida pelo fabricante. A sensibilidade e especificidade alegada são de 87% (IC 83.3-90.3) e de 99% (IC 0.97-1.0) respectivamente. O teste tem como desvantagem a necessidade de refrigeração a 4 ºC para estocagem (Sundar S at al, 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah KA, Nour BY, Schallig HD, Mergani A, Hamid Z, Elkarim AA, Saeed OK, Mohamadani AA. Evaluation of the direct agglutination test based on freeze-dried *Leishmania donovani* promastigotes for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudanese patients. Trop Med Int Health. 9(10):1127-31, 2004.

- Bern C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD, Bista MB. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. Am J Trop Med Hyg 63: 153–157, 200.
- Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proc Nat Acad Sci USA 90: 775–779, 1993.
- Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 68(3):321-4, 2003.
- da Silva MR, Stewart JM, Costa CH. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 72(6):811-4, 2005.
- Delgado O, Feliciangeli MD, Coraspe V, Silva S, Perez A, Arias J. Value of a dipstick based on recombinant rK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. Parasite 8: 355–357, 2001.
- Garcez LM, Shaw JJ, Silveira FT. Direct agglutination tests in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in the state of Para. Rev Soc Bras Med Trop. 29(2):165-80, 1996.
- Hailu A, Schoone GJ, Diro E, Tesfaye A, Techane Y, Tefera T, Assefa Y, Genetu A, Kebede Y, Kebede T, Schallig HD. Field evaluation of a fast anti-*Leishmania* antibody detection assay in Ethiopia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 100(1):48-52, 2006.
- Jelinek T, Eichenlaub S, Losher T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 18: 669–670, 1999.
- Joshi AB, Singhasivanon P, Khusmith S, Fungladda W, Nandy A. Evaluation of direct agglutination test (DAT) as an immunodiagnostic tool for diagnosis of visceral leishmaniasis in Nepal. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 30(3):583-5, 1999.
- Mbati PA, Githure JI, Kagai JM, Kirigi G, Kibati F, Wasunna K, Koech DK. Evaluation of a standardized direct agglutination test (DAT) for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. Ann Trop Med Parasitol. 93(7):703-10, 1999.
- Schallig HD, Canto-Cavalheiro M, da Silva ES. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 97(7):1015-8, 2002.
- Sundar S, Reed S, Singh V, Kumar P, Murray H. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. Lancet 351: 563−565, 1998.
- Sundar S, Pai K, Sahu M, Kumar V, Murray, HW, 2002. Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol 96:19-23, 2002.
- Sundar S, Agrawal S, Pai K, Chance M, Hommeld M. Detection of *Leishmania* Antigen in the Urine of Patients with Visceral Leishmaniasis by a Latex Agglutination Test. Am. J. Trop. Med. Hyg., 73(2): 269–271, 2005.
- Veeken H, Ritmeijer K, Seaman J, Davidson R. Comparison of an rK39 dipstick rapid test with direct agglutination test and splenic aspiration for the diagnosis of kala-azar in Sudan. Trop Med Int Health. 8(2):164-7, 2003.
- Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, Kager PA. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 86 (5):505-7, 1992.

Técnicas Diagnósticas Utilizadas na Rotina dos Serviços de Saúde do Brasil

Dra. Geane Maria de Oliveira

Coordenação Geral de Laboratorios

Departamento de Vigilância Epidemiológica

Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde

SHS, Quadra 06, conj. A, bloco C, sala 719
Edifício Business Center Tower - CEP: 70322-915 - Brasília/DF
Tel: (61) 2107.4360 - Fax: (61) 2107.4368 - geane.oliveira@saude.gov.br

A leishmaniose visceral (LV) permanece hoje como um grave problema de saúde pública no Brasil, estando atualmente em franco processo de expansão e urbanização.

Esse novo perfil que a doença apresenta desperta a necessidade da busca de novas ferramentas de diagnóstico da doença, uma vez que o diagnóstico rápido e precoce representa uma maior possibilidade de diminuição da letalidade.

O diagnóstico laboratorial da LV pode ser feito por meio de exames parasitológicos, imunológicos e moleculares, sendo complementado ainda por meio de exames bioquímicos.

Apesar da suspeita de ocorrência de caso de LV ser baseada em dados epidemiológicos e nos achados clínicos e laboratoriais, o diagnóstico de certeza consiste no encontro do parasito no tecido infectado. Esse exame pode ser feito por punção de medula (mielograma), punção esplênica, isolamento em cultivo in vitro (meios de cultivo) ou *in vivo* (inoculações em animais ou xenodiagnóstico). O mielograma e a cultura, apesar da alta especificidade, podem apresentar baixa sensibilidade em casos de baixo parasitismo. Estudos demonstram que a associação dos dois métodos (mielograma e cultura), melhora a sensibilidade.

Dentre os exames imunológicos disponíveis no Brasil para diagnóstico da LV humana, citam-se: a imunofluorescência indireta (IFI), utilizando como antígeno promastigotas de *Leishmania major like*, como também outras preparações antigênicas utilizando promastigotas ou amastigotas de *L. chagasi*; ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando diversas preparações antigênicas, desde recombinantes como proteína rK39, até antígenos brutos de L. chagasi e *L. major like*; os testes imunocromatográficos, que utilizam a proteína rK39 com antígeno; e o teste de aglutinação direta (DAT) que utiliza *L. chagasi* como antígeno. Os exames sorológicos, embora possuam boa sensibilidade, geralmente apresentam reações cruzadas na presença de outros agentes.

Não obstante a aparente diversidade de metodologias disponíveis para diagnóstico da LV no Brasil, a IFI é a metodologia adotada como exame de rotina no Brasil, sendo disponibilizados para toda a rede de laboratórios de saúde pública, kits de diagnósticos, utilizando *L. major like* como antígeno; consideram-se positivas as amostras reagentes a partir da diluição de 1:80, com quadro clínico e epidemiológico compatíveis.

A pesquisa de antígenos de leishmania pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) apresenta alta sensibilidade e especificidade, mas pelo custo elevado e ausência de padronização, está disponível apenas em Centros de Referência.

Uma avaliação do banco do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) de 2004, demonstrou que, dos 3.456 casos notificados de LV, apenas 22,4 % fizeram IFI e parasitológico para confirmação do diagnóstico. Nessa avaliação não foram considerados os diagnósticos por ELISA, pois não há nenhum kit registrado na Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), órgão responsável pelos registros dos mesmos no Brasil.

Dos 3.456 casos, 55% fizemos parasitológicos, enquanto apenas 48% fizeram IFI, apesar desta última ser uma técnica não invasiva, estar devidamente padronizadas e ser disponibilizado kits de diagnóstico para toda a rede de saúde pública.

Surpreendentemente, apesar do ELISA não estar recomendado pelo Ministério da Saúde, pela ausência de um kit devidamente registrado na Anvisa, 18% dos casos fizeram ELISA, dentre os quais, 9,2% utilizaram somente este método para confirmação do diagnóstico laboratorial, sendo 48,4% positivos e 51,6% negativos.

Analisando os testes simultaneamente, observa-se que 775 casos fizeram IFI e parasitológico, com uma concordância global de 61,1%; 385 casos fizeram IFI e ELISA, com uma concordância global de 44,4%; 335 casos fizeram ELISA e parasitológico com uma concordância global de 50,4%; o índice kappa foi calculado para todas as associações demonstrando uma concordância desprezível em todos eles.

Os dados apresentados demonstram a necessidade de um melhor acompanhamento do diagnóstico laboratorial da LV, principalmente no que se refere à utilização de técnicas não regularizadas junto aos órgãos competentes.

Percebe-se ainda a importância de realizarem-se capacitações para ampliar a rede de diagnóstico por imunofluorescência, descentralizando as ações para os municípios endêmicos, melhorando a capacidade de resposta laboratorial, permitindo um diagnóstico precoce que irá contribuir para a diminuição da letalidade.

Em relação ao diagnóstico da leishmaniose visceral canina, utiliza-se IFI e ELISA na rotina dos laboratórios de saúde pública, ambos utilizando *L. major like* nas preparações antigênicas, sendo os kits de diagnóstico distribuídos para toda a rede de laboratórios de saúde pública pelo Ministério da Saúde.

Recomenda-se como material para diagnósticas amostras em soro, embora alguns estados ainda utilizam coleta de sangue em papel filtro.

A técnica de ELISA está implantada em 50% dos estados (10) autoctonia de LV e está recomendada como triagem, devendo todas as amostras reagentes ou indeterminadas confirmadas por imunofluorescência. Consideram-se positivas todas as amostras reagentes a partir da diluição de 1:40, recomendando-se a eutanásia dos cães sorroreagentes.

O Ministério da Saúde tem buscado novas alternativas de diagnóstico e investido em pesquisas para a descoberta de novas ferramentas de diagnóstico que sejam mais sensíveis, tendo em vista o propósito de um programa de triagem sorológica, mas também mais específicos diminuindo a possibilidade de resultados falsos-positivos. Uma das propostas já em andamento é a substituição da cepa atualmente utilizada como antígeno por uma cepa específica de *L. chagasi*, que significará um ganho de especificidade nos resultados emitidos. Além disso, consideram-se a possibilidade do emprego de kits que utilizem antígenos recombinantes e exo-antígenos, permitindo assim resultados mais confiáveis.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Camrgo, ME & Rebonato, C. Cross-reactivity in immunofluorescence for Trypanosoma and *Leishmania* antibodies. A. J. Trop. Med. Hyg., 18: 500-505, 1969.
- Guimarães, MCS et al. Antígenos de *Leishmania major like* e *L. braziliensis* na reação de imunofluorescência (IgG-IF) na leishmaniose muco-cutânea. Ver. Soc. Bras. Méd. Trop., 24 (supl. II): 112, 1991.
- Jekel, JF. Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- Lira, RA. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: avaliação do desempenho dos kits EIE-Leishmaniose visceral canina – Bio-Manguinhos e IFIlLeishmaniose visceral canina – Bio-Manguinhos. Dissertação de Mestrado. 2005.
- Pastorino, AC., Jacob, CMA., Oselka, GW., Carneiro-Sampaio, MMS.. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. Jornal de Pediatria - Vol. 78, Nº2, 2002.
- Silveira, FT. et al.Comparação da Reatividade entre antígenos de *Leishmania (L.) chagasi*, *L.(L.) amazonensis* e *Leishmania* sp (Bio-Manguinhos) no sorodiagnóstico da Leishmaniose visceral através da reação de imunofluorescência indireta.

Desafios para Estruturar uma Política de Medicamentos para o Tratamento da Leishmaniose Visceral nas Américas

Christina Zackiewicz

Drugs for Neglected Diseases initiative

Rua Santa Luzia 651/11o andar
Cep: 20030-041 – Rio de Janeiro – RJ
christina@dndi.org.br - Tel: + 55 21 2220 3523 - Fax : + 55 21 2215 0195

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV), apesar de ser uma doença parasitária pouco conhecida nos países ricos, está presente em muitos países em desenvolvimento, colocando em risco a vida de milhares de pessoas. Ela afeta principalmente populações pobres isoladas em áreas rurais, mas também tem sido crescentemente associada a co-infecções com HIV/Aids nas áreas urbanas. O tratamento é realizado com um escasso arsenal de medicamentos antigos, tóxicos, de difícil administração e que enfrenta a resistência crescente do parasito. A ausência de dados epidemiológicos confiáveis, a dispersão geográfica dos pacientes, a escassez de infra-estrutura em saúde nas áreas mais remotas, e a falta de recursos reservados à doença são fatores que dificultam a implementação de uma política de medicamentos eficiente para o tratamento da LV nas Américas.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma doença sistêmica causada por espécies de protozoário do gênero *Leishmania*. É transmitida ao homem pela picada de uma mosca pertencente ao gênero *Phlebotomus*, e o parasita penetra nos macrófagos, onde se multiplica e estabelece a infecção. Uma série de sintomas clínicos da doença aparece gradualmente, com destaque para a esplenomegalia, febre recorrente e irregular, anemia, perda de peso e fraqueza. Os pacientes acometidos se tornam progressivamente anêmicos, fracos e susceptíveis a infecções intercorrentes. A doença é quase sempre fatal se não tratada e mata silenciosamente seu hospedeiro. Além disso, ela afeta não somente os indivíduos mais vulneráveis de uma comunidade, como as crianças e aqueles que sofrem de outras doenças como HIV/Aids ou tuberculose, mas também adultos sadios e grupos sociais economicamente produtivos.

Estimam-se 500 mil novos casos de LV ao ano, e um décimo destes pacientes está condenado a morrer. Mas a mortalidade real pode ser ainda maior do que a estimada, considerando-se a existência de focos não identificados da doença. Cerca de 90% dos afetados pela doença estão concentrados em cinco países, a saber, Brasil, Índia, Bangladesh, Nepal e Sudão.

A LV existe freqüentemente em áreas remotas ou de difícil acesso, e onde a estrutura de saúde é precária ou inadequada. As pessoas mais sujeitas à infecção são as mais pobres, que moram em pequenos vilarejos longe do acesso a rodovias e dos centros de saúde. Esses pacientes vivendo em comunidades remotas muitas vezes morrem nos seus vilarejos sem que possam receber tratamento. Outras vezes, chegam a alcançar os centros de saúde distantes, mas chegam já sem tempo de serem tratados. E aqueles que conseguem viajar até o hospital, acabam sucumbindo à doença devido à ausência de medicamentos no local. Por este motivo, muitos decidem permanecer em casa até morrerem. Porém, ao tomarem esta atitude, acabam por se transformar em reservatórios de infecção, transmitindo o parasita para a família e vizinhos através da picada das moscas.

Atualmente, as tentativas de controle da LV variam de região a região de acordo com os padrões epidemiológicos da doença, sendo que na América Latina, destaca-se o controle da infecção através do controle de reservatórios silvestres.

IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES E NECESSIDADE DE MELHORES FERRAMENTAS

A maioria das infecções ocorre em regiões remotas, com escassa infra-estrutura em saúde, e onde as infecções co-existem muitas vezes com a malária e outras doenças parasitárias. Sob estas circunstâncias, o diagnóstico da doença normalmente apresenta-se como um dilema. Para superar esta dificuldade, os profissionais de saúde precisam de informações atualizadas sobre a distribuição geográfica da LV nos paises endêmicos. As principais atividades de mapeamento envolvem vigilância ativa na busca de casos, testes cutâneos, e *screening* sorológico das populações. O mapeamento da LV é complexo, uma vez que a distribuição da doença é multi-focal por natureza, com grande variação na sua prevalência e incidência. Além disso, em sua maioria, os casos clínicos não são nem tratados nem reportados. Esta dificuldade é ainda maior pelo fato de que a maioria das infecções por *Leishmania* são sub-clínicas.

A LV é endêmica em 62 paises, com um total de 200 milhões de pessoas sob risco de infecção, e com 500 mil novos casos estimados por ano. Tal como no caso de outras doenças tropicais, os dados epidemiológicos são incompletos e os registros oficiais provavelmente subestimam a prevalência real da doença. O deslocamento de populações como resultado de conflitos, seca, fome ou imigrações da zona rural para a urbana têm contribuído para o ressurgimento da doença em vários países e para seu espalhamento urbano no Brasil. Os fatores de risco para o desenvolvimento da doença incluem má nutrição, drogas imunossupressoras, e sobretudo a co-infecção com o HIV, notavelmente na Índia e no Brasil, onde a epidemia urbana do HIV e a leishmaniose visceral rural estão cada vez mais entrando em contato. Casos de co-infecção são vistos como uma doença importada nas áreas não endêmicas. Os pacientes com co-infecção são difíceis de diagnosticar, respondem mal ao tratamento, e sofrem freqüentes recidivas. A falta de dados confiáveis a respeito da morbidade e mortalidade associadas à leishmaniose tem sido tanto o resultado como a causa para os escassos recursos alocados ao estudo e controle da doença.

TRATAMENTOS DISPONÍVEIS: ANTIGOS, TÓXICOS, E DIFÍCEIS DE ADMINISTRAR

Antimoniais pentavalentes: por muitas décadas, o tratamento da LV se baseou nos antimoniais pentavalentes, como o sódio estibogluconato (Pentostam®/Glaxo Wellcome, UK) ou o antimoniato de meglumina (Glucantime®/Rhone-Poulenc Rohrer, França), administrados via injeção intramuscular ou intravenosa por um período de um mês. Tradicionalmente, o antimoniato de meglumina é usado nos países latino-americanos, e o sódio estibogluconato nos demais paises. Ambas as drogas são consideradas idênticas em eficácia e toxicidade.

Descoberto há 60 anos, o sódio estibogluconato se mantém como o principal tratamento de LV a despeito de sua cardiotoxicidade em alguns pacientes. O tratamento é seguido durante 30 dias com injeções intramuscular ou intravenosa, e deve ser realizado em ambiente hospitalar. Embora ainda seja eficaz na maioria dos países endêmicos, com taxa de cura de 95%, a resistência está crescendo em algumas regiões, especialmente na Índia, onde esta taxa de cura baixou para 65%. Os antimoniais não estão mais sob proteção patentária, e há formas genéricas produzidas por indústrias farmacêuticas na Índia e China. Apesar disto, os medicamentos de marca ainda são muito caros.

Anfotericina B (Fungizone®, BMS): esta droga é altamente eficaz, entretanto está associada a sérios efeitos adversos e pode ser administrada apenas em hospitais.

Anfotericina B liposomal (AmBisome®, Nextar, EUA): considerado o mais eficaz dos medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da LV, tem um custo proibitivo e deve ser administrado por injeção intravenosa, tornando seu uso mais difícil no campo. O alto custo do AmBisome é devido, além das dificuldades técnicas de produção, ao fato do seu alvo ser o lucrativo mercado de antifúngicos para pacientes imuno-deprimidos nos paises ricos. No entanto, esta situação é inaceitável e o acesso ao AmBisome precisa ser ampliado, ou através da redução do preço, ou por meio de uma doação voltada aos pacientes que mais precisam deste medicamento, ou ainda por meio de financiamento adicional. Por outro lado, estudos clínicos recentes na Índia envolvendo 203 pacientes mostraram que a anfotericina B liposomal poderia ser usada em regime de dose única com taxa de cura de 90%.

Miltefosina: este medicamento é eficaz contra LV, mas é caro e teratogênico, apresentando limitações para seu uso. Traz em si um risco teórico de desenvolvimento de resistência se não usado em combinação. A miltefosina está registrada na Índia para tratamento de LV, e na Europa para pacientes co-infectados com HIV.

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS

A possibilidade de um tratamento eficaz dos pacientes é também uma medida para controlar os reservatórios e a transmissão. Dado os problemas associados com os escassos medicamentos hoje disponíveis para o tratamento da LV, novos e melhores tratamentos para substituir ou complementar a terapia existente são urgentemente necessários. A combinação de medicamentos para o tratamento da LV deveria apresentar vantagens de proteção contra a resistência do parasito, bem como redução da duração do tratamento e sua toxicidade.

A paromomicina (conhecida também como aminosidina), um antibiótico da família dos aminoglicosídeos com reconhecida atividade contra a leishmaniose, é um medicamento candidato para o tratamento da LV. Estudos clínicos preliminares no Quênia e Índia mostraram que esta droga é eficaz no tratamento da LV. A duração do tratamento é 21 dias se usado isoladamente, mas pode ser reduzido a 17 dias quando utilizado em combinação com sódio estibogluconato, conforme experimentado por Médicos Sem Fronteiras. A DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative) está realizando estudos clínicos de fase 3 com a paromomicina no leste da África com a intenção de registrar o medicamento na Etiópia, Sudão e Quênia. O IOWH (Institute One World Health), uma empresa farmacêutica sem fins lucrativos, conduziu ensaios de fase 3 com a paromomicina com fins de registro na Índia. A DNDi também possui projetos voltados para a identificação de novos compostos com atividade leishmanicida, e com terapia combinada para o tratamento da LV.

DESAFIOS PARA A ESTRUTURAÇÃO DE UMA POLÍTICA DE MEDICAMENTOS PARA A LV

A LV nos países endêmicos apresenta um desafio único à pesquisa e desenvolvimento de novas ferramentas para o controle e tratamento da doença. Os orçamentos governamentais são inadequados e os ministérios de saúde estão sobrecarregados com excessivas requisições de recursos. Em muitas áreas, a infra-estrutura hospitalar é ausente ou subdesenvolvida. As técnicas para *screening* e identificação de pacientes são inadequadas. As técnicas atuais de diagnóstico são invasivas e complicadas, e requerem pessoal treinado. Os tratamentos são tóxicos, caros, e difíceis de administrar. Todas estas limitações corroboram para o impedimento de uma política de medicamentos de ampla cobertura, eficaz e eficiente, e que seja capaz de proporcionar uma substancial melhoria no acesso a medicamentos.

Por outro lado, as possibilidades de tratamento com regime de dose única de anfotericina B liposomal, a disponibilidade de miltefosina para tratamento via oral de LV, a terapia combinada de drogas leishmanicidas, e potenciais formulações de uso tópico da paromomicina podem proporcionar oportunidades para o desenvolvimento de regimes de tratamentos simplificados, e que podem impactar positivamente na construção de um protocolo de tratamento mais simplificado e universal.

RECOMENDAÇÕES

- registro de versões genéricas dos antimoniais pentavalentes nos países onde a leishmaniose é endêmica
- empenho para obtenção do AmBisome e da Miltefosina por preços mais acessíveis
- estímulo à Pesquisa e Desenvolvimento de novos e melhores medicamentos, sobretudo de administração oral
- uso da paromomicina em combinação com outras drogas leishmanicidas
- desenvolvimento de formulação tópica da paromomicina

BIBLIOGRAFIA

- Hailu A, Musa AM, Royce C, Wasunna M (2005) Visceral Leishmaniasis: New Health Tools are Needed. PLoS Medicine 2(7): 590-594.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesús MN, Marzal PC, Andrade Junior HF, Tempone AG (2003) Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. Quím Nova 26(4): 550-555.

- Olliaro P, Lazdins J, Guhl F (2002) Developments in the treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. Expert Opin. Emerging Drugs 7(1): 1-7.
- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson ADM (2002) Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposer research and development agenda. Lancet Infect Dis 2: 494-501.
- Medecins Sans Frontieres (2005) Leishmaniasis: Patient's need driven R&D Agenda. Disponível: http://www.accessmedmsf.org/documents/Leish%20London%208%20Junea.ppt
- Medecins Sans Frontieres (2004) MSF Campaign for Access to Essential Medicines: Leishmaniasis Factsheet. Disponível: http://www.accessmed-msf.org/documents/kalaazarfactsheet.pdf

Present Situation and New Perspectives for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in the New World

Carlos H. N. Costa, MD, DSc.

Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella

Universidade Federal do Piauí.

Rua Artur de Vasconcelos 151-Sul
CEP: 64.049-750 – Centro – Teresina-PI – Brazil
Email: chncosta@gmail.com

ABSTRACT

A critical review of the present situation of therapy for American visceral leishmaniasis (VL) is presented. The worsening epidemiological and clinical situation of the disease in Brazil imposes the search for better therapeutic options. Among the specific drugs available, antimonial pentavalent salts (Sb^V), pentamidine, deoxycholate and liposomal formulations of amphotericin B, aminosidine and miltefosine, only the two formulations of amphotericin B have been evaluated by phase II clinical trials in the New World. None had undergone phase III trials. It is proposed that Old World VL clinical assays should not be straightly applied for American VL. Due to its historical good results, Sb^V is the drug to be challenged by amphotericin B in phase III clinical assays. Case-fatality rates should be the main end-points of phase III studies but they should not be used to compare drugs tested in phase II trials. Adjuvant therapies for complications such as sepsis or bleeding disorders must be tried as well as the pathophysiological events of severe disease and prognostic factors for death. Also, it is suggested that therapy should be elected as priority for funding research in American VL.

During the last quarter of century, American visceral leishmaniasis (VL) or kala-azar, took an astonishing shape in Brazil, and defied both public health workers and researchers: the disease invaded cities, from the smallest to metropolis; there it triggered epidemic waves and expanded to the north, west and to the industrialized south and joined to HIV, to puzzle disease epidemiology and therapy. Besides, urban American VL has been challenging the traditional control strategies, since dog culling has been shown to be innocuous, and residual insecticide spraying also lacks clear-cut demonstration of its usefulness. Even the most modern strategy, the recently proposed use of dog collars impregnated with insecticides, also failed in reducing even zoonotic prevalence in the New World, and no vaccine is available yet. Finally, disease mortality has been increasing around up to 8-9% in the last year, in spite of the general advances in medical therapy and the introduction of new drugs (Ministry of Health, unpublished data). As an example, 50 persons died of the disease in a single reference hospital in 2003 in Teresina, Brazil (Costa DL, unpublished data).

If not treated, VL is normally fatal. Therefore, drug therapy is the only undisputed action that clearly is able to change the disease burden on humans. Without the old fashioned pentavalent antimonial (Sb^V) and the more toxic pentamidine many thousands of deaths would have occurred in the past, similarly to the lethal epidemic among displaced people in Sudan 10-20 years ago. More recently, amphotericin B has been shown to be more active than Sb^V in India, and, additionally, the less toxic liposomal formulation may show even more advantage, based on data from Sudan. However, either formulation had not shown any advantage over Sb^V for the treatment of HIV co-infected patients. The aminoglycoside aminosidine, which has previously shown advantages for Sudanese VL has been now awakened for treating kala-azar in India, and the oral miltefosine would represent a great advance in the New World if it shows the therapeutic benefits demonstrated for Indian kala-azar. Hence, these five specific drugs and six formulations represent the available arsenal for fighting the disease. Because many patients die before or immediately after the start of specific therapy, early diagnosis and adjuvant therapy for complications should also compose the set of actions targeting the principal objective of treatment, which is to consistently reduce case-fatality.

Meanwhile research for better control methods for prevention of parasite transmission goes on, reduction on mortality by drug therapy should be targeted. And while awaiting the development of new drugs, comparison among the available therapy to choose the best should assume the priority for American VL. Therefore, these comparisons should target preferentially mortality rather than parasitological cure as outcome, since the main objective is to reduce case-fatality. An organized agenda for drug evaluation must be developed because present therapeutic choices are still based on lower level of evidence-based studies.

Clinical trials are much more advanced in the Old World than for American VL, but the question if they could be applied to the New World remains. American VL, which is similar to the zoonotic VL transmitted in Europe, Northern Africa, Near East, Central Asia and China, shows important differences when compared to the disease found in the Indian Subcontinent and East Africa. For instance, cladogram analysis of DNA fragments has demonstrated that the agent of American VL, *Leishmania chagasi* and the causative agent of zoonotic VL, *L. infantum* may be molecularly classified as similar among them, but are genetically more distant from the Indian species *L. donovani*. While they are also transmitted among dogs, wild canines, and opossums, L. donovani only infects humans. Post-kala-azar visceral leishmaniasis, which is much commoner in India and may play an important role on parasite transmission, is very unusual among immunocompetent American VL patients. Another difference is the mean age distribution: American VL hits younger children than Indian kala-azar. However, the most important difference relates to drug response; while less than 2% of American VL immunocompetent patients were identified as having failed to respond to Sb^V, drug resistance is widespread in India. This set of data indicates that although drug experience in India must be taken into account for therapeutic evaluation for New World or zoonotic VL they should not be straightly imported for these forms of kala-azar, and must be retested.

If mortality is chosen as outcome for clinical trials of VL, phase II studies are not valid for drug comparison because the epidemiology is misleading for such assays of efficacy. This happens because age is one of the strongest risk factors for death by kala-azar at the extremes of life, and the age-distribution of the disease is highly variable in place and time (Ministry of Health: unpublished). Theoretically, it is well established that the force of infection is inversely related to the age distribution in diseases that generate long lasting immunity, a hypothesis that was confirmed in American VL by a cross-sectional study of one epidemic. Therefore, when the transmission is highest in endemic areas, many small children get sick, which may increase mortality. On the hand, when disease is sparse or has been recently introduced in a new area, more non-immune older persons are infected and die, which also might increase the mortality ratio (besides increased lethality due to medical lack of experience in dealing with the recently introduced disease). These observations are in accordance with mortality variation of American VL through time and space; it varies with time at the local level, and is quite different from place to place, according to the intensity of transmission and the length of time of introduction of the disease (Ministry of Health, Brazil: unpublished data). Lastly, a critical feature of phase II studies, which is the high stringency of inclusion and exclusion criteria at patient selection, may hide the moment and the local most severe clinical presentation, and artificially reduce mortality of VL. This may lead to wrong conclusions about therapeutic performance of drugs. Therefore, mortality variation of VL imposes a serious limitation for conclusions of therapeutic success or failure based on phase II studies. Since no phase III study has ever been done for the treatment of American VL, and since many therapeutic options are presently offered, controlled studies are imperative for deciding which drug reduces the most mortality caused by VL of the New World.

Sb^V was well established for treating American VL in Brazil as consequence of its dramatic results in the past. Also, as a result of not having so many and serious adverse effects as seen in the competing drug pentamidine, the glucamine salt of Sb^V was established as the first line drug therapy for VL. However, to our knowledge no well-organized phase II trial has ever been tried with any of these two drugs in the New World. Lately, amphotericin B was shown to be able to cure American VL, but the frequent side effects and necessity of in-hospital treatment led to settle the drug as second line therapy. However, while phase II and III trials were performed in India[5,6] and Sudan[7] in the past decade, only now phase II trials for New World VL have been finished in Brazil, with quite impressive favorable results. This success of deoxycholate amphotericin B reinforces the future role of lipid formulations. The effect of this drug was demonstrated by an earlier trial of the colloidal dispersion of amphotericin B, which showed good performance and much shorter duration of therapy and few side effects. This result is similar to a prior phase III trial among *L. infantum* infected patients in Spain, with the liposomal presentation of the medication. Due to the promising results of amphotericin B, its

liposomal formulation was established as the drug of choice in non-endemic developed countries, like the United States and United Kingdon (Bryceson A: personal communication). This is the present situation of drug evaluation for American VL.

As mentioned before, the choice for the best drug therapy for New World VL has not been evaluated by cutting-edge studies yet. For instance, the new drug miltefosine is still submitted to the scrutiny of a phase II study and aminosidine has been tried only in one patient infected with *L. chagasi* to date (successfully). Also, no trial with pentamidine has been ever done in any patients with American VL. Just one phase II trial with amphotericin B deoxycholate has been performed, right now sent for publication, and whose efficacy was excellent, with low toxicity.[18] Going further, Carvalho et al. tested short duration therapy of the association of deoxycholate of amphotericin B with SbV, also with very positive results. No phase II trial has been done for liposomal amphotericin B although the good results of colloidal dispersion[27] could be extrapolated for it. Although Sb^V has never been under phase II tests, its position as a very successful first line drug therapy for American VL during a long time indicates that it is the drug to be challenged in phase III studies. Lastly, no trial has been performed for co-infection of HIV with *L. chagasi*. Therefore, this out-of-date situation of drug therapy evaluation for New World VL should urgently be corrected through more advanced trials.

Amphotericin B should be the drug to be first compared with Sb^V in phase III studies for American VL, either with the deoxicholate as well as with the lipid formulations. This priority is stressed by three reasons: first, phase II trial have already been done for both formulations;[27,28] second, liposomal amphotericin B is already the drug of choice in other countries and third, the Brazilian Guidelines for severe American VL indicates the use of amphotericin B for patients under a higher risk of death (Manual do Calazar Grave, Ministry of Health, Brazil: unpublished). Nevertheless the excellent results with the use of aminosidine for Old World visceral leishmaniasis,[10,11] this drug, besides pentamidine and miltefosine, should be fully evaluated in phase II studies for American VL before they are able to challenge the first line drug in phase III studies.

Although with a good appeal caused by the impressive results of phase II trials in India and Brazil, the advocacy for the use of any formulation of amphotericin B as first line therapy for American VL is not based on higher level of evidence for treating disease caused by *L. chagasi*. Therefore, these evidences are not sufficiently strong to change the well-known excellent performance of the present Sb^V as the primary indication for therapy for treating New World VL. However, a limited suggestion for amphotericin B use has been released at the national level in Brazil. This indication of the deoxicholate formulation by the Brazilian Guidelines was destined only to riskier clinical presentations, based on the mentioned phase II trial to be published. It was restricted to patients that should be maintained in-hospital and whose clinical status could be threatened by the cardiac toxicity of Sb^V. The other decision, to restrain the indication of the lipid formulation only to patients with limited renal conditions, like failure or transplantation, was based on the authoritative argument that there was no immediate availability of this presentation of amphotericin B. However, given that both decisions will lead to the prescription of amphotericin B at the national level, retrospective and prospective evaluation of the effect of the Guidelines application on American VL mortality is mandatory.

One of the weaknesses of the kala-azar body of knowledge is the pathological basis of its complications. Patients die mostly by sepsis or by bleeding. And, if they have jaundice, they have more hemorrhagic disturbance, although exactly why they bleed is not known.[13] Thrombocytopenia does not sounds to be the main reason for it, since patients bleed severely even with a platelet count that would not be otherwise associated with bleeding. As a matter of fact, platelet count decrease could actually be an epiphenomenon of a generalized inflammatory syndrome, like disseminated intravascular coagulation syndrome (DIC). This syndrome has already been described in kala-azar, and besides further background disturbances, such as liver failure, high tumor necrosis factor (TNF) levels and thrombocytopenia itself, DIC may be responsible for many deaths. Thus, targeting infection and the pathological roots of hemorrhage is a potentially helpful strategy.

Approaching infection may also be confusing for therapeutic decisions. For instance, since American VL is already a febrile disease, the frequently found neutropenia may be misleading and exaggerate the use of antibiotics if the guidelines for febrile neutropenia are followed. Similarly, toxemic patients, mostly small children, would use more antibiotics than necessary if the guidelines for fever without localization are to be applied. However, the common outcome of bacterial infection in American VL outweighs the risks of antibiotic usage and justifies the empirical prescription of antibiotics for situations like these. Since many therapeutic approaches are available for the several

clinical alterations seen in New World kala-azar whose multiple pathogenic targets are not well known, several therapeutic adjuvant options should be considered to reduce mortality. Evaluation of the usefulness of recommendations for antibiotic scheme choice to severe American VL, like those for fever without localization among children, or for neutropenic patients with fever or for blood cells transfusion, are immediate candidates for trials. Also attractive are clinical assays targeting liver failure, like fresh frozen plasma or vitamin K, or addressing DIC or TNF with drugs such as activated factor VII and pentoxifylline. Finally, the identification of prognostic factors for death would further improve therapeutic decisions.

American VL is a growing and puzzling problem in Brazil and South America. Raising mortality ratios over time and the recent epidemiological changes have challenged basic science, clinical medicine and public health. Co-infection with HIV poses additional trouble. Experience with specific therapy is still based on old choices, founded on weak evidenced-based background. Therefore, funding good research whose objectives are to solve the underline mechanisms of disease complications, and principally to evaluate specific or adjuvant therapy, through phase III trials designed to measure mortality as outcome, must drive a shift on the policy of scientific funding for short-term reduction of mortality caused by kala-azar in the New World.

REFERENCES

- Ashford D.A., David J.R., Freire M., David R., Sherlock I., Eulálio M.C., Sampaio D.P., Badaro R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1998; 59:53-57.
- Dietze R., Barros G.B., Teixeira L., Harris J., Michelson K., Falqueto A. & Corey R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. Clin Infect Dis. 1999; 25:1240-1242.
- Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G, Davies CR. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? Int J Parasitol. 2004; 34: 55–62.
  Seaman J, Mercer AJ, Sondorp E. The epidemic of visceral leishmaniasis in Western Upper Nile, Southern Sudan: course and impact from 1984 to 1994. Int J Epidemiol. 1996; 25:862-871.
- Thakur CP, Sinha GP, Sharma V, Pandey AK, Kumar M, Verma BB. Evaluation of amphotericin B as a first line drug in comparison to sodium stibobluconate in the treatment of fresh cases of kala-azar. Indian J Med Res. 1993; 97:170-175.
- Mishra M, Biswas UK, Jha AM, Khan AB. Amphotericin versus sodium stibogluconate in first-line treatment of Indian kala-azar. Lancet. 1994; 344(8937):1599-1600.
- Seaman J, Boer C, Wilkinson R, de Jong J, de Wilde E, Sondorp E, Davidson R. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of complicated kala-azar under field conditions. Clin Infect Dis. 1995; 21:188-93.
- Laguna F, Videla S, Jimenez-Mejias ME, Sirera G, Torre-Cisneros J, Ribera E, Prados D, Clotet B, Sust M, Lopez-Velez R, Alvar J; Spanish HIV-Leishmania Study Group. Amphotericin B lipid complex versus meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis in patients infected with HIV: a randomized pilot study. J Antimicrob Chemother. 2003; 52:464-468.
- Laguna F, Lopez-Velez R, Pulido F, Salas A, Torre-Cisneros J, Torres E, Medrano FJ, Sanz J, Pico G, Gomez-Rodrigo J, Pasquau J, Alvar J. Treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a randomized trial comparing meglumine antimoniate with amphotericin B. Spanish HIV-Leishmania Study Group. AIDS. 1999; 13:1063-1069.
- Seaman J, Pryce D, Sondorp HE, Moody A, Bryceson AD, Davidson RN. Epidemic visceral leishmaniasis in Sudan: a randomized trial of aminosidine plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone. J Infect Dis. 1993. 68:715-20.
- Jha TK, Olliaro P, Thakur CPN, Kanyok TP, Singhania BL, Singh IJ, Singh NKP, Akhoury S, Jha S

- Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. BMJ. 1998; 316:1200–5.
- Bhattacharya SK, Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Junge K, Karbwang J, Bryceson ADM, Berman JD. Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. Clin Inf Dis. 2004; 38:217–221.
- Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. Infection. 2003; 3:174-7.
- Mauricio IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplifed gp63 intergenic regions. Parasitology. 2001; 122, 393-403.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet. 1999. 354: 1191–1199.
- Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EA, el-Hassan IM, el-Hassan AM. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2003; 3:87-98.
- Pearson RD, Jeronimo SMB, Sousa AQS. Leishmaniasis. In. Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, ed. Tropical Infectious Diseases. 1st ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone; 1999: 797-813.
- Santos MA, Marques RC, Farias CA, Vasconcellos DM, Stewart JM, Costa DL, Costa CHN. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35:629-633.
- Thakur CP, Narayan S, Ranjan A. Epidemiological, clinical & pharmacological study of antimonyresistant visceral leishmaniasis in Bihar, India. Indian J Med Res. 2004; 120: 166-172.
- Seaman J, Mercer AJ, Sondorp E. Epidemic visceral leishmaniasis in Southern Sudan: treament of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. Am College Physicians. 1996; 124:664-672.
- Collin S, Davidson R, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, Kipngetich S, Davies C. Conflict and kala-Azar: determinants of adverse outcomes of kala-Azar among patients in Southern Sudan. Clin Inf Dis. 2004; 38:612–9.
- May R. Ecology and Population. In: Warren K, Mahmoud A, ed. Tropical and Geographical Medicine. 2nd ed. New York, NY: McGraw & Hill; 1990:130-145.
- Costa CHN, Pereira HF, Araujo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil (1980-1986). Rev Saude Pública. 1990; 24: 361-372.
- Alencar, J. Aspectos clínicos do calazar americano. Rev. Bras. Malariologia Doenças Trop. 1959; 11: 19-44.
- Bryceson, A. Therapy in man. In: Peters, W., Killick-Kendrick R, ed. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London, UK: Academic Press; 1987:848-907.
- Prata A. Treatment of kala-azar with amphotericin B. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1963; 57: 266-268.
- Carvalho SFG, Borges LG, Dietze R. Low doses of amphotericin B deoxycholate (Fungizon™) in the treatment of Brazilian visceral leishmaniasis. Clin Inf Dis. Submitted.
- Berman J, Dietze R. Treatment of visceral leishmaniasis with amphotericin B colloidal dispersion. Chemotherapy. 1999; 45 (Suppl 1):54-66.
- Nadal MCF, Miguel MJG, Botet FA, Bernardo RV, Baeza AC, Aoiz IA. Tratamiento de corta duración de la leishmaniasis visceral con anfotericina B liposómica en pacientes imunocompetentes. An Pediatr (Barc) 2003; 59: 535-540.
- Berman JD. Food and Drug Administration approval AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. Clin Infect Dis. 1999; 28:49-51.
- Castro C, Macedo V, Silva-Vergara ML, Cuba C, Silveira CA, Carvalho E, Marsden P. Efetividade do sulfato de aminosidina em leishmaniose visceral grave, resistente ao tratamento com antimônio pentavalente. Rev Soc Bras Med Trop. 1995; 28:273-277.
- Carvalho SF. Associação de Antimoniato de N-metil-glucamina e Anfotericina B no Tratamento de Leishmaniose Visceral em Crianças e Adolescentes. Thesis. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brazil. 2005.

- Levi M, Jonge E, Meijers J. The diagnosis of disseminated intravascular coagulation. Blood Reviews, 2002; 16: 217–223.
- Pardo Jr P, Mdel FCC, Rangel MLS, Fernandez AF. Visceral leishmaniasis and consumption coagulopathy: a case report and review of the literature. Med Clin. 2004; 2:123:438-439.
- Duarte MI, Corbett CE.. Histopathological patterns of the liver involvement in visceral leishmaniasis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1987; 29:131-136.
- Karplus TM, Jeronimo SMB, Chang H, Helms BK, Burns TL, Murray JC, Mitchell AA, Pugh EW, Braz RFS, Bezerra FL, Wilson ME. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. Infect Immun. 2002; 70:6919-6925.
- Wade JC, Rubenstein EB; NCCN fever and neutropenia practice guidelines panel. NCCN: fever and neutropenia. Cancer Control. 2001; 8(6 Suppl 2):16-21.
- Baraff LJ, Bass JW, Fleisher GR, Klein JO, McCracken GHJr, Powell KR, Schringer DL. Practice guideline for the management of infants and children 0 to 36 months of age with fever without source. Pediatrics. 1993; 92:1-12.
- Guerreiro J, Ribeiro S, Carvalho EM, Badaro R, Rocha H. Infecção bacteriana em pacientes com leishmaniose visceral. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985; 80:447-452.

Recommendations for the Treatment of Visceral Leishmaniasis

Dra. Dorcas Lamounier Costa
Profesora
Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella

Rua Artur de Vasconcelos 151 – Sul - Centro
Teresina, Piauí - CEP: 64001-450
Telefax: (86) 3221-2424 - dorcas.lc@gmail.com

Abbreviations: VL: visceral leishmaniasis; SbV : Pentavalent antimony; AmBD: Amphotericin B deoxicolate; L-AmB: Liposomal amphotericin B

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis represents a serious public health problem in Brazil, with a high incidence rate and an increasing mortality rate despite the national programs for the control of the disease. Recent published guidelines coordinated by the Brazilian Ministry of Health will be soon available. They are intended to support health workers in the identification of factors associated with severity and death from visceral leishmaniasis and in the prompt institution of efficient therapy. Clinical signs and laboratory tests will identify patients at higher risk to progress to more severe forms of the disease. Pentavalent antimonials represent the first-line therapy for most patients with visceral leishmaniasis but amphotericin B deoxycholate should be preferred in the presence of severity signs, resistance or toxicity to pentavalent antimonials, relapse of visceral leishmaniasis or pregnancy. Liposomal amphotericin B should be recommended for patients with renal failure, kidney transplantation, resistance or toxicity to amphotericin B deoxycholate. Antibiotic therapy and blood transfusion may represent important co adjuvant therapy. The efficacy of these recommendations in reducing death from visceral leishmaniasis is to be validated in prospective studies.

INTRODUCTION

The leishmaniasis is a group of diseases caused by several species of the genus *Leishmania* with different clinical forms of disease throughout the world. In South America visceral leishmaniasis is mainly caused by *Leishmania chagasi*. Visceral Leishmaniasis (VL) remains a neglected disease with respect to new drug development, preventive measures and research investments, once is seems to be little possibility of financial return. Symptoms include prolonged fever, hepatosplenomegaly, immunosuppression, pancytopenia, bacterial infections and bleeding. Children are mainly affected and morbidity associated with the infection is high. Death may occur in some patients, especially if no prompt diagnosis is done and early treatment is not initiated. In Brazil, mortality rate increased from 3, 6% in 1994 to 6, 7% in 2003[1]. Programs addressed to control for reservoirs and vectors failed to reduce the incidence and the severity of the disease. Therefore, efforts may be targeted reduce mortality.

Few attempts have been done to identify signs and symptoms that can suggest unfavorable prognosis of visceral leishmaniasis. In Brazil, factors associate with a poor outcome were: severe anemia, diarrhea, jaundice fever for over 60 days, age below one year old, co-infection and bacterial infections[2, 3]. In Sudan death was associated to age less than two or more than forty five years old, ilness lasting for more than five months, malnutrition, anemia, diarrhea, vomits, bleedings events and the spleen size[4, 5]. In Tunisia seven factors were found to be associated to poor outcome: fever for over 21 days, low or normal temperature, hemorrhagic events, hemoglobin less than 5,5 g/dL, hip sedimentation over 25mm/h and duration of disease over 56 days[6]. The identification of the factors associated with a higher chance to

progress to severe forms of disease and to die is of fundamental importance once highly effective therapy could be stated and complications as bleeding and infections could be monitored.

Specific anti-leishmanial treatment is challenging because of the diversity of the disease in different geographic areas and the inadequacy of published data. Most studies were conducted in India and Africa, so external validity of information to Brazil may be compromised. Since 1940 pentavalent antimonials compounds (sodium stibogluconate and meglumine antimoniate- Sb^{v}), have been the mainly used drugs, and they remain the mainstay of antileshmanial therapy in Brazil. Amphotericin B deoxicholate (AmBD) seems to be higher effective than Sbv, as it achieved high cure rates with few relapses in many published studies[7, 8, 9], and it has been used as a salvage therapy in cases of antimony-unresponsive leishmaniasis[10] with a quicker abatement of symptoms[11]. However, comparative studies on efficacy and safety of Sbv and AmBD are insufficient for decision analysis. The improved safety profile of new lipid formulations of amphotericin B permits its administration in higher doses which may be advantageous in cases of toxicity or resistance. Other parenteral alternatives such as pentamidine and paramomicyn have shown suboptimal effectiveness and more toxic effects. Phase II study of miltefosina, an oral agent approved and largely used in India, has just been initiated in Brazil.

Other approaches that have merit in the management of the severely ill patient with VL are antibiotic therapy and blood derivates use, which can be lifesaving therapies in many situations.

INITIAL APPROACH TO PATIENTS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

Initial investigation of patients with visceral leishmaniasis should include a complete anamnesis, detailed physical exam and a laboratorial evaluation.

Patients with severe visceral leishmaniasis or patients with greater chances to progress to critical stages of the disease should be identified at the first evaluation. Based on scattered published data, this group includes patients aging less than six months old or over 65 years old, and those who present one of the following symptoms: jaundice, generalized edema, toxemia, extreme malnutrition, presence of co-morbidities, including any bacterial infections and hemorrhagic phenomena. Epistaxis alone, however, has not been associated with an increase in mortality. These conditions will be referred as severity signs.

Alert signs, defined as situations of potential risk to progress to severe forms of the disease may include: children between 6 months and one year old, adults between 50 and 65 years old, suspected bacterial infection, relapse of VL, presence of diarrhea or vomiting, localized edema, or patients presenting fever for over 60 days. Attention has to be focused, however, on extremely aggressive forms of VL observed in individuals presenting with a very acute illness.

Patients with alert signs or severity signs should be referred to a hospital. Patients without alert or severity signs can be followed as out-patients. However, if any alert or severity sign or any significant laboratory abnormality is observed during follow-up, patient should be promptly referred to a hospital. Laboratorial abnormalities indicating the need of hospitalization are: leucocytes count less than 1000/mL, platelets count less than 50.000/mL, serum hemoglobin less than 7,0 g/dL, serum creatinin over two times the reference value, prothrombin time less than 70%, aminotransferases over five times the reference value and serum albumin less than 2,5 g/dL.

GENERAL SUPPORT

Support therapies, such as hydration, diet support, antipyretic drugs, blood transfusion and early treatment with antibiotics whenever necessary.

ANTILEISHMANIAL THERAPY

The Sb^{V} is the drug of first choice for those patients without severity signs as it was recommended elsewhere[12]

AmBD is the only available drug for pregnant women and will be recommended as a first line option for patients with one or more of the following situations: jaundice, generalized edema, toxemic signs, bleeding events (epistaxis not

considered), children less than six months old and in cases of antimony-unresponsive VL. AmBD should be a second line therapy in cases of resistance or toxicity related to antimonials. It is suggested by published medical literature that AmB must be a first line therapy for pregnant women and patients who have undergone a renal transplantation or patients with renal failure.

Lipid formulations of amphotericin B such as liposomal amphotericin B may be of value for salvage therapy when Sb^V and AmBD have failed[10, 13], and for patients with renal failure or who had undergone a renal transplantation and in cases when any toxicity would be of great concern[14].

ANTIBIOTIC THERAPY

Most patients with VL are at higher risk of apparent or occult infection[15]. Bacterial infection in the patient with visceral leishmaniasis tends to be severe and suggestive signs may be absent. Published data on clinical presentation of and diversity of germs involved in these concurrent infections are scattered and have involved un insufficient number of individuals. For this reason it may be difficult to decide between early administration of antibiotics or a more conservative decision. In the absence of more specific data, recommendations were adapted from the guidelines for neutropenic febrile patient with cancer and for children with acute fever without source[16, 17, 18, 19].

Antibiotic therapy may be initiated soon after cultures have been collected[15, 20] in according to etiology and to the site of infection when possible or following the Commission of Hospital Infection Control – CHIC recommendations.

Empiric antibiotic is advocated for toxemic patient, children less than two months old ant when neutrophil count is less than 500cels/ mm^3 who are at higher risk of clinical atypical presentations of infections. For community acquired infections, ceftriaxone and oxacilyn may be an acceptable scheme. When infections were acquired in hospitalar setting, coverage for *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* is recommended. In all cases, the cultures and antibiograms will guide possible adaptations of the initial antibiotic scheme.

HEMOTHERAPIC SUPPORT

The treatment of hemorrhage in a patient with visceral leishmaniasis is controversial. Most published comments about therapy are based upon tradition instead of clinical judgment. Very few series of patients with bleeding disorders including etiologic study, therapy, morbidity, mortality and survival have been published. Great difficulties in therapeutic clinical trials are anticipated because of the diverse possible etiologies. The decision on when indicate a blood transfusion should be highly individualized, considering characteristics such as the age of the patient, hemodynamic status, time of establishment of anemia, presence of co-morbidities such as septicemia and intravenous disseminated coagulation.

Red blood cells concentrate is indicated for patients with hemoglobin count less than 7g/dL or hematocrit count below 21%. In the presence of bleeding, two or more transfusions may be necessary[21].

Platelets concentrate transfusion may be lifesaving in cases of bleeding due to thrombocytopenia[22, 23]. However, other etiologic explanations may be considered even if platelets count is really low, as autoimmune thrombocytopenia[24], circulating anticoagulants[25, 26], hepatocellular insufficiency, vitamin K deficiency[27, 28] or disseminated intravascular coagulation[29, 30, 31, 32].

Administration of fresh frozen plasma may be considered for patients that present important bleedings that were not controlled after the platelets transfusion[33]. There is no evidence that albumin administration would be beneficial for critically ill patients and it may increase the risk of death[21].

Some potentially useful therapies may include vitamin K, cryoprecipitate, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor[34], anti-thrombin and activated protein C, but more scientific evidences are needed in order to make such recommendations.

Comments

These guidelines are part of a national plan to reduce mortality from visceral leishmaniasis in Brazil. Their purpose is to support internists, pediatricians and family practitioners in the identification of risk factors for death from visceral leishmaniasis and in the prompt institution of efficient therapy. They were based on scientific evidences whenever

possible. However, most articles reviewed were level B or C recommendations as they were mainly based on studies with strength of evidence class II or III, therefore, in some instances, when published data was insufficient, suggestions were based on the expertise's consensus. Recommendations are very general and not intended to present the only management option that the physician can consider. Variations in individual presentation of the disease and the settings in which patients are being treated should be considered before decision is made.

Prospective studies may be encouraged in order to assess the efficacy of these guidelines in reducing death from VL.

REFERENCES

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. MS/SVS/DVE-2003, Brasília. Ministério da Saúde.
2. Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. Infection. 2003;3:174-177.
3. Santos MA, Marques RC, Farias CA et al. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35:629-633.
4. Collin S, Davidson R, Ritmeijer K et al. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. Clin Infect Dis. 2004; 38:612-619.
5. Seaman J, Mercer AJ, Sondorp HE, Herwaldt BL . Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severelydebilitated patients under wartime conditions and with limited resources. Ann Intern Med. 1996;124:664-672.
6. Abdelmoula MS, M'Hamdi Z, Anri F, Tebib N, Ben Turkie H, Ben Dridri MF. Visceral leishmaniasis in children: prognostic factors. Tunis Med. 2003; 81: 545-549
7. Thakur CP, Sinha GP, Sharma V, Pandey AK, Kumar M, Verma BB. Evaluation of amphotericin B as a first line drug in comparison to sodium stibogluconate in the treatment of fresh cases of kala-azar. Indian J Med Res. 1993;97:170-175.
8. Thakur CP, Narain S, Kumar N, Hassan SM, Jha DK, Kumar A. Amphotericin B is superior to sodium antimony gluconate in the treatment of Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol. 1997;91:611-616.
9. Thakur CP, Narayan S. A comparative evaluation of amphotericin B and sodium antimony gluconate, as first-line drugs in the treatment of Indian visceral leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol. 2004;98:129-138.
10. Sundar S, Murray HW. Cure of antimony-unresponsive Indian visceral leishmaniasis with amphotericin B lipid complex. J Infect Dis. 1996;173:762-765.
11. Mishra M, Biswas UK, Jha AM, Khan AB. Amphotericin versus sodium stibogluconate in first-line treatment of Indian kala-azar. Lancet. 1994;344:1599-1600.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. MS/SVS/DVE-2003, Brasília. Ministério da Saúde.
13. Davidson RN, Croft SL, Scott A, Maini M, Moody AH, Bryceson ADM. Lipossomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis. The Lancet 1991; 337:1061-2.
14. Martino L, Raimondi F, Scotti S et al. Efficacy and tolerability of liposomal amphotericin B in Italian infants with visceral leishmaniasis. Trans Roy S Trop Med Hyg 1993; 87: 477
15. Andrade TM, Carvalho EM, Rocha H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. The Journal Infectious Diseases 1990; 162: 1354-1359.
16. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP et al. From the Infectious Diseases Society of America: guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. Clin Infect Dis. 2002;34:730-751.
17. Baraff LJ, Bass JW, Fleisher GR et al. Practice guideline for the management of infants and children 0 to 36 months of age with fever without source. Pediatrics, 1993; 92:1-12

18. Link H, Bohme A, Cornely OA et al. Antimicrobial therapy of unexplained fever in neutropenic patients-guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). Ann Hematol. 2003; 82:S105-S117.
19. Trotta EA, Gilio AE: Febre aguda sem sinais de localização em crianças menores de 36 meses de idade. Jornal de Pediatria,1999;75:S214-S222.
20. Kadivar MR, Kajbaf TZ, Karimi A, Alborzi A. Childhood visceral leishmaniasis complicated by bacterial infections. East Mediterr Health J. 2000;6:879-883.
21. No authors listed. The administration of blood and blood components and the management of transfused patients. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Royal College of Nursing and the Royal College of Surgeons of England. Transfus Med. 1999; 9:227-238.
22. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA/MS, Resolução-DRC no.129, de 24 de maio de 2004. Aprova as diretrizes para transfusão de plaquetas, que constituem recomendações para indicação do uso do hemocomponente. DOU-Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 de maio de 2004.
23. Schiffer CA, Anderson KC, Bennett CL et al: Platelet transfusion for patients with cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol. 2001;19:1519-1538.
24. Wolga JI, Stahl JP, Gaillat J, Ribeiro CD, Micoud M. Immune and autoimmune manifestations of autochthonous visceral leishmaniasis with liver, kidney and vascular involvement. Bull Soc Pathol Exot Filiales. 1983;76:369-76
25. Morand JJ, Galzin M, Gisserot O et al. Visceral leishmaniasis of tussive form with presence of circulating anticoagulants: 2 cases in non-immunosuppressed patients.
26. Disdier P, Delage Y, Vaisse B, Aillaud MF, Fenasse R, Bernard PM. Circulating anticoagulant during visceral Mediterranean leishmaniasis Presse Med. 1990;19:922
27. Sen Gupta PC, Charkravarty NK, Ray HN, Das Gupta B. The liver in Kala-azar. Ann Trop Med Parasitol. 1956; 50:252-259.
28. Singh UK, Sinha RK, Sharma VK. Fulminant hepatitis in Kala-azar. Indian J Pediatr. 1995;62:571-574.
29. Mishra P, Dixit A, Chatterjee T et al. Disseminated intravascular coagulation as an unusual presentation of Kala-azar: report of two cases.Scand J Infect Dis. 2004;36:519-521.
30. Mateos Polo L, Martinez Sapina A, Gil Llano JR, Ruiz Llana F. Visceral leishmaniasis associated with disseminated intravascular coagulation. Apropos of a case. An Med Interna. 1994;11:513.
31. Gonzalvo F, Marco P, Soler S, Portilla J. Visceral leishmaniasis associated with disseminated intravascular coagulation. Report of 2 cases. Med Clin (Barc). 1993;100:47.
32. Blount ER, Hartmann R, Nernoff J. Kala-azar as a cause of disseminated intravascular coagulation. Clin Pediatr (Phila). 1980;19:139-140.
33. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA/MS, Resolução-DRC no.10, de 21 de janeiro de 2004. Aprova as diretrizes para uso de Plasma Fresco Congelado-PFC e de Plasma Vírus Inativo. DOU-Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de janeiro de 2004.
34. Badaro R, Nascimento C, Carvalho JS et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in combination with pentavalent antimony for the treatment of visceral leishmaniasis. Eur.J.Microbiol. Infect.Dis.1994; 13: 23-28.

Flebótomos Transmissores de *Leishmania (L.) Infantum Chagasi* nas Américas e Técnicas Disponíveis de Captura para Vigilância Entomológica

Elizabeth Ferreira Rangel
Pesquisadora Titular
Chefe do Departamento de Entomologia
Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

elizabethrangel@fiocruz.br
Tels.: 21-2290-9339 - 25984321/22 R.: 115

VETORES DE *LEISHMANIA (L.) INFANTUM* CHAGASI

Estudos sistematizados e observações ao longo de décadas permitiram estabelecer critérios para que uma espécie de flebotomíneo seja considerada como transmissora de leishmaniose (Killick-Kendrick 1990). Tais critérios estão classificados como: essenciais e complementares. Os primeiros se referem a antropofilia da espécie, sua distribuição espacial coincidente com a dos casos humanos, além do seu achado com infecção natural por *Leishmania* sp. Os demais, dizem respeito à atração do flebotomíneo pelos reservatórios de leishmânia e, em laboratório, sua capacidade de se infectar e transmitir o parasita, de hamster para hamster, pela picada.

Os vetores das leshmanioses são dípteros, da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Segundo a classificação proposta por Young & Duncan (1994), para o Novo Mundo os flebotomíneos estão agrupados em três gêneros: *Bruptomyia*, *Warileyia* e *Lutzomyia*, estando apenas neste último as espécies de importância epidemiológica.

Em relação ao agente etiológico da leishmaniose visceral, *Leishmania (L.) infantum chagasi*, pode-se apontar três flebotomíneos vetores: *Lutzomyia longipalpis, Lutzomyia evansi* e *Lutzomyia cruzi*, com destaque especial para *L.longipalpis*.

Lutzomyia longipalpis é, de fato, um vetor eficientíssimo da *L. (L.) infantum chagasi* e é o único, no conjunto dos transmissores das leishmanioses, a cumprir todos os critérios estabelecidos para avaliação de competência vetorial. Os primeiros estudos sobre *L. longipalpis* datam de 1956 e foram realizados no Estado do Ceará, quando Deane pode observar a antropofilia da espécie, o encontro de infecção natural por leptomonas (= promastigotas), a sua distribuição espacial em concordância com a ocorrência de casos humanos de leishmaniose visceral (pé de serra), a atração do flebotomíneo pelos reservatórios (raposas e cães), além da infecção experimental. Posteriormente, novas evidências foram apresentadas por Ralph Lainson e seu colaboradores, em 1977, quando obtiveram a transmissão experimental de *L. (L.) infantum chagasi* por *L. longipalpis*, criados em laboratório, pela picada de hamster para hamster. Este mesmo grupo, em 1984 e 1985, isolou e caracterizou flagelado de L. longipalpis, naturalmente infectados, com *L. (L.) infantum chagasi*, num total de 16 isolados; ainda como prova conclusiva, flebótomos naturalmente infectados e coletados em Santarém, Estado do Pará, transmitiram a *L. (L.) infantum chagasi* para hamsters.

Hoje, admite-se com total convicção que *L. longipalpis* é o mais importante transmissor do agente da leishmaniose visceral nas Américas, não apenas pelos hábitos que condicionam a sua competência vetorial, mas, também, por sua ampla distribuição continental.

Entretanto, possivelmente, tem-se um outro flebotomíneo associado à transmissão da *L. (L.) infantum chagasi*: trata-se de *Lutzomyia evansi*. Investigações em 1942 (Potenza & Anduze) e em 1946 (Pífano & Romero), na Venezuela, estariam sugerindo a participação deste flebotomíneo na transmissão do agente da leishmaniose visceral, considerando a aparente ausência de *L. longipalpis* na área de ocorrência de casos humanos. Entretanto, foram os estudos desenvolvidos na Colômbia que apresentaram evidências mais concretas sobre a associação de *L. (L.) infantum chagasi* e *L. evansi.* No norte da Colômbia, Travi e colaboradores (1990,1996) verificaram a predominância da espécie em 87%, em área de transmissão de leishmaniose visceral, identificaram a infecção natural do flebotomíneo com caracterização do parasito e a sua ocorrência no ambiente domiciliar, além de não terem registrado *L. longipalpis*. Posteriormente, *L. evansi* foi registrada em área urbana, na costa Caribenha (Bejarano et al. 2001). E, mais recentemente, em 2003, estudos

experimentais demonstraram o estabelecimento da infecção por *L. (L.) infantum chagasi* em *L. evansi*, entretanto com um padrão diferenciado de susceptibilidade e infecção (diferenciação, migração e adesão ao epitélio do tubo digestivo), quando comparado com infecções experimentais com o mesmo parasita em *L. longipalpis*.

Diante destes achados, admite-se que *L. evansi* poderia ser considerado com um vetor alternativo da leishmaniose visceral na Colômbia, uma vez que se assume *L. longipalpis* como o principal vetor (Ferro et al. 1995). Existem ainda algumas informações acerca da ocorrência de *L. evansi* em outros países do Continente Americano, mas que aparentemente não caracterizam sua participação na cadeia epidemiológica da leishmaniose visceral: Costa Rica, Honduras, Nicarágua, El Salvador, Guatelama (Young & Duncan 1994), Venezuela (Aguilar et al. 1998, Feliciangeli et al. 1999) e México (Ibáñez-Bernal et al. 2004).

Em 2001, foi descrita, na Venezuela, a primeira espécie do complexo *longipalpis*, *Lutzomyia pseudolongipalpis*, por Arrivillaga & Feliciangeli, a partir de exemplares da localidade La Riconada, Curarigua, Estado de Lara. Esta nova espécie está sendo considerada como possível vetor local, sendo responsável por 99, 8% da fauna flebotomínica (Feliciangeli et al. 1999, Arrivillaga & Feliciangeli 2001).

No Brasil, existe uma situação peculiar no Estado de Mato Grosso do Sul, onde as evidências apontam *Lutzomyia cruzi* como vetor da *L. (L.) infantum chagasi*. Em Corumbá e Ladário (MS), diante da ausência de *L. longipalpis*, verificou-se a distribuição espacial de *L. cruzi* concomitante com a dos casos humanos, bem como a sua infecção natural por *L. (L.) infantum chagasi* (Santos et al. 1998).

TÉCNICAS DE COLETAS PARA VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA

Nas atividades de Vigilância Entomológica buscam-se gerar informações de caráter qualitativo e quantitativo sobre os flebotomíneos vetores, que possam orientar as ações de prevenção e controle.

Algumas técnicas de coletas têm sido empregadas com êxito, tais como: sucção manual com aspirador de Castro, sucção com aspirador motorizado, armadilhas luminosas (CDC, HP, Falcão), armadilha ("barraca") de Shannon e armadilha de isca adesiva (Alexander 2000, Vilela et al. 2003, Passerat Silans 2000).

Duas destas técnicas de coletas de flebotomíneos podem ser destacadas, dentre as recomendadas pelo Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (2003), e que têm sido empregadas com sucesso e mais frequentemente: (1) A sucção manual com aspirador de Castro tem sido realizada nas paredes internas e externas dos domicílios, bem como no peridomicílio, em anexos e abrigos de animais domésticos, preferencialmente do crepúsculo até às 22:00h, ou no mínimo por 30 minutos; (2) As coletas com armadilhas luminosas são muito eficientes para a maioria dos vetores das leishmanioses, incluindo aqueles associados à leishmaniose tegumentar, embora se tenha o relato de algumas poucas espécies de flebotomíneos que não são tão facilmente atraídas pela luz. As armadilhas luminosas são instaladas no interior das residências e no peridomicílio, junto aos abrigos de animais domésticos, funcionando do crepúsculo até 7:00h, do dia seguinte.

Outras técnicas de coletas opcionais vêm sendo empregadas por alguns municípios brasileiros na Vigilância Entomológica: sucção com aspirador motorizado, armadilha de isca adesiva e armadilha de Shannon.

Cada vez mais, há a compreensão de que o entendimento dos aspectos eco-epidemiológicos da leishmaniose visceral, bem como o sucesso das ações de vigilância e controle, necessitam de conhecimentos mais precisos dos elos que compõem a cadeia de transmissão, onde os estudos sobre os flebotomíneos vetores devem sempre merecer uma constante e especial atenção.

Vigilância entomológica e controle de vetores da leishmaniose visceral americana

Dra. Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves

Grupo de Estudos em Leishmanioses

Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

Av. Dr. Arnaldo, 351 1º andar, sala 130 Cerqueira César - CEP: 01246-902

Tel: 11-3066-8906/8905 - Fax: 11-3066-8904 - veracamargo@saude.sp.gov.br

RESUMO

A vigilância entomológica é definida como um componente do sistema de vigilância epidemiológica que prevê a contínua observação e avaliação de informações sobre as características biológicas e ecológicas dos vetores sob a influência dos fatores ambientais, dos níveis de interações com hospedeiros humanos e animais reservatórios e permite o conhecimento necessário para a detecção de mudanças no perfil de transmissão das doenças (Gomes 2002). Assim sendo, as ações recomendadas pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) no Brasil (MS 2003, SES-SP 2003) para a vigilância e controle vetorial considera esse amplo conceito e reconhece a importância desse componente para o desencadeamento das medidas de prevenção e controle do agravo.

O objetivo da vigilância entomológica no PVCLV é o de levantar as informações de caráter qualitativo e quantitativo sobre flebotomíneos transmissores da LV. Qualitativamente a simples presença do vetor - *Lutzomyia longipalpis* e/ou *L. cruzi* - vem a ser um indicador de risco de transmissão, que permite: 1 - a classificação de municípios/áreas ou setores urbanos ou de localidades rurais, nas quais as demais medidas de prevenção e controle da doença deverão ser implementadas; 2 - o conhecimento da distribuição espacial do vetor, a fim de estabelecer prioridades em áreas ou setores urbanos ou localidades rurais, nos quais deverão ser desencadeadas as ações de prevenção e controle do vetor e, 3 - a priorização dos setores ou localidades que serão avaliados quanto à presença de enzootia canina ou das taxas de prevalência canina. Quantitativamente, permite: 1 - obter indicadores de densidade vetorial por domicílio, a fim de estabelecer a curva de sazonalidade vetorial, de modo a orientar o período mais adequado para a realização do controle vetorial e, 2 - avaliar o impacto das ações de controle do vetor.

Em decorrência das dificuldades, que atualmente os serviços de saúde enfrentam com relação à aquisição de insumos, equipamentos e, principalmente, recursos humanos para o controle de doença transmitida por vetores, o PVCLV recomenda o desenvolvimento de atividades de entomologia, com metodologias factíveis de serem realizadas. Desta forma, diferentes atividades são preconizadas de acordo com a classificação epidemiológica da área ou do município, isto é, municípios com transmissão humana de LV e municípios silenciosos, naqueles onde a transmissão ainda não foi detectada e não receptivos (isto é, onde o vetor ainda não tenha sido detectado) independente da vulnerabilidade (isto é, municípios contíguos aos municípios ou que possuam fluxo migratório intenso ou façam parte do mesmo eixo viário dos municípios com transmissão de LV).

As atividades propostas no PVCLV são: a investigação de foco, o levantamento entomológico e o monitoramento. A primeira é realizada na ocorrência de detecção de primeiro caso humano ou canino autóctone ou em decorrência de surto de LV e em municípios silenciosos não receptivos vulneráveis ou não; a segunda, é realizada em municípios silenciosos não receptivos, principalmente, nos vulneráveis, bem como, em municípios com transmissão, neste caso, apenas em setores urbanos onde o vetor ainda não tenha sido detectado; e a última é realizada, principalmente em municípios com transmissão moderada ou intensa.

Investigação de foco

Esta atividade tem como objetivo verificar a presença de *L. longipalpis* e/ou *L. cruzi*, sendo mais um indicador que auxiliará na confirmação da transmissão autóctone no município. Várias são as metodologias que podem ser utilizadas numa pesquisa em investigação de foco (Forattini 1973), no entanto, o PVCLV propõe a coleta manual, que consiste na pesquisa de vetor em área interna (intradomicílio) e externa do domicílio (peridomicílio) nas superfícies (paredes e muros) do(s) caso(s) autóctone(s) (cão ou ser humano) ou a utilização de armadilha adesiva (conjunto de cinco folhas de papel sulfite impregnadas com óleo de rícino) expostas de forma suspensa no intra e no peridomicílio, geralmente em um abrigo de animal, protegidos de intempéries, sendo expostas, no mínimo, uma armadilha em cada ambiente. A exposição é ininterrupta, de três a quatro dias, iniciando uma hora após o crepúsculo, do primeiro dia até manhã do quarto ou quinto dia. A coleta manual é realizada com o auxílio de um tubo de sucção (tipo aspirador de Castro) ou aspiradores elétricos (6 volts) e por uma fonte de luz, geralmente uma lanterna. No intradomicílio, são pesquisadas as paredes, especialmente, dos dormitórios e, no peridomicílio, as pesquisas são realizadas principalmente nas superfícies externas do domicílio, dos anexos e os abrigos de animais. As coletas são realizadas por três noites consecutivas em cada domicílio, por um período mínimo de 30 minutos/domicílio, sendo: 15 minutos, para a coleta no intradomicílio e 15 minutos, para o peridomicílio, podendo, também, ser realizada simultaneamente de 15 a 20 minutos em cada domicílio a ser pesquisado. A coleta manual é iniciada uma hora após o crepúsculo até as 22:00 horas.

Levantamento entomológico

Esta atividade tem como objetivos: - verificar a presença de *L. longipalpis* e/ou *L. cruzi* e conhecer a dispersão do vetor no município. A metodologia proposta para o levantamento entomológico é a armadilha de isca luminosa. A unidade de pesquisa para a zona rural é a localidade e para a zona urbana, os setores de zoneamento para o controle do *Aedes aegypti*. As armadilhas são expostas em todos os setores/localidade do município, utilizando-se de duas até dez armadilhas em cada setor/localidade. Cada armadilha é instalada no peridomicílio, preferencialmente, em abrigos de animais. O período de exposição é de uma hora após o crepúsculo até o período matutino seguinte (de preferência retirar antes das 7:00) durante três noites consecutivas. Os domicílios selecionados são, preferencialmente, aqueles sugestivos para a presença do vetor tais como: residências com peridomicílio que possuem presença de plantas (árvores, arbustos), acúmulo de matéria orgânica, presença de animais domésticos (cães, galinhas, porcos, cavalos, cabritos, aves em geral, entre outros). As condições sócio-econômicas e o tipo de moradia são critérios que são levados em consideração para a seleção da unidade domiciliar.

Monitoramento

Esta atividade tem como objetivo conhecer a distribuição sazonal e abundância relativa das espécies *L. longipalpis* e/ou *L. cruzi*, visando estabelecer o período mais favorável para a transmissão da LV e direcionar as medidas de controle químico do vetor, em um ou mais municípios de acordo com as regiões climáticas, topográficas e cobertura vegetal natural, dado que a presença e a flutuação estacional das populações de flebotomíneos, em uma determinada região geográfica, estão correlacionadas a esses fatores (Camargo-Neves 1999). O método preconizado para a realização do monitoramento é a armadilha de isca luminosa, expostas no peridomicílio, de preferência em abrigos de animais, de dez domicílios (no mínimo, dependendo do tamanho do domicílio), que são os pontos de coleta fixos, nos quais durante dois anos são realizadas as coletas mensais. As armadilhas são expostas por 12 horas, iniciando-se uma hora a partir do crepúsculo, durante quatro noites consecutivas por mês. O domicílio escolhido também é aquele sugestivo para a presença do vetor. Também, em alguns Estados, como o estado de São Paulo, pesquisas no ambiente intradomiciliar são realizadas, de modo a verificar a relação da abundância relativa do vetor no peri e intradomicílio, com a finalidade de orientar medidas de controle nestes ambientes. Neste caso, as pesquisas no peri e intradomicílio são concomitantes.

Indicadores entomológicos: Quatro indicadores são utilizados para a avaliação e acompanhamento das atividades de vigilância entomológica:

1 - Índice de setores/localidades positivas: permite avaliar a dispersão do vetor e a extensão do risco de transmissão no âmbito do município.

N° de setores/localidades positivas com *L. longipalpis*/*L. cruzi* X 100

Total de setores / localidades pesquisadas

2 - Infestação domiciliar: permite avaliar a magnitude da infestação no município e a sua dispersão.

Total de domicílios positivos para *L. longipalpis*/*L. cruzi*/ metodologia X 100

Total de domicílios pesquisados

3 - Abundância relativa do vetor: permite avaliar a densidade vetorial dada pela média de *L. longipalpis*/*L. cruzi* por domicílio, ao longo do tempo, permitindo avaliar a sazonalidade vetorial, bem como as intervenções realizadas contra o vetor.

N° de *L. longipalpis*/*L. cruzi* coletados por metodologia por intra ou peri

Total de domicílios pesquisados por metodologia por intra ou peri

4 - Distribuição espacial do vetor: consiste na distribuição espacial dos indicadores acima apresentados na unidade de trabalho desejada (município e/ou localidade e/ou setor do programa de controle da dengue ou setor censitário), em cartograma, permitindo principalmente, auxiliar na delimitação da área para a borrifação.

Medidas de Controle

As ações de controle são realizadas de forma integrada de forma a obter melhores resultados. O PVCLV preconiza dois tipos de intervenção:

- Saneamento ambiental, que consiste em medidas de controle mecânico, que alterem as condições propícias para o estabelecimento de criadouros do vetor ou de repouso ou, ainda, que impeçam o desenvolvimento larvário, por meio de limpeza de quintais, terrenos e praças públicas;limpeza urbana e a eliminação dos resíduos sólidos orgânicos, bem como o destino adequado dos mesmos.
- Controle químico, medida dirigida apenas para o inseto adulto, que tem como objetivo evitar e/ou reduzir o contato entre o inseto transmissor e a população humana, conseqüentemente, diminuir o risco de transmissão da doença, sendo recomendado no âmbito da proteção coletiva. Esta medida é implementada em áreas com registro do primeiro caso autóctone ou surto de LV, imediatamente após a investigação entomológica. A programação de um novo ciclo (isto é, período necessário para cobrir a área delimitada a ser borrifada, no menor espaço de tempo possível) de aplicação do inseticida é realizada de acordo com a curva de sazonalidade do vetor ou, caso essa ainda não seja conhecida, a aplicação é realizada ao final do período chuvoso e 3 a 4 meses após o primeiro ciclo. Em áreas/municípios com transmissão moderada e intensa, se a curva de sazonalidade do vetor for conhecida, são realizados dois ciclos de aplicação do inseticida de ação residual, no período do ano em que se verifica o aumento da densidade vetorial. O inseticida utilizado pertence à classe dos piretróides sintéticos e a sua aplicação é feita por meio de equipamentos de compressão constante e são borrifadas as paredes internas e externas do domicílio, incluindo o teto, quando a altura deste for de até 3 metros. Nos abrigos de animais ou anexos, quando os mesmos possuam superfícies de proteção e cobertura superior. A avaliação do controle químico consiste no método preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO 1970), a fim de verificar a persistência do inseticida nas superfícies tratadas e a efetividade do produto em relação à mortalidade do vetor.

Competências

Por se tratar de atividade especializada, entende-se que as ações de vigilância entomológica deverão ser de competência das Secretarias de Estado da Saúde - SES, podendo contar com o apoio das Secretarias Municipais de Saúde - SMS. Também cabe a esfera estadual a responsabilidade pela: capacitação de recursos humanos, assessoria técnica para definição de estratégias de intervenção, delimitação de áreas a serem trabalhadas e avaliação do controle químico. As SMS cabem a realização das ações de vigilância sanitária e saneamento domiciliar e a aplicação de inseticidas de ação residual, quando esta for preconizada. Os defensivos químicos para o controle de vetores são considerados insumos estratégicos e o seu fornecimento aos estados e municípios estão garantidos pelo Ministério da Saúde, conforme determinado na Portaria 1172 de 1 de junho de 2004.

Finalmente, as ações de vigilância e controle vetorial no PVCLV são realizadas buscando a construção de uma base de informação indispensável para viabilizar uma intervenção mais racional e efetiva na prevenção e interrupção da transmissão da doença para o homem. a fim de otimizar os recursos e a efetividade das ações de controle do vetor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gomes AC Vigilância Entomológica. Informe Epidemiológico do SUS. 2002; 11(2): 79 - 90.
- Camargo-Neves VLF. Características da transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil. São Paulo; 1999. [Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo - USP].
- Forattini OP. Subgênero *Lutzomyia* França, 1924. In: Entomologia Médica 4º vol. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartolenose. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda e Editora da Universidade de São Paulo, 1973.
- [MS] Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2003.
- [SES – SP] Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. II Informe técnico: Leishmaniose Visceral Americana, agosto 2003. Disponível em http://www.sucen.sp.gov.br. Acessado em 20 de novembro de 2005.
- [WHO] World Health Organization. Insecticide resistance and vector control. Seventeenth Report of the WHO Experts Committee on Insecticides. Technical Report Series, 1970: 443:1 - 279.

Estudo para a Adequação de Doses de Inseticidas de Efeito Residual, para o Controle de *Lutzomyia Longipalpis*.

Laura Ney Marcelino Passerat de Silans

Secretaria de Estado de Saúde da Paraíba

Rua Prof. Geraldo Von Shostem, 285
Bairro Jaguaribe – João Pessoa, PB - CEP: 58038-232
Telefax: 83 3241 4545 - lauraney@jpa.neoline.com.br

INTRODUÇÃO

A aplicação de inseticidas de ação residual no ambiente domiciliar continua sendo a medida de eleição para o controle do transmissor da leishmaniose visceral (LV), no âmbito da proteção coletiva (Desjeux 1991, Arias et al., 1996, Passerat de Silans, 1997). No entanto, o impacto do uso desses produtos precisa ser acompanhado, em razão da variada persistência dos inseticidas nos diferentes tipos de paredes (que afeta diretamente o custo da operação); da possibilidade dos insetos desenvolverem resistência aos inseticidas; da necessidade de se conhecer a proteção que tal ação promove para a população sujeita ao risco da doença (Passerat de Silans et al. 1998).

No Brasil, os piretróides vêm sendo os únicos inseticidas utilizados em aplicações domiciliares para o controle de *Lutzomyia. longipalpis* desde o início dos anos 90. Entretanto, a introdução desses produtos no país se deu sem uma avaliação prévia do nível de susceptibilidade das populações vetoras nativas (Passerat de Silans 1991). Tal procedimento poderia resultar em uma adequação das doses recomendadas no combate do vetor e proporcionar melhor ajuste do custo benefício do controle químico.

Durante os últimos 15 anos os piretróides utilizados no país foram a cipermetrina, na formulação pós molhável (dose 125mg.i.a./m²) e a deltametrina,lem suspensão concentrada (dose 25mg. i.a./m²).

A efetividade dos piretróides no combate aos flebotomíneos vem sendo acompanhado em área endêmica de leishmaniose visceral do Estado da Paraíba, há mais de uma década. Os resultados têm mostrado um efeito limitado desses produtos nos tipos de habitações tradicionais da referida área, onde predomina domicílios construídos com paredes de barro (tipo adobe), freqüentemente pintadas à cal. Com 90 dias do tratamento as taxas de mortalidade de *L longipalpis* submetidos a paredes tratadas com deltametrina ficaram em torno de 30%. Já os testes feitos sobre superfícies de madeira mostraram taxas de mortalidade de 100% até quatro meses após a borrifação. Foi observado também que a cipermetrina, em PM, apresentou uma persistência ligeiramente superior e mais homogênea para os diferentes tipos de paredes, com taxas de mortalidade situadas entre 60% e 95%. Porém, em trabalho realizado em área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana, na região do Agreste, a efetividade da deltamentrina se mostrou satisfatória até sete meses após o tratamento, com taxas de mortalidade entre 80% e 100%. Vale salientar que, a composição das paredes, o clima e as espécies utilizadas nos testes foram diferentes daqueles avaliados na área endêmica de LV.

Efeitos semelhantes dos citados produtos foram observados por outros investigadores em outras partes do Nordeste (Marcondes et al. 1992, Oliveira Filho et al. 1994) e em outras regiões do Brasil, onde os mesmos são utilizados no combate de outros insetos vetores (Alecrim et al. 1996).

Em 2004, o alfacipermetrina foi introduzido no controle dos referidos vetores e recentemente foi iniciado o acompanhamento do efeito residual do composto. Os resultados preliminares apontam para uma rápida queda da persistência do produto em um curto espaço de tempo.

Considerando a pouca experiência com o emprego de outros piretróides no país e o significativo crescimento da transmissão da LV em área urbana nos últimos anos, com conseqüente intensificação do controle vetorial, fica evidente a necessidade premente de avaliar outros produtos, incluindo também outros grupos químicos, com a finalidade de

aumentar a disponibilidade de inseticidas alternativos e eficazes para o combate dos flebotomíneos; construir as curvas de susceptibilidade de cepas brasileiras de diversas regiões, aos produtos mais utilizados nos programas de controle e normatizar, implantar e acompanhar um programa de monitoramento da resistência de insetos a inseticidas.

METODOLOGIA

Escolha dos produtos

A proposta do estudo era de determinar a susceptibilidade do *L. longipalpis* a cinco inseticidas de dois grupos químicos, sendo três piretróides sintéticos: alphacipermetrina, deltametrina e lambdacalotrina, e dois organofosforados: fenitrothion e malathion. Em seguida, avaliar a efetividade de dois produtos selecionados na etapa anterior em sete tipos de superfícies, para acompanhar a efetividade deses inseticidas durante seis meses.

Determinação da susceptibilidade de *L. longipalpis*

Os bioensaios para determinar a susceptibilidade de populações naturais de *L. longipalpis* aos inseticidas, foram efetuados seguindo a metodologia descrita no Informe Técnico Nº 443 de 1970, da Organização Mundial da Saúde (OMS) e Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio-Efficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surface (WHO 1998). Os papéis utilizados foram impregnados pelo Núcleo de Produtos Naturais, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (NPPN/UFRJ) e Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN). Foram também utilizados Kit para bioensaio (Bioassay Kit/WHO/VBC/81.806).

O método foi desenhado para mensurar a susceptibilidade de uma população de inseto ao inseticida, através do estabelecimento dos níveis de mortalidade dos insetos considerados normais à determinada dose do produto em função do tempo de exposição (dose resposta).

Cada inseticida foi testado em no mínimo três doses: uma delas preparada de acordo com o valor da dose discriminante indicada na literatura para os flebótomos. Quando a mesma não era conhecida, foi considerada como referência a dose indicada para mosquitos em WHOPES (WHO/CTD/97.2). A segunda e terceira doses eram eqüivalentes respectivamente a 50% e 25% do valor da primeira.

Os bioensaios

Os insetos utilizados nos testes eram provenientes de populações naturais, coletadas no mesmo local, onde a *L. longipalpis* representa 98% das espécies encontradas. Os insetos foram expostos durante uma hora e para os piretróides,. O efeito knocked-down foi observado a cada 10 minutos. A quantificação das taxas de mortalidade foi feita com 24 horas. Os ensaios foram desenvolvidos em um ambiente onde a temperatura e a umidade relativa do ar foi mantida em torno de 25ºC a 26ºC e 85% respectivamente. Os flebótomos submetidos aos testes foram posteriormente identificados.

Resultados preliminares

Devido a dificuldades encontradas na execução do plano de trabalho, em conseqüência dos trâmites burocráticos e administrativos da Secretaria de Estado da Saúde para a execução financeira dos recursos, apenas parte do projeto foi desenvolvido, correspondendo aos testes de susceptibilidade.

Determinação da susceptibilidade

Para a deltametrina

Oos bioensaios foram feitos com papéis impregnados pelo NPPN/UFRJ. O composto foi avaliado nas doses: 0,025%; 0,0125% e 0,05%. (4,56 mg i.a./m², 9,12 mg i.a./m² e 18.25 mg i.a./m²). Nos testes controles foram utilizados papeis impregnados com óleo mineral. Os flebótomos foram coletados nas localidades Marado II st., Olho D´Água st. e Côcos st., pertencentes aos municípios do Conde e de Marcação (no litoral norte e sul) e de Cajazeiras (no Sertão).

a) Relação efeito versos dose

Os resultados dos ensaios mostraram variação no efeito letal do produto em função da população e da dose. As taxas globais de mortalidade, obtidas por população e por dose para 1ª, 2ª e 3ª foram respectivamente:

Marado II: (n=471) 91%, (n=586) 100% e (n=436) 100%;

Olho D'Água: (n=303) 100%, (n=310) 100% e (n=294) 100%;

Côcos: (n=240) 82,5%, (n=240) 88,0% e (n=240) 100%;

A mortalidade global dos testes controle foi muito baixa, variando entre zero e 1,5%.

b) Relação ao efeito knock-down:

Pop. de Marado II: na 1ª dose, a quantidade de insetos caídos chegou no máximo a 32,8%; na 2ª dose, o efeito letal sobre os insetos variou entre 34,7% e 88,5% e para a 3ª dose, esse percentual foi superior, ficando entre 65,8% e 100%.

Pop. de Olho D´Água: o efeito de intoxicação sobre os insetos foi elevado para as três doses, alcançando: 88%, 92% a 100% respectivamente.

Pop. de Côcos: para a 1ª e 2ª doses, a média de insetos fortemente intoxicados ficou próximo de 60%;. na 3ª dose, esse valor subiu para 86,5%.

Para Cipermetrina (incluída posteriormente no estudo):

Os testes foram desenvolvidos com papéis impregnados pelo NPPN/UFRJ. As doses utilizadas para a exposição foram : 0,075%; 0,15%; 0,3% e 0,4% (27,37 mg.i,a./m², 54,75 mg i.a./m² 109,5 mg i.a./m² e 145 mg i.a./m²). Os testes controle foram feitos com papéis impregnados com óleo mineral. A origem dos espécimes foi a mesma já referida.

a) Relação efeito versos dose

Os resultados dos testes mostraram que as populações de *L. longipalpis* foram susceptíveis as doses de cipermetrina avaliadas. As taxas de mortalidade das três populações do vetor, obtidas por local e por dose (da 1ª a 4ª dose) após 24 horas foram as seguintes:

Marado II: (n=280): 100%; (n=268): 100%; (n=270): 100%; (n=285): 100%; Camurupim: (n=211): 99,5%; (n=202): 100%; (n=)(214): 100%;

Côcos: (n=210): 100%; (n=210): 100%; (n=210): 100% e (n=205): 100%.

b) Relação ao efeito knock-down

O grau de intoxicação dos especimens de *L. longipalpis* variou em função do tempo e da dose de inseticida, sendo observado que, quanto maior a dose mais rápida era o efeito knock-down. Após uma hora de exposição, a proporção de insetos caídos (fortemente intoxicados) da 1ª para a 4ª dose foi de 60%, 80%, 95% e 97% respectivamente.

As mortalidades globais dos exemplares submetidos aos testes controle: Marado II (n=321): 1,0%; Camurupim: (n= 321): 0,25% e Côcos: (n= 284): 1,2%.

Para o fenitrothion:

Os bioensaios foram realizados com papéis impregnados pela SUCEN, com as seguintes doses: 0,25%, 0,5% e 1,0%. Os exemplares usados nos ensaios foram coletados na localidade Marado II sitio. (Conde).

a) Relação efeito versos dose

As taxas de mortalidade da população vetora, da 1ª a 4ª dose, após 24 horas, foram as seguintes: (n=292): 100%; (n=348): 100%; (n=250): 100%.

O grau de intoxicação dos flebótomos variou em função do tempo e da concentração do inseticida. Após uma hora de exposição, a média de insetos fortemente intoxicados foi de 60%; 84% e 96,5% respectivamente.

Para o malathion:

Os testes foram desenvolvidos com papeis impregnados pelo OMS e pela SUCEN. As doses utilizadas para a exposição foram: 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,4%; 0,8%; 1,25%; 2,5%; e 5,0%.

a) Relação efeito versos dose

As taxas de mortalidade da população vetora, após 24 horas, por dose, foram: (n=89:) 88,7%; (n=86): 98,0%; (n=87): 100%; (n=90): 100%; (n=:353): 88,8%; (n=354): 98,0%; (n=356): 100%; (n=266): 100%.

As taxas globais de mortalidade dos insetos submetidos aos testes controle oram inferior a 2%.

CONCLUSÃO

As populações de *L. longipalpis* avaliadas mostraram-se susceptíveis as doses dos inseticidas utilizados. No entanto, não foi possível construir a curva de susceptibilidade para as mesmas, pela impossibilidade de dispor de novos papéis impregnados com dose inferior aquelas usadas nos experimentos.

No momento, está sendo procedida feita analise estatística dos resultados dos bioensaios, para tentar se obter as curvas de susceptibilidade com auxilio de SOFTWARE.

Outra alternativa encontrada para tentar suprimir a dificuldade apontada acima, foi de utilizar o método do teste de garrafa (método do CDC de Atlanta), que permite trabalhar com doses mais baixas e construir os pontos das curvas de susceptibilidade.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- Desjeux P. Information sur l``epidemiologie des leishmanioses et la lutte contre ces maladies par pays ou territoire. Who/Leis/91.30, 48 pp. 1991.
- Arias JR, Desjeux P, BeltránF, Walton B. La Epidemiology y el combate de las Leishmaniosis en las Américas, por País. Organizacíon Panamericana de la Salut: Cuaderno Técnico. 44, 52pp. 1996
- Passerat de Silans LNM. Monitoração do efeito residual do inseticida deltametrina, sobre a mortalidade de *Lutzomyia longipalpi*, no Estado da Paraíba, Brasil. Rev. Bras. Med. Trop. 31:1:73-74. 1998.
- Passerat de Silans LNM. Relatório de resultado de prova biológica de parede, realizada com flebótomineos adultos em superfícies borrifadas com inseticidas do grupo piretroíde. Diretoria Regional da SUCAM - Paraíba. 20 p. 1991
- Passerat de Silans LNM, Dedet JP, Arias JR. Field monitoring of cypermethrin residual effect on the mortality rates of the phlebotomine sand fly Lçutzomyia longipalpis in the State of Paraíba, Brasil, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 93: 3: 339-344. 1998.
- Marcondes CB, Nascimento JA. Avaliação da eficiência de deltametrina (K-Othrine CE) no controle de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae), no município de Santa Rita,, Paraíba, Brasil. Rev. Bras. Med. Trop.26:15-18. 1993.
- Oliveira-Filho AM, Marly MTV. Vectors control importance on leishmaniasis Transmission. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 89: 451-456. 1994.
- Alecrim W, Silva M, Charlwood D, Martins WGC, Webb R, Moreira E. Ensaios com Lambdacialotrina (ICON) contra os vetores da malária em Rondônia - Coletânea Zeneca. 1996
- WHO. Resistencia a los insecticidas y lucha contra los vectores. Informes Tecnicos N° 443, 307 pp. 1970.
- WHO. Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio-Efficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surface. WHO/CDC/MAL.1998.12
- WHO-CTD/PR/97.2 - Division of control Tropical Deseases –Progress Report, Geneve. 1996.

Dificuldades técnicas para a execução do projeto

- Conseguir os inseticidas em grau técnico, com qualidade garantida, através de certificação analítica;
- Falta de disponibilidade de referência para fazer a impregnação de papéis;
- Desconhecimento sobre efeito dose resposta para *Lutzomyia longipalpis*. As doses usadas foram estabelecidas para culicideos e não permitiram discriminar as taxas de mortalidade para elaborar a curva de susceptibilidade. Ex: foram testadas oito doses de malathion (5 inferiores as doses selecionadas), e não foi possível discriminar a mortalidade para desenhar a curva;
- Falta de condição estrutural nos laboratórios para impregnar os papéis, de acordo com a conveniência do trabalho.

RECOMENDAÇÕES SOBRE O CONTROLE QUÍMICO DE FLEBOTOMÍNEOS

1. Normatizar, implantar e acompanhar um programa de monitoramento da resistência de insetos a inseticidas;
   - definir técnicas, freqüência de acompanhamento, indicadores para análises.
   - selecionar e manter colônias para distribuição de cepas susceptíveis para os bioensaios em laboratório.
   - construir as curvas de susceptibilidade de cepas brasileiras de diversas regiões, aos produtos mais utilizados nos programas de controle.
2. Padronizar, produzir e fornecer papéis impregnados com inseticidas, para o monitoramento da resistência de insetos;
3. Fornecer os inseticidas em grau técnico, com certificação analítica, para os laboratórios de referências;
4. Normatizar protocolo para avaliar, rotineiramente, o impacto do controle químico de vetores, quanto ao efeito residual dos produtos e sua eficácia no combate ao vetor.

Controle da Leishmaniose Visceral Baseado no Reservatório Canino

Waneska Alexandra Alves

Consultora Técnica

Gerência Nacional das Leishmanioses

Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde

Ed. Business Center Tower - Complexo Brasil XXI
SHS Quadra 6, Conjunto A, Bloco C, Sala 727 - 70322-915 - Brasília/DF
Fax:61-2107-4436 - Tel.:61-2107-4439 - waneska.alves@saude.gov.br

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são consideradas, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma das seis mais importantes doenças infecciosas mundiais (Boletim..., 1999), de importante caráter zoonótico, cujo parasita é transmitido por insetos conhecidos popularmente como flebotomíneos, possuindo reservatórios silvestres e domésticos na natureza (Gontijo, 2000; Sanchez-Tejeda et al., 2001).

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma doença infecciosa de importante caráter zoonótico, cujo parasita é transmitido por insetos conhecidos popularmente como flebotomíneos. A doença, que atinge crianças, adultos jovens ou pessoas imunodeprimidas e, quando não tratada, pode levar à morte 95% dos pacientes, apresenta curso crônico com sintomatologia sistêmica (Corrêa & Corrêa, 1992; Veronesi & Focaccia, 1996).

As primeiras observações da doença foram feitas na Índia por Cunningham, no final do século XIX, em indivíduos acometidos pelo calazar. William Leishman e Charles Donovan descreveram o agente da LV em um soldado inglês e em uma criança hindu, respectivamente. Em 1903, Ross criou o gênero *Leishmania*, denominando *Leishmania donovani* o agente etiológico do calazar indiano. No ano de 1908, na Tunísia, os pesquisadores Nicolle & Comte demonstraram pela primeira vez o parasita em cães, sugerindo o possível papel destes animais como reservatórios do agente (Corrêa & Corrêa, 1992; Veronesi & Focaccia, 1996; Neves, 1998).

Seguiram-se relatos da enfermidade no ser humano e em cães em vários países do mundo e em 1913, foi relatado o primeiro caso de calazar na América do Sul. No Paraguai, Migone realizou o primeiro diagnóstico de LV em um paciente que havia, provavelmente, contraído a doença no Estado do Mato Grosso, no Brasil (Migone, 1913).

Penna, em 1934, no Brasil, identificou o parasito em lâminas de fígado de pacientes visceroctomizados pós-mortem para o diagnóstico da febre amarela. O diagnóstico da doença *in vivo* foi feito por Evandro Chagas e seus colaboradores em 1936 (Penna, 1934; Chagas, 1937). A partir daí seguiram-se vários estudos para a elucidação do agente, do reservatório e do ciclo de transmissão da enfermidade.

No Brasil, a importância do cão como reservatório da LV se deu em estudos iniciais realizados na região Nordeste, no estado do Ceará, pelos pesquisadores Alencar & Coelho Neto, Deane & Deane, em 1956. Estes pesquisadores estabeleceram aspectos básicos do ciclo epidemiológico da LV naquela região (Alencar & Coelho Neto, 1956; Deane, 1956; Genaro 1993).

Em nosso país, a LV é uma antropozoonose que afeta seres humanos e animais, tendo distribuição de casos humanos e caninos em 20 Unidades Federadas, sendo registrado no período de 1994 a 2004 uma média de 3.352 casos/ano e letalidade média de 6,3%/ano. No Brasil, esta enfermidade inicialmente foi descrita como uma doença associada aos bolsões de pobreza tradicionais do Nordeste brasileiro. Entretanto, o padrão de distribuição desta doença vem se modificando com uma visível expansão de seus domínios para municípios dos estados da Região Sudeste e Centro Oeste, além do incremento em alguns municípios dos estados da Região Nordeste (Boletim Epidemiológico, 1999; Ministério da Saúde, 2004).

Em estudos eco-epidemiológicos realizados, tem sido demonstrado a presença de animais silvestres naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. A literatura científica cita mamíferos silvestres, como raposas e marsupiais, e o cão, como o principal reservatório doméstico da LV. Na América do Sul, após os trabalhos de Deane & Deane (1954), a raposa foi incluída no rol dos reservatórios silvestres. E marsupiais didelfídeos foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (Castro, 1996; Genaro, 1997).

O cão há muitos anos, é incriminado com reservatório doméstico potencial da LV. Seu papel como reservatório doméstico na leishmaniose visceral esta mais bem elucidado do que na leishmaniose tegumentar, no entanto, a literatura é rica no que concerne a pesquisa relacionada a este animal e as leishmanioses.

Segundo literatura científica a infecção canina precede o aparecimento de casos humanos sendo, entretanto, mais prevalente que a doença humana. No âmbito doméstico a maioria dos cães que tem sorologia reagente, não apresenta sinais clínicos, atuando, no entanto, como bons reservatórios, com grande poder de infectar o vetor da doença (Marzochi et al., 1985; Genaro, 1993; Cosenza, 1995; Moreno & Alvar, 2002; Silva et al, 2005).

Ferrer (1999) denomina a leishmaniose canina como uma doença sistêmica severa causada por parasitas do gênero *Leishmania*. Segundo este autor a manifestação clínica da doença irá depender da resposta imunológica do animal.

O quadro clínico dos cães infectados é muito semelhante ao quadro humano da doença, apresentando um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a um severo estagio final. Classicamente, na LV canina, tanto a natural como a experimentalmente induzida, se admite um período de incubação e prepatente de 3 a 6 meses até vários anos. Esta infecção, invariavelmente, evolui para os estados latentes ou patentes que, por sua vez, em períodos variáveis de semanas, meses ou anos, podem evoluir para as formas agudas, subagudas, crônicas ou regressivas. Assim, é possível classificar os quadros clínicos dos cães do seguinte modo: animais assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (Marzochi et al., 1985a e b; Genaro, 1993; Cosenza, 1995; Silva, 1997; Silva, 1998; Neves, 1998; Ferrer, 1999; Noli, 1999; Feitosa et al., 2000; Moreno & Alvar, 2002).

Os animais assintomáticos podem representar cerca de 40 a 80% de uma população sororreagente (Marzochi et al., 1985; Neves, 1998; Feitosa et al., 2000; Alves 2001; Silva 1997; Silva 2003; Camargo-Neves, 2004). Em cães susceptíveis para LV, após a infecção da pele, ocorre disseminação do parasito por todo o corpo, com posterior desenvolvimento dos sinais clínicos. Dependendo da imunocompetência do hospedeiro, os sinais clínicos tornam-se evidentes dentro de um período que varia de um mês a vários anos, mas, uma vez evidenciado o processo, a doença evolui, inevitavelmente, para a morte (Feitosa et al., 2000).

O agente etiológico da LV canina (LVC) pode afetar vários órgãos, uma vez que, se tem encontrado parasitas em todas as partes do corpo exceto, provavelmente, no sistema nervoso central. Por esta razão a LVC pode ter características clínicas diferentes (Genaro, 1993; Silva, 1997; Silva, 1998; Noli, 1999).

O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) do Brasil foi revisado no ano de 2003, sendo seu novo enfoque centrado não apenas nos estados e municípios com transmissão, mas também o de incorporar nas ações de vigilância e controle da mesma, os estados e municípios silenciosos, ou seja, sem ocorrência de casos humanos ou caninos da doença, visando assim evitar ou minimizar os problemas referentes a este agravo em novas áreas (Ministério da Saúde, 2004).

O PVCLV possui os seguintes componentes: vigilância epidemiológica (caso humano, entomológica e de reservatório), ações preventivas e ações de controle. Os objetivos do Programa são o de reduzir as taxas de letalidade e o grau de morbidade através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, bem como diminuir os riscos de transmissão mediante controle da população de reservatórios e do agente transmissor. A análise da situação epidemiológica indicará as ações de prevenção e controle a serem adotadas.

A Vigilância de reservatório doméstico (VRD) é um componente novo deste Programa sendo que as ações deverão ser desencadeadas em áreas com e sem ocorrência de casos humanos e caninos, nesta última com presença de vetor (áreas silenciosas receptivas). A VRD possui os seguintes objetivos: realizar alerta ao serviço de saúde pública e à classe médica veterinária, quanto ao risco da LVC; divulgar a população sobre a ocorrência da LVC na região e alertar sobre os sinais clínicos da doença canina e os serviços para o diagnóstico da mesma, bem como as medidas preventivas para eliminação dos prováveis criadouros do vetor; alertar o poder público para iniciar o desencadeamento e implementação das ações de limpeza urbana destinando de maneira adequada a matéria orgânica recolhida; e na suspeita clínica de cão,

delimitar a área para investigação do foco, defindo-se este como a área a partir do primeiro caso canino, circunscrita em um raio de no mínimo 100 cães a serem examinados. No foco deverão ser desencadeadas as seguintes ações: busca ativa de cães sintomáticos para exame parasitológico e confirmação da identificação da espécie de *Leishmania*. Uma vez confirmada a *L. (L.) chagasi*, deve ser coletado material sorológico em todos os cães da área, a fim de avaliar a prevalência canina e desencadear as demais medidas.

A VRS poderá ser realizada por meio das seguintes atividades de monitoramento:

1 - Inquérito sorológico amostral:

É indicada a realização deste tipo de inquérito nas seguintes situações:

- Municípios silenciosos e receptivos, isto é, onde a *Lutzomyia longipalpis* já foi detectada, mas não tenha sido confirmada a transmissão da LV humana ou canina, com a finalidade de verificar ausência de enzootia;
- Municípios com transmissão moderada e intensa, que permitirá avaliar as taxas de prevalência a fim de identificar as áreas prioritárias a serem trabalhadas.

O inquérito amostral poderá ser realizado em todo ou em parte do município dependendo do tamanho do mesmo e da distribuição do vetor.

2 - Inquérito sorológico censitário:

A indicação da realização deste tipo de inquérito é para as seguintes situações:

- Municípios classificados como silencioso e receptivo com população canina menor que 500 cães;
- Municípios classificados como de transmissão moderada ou intensa, em áreas de transmissão urbana;
- Área rural de municípios em qualquer uma das situações de transmissão de LV;

Este tipo de inquérito terá como objetivo o controle através da identificação de cães infectados para a realização da eutanásia, como também de avaliar a prevalência.

Estas atividades de monitoramento canino deverão ser realizadas, anualmente, sincronizado com as demais ações de controle, por no mínimo três anos consecutivos, independente da notificação de novos casos humanos confirmados de LV.

Em virtude das características epidemiológicas e do conhecimento ainda insuficiente sobre os vários elementos que compõem a cadeia de transmissão da LV, as estratégias de controle desta endemia ainda são pouco efetivas e estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos, redução da população de flebotomíneos, eliminação dos reservatórios infectados e atividades de educação em saúde.

Valem destacar, que as ações voltadas para o diagnóstico e tratamento dos casos humanos e atividades educativas, devem ser em todas as situações priorizadas, lembrando que as demais medidas de controle devem estar sempre integradas para que possam ser efetivas.

As ações referentes à vigilância e controle de reservatórios tiveram desdobramentos diferenciados e adaptados para a realidade de cada município, bem como uma adequação das possibilidades operacionais.

Do ponto de vista epidemiológico, a infecção canina é considerada de extrema relevância, pois, além de ser mais prevalente, apresenta grande contingente de animais assintomáticos albergando parasitas no derma.

A despeito das inúmeras informações acumuladas, carece ainda de estudos a respeito da determinação de fatores ambientais, humanos, sociais, econômicos, entre outros, que possam ter influência na instalação e na propagação da LV nas áreas periurbanas e urbanas dos municípios, uma vez tratar-se de uma doença típica do meio rural, mas que esta se urbanizando e expandindo territorialmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, J. E. & COLÉELO NETO, B. Leishmaniose canina no Ceará. XXII Congr. Brás. De Higiene, Fortaleza, Ceará, Brasil, 1956.
- ALVES, W. A. Estudo epidemiológico da leishmaniose tegumentar na área urbana do município de viçosa: prevalência canina e descrição dos casos humanos. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária. Viçosa, Minas Gerais, 2001, 180p. (Dissertação Mestrado).
- ASHFORD R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int. J. Parasitol.; v.30, n.12-13, p.1269-81, 2000.
- BEVILACQUA, P.D. Leishmaniose visceral: interesses públicos e interesses privados na construção social de uma epidemia em Belo Horizonte. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, 1999. 343p. Tese (Doutorado).
- BEVILACQUA, P.D., PAIXÃO, H.H., CASTRO, M.C.P.S., MODENA, C.M. Leishmaniose visceral: história jornalística de uma epidemia em Belo Horizonte, Brasil. Interface - Com., Saúde, Educ., v.4, n.7, p.83-102, 2000.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Edição Especial, Brasília: Fundação Nacional da Saúde – Centro Nacional de Epidemiologia, 1999.
- CASTRO, A.G. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 88p., 1996.
- CAMARGO-NEVES, V. L. F. Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo, Brasil. Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2004. 226p. (Tese Doutorado).
- CHAGAS, E. - CUNHA, A. M.; CASTRO, G.O.; FERREIRA, L.C. & ROMANA, C. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 32: 321-385, 1937.
- COSENZA, G.W. Leishmaniose visceral em Belo Horizonte. Boletim epidemiológico, Secretaria do Estado da Saúde, SUS, Minas Gerais. v.4, n.2, p.4-6, 1995.
- CORRÊA, C.N.M., CORRÊA, W.M.C. Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos. Rio de Janeiro: Médica e Científica Ltda. p. 717 – 720, 1992.
- DEANE, L.M. Leishmaniose visceral no Brasil, estudos sobre reservatório e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956, 162p. Tese (Livre docência).
- DEANE, L.M., DEANE, M.P. Encontro de leishmânias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar nos arredores de Sobral, Ceará. O Hospital, v.45, p.419-421, 1954.
- FEITOSA, M.M., et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). Clínica Veterinária, v.5, n.28, p.36-42, 2000.
- FERRER, L.M.. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: an update. Ann. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, Espanha, 1999.
- GENARO, O. Leishmaniose visceral canina experimental. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológica, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1993. 202p. (Tese Doutorado).
- GENARO, O. Leishmaniose visceral. In: NEVES, D. P. Parasitologia humana. 7.ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, p.55-72, 1997.
- GONTIJO, C.M.F. Leishmaniose Tegumentar em Minas Gerais: estudos Moleculares de amostras de Leishmania isoladas de casos humanos. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, 2000. 140. (Tese Doutorado).
- MARZOCHI, M.C.A., COUTINHO, S.G., SOUZA, W.J.S. de, TOLEDO, L.M. de, GRIMALDI JÚNIOR, G., MOMEN, H., PACHECO, R .da S., SABROZA, P.C., SOUZA, M.A. de, RANGEL JÚNIOR, F.B., TRAMONTANO, N.C. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). Mem. Inst. Osw. Cruz, v.80, p.349-357, 1985.
- MARZOCHI, M.C.A., SABROZA, P.C., TOLEDO, L.M., MARZOCHI, K.B., TRAMONTANO, N.C., RANGEL FILHO, F.B. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro - Brasil. Cad. Saúde Pub., v.1, p.5-17, 1985b.
- MIGONE, L.E. Un caso de kala-azar a Assuncion (Paraguay). Bull. Soc. Exot., 6: 118-120, 1913.
- MINISTERIO DA SAUDE, Manual de vigilância e Controle da leishmaniose Visceral. Brasília: Editora MS, 2004.120p.

- MORENO, J. & ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. TRENDS in Parasitology, v.18, n. 9, 2002.
- NEVES, D.P. Parasitologia humana. São Paulo: Atheneu, 1998. 524p.
- NOLI, C. Leishmaniosis canina. Waltham Focus, v.9, n2, p.16-24, 1999.
- PENA, H.A. Leihsmaniose visceral no Brasil. Brasil-Médico, 48: 949-950, 1934.
- SANCHEZ-TEJEDA, G., RODRÍGUEZ, N., PARRA, C.I. et al.. Cutaneous leishmaniasis caused by members of *Leishmania braziliensis* complex in Nayrit, State of Mexico. Mem. Inst. Osw. Cruz, v. 96, n. 1, p. 15-19, 2001.
- SILVA, J.C.F. Leishmaniose visceral canina no município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológica, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1997. 133p. (Dissertação Mestrado).
- SILVA, E.S. Leishmaniose visceral canina na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais - Brasil. Diagnóstico, aspectos clínicos e caracterização de amostras de *Leishmania*. Centro de Pesquisa René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1998. 153p. (Dissertação Mestrado).
- SILVA, J.C.F. Distribuição Espacial e Temporal da Leishmaniose Visceral canina em relação a densidade vetorial e ao controle de cães infectados em Porteirinha, Minas Gerais, Brasil (1998-2002). Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológica, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2003. 146p. (Tese Doutorado).
- SILVA, A.V.M.; DE PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A.; CARREIRA, J.C.A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.21, p. 324-328, 2005.
- VERONESI, R., FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia, São Paulo: Editora Atheneu, 1996.

Utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para o controle da leishmaniose visceral americana. Resultados preliminares de um estudo conduzido no Estado de São Paulo, Brasil

Dra. Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves

Grupo de Estudos em Leishmanioses

Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

Av. Dr. Arnaldo, 351 1º andar, sala 130 Cerqueira César - CEP: 01246-902
Tel: 11-3066-8906/8905 - Fax: 11-3066-8904 - veracamargo@saude.sp.gov.br

1 - INTRODUÇÃO

Inúmeras dificuldades vêm sendo observadas, em zona urbana, para a implementação das medidas de controle tradicionalmente empregadas em zona rural, para o controle da leishmaniose visceral americana, tais como: o inquérito sorológico canino semestral para a eliminação de cães positivos e a borrifação das paredes internas e externas das casas em ciclos semestrais, por um período de 2 anos (MS 1996, SES-SP 2000, 2003). Entre essas dificuldades pode-se citar o tempo exacerbado entre a coleta de sangue e a eliminação do cão e, somado a isto, a recusa da população a medida; a grande dimensão do trabalho a ser executado, quando se refere às medidas de controle químico voltadas para o controle do vetor, que se tornam inviáveis ao longo do tempo (Camargo-Neves 2004, 2004a). Por outro lado, verifica-se também que as medidas mesmo quando bem empregadas, são autolimitantes chegando a patamares que não se consegue reduzir a incidência canina, dado a alta reposição desta população (Camargo-Neves 2004). Em estudo conduzido em três áreas no município de Araçatuba, verificou-se que a eutanásia de cães, associada ou não as atividades controle vetorial foram efetivas em controlar a força de infecção entre os cães, resultando na redução da incidência humana, desde que conduzida de forma periódica e sistemática. No entanto, nas três áreas, não se verificou diferença significativa nas taxas de prevalência canina final em relação as iniciais, o que pode ser explicado, talvez, pela dinâmica da população canina nestas áreas, dado que se observou alto percentual (de 18,5 a 26,2%) de cães oriundos de outras áreas que migraram para as áreas estudadas (Camargo-Neves 2004).

A eliminação de cães soropositivos, embora seja uma medida cujos resultados são limitados, como já mencionados anteriormente, é ainda a única que pode ser, dirigida diretamente sobre a fonte de infecção para o vetor e executada em larga escala (sob o ponto de vista de saúde pública). No entanto, fazem-se necessárias outras medidas alternativas de controle mais factíveis e exeqüíveis ao longo do tempo e que também atuem sobre os flebotomíneos. Entre essas medidas destacam-se: - o uso de cortinas impregnadas de inseticida do grupo dos piretróides sintéticos, em janelas e portas (Feliciangeli e col. 1995; Perruolo 1995; Killick- Kendrick 1999); - o tratamento tópico de cães com inseticidas por meio de banho ou aplicação localizada (Guanghua e col.1994; Reinthinger e col. 2001), que demonstraram resultados promissores em estudos experimentais no laboratório e em campo, para as diferentes espécies de flebotomíneos testados, porém está medida depende do apoio do proprietário, uma vez que requer inúmeras aplicações, dado o tempo limitado de atuação do inseticida, sendo inviável enquanto medida de saúde pública e; - o emprego de coleiras impregnadas com deltametrina a 4%, que mostrou resultados satisfatórios em experimentos de laboratório, com redução das taxas de alimentação sangüínea e efeito letal para as diferentes espécies de flebotomíneos testados em diferentes países (Killick-Kendrick e col. 1997; Lucientes 1999; David e col. 2001).

Entre os estudos de campo, um dos pioneiros foi o estudo realizado no sudeste da Itália para avaliar o impacto do uso de coleiras impregnadas com deltametrina em cães, em focos de leishmaniose visceral canina, cujo vetor é o *Phlebotomus perniciosus*. Foram comparadas duas áreas - uma controle e outra tratada - durante as estações de

transmissão, nos anos de 1998 e 1999; verificando-se proteção de 86% nos cães da área tratada, após a segunda estação de transmissão no ano de 1999 (Maroli e col. 2001). Outro estudo conduzido, no Irã, em 18 vilas, destas 9 com intervenção e 9 controles, verificou-se a redução da incidência em cães com *L. infantum* (64%) e em crianças (decréscimo de 43%) depois de um ano de utilização da coleira (Gavgani e col 2002). No Brasil, em estudo conduzido por Lima e col. (2002, dados não publicados) concluiu-se que a utilização de coleiras impregnadas foi mais efetiva para prevenir a transmissão entre os cães quando comparada com a eutanásia de cães soropositivos, embora outras avaliações de campo semelhantes a estes últimos estudos devam ser realizadas com a finalidade de conhecer o impacto desta medida de controle no comportamento da transmissão, frente às diversas condições epidemiológicas encontradas no Brasil.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a efetividade da utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4%, como medida alternativa no controle da LVA visando à redução da prevalência canina e da incidência na população humana. São apresentados os resultados preliminares da coorte canina conduzida no município de Andradina -SP, Brasil, no período de 2002 a 2005.

2 - METODOLOGIA

2.1 - Área de Estudo: O estudo foi desenvolvido no município de Andradina, pertencente à região administrativa de Araçatuba, região endêmica para a LVA a partir de 1999. Neste município, a estimativa da população em 2002 era de 55.161 habitantes (IBGE 2000) e da população canina de 15.600 cães. O município é dividido, segundo critérios operacionais, em duas áreas, sendo cada uma delas divididas em cinco setores. O vetor *L. longipalpis* foi detectado em área urbana do município em 1998 e os primeiros casos de LVA canina em 1999. Em inquérito canino realizado neste mesmo ano, a prevalência canina foi de 3,1% e até 2000 não havia sido registrado nenhum caso humano. A partir de 2001, observou-se o agravamento da situação epidemiológica, quando então foram registrados os primeiros casos humanos e 2 óbitos no município. Até maio de 2002, haviam sido notificados 20 casos humanos correspondendo a um coeficiente de incidência de 38 casos/100.000 habitantes e de letalidade de 21,1%.

2.2 - Avaliação das Taxas de Prevalência Canina e Incidência Humana: Foi constituída uma coorte canina entre outubro de 2002 a maio de 2005. Foram cadastrados todos os cães domiciliados existentes no município. Os dados coletados foram registrados em boletim apropriado, sendo anotados o: nome e endereço do proprietário, número do cadastro, nome e características (sexo, idade, tipo de pêlo, cor) do cão; data e resultado do exame sorológico; data da eliminação e dados sobre as perdas de observação e reações adversas às coleiras. As avaliações sorológicas foram realizadas em intervalos de 6 a 7 meses no 0, 6º, 12º, 18º, 25º e 31º meses. As amostras de sangue foram obtidas pela punção da veia marginal auricular do cão, utilizando-se estiletes descartáveis. O material obtido foi coletado em lâminas de papel de filtro Whatmann nº 1, sendo a área embebida de sangue de 3cm de diâmetro. Para o exame sorológico foi utilizada a reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos da classe IgG (IFI – IgG), conforme metodologia descrita por Camargo e Rebonato (1969). Para tanto foram utilizados kits padronizados por Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Os exames foram realizados no laboratório regional - Instituto Adolfo Luz (IAL) de Andradina. O título discriminante foi de 1/40. Os casos humanos foram obtidos do Sistema Nacional de Agravos de Notificação – SINAN, revisados pela vigilância epidemiológica da regional de saúde de Araçatuba (DIR VI), sendo considerados casos novos por ano, aqueles cuja data de início de sintoma se deu no ano em questão e confirmados por critérios clínico - laboratoriais, sendo o local de infecção o município de Andradina.

2.3 - Colocação e manutenção das coleiras: Coleiras impregnadas com deltametrina a 4% Scalibor® foram utilizadas em todos os cães domiciliados previamente cadastrados, no período de outubro de 2002 a outubro de 2004. As coleiras consistiam de fitas brancas de 65cm de polivinil clorido (PVC) pesando 25g e impregnadas com 40mg/g Todos os cães foram previamente avaliados sorologicamente e aqueles com resultado positivo (IFI – IgG) foram eutanasiados, conforme as normas do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral Americana (PCLVA) do Estado de São Paulo (SES-SP 2000, 2003). Todos os cães com resultado sorológico negativo receberam a coleira conforme o seu peso (<20kg e >20kg), exceto em cães menores de 3 meses, conforme indicação do fabricante, a fim de reduzir a chance de efeito adverso a deltametrina. Os cães errantes foram recolhidos e eutanasiados conforme as normas do PCLVA (SES-

SP 2003). As trocas das coleiras ocorreram em abril/2003, outubro/ 2003 e abril/2004. No intervalo entre as coletas, todos os imóveis foram visitados para a verificação da presença e integridade das coleiras e para a detecção de eventuais reações adversas. Também foi estimulada a população para solicitar a troca em caso de quebra ou reposição em caso de perda, bem como a notificação de sintomas que pudessem sugerir um quadro de reação alérgica à coleira. Nestes casos, esses cães eram visitados por um médico veterinário, sendo aconselhada à descontinuidade do uso da coleira caso o cão apresentasse qualquer sinal de reação de hipersensibilidade.

2.4 - Cálculo da taxa de prevalência canina e incidência humana: As taxa de prevalência canina e os coeficientes de incidência foram calculados. A taxa de prevalência canina pelo número de casos de LVA canina por 100 cães: E, o coeficiente de incidência humana, por 100.000 habitantes. Para o cálculo, foi considerada como população exposta no município a estimativa de população segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2000). Foram excluídos para o cálculo da incidência casos que se configuraram como recidivas.

2.5 - Análise estatística: As proporções foram comparadas pelo teste de qui-quadrado ($\chi 2$), corrigido pelo coeficiente de Yates quando indicado. Para resultados estatisticamente significantes foi considerado o nível de significância de 5%.

3 - RESULTADOS

No período de outubro de 2002 a maio de 2005, 6 avaliações foram realizadas, verificando-se a redução do número de cães examinados, variando de 11.486 cães (em outubro/2002) a 7.698 cães (maio/2005) e esta foi acompanhada da redução da prevalência canina, no entanto, esta passa a ser estatisticamente significante a partir do segundo ano de avaliação em abril/2004, quando comparada com as avaliações anteriores. Os valores observados foram: 10,8%, em outubro/2002; 11,9%, em abril/2003; 9,8%, em outubro/2003; 4,8%, em abril/2004, quando a última troca de coleiras foi realizada; 3,6%, em novembro/04 e 3,1%, em maio/2005, após 7 meses e 13 meses da última troca de coleiras, respectivamente.

Esta redução da prevalência canina foi acompanhada da redução do número de casos humanos (de 19 casos, em 2002 para 2, em 2004) e dos coeficientes de incidência (de 34,1 casos/100.000h, em 2002 para 3,6 casos/100.000h, em 2004). Após 13 meses da última troca de coleiras ainda se observou redução das taxa de prevalência canina (3,1%). Embora esta não tenha apresentado diferença significativa quando comparada a taxa do período anterior, nenhum caso humano foi registrado no período, enquanto em outros municípios endêmicos da região de Araçatuba, em 2004, foram registradas taxas de incidência de 21,0 casos /100.000 hab., em Araçatuba e 18,2 casos/ 100.000hab., nos demais municípios da região.

Com relação ao número de coleiras repostas por quebra ou perda verificou-se que das 36.638 coleiras utilizadas, 1796 foram utilizadas para reposição, observando-se taxa de reposição para o período do estudo foi de 4,9%. Foram notificadas durante o estudo 832 reações adversas à coleira, destas 3,4% ocorreram na área 1 e 3,1%, na área 2.

4 - DISCUSSÃO

Os resultados obtidos até o momento apontam para uma efetividade da utilização das coleiras impregnadas com deltametrina associada as demais medidas de controle, dado que a eliminação de cães soropositivos não foi interrompida, não sendo possível afirmar que apenas a utilização da coleira levaria a uma redução da prevalência canina; embora tenha ficado evidente, neste estudo, a associação entre os valores das taxas de prevalência canina e os coeficientes de incidência humana. O aumento observado na segunda coleta parece refletir ainda a uma soroconversão tardia. Como já foi apontado por outros autores, métodos sorológicos, como a imunofluorescência, podem detectar anticorpos até 8 meses depois da infecção (Quinnel e col 1997). Em estudo anterior realizado no município de Araçatuba (Camargo-Neves 2004), verificou-se que o período pré-patente pode variar em média de 4 a 5 meses, portanto, os valores semelhantes da prevalência canina no primeiro ano em Andradina, a exemplo do que ocorreu em Araçatuba, pode refletir essa virada sorológica tardia, o que levou a um resultado mais evidente, na redução das taxas de prevalência canina, a partir do segundo ano de acompanhamento. Nas duas áreas do município, observou-se redução dos dois indicadores, provavelmente pela redução da força de infecção entre os cães, o que implicaria numa menor chance de

infecção do vetor, devido à barreira imposta pelo uso constante da coleira, e conseqüente redução da incidência humana. Esses resultados nos levam a refletir sobre a necessidade de impor uma barreira entre a fonte de infecção e o vetor, o que parece ser factível a partir do uso das coleiras.

Estudos de campo conduzidos em outros países como Itália (Maroli e col 2001) e Irã (Gavgani e col 2002), bem como o estudo conduzido no Brasil (Lima e col 2002, dados não publicados) mostraram resultados semelhantes ao observado em Andradina, com relação à redução da incidência humana, porém esses estudos tiveram uma abordagem diferente da proposta neste trabalho, uma vez que compararam áreas com e sem a intervenção e, talvez por isso pode ser observada diferenças em um ano após a intervenção, o que não foi observado neste estudo.

Neste estudo, encontrou-se que 4,9% das coleiras tiveram que ser repostas, resultados semelhantes ao encontrado por Maroli e col. (2001). Porém, diferente dos resultados encontrados por Lima e col. (2002, dados não publicados), que relataram uma perda por quebra de 41%, nos primeiros 6 meses de avaliação, o que pode ser explicado pelas condições desse estudo, que foi realizado em zona peri-urbana, em que grande parte da população canina era parcialmente domiciliada; enquanto em Andradina, o estudo foi conduzido em área urbana e os cães que participaram eram domiciliados.

Cabe lembrar, que a implantação de um programa de controle da LVA com a utilização deste novo instrumento, requer estruturação do município e planejamento das ações. Atualmente, um dos maiores problemas nas áreas endêmicas refere-se à descontinuidade das ações. Os resultados preliminares deste trabalho apontam para a utilização da coleira como mais um método a ser empregado no controle da LVA, apesar de ser uma medida comprovada para a proteção individual do animal (Killick-Kendrick e col. 1997; Lucientes 1999; David e col. 2001), em saúde pública só faz sentido se aplicada de modo integral e ao que parece por tempo prolongado, com a vantagem que após a retirada das coleiras os resultados se mantêm ao longo de pelo menos um ano, desde que mantidas as atividades de eliminação de cães soropositivos. Não deve ser adotado de modo campanhista, pois requer abrangência na sua utilização, pela maioria dos cães de uma área, a fim de reduzir a força de infecção. Ainda não deve ser uma medida que substitua os inquéritos caninos ou o controle vetorial nas áreas de maior risco. Deve ser um programa com participação de outros setores da sociedade, participação comunitária e individual e estar associado a um programa de controle de população animal.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. Camargo ME, Rebonato C. Cross – reactivity in fluorescense tests for Trypanosoma and Leishmania antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1969; 18: 500 - 505.
02. Camargo-Neves VLF. Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, Brasil. São Paulo. [Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo - USP]: 225 pp, 2004.
03. Camargo-Neves VLF. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: Situação Atual. Boletim Epidemiológico Paulista: Informe Mensal sobre agravos à Saúde Pública - BEPA. 2004a; 6. <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia /bepa6_lva.htm>.
04. David J R, Stamm LM, Bezerra HS, Souza RN, Killick - Kendrick R, Lima JWO. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and inseticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. Mem. Inst Oswaldo Cruz. 2001;96 (6): 839 - 847.
05. Feliciangeli MD, Maroli M, Wheeler A, Towson H, Ward R, Maigon R. Sandfly control trial with deltamethrin impregnated curtains in El Ingenio, Miranda State, Venezuela. Bol. Dir Malariol. Y San. Amb. 1995; XXXV (Supl 1): 127 – 132.
06. Gavgani ASM, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomized trial. The Lancet. 2002; 360: 374 – 379.
07. Guanghua X, Changfa J, Xinzhong C, Zyhongwei S, Yumei H. Are insecticida impregnated delthamethrin bath of domestic dog in the prevention of sand fly bite? End. Dis. Bull. 1994; 9: 32-34.

08. Killick – Kendrick R, Killick – Kendrick M. Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In: Canine Leishmaniasis: an update. Proceedings of the International Canine leishmaniasis Forum Barcelona, Spain. (Ed. R. Killick-Kendrick), Wiesbaden: Hoechst Roussel Vet: 26 - 31, 1999.
09. Killick – Kendrick R, Killick – Kendrick M, Killick-Kendrick C, Focheux J, Dereure M, Puech P, Cadiégues M C. Protection of dogs from bites of phlebotomus sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. Med. Vet. Entomol. 1997; 11: 15 – 21.
10. Lucientes J. Laboratory observations on the protection of dogs from the bites of Phlebotomus perniciosus with Scalibor® ProtectorBands: preliminary results. In: Canine Leishmaniasis: an update. Proceedings of the International Canine leishmaniasis Forum Barcelona, Spain. (Ed. R. Killick-Kendrick), Wiesbaden: Hoechst Roussel Vet: 92 – 94, 1999.
11. Maroli M, Mizzoni V, Siragusa C, D´orazi AD, Gradoni L. Evidence for am impacto n the incidence of canine leishmaniasis by mass use of deltamethrin-impregnates dog collars in southern Italy. Med. and Vet. Ent. 2001;15: 358 - 363.
12. S - Ministério da Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar). Normas Técnicas. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 1996.
13. [MS] Ministério da Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar). Normas Técnicas. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 1996.
14. [MS] Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2003.
15. Perruolo G. Factibilad de utilizacion de cortinas impregnadas com deltametrina para el control de flebotomos. Bol Dir. Malariol. Y San. Amb. 1995; XXXV (Supl I): 295 – 304.
16. Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. Parasitology. 1997; 115: 143 - 156.
17. Reithinger R, Teodoro U, Davies CR. Topical Insecticide Treatments to Protect Dogs from Sand Fly Vectors of Leishmaniasis. Emerging Inf. Diseases. 2001; 7(5): 872 - 876.
18. [SES/SP] Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Leishmaniose visceral americana. São Paulo; 2000, 2003. (Informes técnicos).

Tratamento da LV Canina e seu Impacto na Incidência de LV Humana e na Prevalência da LV em Cães. Uma Experiência em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

M.V. PhD Victor Márcio Ribeiro[1]

[1]*Escola de Veterinária PUCMINAS.*

Av. Amazonas, 2218 - Belo Horizonte - Minas Gerais
CEP: 30180-003 - vitor@pucminas.br

O tratamento da LV canina não é uma novidade no mundo científico. Na Europa vem sendo realizado há 50 anos e como forma preventiva MANCIANTI et al. (1988) demonstraram que o uso do antimonial em cães poderia ser recomendado como forma de controle da doença canina, uma vez que ele preveniu o desenvolvimento da doença em 90% de cães assintomáticos. GRADONI et al. (1988) verificaram que o tratamento da LVC com antimonial como medida de controle mostrou redução da prevalência de LVC em 9,2% dos cães da Ilha de Elba. ALVAR et al. (1994) utilizando no tratamento canino antimonial e alopurinol, por períodos reduzidos, verificaram que além da melhora clínica, os animais se mantiveram não infectantes por pelo menos quatro meses após o tratamento. Os autores advogaram um curso de tratamento para os cães infectados durante a estação de transmissão da doença na Europa, como forma de controle da transmissão. BANETH et al. (2001) demonstraram que o tratamento diário com alopurinol induzia melhora clínica mas não a cura parasitológica. Entretanto, os autores verificaram forte decréscimo da infecciosidade dos cães tratados para *Lu longipalpis* sendo esta uma medida possível de ser aplicada em áreas de transmissão.

No Brasil, entretanto, o tratamento da LVC somente começou a ser discutido após a sua urbanização. Até então, o tratamento da LVC era considerado inadequado, conforme demonstrado por MARZOCHI et al. (1985) que consideraram o antimonial muito tóxico para uso em cães. Porém, o tratamento da LVC começou a ser discutido a nível nacional, pela comunidade veterinária, a partir da ocorrência da doença em Belo Horizonte. Desta forma, é importante a compreensão da dinâmica da doença nessa cidade. A cidade de Belo Horizonte, capital do estado de Minas Gerais, possui cerca de 2.350.564 habitantes (IBGE, 2000) e população canina estimada em 240.000 cães. Conforme descrito por GENARO et al. (1990), em março de 1989 ocorreu o óbito de uma criança com 2 anos de idade, de família migrante de zona endêmica no norte de Minas Gerais, no município de Sabará, vizinho de Belo Horizonte. Na ocasião foram feitos exames sorológicos em 289 cães e encontrou-se prevalência de 2,76% de LVC. Os cães soropositivos foram eliminados e, segundo os autores, medidas profiláticas foram aplicadas visando controle da endemia. BEVILACQUA et al. (2001) fizeram um estudo da urbanização da LV em Belo Horizonte e descreveram que em novembro de 1992, foram feitos os primeiros diagnósticos sorológicos da LVC na cidade, a partir de atendimentos realizados por médicos veterinários da rede privada. A partir desses casos o serviço público optou por ações centradas no inquérito canino e sacrifício dos cães soropositivos durante os anos de 1993 e 1994. O combate ao vetor foi incorporado a partir de borrifações intra e peridomiciliares durante o ano de 1994, embora em número pequeno de residências e de forma não sistematizada e não contínua. A expansão da doença foi evidente e a partir de fevereiro de 1994 começaram a ser registrados casos humanos de LV. Desta forma, desde então foram confirmados, até outubro de 2005, 710 casos humanos de LV; sendo que nos últimos quatro anos observou-se crescimento da ocorrência da LVH. O percentual de positividade da LVC iniciou, em 1993, com 5,5% e em 2004, 11 anos depois, foi de 7,4%. Anualmente vêm sendo examinados mais de 100.000 cães e nos últimos três anos foram borrifados mais de 100.000 domicílios. A média de retirada dos cães encontrados sororeagentes nos últimos cinco anos foi de 84,8%, superior à média anterior, de 75,3% encontrada entre os anos de 1996 a 1999. Isto significa que de 1996 a outubro de 2005 foram sacrificados 38.713 cães, deixando de ser retirados, por motivos diversos, 9.897 cães, ou seja, 8%. Os motivos de não recolhimento de cães sororeagentes vêm sendo levantados pelo Ministério Público (MP) de Minas Gerais – 1ª Promotoria de Defesa da Saúde

e, até agora, relacionam-se os resultados falso positivos, situações em que o serviço não retornou para recolhimento do animal e a opção pelo tratamento do cão. Observa-se, nas declarações dos proprietários ao MP que a maioria tem optado por repetir o exame realizado pelo serviço público, em laboratórios particulares. RIBEIRO & MICHALICK (2002), estudando características de cães sorologicamente positivos para LV durante atendimento médico veterinário verificaram que 80% dos proprietários destes animais, após esclarecidos em relação ao prognóstico da doença, sua condição, em geral, incurável, seu aspecto zoonótico e a necessidade de implementação de medidas de segurança, optaram pelo tratamento. Em outra oportunidade RIBEIRO & LIMA (2005) observaram, através da aplicação de um questionário, que os entrevistados, em sua maioria, discordam com a prática da eliminação canina e expressam o desejo em tratar os cães acometidos pela doença. Entre os principais motivos da opção pelo tratamento dos animais relacionaram-se o amor e o fato de existir o tratamento. Sabemos que o conhecimento das pessoas da existência de tratamento da LVC ocorre pela sua divulgação através da comunidade médica veterinária. Vale a pena expressarmos aqui que a história da LVC em Belo Horizonte junto à comunidade médico veterinária da rede privada esteve atrelada à saúde pública desde o início dos surgimentos dos casos. Conforme já documentado por BEVILACQUA et al. (2001), foram os médicos veterinários da rede privada os primeiros a diagnosticar clinicamente os casos de LVC em Belo Horizonte que foram confirmados sorológica e parasitologicamente no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Também os médicos veterinários deram apoio ao serviço de saúde no início da manifestação da doença em Belo Horizonte. Era grande o número de casos notificados e animais sacrificados pelos clínicos veterinários e, a cada dia, aumentava a ansiedade desta categoria profissional pelo crescente número de animais sororeagentes e conseqüentemente sacrificados. À medida que o tempo passava e os casos caninos aumentavam, associados a casos humanos a partir do ano de 1994. Os médicos veterinários especialistas em pequenos animais buscavam conhecimento e opções para o manejo do cães infectados. Já começavam a surgir notícias de médicos veterinários que, de forma isolada, tratavam cães com LV. Houve, neste período, intenso contato entre os médicos veterinários da cidade com colegas de outros países e finalmente, em 1997, a comunidade dos médicos veterinários da cidade de Belo Horizonte, declarou através do periódico de sua associação, a ANCLIVEPA – Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais – Regional Minas Gerais, sua adesão e recomendação de protocolos para o tratamento canino da LV. Posteriormente, em 2002, a ANCLIVEPA NACIONAL referendou esta recomendação, em um comunicado distribuído às ANCLIVEPAs Regionais de todo o país. Na cidade de Belo Horizonte, os médicos veterinários tem sido orientados pela ANCLIVEPA, a seguir criteriosamente as recomendações de tratamento e acompanhamento dos cães com LV. Desta forma, os cães candidatos a tratamento da LV devem ser inseridos em protocolos já definidos pela literatura, ter rigoroso controle clínico por parte do médico veterinário que deve notificar os órgãos sanitários e validar medidas de controle que assegurem que o animal tratado não represente risco à saúde pública. RIBEIRO & MICHALICK (2001) apresentaram a seqüência indicada para um cão candidato ao tratamento da LV. Inicialmente, deve-se considerar parâmetros ligados à condição clínica do paciente e a participação consciente do proprietário. Os exames clínico e laboratoriais incluem a confirmação do diagnóstico e a pesquisa do parasita na pele. Abre-se aqui um parêntesis para a importância da pesquisa do parasita na pele, uma vez que este exame reflete a infecciosidade do animal. O padrão seguido para pesquisa de parasita na pele, é o método imunohistoquiímico apresentado por TAFURI et al. (2005) que permite a identificação, através de método histológico, de Leishmanias na pele dos cães infectados, independentes de sua condição clínica, aumentando o conhecimento da LVC e o risco potencial do seu papel como reservatório. O esclarecimento detalhado sobre a doença, sua condição de enfermidade crônica e incurável e a necessidade de medidas profiláticas concomitantes ao tratamento devem ser passados ao proprietário. Os cães em tratamento devem ser revisados a cada três meses por meio de exames físicos e laboratoriais, como sorologia para mensuração do título de anticorpos, bioquímica sérica, hemograma completo, proteinograma e pesquisa de parasitas da pele. RIBEIRO et al. (2002) acompanhando cães em tratamento de LV por até 18 meses, demonstraram que antes de iniciar o tratamento, 14% dos animais apresentaram formas amastigotas na pele e após iniciado o tratamento foram encontradas formas do parasita em um cão, representando 0,9% da amostra. Experimento realizado por RIBEIRO et al. (2005) objetivando avaliar o impacto do tratamento associado ao controle vetorial em um canil situado em área endêmica de LV, verificaram a interrupção da transmissão durante o período de duração do estudo, de dois anos. A medida de controle do vetor utilizada foi a colocação do colar inseticida (Scalibor®) em todos os animais da propriedade e o tratamento dos animais sororeagentes com alopurinol. Após dois anos de acompanhamento nenhum novo caso foi registrado no canil, tendo um animal sororeagente convertido para negativo. Dados preliminares, não publicados, de

RIBEIRO et al., verificaram presença de formas amastigotas na pele de 76 (36%) de 219 cães infectados, examinados antes de qualquer medida terapêutica, através do método de imunohistoquímica (TAFURI et al., 2005). Também foi observado que em 80 cães submetidos a tratamento utilizando anfotericina b e alopurinol, com tempo superior a quatro meses pós tratamento, foram realizadas 172 biópsias em tempos diferentes. Destas, seis (3%) foram positivas pelo mesmo método. Ressalta-se que dois cães apresentaram durante o período de observação duas recidivas de parasitismo cutâneo cada um. A redução do encontro de parasitas na pele em cães tratados, demonstra a efetividade do tratamento, uma vez que, do ponto de vista clínico os animais do estudo tiveram mais de 90% de recuperação.

Não foi documentado em nenhum dos casos de cães submetidos a tratamento, dentro dos protocolos e cuidados recomendados, que tenha havido ocorrência na mesma residência de um caso humano de LV. Ao mesmo tempo, refletimos que a ocorrência de casos humanos liga-se ao aumento da força de transmissão pelo número excessivo de reservatórios e, sobretudo, de vetores no foco. Não existe na cidade de Belo Horizonte uma campanha sistemática de orientação popular de controle do vetor através do uso de colares inseticidas nos cães. Conforme pudemos observar nos levantamentos realizados pelo Ministério Público, nenhum dos depoimentos dos cidadãos relatou que os técnicos da saúde tenham orientado sobre as ações de controle do vetor centradas no cão ou no ambiente. A orientação manteve-se centrada no sacrifício dos cães, o que ao nosso ver é a sedimentação de um equívoco. Nenhuma campanha tem sido desenvolvida junto à inciativa privada. É importante que os profissionais médico veterinários sejam alertados da época de maior transmissão vetorial, durante e logo após a estação chuvosa. Os médicos veterinários podem acentuar neste período as recomendações junto aos proprietários para aplicação dos inseticidas nos cães domiciliados. Nesta ocasião torna-se mais difícil e menos eficiente a borrifação peridomiciliar.

Um cão devidamente protegido da aproximação do vetor pelos métodos já reconhecidos e sob terapêutica supervisionada, não nos parece exercer riscos à saúde pública. O impacto sobre a saúde pública pode ser visto sob os aspectos de que a comunidade privada veterinária pode se tornar uma ferramenta útil na educação para saúde de proprietários de cães, orientando na prevenção de novos casos e na possibilidade de transmissão. À rede de informações da doença poderá ter incorporada além da notificação dos casos de cães infectados, aqueles submetidos a tratamento. Novos estudos que abordem este tema são necessários para sua melhor compreensão, fundamentados no princípio da busca de um caminho que possa unir os setores envolvidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRÉS, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZÁLEZ, F.; SAN ANDRÉS, M.D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; SÁINZ, A.; ESCACENA, C. Canine leishmaniasis clinical, parasitological and entomological follow-up alter chemotherapy. Annals of Tropical Medicine and Parasitology , 88, 2, 371-378, 1994.
- BANETH, G.; HOFFMAN, O.; JAFFE, C.L.; STRAUSS, D.; SCHMUR, L.F.; SANDLER, B.; SEKELES, E.; EISENBERGER, C.L.; JACOBSON, R.L.; WARBURG, A. A study of the treatment of canine leishmaniasis with allopurinol: parasitological status, infectivity to sand-flies, clinical & serological progression. Worldleish2 Second World Congress on Leishmaniosis, 20-24 May 2001, Creta Maris Hotel Hersonissos, Crete, Greece, Abstract Book, 154, p 40, 2001.
- BEVILACQUA, P.D.; PAIXÃO, H.H.; MODENA, C.M.; CASTRO, M.C.P.S. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., vol 53, 1, 2001.
- GENARO, O.; COSTA, C.A.; WILLIAMS, P.; SILVA, J.E.; ROCHA, N.M.; LIMA, S.L.; MAYRINK, W. Ocorrência de Calazar em área urbana da Grande Belo Horizonte, MG. Nota Prévia, Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 23(2), 121, 1990.
- GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F.; PIERI, S. Studies on leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the island of Elba, Italy. Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene, 82, 3, 568-571, 1998.
- MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Transactions Royal Society Medicine Hygiene, 82, 566-567, 1988.

- MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; TOLEDO, L.M.; GRIMALDI, J.G.; MOMEN, H.; PACHECO, R.S.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.E.; RANGEL, Jr.F.B.; TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings (1977-1983). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 80, 349-357, 1985.
- RIBEIRO, V.M.; MICHALICK, M.S.M. Protocolos terapêuticos e controle da Leishmaniose Visceral Canina. Nosso Clínico, 4, 24, 10-20, 2001.
- RIBEIRO, V.M.; MICHALICK, M.S.M. Características de cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral durante atendimento médico veterinário. XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas VI Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, Programa e Resumos, Uberaba, MG, 17 a 20 de outubro de 2002, 74, 2002.
- RIBEIRO, V.M.; CHIARELLI, I.M.; XAVIER, S.C.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L. Padrão histológico e infectividade da pele de cães com leishmaniose visceral antes e durante o tratamento com antimoniato de n-metilglucamina (Glucantime®) e alopurinol. . XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas VI Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, Programa e Resumos, Uberaba, MG, 17 a 20 de outubro de 2002, 63, 2002.
- RIBEIRO, V.M.; RAJÃO, R.A.; ARAÚJO DINIZ, S.; MICHALICK, M.S.M. Evaluation of the potential transmission of visceral leishmaniasis in a canine shelter. Revue de Medecine Veterinaire, 156, 1, 20-22, 2005.
- RIBEIRO, V.M.; LIMA, M.C.C.D. Aspectos do controle da Leishmaniose Visceral em Belo Horizonte – opiniões de pessoas que freqüentam clínicas veterinárias. II° Congresso Mineiro da ANCLIVEPA, 7 a 9 de setembro de 2005, Hotel Boulevard, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2005.
- TAFURI, Wg.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. Journal Immunological Methods, 292, 17-23, 2004.

Leishmaniose visceral em meio urbano: avaliação das estratégias de controle utilizando uma abordagem espacial

Guilherme Loureiro Werneck

Universidade Federal do Rio de Janeiro

NESC

Av. Brigadeiro Trompovsky S/N
Tel.: (21)2598-9323 - Fax: (21)2264-1142
gwerneck@nesc.ufrj.br - guilhermewerneck@aol.com

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença emergente em diferentes áreas urbanas brasileiras. Transformações ambientais associadas a movimentos migratórios e ao processo de urbanização podem explicar, em parte, porque a LV, originalmente uma doença restrita às áreas rurais, passou a ocorrer de forma endêmica e epidêmica em grandes cidades do nordeste brasileiro. Até o momento, o programa de controle da leishmaniose visceral tem baseado suas estratégias na eliminação dos reservatórios domésticos infectados e no controle de vetores. Entretanto, Estas estratégias não têm sido efetivas em limitar a expansão da doença.

OBJETIVO

Avaliar a efetividade de estratégias de controle do calazar em diferentes cenários epidemiológicos de transmissão

MÉTODO

Desenho de estudo:

Estudo de intervenção comunitário por conglomerados com desenho fatorial

Locais de estudo: 10 localidades distribuídas por 7 bairros de Teresina/PI

- Todos os bairros com transmissão recente (casos detectados)
- 2 com taxas de incidência abaixo da mediana e 5 acima
- Padrão variado de vegetação / uso do solo

População de estudo:

Moradores da área urbana de Teresina acima de 5 anos de idade.

Desenho amostral:

Dentro de cada localidade foi selecionada área com padrão homogêneo de uso do solo e cobertura vegetal através de imagens de sensoriamento remoto e aerofotos. Cada área foi dividida em lotes (~50 domicílios), sendo sorteados 4 lotes que foram randomizados a 4 diferentes intervenções.

- Não intervenção
- Borrifação domiciliar e de anexos residenciais;

- Eliminação de cães infectados;
- Borrifação + eliminação canina

Aferição e coleta: Indivíduos foram visitados em seus domicílios em 4 ocasiões com intervalo de 6 meses. Na primeira, responderam a um questionário sobre condições de vida e saúde, exposição a fatores de risco para infecção por *L. chagasi*, história pessoal ou familiar de LV, etc. Nesta visita tiveram sangue coletado para realização de exames sorológicos e foram submetidos ao teste intradérmico de leishmanina. Aqueles que apresentaram reação <5mm foram avaliados novamente, na 4a e última visita. Na três primeiras visitas todos os participantes tiveram sangue coletadopara realização de sorologia por imunofluorescência indireta.

Desfechos: Incidência de infecção

- Conversão IFI em 12 meses
- Conversão de IDR em 18 meses

Análise:

Regressão log-binomial, obtendo-se o risco relativo (RR) comomedida de associação e seus respectivos intervalos de 95% de confiança (IC95%)

Aspectos éticos:

O projeto foi aprovado pela comissão de ética do NESC/UFRJ

Financiamento:

Fundação Nacional de Saúde (convênio 1473/2002, FUNASA/FUJB Proc. 10664-0)

Resultados preliminares:

Resultados de soroconversão aos 6 meses não mostrou diferença significativa entre os diferentes tipos de intervenção.

Critérios para registro de produtos veterinários

Marcos Vinícius de S. Leandro Jr.

Médico Veterinário

DPB/CPV

Esplanada dos Ministérios, Bloco D, anexo A sala 447
CEP 70043-900 Brasília - DF.
Tel.: (61) 3218-2230/3218-2704/3218-2732 - Fax: (61) 3323-5936
mvleandro@agricultura.gov.br

RESUMO

No Brasil o registro de produtos de uso veterinário está regulamentado pelo decreto-lei 467/69 e decreto 5053/04.

O artigo 1º do decreto-lei 467/69, estabelece a obrigatoriedade da fiscalização da indústria, do comércio e do emprego de produtos de uso veterinário, em todo o território nacional. O parágrafo único do mesmo define produto de uso veterinário como "todos os preparados de fórmula simples ou complexa, de natureza química, farmacêutica, biológica ou mista, com propriedades definidas e destinadas a prevenir, diagnosticar ou curar doenças dos animais, ou que possam contribuir para a manutenção de higiene animal".

O artigo 2º do decreto supra, determina os locais de aplicação desta norma, que são todos os estabelecimentos privados e oficiais, cooperativas, sindicatos rurais ou entidades congêneres que fabriquem, fracionem, comerciem ou armazenem produtos de uso veterinário, estendendo-se essa fiscalização à manipulação, ao acondicionamento e à fase de utilização dos mesmos.

O artigo 3º institui a obrigatoriedade de registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de todos os produtos de uso veterinário, elaborado no País ou importados, e bem assim os estabelecimentos que os fabriquem ou fracionem, e ainda aqueles que comerciem ou armazenem produtos de natureza biológica e outros que necessitem de cuidados especiais.

O decreto 5053/04 veio para regulamentar o decreto-lei, detalhando a operacionalização das atividades de fiscalização e registro de produtos veterinários.

Para solicitar o registro de um produto veterinário, o interessado deverá antes de mais nada registrar no MAPA o estabelecimento que irá elaborar ou importar este produto. Para registrar este estabelecimento, o MAPA realiza uma vistoria na qual é verificado o atendimento as exigências legais vigentes, tais como o decreto 5053/04 (artigos 11 a 16) e Instrução Normativa 13/03 que trata de Boas Práticas de Fabricação. Todo estabelecimento que elabora ou importa produtos de uso veterinário, deve ter um responsável técnico, que responde ao MAPA. No caso de estabelecimentos que elaboram produtos biológicos, este responsável técnico deve ser um Médico Veterinário.

Após o registro do estabelecimento, o interessado pode então dar entrada no pedido de registro do produto veterinário. Para tanto deve se dirigir a uma superintendência do MAPA no estado no qual está sediado e solicitar uma autorização para fabricação de lote piloto do produto em questão. O MAPA pode acompanhar qualquer uma das fases de produção deste lote, a fim de verificar as condições de biossegurança, e o andamento da produção e dos testes realizados.

Com as informações obtidas do lote piloto, o interessado confecciona o relatório técnico solicitando o registro do produto de uso veterinário, que deverá atender ao roteiro publicado na portaria SDA 74 DE 11 DE JUNHO DE 1996. As informações apresentadas no relatório técnico são então avaliadas por técnicos do MAPA, levando-se em conta a legislação vigente no Brasil, farmacopéias nacionais e internacionais e trabalhos científicos publicados.

No caso de dúvidas sobre alguma das informações técnicas apresentadas, o MAPA envia questionamentos ao interessado, e pode consultar outras instituições tais como universidades e instituições de pesquisa.

O produto é registrado, somente após o esclareciemtno de todas as dúvidas técnicas.

É importante ressaltar que a qualquer momento, o MAPA pode questionar a empresa fabricante ou importadora a respeito de aspectos técnicos relacionados a um dado produto, bem , como estabelecer novos regulamentos para avaliação dos parâmetros de qualidade do mesmo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Decreto-lei 467 de 13/02/1969

Decreto 5053 de 22/04/2004

Portaria SDA 74 de 11/06/1996

ROTEIRO PARA REGISTRO DE PRODUTOS BIOLÓGICOS DE USO VETERINÁRIO:

1. NOME COMERCIAL DO PRODUTO:
(MARCA)

2. ESTABELECIMENTO SOLICITANTE:
2.1 Nome:
2.2 Endereço:
2.3 Número de Registro:
2.4 Responsável técnico:
2.4.1. Profissão:
2.4.2. Número de Conselho/Região:

3.ESTABELECIMENTO FABRICANTE:
3.1 Nome:
3.2 Endereço:
3.3 Número:
3.4 Responsável Técnico:
3.4.1 Profissão:
3.4.2 Número do Conselho/Região:

4.ESTABELECIMENTO IMPORTADOR:
4.1 Nome:
4.2 Endereço:
4.3 Número de registro:
4.4 Responsável técnico:
4.4.1 Profissão:
4.4.2 Número do Conselho/Região:
4.5 Origem (País de procedência):
4.6 Empresa fabricante:
4.6.1 Endereço:

5.ESTABELECIMENTO FRACIONADOR:

5.1 Nome:

5.2 Endereço:

5.3 Número de registro:

5.4 Responsável técnico:

5.4.1 Profissão:

5.4.2 Número do Conselho/Região:

6. FORMA FARMACÊUTICA E DE APRESENTAÇÃO:

Forma física, características da embalagem (natureza e tipo de recipiente), sistema de inviolabilidade e conteúdo da mesma.

7. DESCRIÇÃO DO PRODUTO:

Antígenos vacinais, soros terapêuticos, reativos para diagnóstico e outros.

8. FÓRMULA QUALI-QUANTITATIVA: CONSTITUIÇÃO BIOLÓGICA E QUÍMICA:

Antígeno: identificação, quantidade/título. Soros: concentração em UI. Inativantes; Conservadores; Estabilizadores; emulsificantes ou outras substâncias.

9. MODO DE ELABORAÇÃO:

Descrever resumidamente os métodos de produção e inativação das substâncias virulentas o modo de obtenção dos agentes patógenos atenuados ou modificados, a origem e caracterização da cepa e o teste de controle da cepa semente.

Para soros: espécies produtoras, estado sanitário, protocolo de imunização dos animais doadores.

10. CONTROLES DO PRODUTO TERMINADO:

10.1 Controle de qualidade e pureza:

a - Provas biológicas (indicação da cepa);

b - Provas físico-químicas;

10.2 Controle de inocuidade:

a - Tipo de provas e espécies;

10.3 Controle de eficácia imunológica antigênica:

a - Forma de inativação;

10.4 Controle de eficácia imunológica e potência:

a - Tipo de método e espécie animal;

10.5 Controle de adjuvantes:

a - Método físico

b - Método físico-químico

c - Método biológico

10.6 Descrição das provas de eficácia biológica e/ou farmacológica de acordo com o inciso III do Art.. 21 das Normas aprovadas pela Portaria Ministerial nº 301, de 19/04/96.

11. ESPÉCIE(S) ANIMAL (IS) A QUE SE DESTINA(M):

12. DOSIFICAÇÃO:

Indicar a(s) quantidade(s) do produto expressado em unidades de volume e/ou UI animal ou peso corpóreo (quando corresponda), na aplicação preventiva e/ou curativa ou diagnóstico para as diferentes espécies, idade, sexo e categorias. Também deve especificar o intervalo entre as doses.

13. VIA DE ADMINISTRAÇÃO E FORMA DE APLICAÇÃO:

Parenteral,oral, dérmica, pulverização, escarificação, ocular, nasal ou outros.

14. PREPARAÇÃO DO PRODUTO PARA O USO CORRETO:

Soluções e suspensões ou outras.

14.1 Para produtos administrados na água de bebida indicar sua estabilidade, compatibilidade e tempo de permanência eficaz na solução.

14.2 Indicar o tempo máximo de utilização depois de sua preparação ou reconstituição.

15. TEMPO NECESSÁRIO PARA CONFERIR A IMUNIDADE E DURAÇÃO DA MESMA.

16. EFEITOS COLATERAIS (LOCAIS OU GERAIS) POSSÍVEIS; INCOMPATIBILIDADE E ANTAGONISMOS:

16.1 Contra-indicações e limitações de uso (casos em que a administração do produto possa dar lugar a efeitos nocivos);

16.2 Precauções que devem ser adotadas antes, durante ou depois da administração do produto.

17. CAUSAS QUE POSSAM MODIFICAR A QUALIDADE DO PRODUTO:

Precipitações, dissociações diminuição ou perda da atividade, frio, calor, luz solar, umidade.

18. LIMITE MÁXIMO E MÍNIMO DE TEMPERATURA PARA SUA CORRETA CONSERVAÇÃO

19. DATA DO VENCIMENTO (PERÍODO DE VALIDADE)

20. PRECAUÇÕES GERAIS:

20.1 Forma de conservação adequada;

20.2 Forma e método de eliminação dos envases quando constituem um fator de risco;

20.3 Riscos para Saúde Pública durante sua manipulação;

21. RÓTULO, INVÓLUCROS E BULA:

Juntar ao presente os modelos de impressos de acordo com o Artigo 21 das Normas aprovadas pela Portaria Ministerial nº 301, de 19/04/96.

22. TRABALHOS CIENTÍFICOS E/OU MONOGRAFIAS:

Deverão ser anexadas aos trabalhos científicos e/ou monografias relacionadas com o produto.

RESPONSÁVEL TÉCNICO

Nome/assinatura

Leishmaniose visceral: situação atual da vacinação canina

Luis Jacintho da Silva
UNICAMP
Faculdade de Ciências Médicas
Campus Universitário " 2GFEZINO VAZ"

CEP: 13081-970 - Campinas, SP
Tel.: (19)3788-7451 - Fax: (19)3788-7451 - ljsilva@unicamp.br

RESUMO

O papel do cão na epidemiologia da leishmaniose visceral humana é conhecido há muito tempo. As medidas clássicas de controle da doença visam tanto à eliminação do vetor flebotomíneo como a eliminação do reservatório canino. Intervenções de saúde pública visando à redução do número de cães infectados não apresentam resultados positivos na prática.

Explicações são a dificuldade de diagnóstico, com exames com sensibilidade e especificidade reduzidas, o tempo entre o diagnóstico do cão infectado e a sua efetiva eliminação e a resistência da população à medida.

A busca por uma vacina efetiva é antiga e muitas vacinas estiveram ou estão em investigação, porém, sem resultados que permitam a sua utilização em saúde pública.

Vacinas contra protozoários são intrinsecamente mais complexas e difíceis de se desenvolver, basta vermos o tempo e os recursos despendidos na busca de uma vacina contra a malária, ainda sem uma solução efetiva.

As leishmanioses apresentam um aspecto que incentiva a busca de uma vacina que é a estreita semelhança antigênica entre as diferentes espécies e variantes, permitindo, teoricamente, que uma única vacina viesse a proteger tanto contra as formas cutâneas e cutâneo-mucosas como as formas viscerais.

Por outro lado, a resposta imune é mais complexa e essencialmente celular, o que dificulta a obtenção de uma vacina eficaz.

A vacinação contra as leishmanioses data de séculos, uma vez que algumas sociedades da Ásia Central e do Oriente Médio praticavam a leishmanização, procedimento em que material de uma lesão cutânea era inoculado na pele de uma pessoa sã, em área coberta, induzindo proteção contra formas desfigurantes.

Vários pesquisadores, no Brasil inclusive, desenvolveram vacinas a partir de formas promastigotas de *Leishmania spp.*, inativadas pelo calor ou substância como fenol ou formol, algumas aplicadas com o BCG como adjuvante.

Essas vacinas, ainda que de baixa eficácia e com elevada incidência de efeitos colaterais, foram capazes de induzir imunidade protetora, estimulando a busca por vacinas melhores.

Os avanços da biologia molecular levaram à obtenção de diversas substâncias, a maioria delas proteínas com poder imunogênico, obtidas por tecnologia recombinante.

Diversas dessas substâncias foram avaliadas como vacinas e como meio diagnósticas, algumas delas ligadas a outras substâncias originárias de *Leishmania spp*.

Pelo menos uma, denominada K39, mostrou utilidade como meio diagnóstico, já estando comercializada.

Quanto à obtenção de vacinas eficazes, ainda se aguarda a comprovação da eficácia clínica e em saúde pública dessas vacinas, ainda que uma delas já esteja sendo comercializada no Brasil, sem, no entanto apresentar estudos que permitam uma conclusão segura sobre sua eficácia.

Dispor de uma vacina canina contra a leishmaniose visceral é um objetivo a ser perseguido, merecedor do apoio dos serviços públicos de saúde, das organizações internacionais de saúde e das financiadoras de pesquisa.

Cabe às organizações como a OMS e a OPAS, estabelecer com a comunidade científica e os produtores padrões de qualidade para essas vacinas e a definição cuidadosa dos "end-points", tamanho amostral e delineamento para os estudos de segurança, eficácia e efetividade, assim como de custo-benefício dessas vacinas.

BIBLIOGRAFIA

- Cole RN, Reed SG. Second-generation vaccines against leishmaniasis. Trends in Parasitology 2005, 21:244-9.
- Kubar J, Fragaki K. Recombinant DNA-derived proteins: from the laboratory to the field. Lancet Infect Dis 2005; 5:107-14.
- Vanloubbeeck V, Jones DE. The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. Ann N Y Acad Sci 2004; 1026: 267–72.

Papel do cão na transmissão da leishmaniose visceral em centros urbanos

Dra. Luciana Hardt Gomes

Diretora

Centro de Controle de Zoonoses

Secretaria Municipal de Saúde

Rua Santa Eulália, 86 – Santana - São Paulo, SP
Tel: (11) 6224 5589/5592 - Fax: (11) 6221 9823
lucianah@prefeitura.sp.gov.br - hardtgomes@terra.com.br

RESUMO

Em 1999 no município de Araçatuba, houve a confirmação do 1º caso humano autóctone de leishmaniose visceral americana (LVA) no estado de São Paulo. Até julho de 2003, o vetor *Lutzomyia longipalpis* foi identificado em 41 municípios da região oeste do Estado, sendo que 23 apresentaram transmissão de LVA canina, com positividade de 2,2 a 10,1%; 13 destes municípios apresentaram casos humanos autóctones. No período de 1999 a outubro de 2005 houve a confirmação de 590 casos humanos autóctones de LVA no estado, com 71 óbitos. O município de São Paulo é silencioso, vulnerável (contíguo a municípios com transmissão de LVA canina) e não receptivo para LVA. Foram diagnosticados 31 casos importados de LVA canina pelo Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores/Gerência de Controle de Zoonoses-SP (LabZoo/GCZ) em 2005. As ações de vigilância dirigida à população canina se dão através do diagnóstico laboratorial de amostras de soro de cães com suspeita clínica encaminhadas por laboratórios ou clínicas veterinárias; inquéritos sorológicos para leishmaniose em cães; diagnóstico parasitológico e molecular de amostras de animais clinicamente suspeitos encaminhados ao LabZoo/GCZ. Entre 1979 e 1982, de 389 cães apreendidos próximos às matas residuais do município, 85 amostras foram reagentes pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), dos quais 10 apresentaram títulos superiores a 40 (Iversson et al., 1983). De 1982 a 1992, foram realizadas coletas de sangue semanais em cães provenientes das mesmas áreas da pesquisa anterior e de outras áreas de mata residual, com 4000 amostras testadas pela RIFI, que foram não reagentes (dados não publicados). Em 1995 e 1996, foi realizado inquérito sorológico, por meio da RIFI, em 973 cães apreendidos em ruas próximas às matas residuais de vários parques do município, sendo todas as amostras não reagentes (Savani et al., 1999). Em 2001, 87 cães apreendidos na região da Serra da Cantareira e Horto Florestal e testados pela RIFI foram não reagentes. Em 2002, tendo em vista a situação de transmissão de LVA canina no Município de Embú das Artes confirmada pelos diagnósticos sorológico e parasitológico realizados pelo LabZoo/GCZ, foram realizadas apreensões de cães em ruas próximas ao limite deste município (bairros de Capão Redondo e Jd. Ângela), sendo as 139 amostras não reagentes. No mesmo ano, outras 93 amostras de cães apreendidos foram negativas para LVA. Em 2003 e 2004, foi realizada sorologia de 380 cães apreendidos, com resultados negativos. Até outubro de 2005, foram apreendidos 258 cães em áreas limítrofes aos municípios com transmissão ou em áreas próximas à matas, todos com sorologia não reagente pela RIFI. Além destes resultados, houve coleta de sangue de 202 cães esterilizados em mutirões realizados em bairros carentes da cidade, todos com resultados negativos para LVA. A vigilância entomológica realizada a partir de 1981 com armadilhas automáticas luminosas para levantamento da fauna flebotomínea nunca identificou as espécies vetoras envolvidas na transmissão da LVA, a *Lu. Longipalpis* e *Lu. cruzi* em áreas de matas residuais. O LabZoo/GCZ é referência desde 2003 para diagnóstico de LVA, sendo procurado por vários municípios do Estado, 10 da Grande São Paulo e outros 16 do interior. Para prevenir a transmissão de LVA no município, propõe-se a intensificação das ações de controle populacional de cães e monitoramento do vetor no entorno de regiões com casos positivos importados. Nos animais de rua a reprodução indiscriminada contribui para aumentar o número de indivíduos suscetíveis ou de reservatórios, portanto a densidade populacional interfere na viabilização da doença.

A cidade é um sistema vivo ou seja, uma construção sócio-ambiental onde existe vida. O crescimento desse sistema está limitado a sua capacidade de suporte e quando esta é extrapolada aparecem problemas como por exemplo: o aumento de animais próximos ao homem, gerando problema de saúde pública.

A população precisa refletir a respeito de seu estilo de vida, incluindo a relação com os animais, mudando valores e paradigmas. A educação para posse responsável de animais vem preencher essa necessidade, uma vez que os animais domésticos aparecem como reservatórios/transmissores de inúmeras zoonoses. O que se tem de novidade é que o enfoque desse processo educativo traz em seu bojo a melhoria de qualidade de vida tanto do homem quanto do animal, contribuindo para a prevenção de doenças e agravos.

O conceito de posse responsável reflete a percepção pelo ser humano, mais precisamente dos proprietários de cães e gatos de estimação, da total dependência física e afetiva desses animais. Cuidar de cães e gatos significa assumir total responsabilidade por toda e qualquer atitude desses animais mantendo-os em perfeitas condições de saúde e contenção, de tal forma que não seja causa de qualquer espécie de constrangimento ou risco a todos de seu convívio social.

Esse processo envolve mudança de comportamento e ela só se concretizará com o envolvimento da comunidade, que deve ser produtora/atora dessa transformação.

O controle reprodutivo da população animal é um dos eixos principais do conjunto de ações de posse responsável, resultando na diminuição da densidade animal que por sua vez diminui o número de animais suscetíveis a Leishmaniose e outras zoonoses.

Vale ressaltar porém que o processo educativo de posse responsável não é apenas a transferência de conhecimento, embora ela faça parte, mas principalmente o esforço e engajamento de todos os setores da sociedade no sentido de levar o cidadão a percepção dos riscos de doenças/agravos relacionados aos animais domésticos e da necessidade de remoção de conceitos ultrapassados no combate a eles. E desse novo pensar mais humano e mais moderno, estabelecer novas atitudes, às vezes corajosas e arrojadas para a determinação do convívio harmonioso homem e animal.

O papel das ongs de proteção animal e perspectivas para o controle da Leishmaniose Visceral

Marco Ciampi

Presidente ARCA Brasil

Assoc. Humanitária de Proteção e Bem-Estar Animal

(11) 3031-6991 - mciampi@arcabrasil.org.br
www.arcabrasil.org.br

RESUMO

Há mais de 40 anos a saúde pública brasileira busca erradicar a Leishmaniose Visceral (LV), por métodos que merecem, no mínimo, ser revistos, já que o problema só aumenta.

Empenhada em contribuir para a implementação de medidas que privilegiem todas as espécies, a ARCA Brasil - Associação Humanitária de Proteção e Bem-Estar Animal, na qualidade de representante do movimento de proteção animal, vem a esse oportuno encontro somar forças e apresentar propostas.

Após promover uma série de eventos e de consultar diversos setores da sociedade envolvidos com a questão, apresentamos nossas recomendações para as dinâmicas de implementação de políticas públicas de combate à Leishmaniose Visceral:

A QUESTÃO AMBIENTAL

1) Desmatamentos:

A ocupação de matas e áreas florestais, sem os essenciais cuidados com o impacto ambiental, é responsável pela migração do mosquito transmissor da Leishmaniose para as áreas urbanas e periurbanas, onde ele substitui seus hospedeiros naturais (animais silvestres) pelo cão e o homem. Essa afirmação reveladora não tem merecido a devida ênfase nos encontros técnicos sobre essa doença. "Grandes obras como a Transamazônica e o gasoduto Brasil - Bolívia provocou desmatamentos significativos. Nestas áreas, constatou-se surtos de enfermidades como a Malária e a Leishmaniose", declarou o Prof. Emérito Domingues Alves Meira, da Faculdade de Medicina da Unesp Botucatu, durante o 2º. Fórum: Leishmanioses – Realidades e Desafios nas Zoonoses, realizado em 5 de agosto de 2005, na cidade de Botucatu, SP. "O gasoduto foi inaugurado em Campinas em 1998; um ano antes, o primeiro caso fora detectado em Araçatuba, etapa anterior da obra".

A constatação é compartilhada por Alessandra Nava, veterinária, especialista em medicina da conservação do Instituto de Pesquisas Ecológicas. Em O Estado de S. Paulo, 03/07/03, declarou: "Com a leishmaniose acontece o mesmo processo da dengue. O mosquito que vive na floresta perde seu habitat e vai para a cidade, onde cria um novo ambiente e substitui seus hospedeiros naturais – os mamíferos silvestres –, por cães. Ou por homens. Quanto mais houver desmatamento, mais doenças vão aparecer".

2) Aprimoramento das políticas de controle ambiental e de controle do mosquito vetor. Os programas de limpeza em peridomicílio e as podas de árvores e arbustos são feitos de forma aleatória, contribuindo para que os mosquitos vetores encontrem condições favoráveis à sua proliferação. Com matéria orgânica à disposição (em lixões, aterros sanitários, granjas, terrenos baldios), os mosquitos sobrevivem e se multiplicam com rapidez assustadora. Cabe aos órgãos municipais encarregados desta prestação de serviço assumirem efetivamente sua responsabilidade nesta questão, cumprindo sua missão de saúde pública, preservando a vida e a integridade de toda população e seus animais.

POLÍTICAS VIGENTES X ALTERNATIVAS TÉCNICAS E HUMANITÁRIAS.

1) Legislação:

No Brasil, a lei vigente sobre a questão data de 1963, e preconiza eliminação compulsória dos cães infectados. Essa política truculenta e obsoleta tem sido crescentemente rechaçada pela sociedade. Não raro, proprietários de cães infectados levam seus animais para outros municípios, a fim de poupá-los, o que promove a disseminação da doença. Até mesmo veterinários declaram que não entregariam seus animais para o sacrifício, o que confirma a obsolescência das normas vigentes.

Outro fator a ser considerado é a alta taxa de reposição de animais. Enquanto o Poder Público pratica a eutanásia de cães, os proprietários adotam novos animais, na maior parte das vezes filhotes e, portanto, com sistema imunológico mais frágil. Esse animal recém-adquirido é colocado no mesmo espaço (possivelmente sem o controle do mosquito transmissor ou de medidas profiláticas), ficando suscetível à infecção. O ciclo de reposição banaliza o vínculo homem-animal e contribui para a ineficácia das políticas de controle da Leishmaniose.

2) Adoção de novos métodos de prevenção:

- Vacina: Desenvolvida no Brasil, a vacina tem eficácia comprovada em cerca de 90%. É reconhecida pelo Ministério da Agricultura, porém não validada pelos órgãos de saúde que, entre outras, alegam que o cão continua a ser transmissor. Tal afirmação é refutada pelos fabricantes, que apontam estudos confirmando o contrário: " Ela não somente protege os cães da incidência e morbidade da doença, mas também os mantém não transmissores quando infectados, bloqueando a transmissão para os flebotomíneos" (Manual Técnico Leishmaniose Visceral Canina – Fort Dodge).
- Coleiras repelentes: Estudos comprovam que o uso da coleira repelente em 80% da população canina, em determinada região, interrompe o ciclo de infecção e transmissão. Esses resultados foram confirmados de forma eloqüente em testes recentes realizados na cidade de Andradina, SP.

3) O aprimoramento dos métodos de detecção da doença, evitaria um grande número de sacrifícios desnecessários. Os métodos moleculares, como PCR, são os mais confiáveis para confirmação de Leishmaniose

4) Conscientização

- Esclarecimento da opinião pública, com forte ênfase nos princípios da posse responsável.
- Esclarecimento da classe veterinária, por meio da produção e difusão de materiais desenvolvidos especialmente para os profissionais da área, de modo a suprir suas eventuais dificuldades em lidar com a doença, tanto no que concerne aos diagnósticos quanto na orientação do proprietário sobre prevenção e / ou manejo e tratamento do animal infectado.

5) Implantação de programas de controle de natalidade animal. Elemento indispensável, pois permite diminuir a população de cães, principal reservatório doméstico da doença. Além de conscientizar o proprietário, é fundamental facilitar o acesso à cirurgia de cães e gatos, especialmente no que se refere aos custos de tais procedimentos.

6) A possibilidade de tratamento para os animais infectados. O laço afetivo dos proprietários de animais é algo que, definitivamente, não pode ser desprezado, como observou o Dr. Vitor Marcio Ribeiro, prof. Titular da PUC-MG, no Seminário Veterinário - Responsabilidade Social e Bem-Estar Animal, promovido pela ARCA Brasil em parceria com a Anclivepa-SP, em outubro de 2005. O especialista defende que, uma vez observadas todas as medidas profiláticas e preventivas, mediante compromisso assumido, este é um direito do proprietário, uma vez que o cão tratado não oferece risco à saúde pública.

7) Custos da eutanásia x medidas humanitárias. Nos órgãos responsáveis pelo controle de zoonoses, o custo médio para a eutanásia chega a R$140,00 (cerca de US$65) por animal. Assim como ocorre em outras áreas da saúde, a implementação de medidas preventivas em grande escala tende a revelar-se economicamente vantajosa. Essa constatação ganha relevância no contexto dos países em desenvolvimento, onde as limitações financeiras freqüentemente servem de justificativa para o não atendimento de inúmeras necessidades.

CONCLUSÃO

Além dos inúmeros argumentos técnicos ora expostos, que apontam para novas perspectivas no combate e controle da Leishmaniose, não podemos perder de vista os aspectos humanitários, em contraponto às abordagens puramente sanitaristas. Os responsáveis pela condução das políticas públicas de controle da Leishmaniose devem estar atentos a estes fatores, sob risco de relegar o cão ao papel de "vilão", quando, na verdade, ele é mais uma vítima. Novas diretrizes podem e devem ser implementadas, sobretudo quando a estas estão agregados valores concernentes à ética, ao respeito pela vida e aos anseios da sociedade.

Cabe aos órgãos municipais responsáveis por essa prestação de serviço à sociedade assumirem efetivamente seu papel de responsáveis por essa questão, cumprindo sua missão de saúde pública e preservando a vida e a integridade de toda população e seus animais.

SOBRE A ARCA BRASIL

As entidades de proteção animal, autenticas representantes da sociedade civil organizada, devem cumprir suas funções e, sempre que possível, atuar como intermediárias entre os vários setores envolvidos com a vida animal. Há 12 anos que a ARCA Brasil desempenha essa tarefa, assessorando municípios na implantação de programas pioneiros de conscientização para a posse responsável e controle populacional de cães e gatos e organizando eventos, campanhas e congressos. Entre suas realizações, destacam-se três Congressos de Bem-Estar Animal, dois seminários Veterinário - Responsabilidade Social & Bem-Estar Animal, co-organização da Conferência Internacional das Interações Homem-Animal e o Programa Veterinário Solidário, que representa uma iniciativa inédita de estabelecimento de parceria entre a proteção animal e a classe médica veterinária.

Surveillance of Visceral Leishmaniasis

Dr. Bruno Chomel

WHO/PAHO Collaborating Center on New and Emerging Zoonoses

Veterinary Public Health Laboratory

Department of Population Health & Reproduction

School of Veterinary Medicine

University of California at Davis

1021 Haring Hall, 95616 - Davis, California, USA
Tel: (530) 752-8112 - Fax: (530) 752-2377/5842 - bbchomel@ucdavis.edu

INTRODUCTION/BACKGROUND

Leishmaniasis represents a complex of diseases with important clinical and epidemiological diversity.[1] Among these; visceral leishmaniasis (VL) is of major importance, as it is usually fatal when not treated. The burden of visceral leishmaniasis, also known as Kala azar in India, is increasing worldwide and is of major concern as it is the cause of much death and disease in several developing countries. Visceral leishmaniasis has also been re-emerging in several developed countries associated with the AIDS epidemic.[1, 2] Worldwide, it is estimated that half a million new cases of visceral leishmaniasis are occurring each year.[1] Visceral leishmaniasis is caused by L. donovani in India, Bangladesh and East Africa, *L. infantum* in the Mediterranean region and *L. chagasi*/*L infantum* in the New World.[2] One of the main risk factors associated with the emergence of visceral leishmaniasis is the main migration from rural to urban areas.[3] In Brazil, incidence of VL has increased from 2,154 cases in 1998 to 3,892 in 1999, with a possible association between human infection and the presence of dogs in or around human dwellings. [3]

Leishmaniasis is a vector-borne parasitic infection transmitted by the bite of an infected female sandfly whose hosts are animals, such as dogs or rodents, or human beings.[4] The Leishmania parasite multiplies in the gut of the sand fly and becomes infective 8-20 days later.[1] In the New World, the vector is mainly *Lutzomyia longipalpis*, but in the old world, several species are involved, mainly belonging to the subgenus *Phlebotomus* (e.g. *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. neglectus*).[5] Leishmaniasis is a highly focal disease with widely scattered foci. Visceral leishmaniasis occurs in at least 65 countries, but 90% of the cases are concentrated in poor rural and suburban areas of 5 countries: Bangladesh, India, Nepal, Sudan, and Brazil.[1] In Brazil and other South American countries, migration of populations from rural to urban areas has led to a quick urbanization of VL. Similarly, unplanned urbanization may encompass rural endemic areas where the zoonotic cycle occurs.[1]

Early case detection and treatment are the most important control measures for leishmaniasis. For zoonotic visceral leishmaniasis, which is usually fatal if left untreated, priority is given to the detection and treatment of human cases. Other control measures include large-scale screening and testing of dogs, the main reservoir, spraying of houses and animal shelters, and individual protection. Environmental management measures such as destroying breeding and resting sites of the vector have been recommenced for zoonotic cutaneous leishmaniasis control.[4]

PUBLIC HEALTH SURVEILLANCE

Public health surveillance has been defined as: "the ongoing systematic collection, analysis and interpretation of health data essential to the planning, implementation and evaluation of public health practice, closely integrated with timely dissemination of these data to those who need to know. The final link in the surveillance chain is the application of these data to prevention and control. A surveillance system includes a functional capacity for data collection, analysis and dissemination linked to public health programs." CDC, 1986.[6]

All these concepts fully apply to surveillance of visceral leishmaniasis, as the objectives of a surveillance system are to: 1) describe the ongoing pattern of disease occurrence and to link with public health action; 2) study the natural history and epidemiology of the disease, and; 3) provide information and baseline data.[7] Therefore, a classical scheme for surveillance is based on disease recognition, which can be delayed when it occurs in new areas where it was not initially observed or detected. When the disease is recognized (usually human cases, more likely in children for VL), a surveillance system will have to identify and confirm the cases, collect data concerning descriptive epidemiology, such as the number of human and animal cases, the density of possible vectors, the type of habitat, etc. Data will then have to be tabulated and analyzed on a regular basis to give appropriate interpretation. That information will have to be distributed to the various public health agencies to allow an appropriate response for prevention and control activities.

Such a system is quite complex for visceral leishmaniasis, as we have to deal not only with cases of disease, but sub-clinical infection in both the victims (humans) and the reservoir (dogs). It is estimated that there are 30-100 sub-clinical infections for every overt case of visceral leishmaniasis.[2] The time between becoming infected after a sandfly bite and developing clinical symptoms is usually long (several weeks to several months; on average 2-4 months). Furthermore, the disease is often diagnosed late, as the mean delay from onset of symptoms to definitive diagnosis was 7.7 months (SD 6.0) in a study in India, and 27.6% of cases were diagnosed longer than 9 months after onset of disease.[2]

SURVEILLANCE METHODOLOGY IN THE HUMAN POPULATION

1. Clinical surveillance: Active and early detection of clinical cases.

Visceral leishmaniasis (VL), also known as 'kala azar', is characterized by irregular fever, weight loss, swelling of the liver and spleen, and anemia. It is the most severe form of leishmaniasis, and is usually fatal if left untreated. In prospective studies conducted in northeastern Brazil, about 12% of the children develop typical visceral leishmaniasis.[8] Malnutrition and immunosuppression is major risk factors that can lead to clinical form of the disease. It has been shown in Brazil that children suffering malnutrition are nine times more likely to develop typical visceral leishmaniasis.[1] The incubation period can be months or years and, unlike the cutaneous forms of leishmaniasis, it involves the internal organs. So far spleen biopsy and visualization of the parasites has been the most reliable method, with a sensitivity of 95% (comparing with only 70% for bone marrow and 58% for lymph node aspirate).[1] Unfortunately, this method is not applicable in most remote areas which do not have appropriate health care facilities. Development of molecular methods using PCR technique on peripheral blood samples is promising, as sensitivity is now to the level of one parasite.[2] However, such a tool is not yet readily available in field conditions. A PCR-ELISA technique has been developed which is highly sensitive and could detect VL infection from peripheral blood smears.[9] Antigen detection is more specific than antibody based immunodiagnostic tests.[9] The new latex agglutination test (KATEX) for detecting leishmanial antigen in urine of patients with VL has a sensitivity ranging from 68 to 100% and a specificity of 100%. The antigen is detected quite early during the infection, which is of major importance for disease control and usually decline rapidly following chemotherapy.[9]

A major limitation to surveillance is that no regular global surveillance exists for leishmaniasis itself, even though leishmaniasis is notifiable in 33 out of the 88 countries where it occurs.[4] A surveillance network has been developed for VL/HIV co-infection, but no similar system exists for typical VL.[1]

2. Active detection of human infections:

The clinical cases of VL are only the visible part of the much larger group of individuals that are infected. Detection of infected people is based on serosurveys in local populations where clinical cases have been detected. Until recently, serological diagnosis was mainly based on ELISA, IFAT or direct agglutination test (DAT).[1, 2] ELISA has 98% sensitivity and 100% specificity, but cannot be used in the field. DAT can be used in the field, but requires a cold chain.[1] DAT has a sensitivity of 91 to 100% and a specificity of 72 to 100%.[8] The use of lyophilized antigen has improved the applicability of the test in field conditions.[1] A recent strip test (dipstick) using the recombinant kinesin protein rK39 antigen has been developed. It had a high sensitivity (100%) and specificity (98%), when tested in India.[2] Interestingly, a change in the anti-rk39 antibody titer during and after therapy for VL was predictive of cure or relapse.[10]

For field studies, the strip test based on rk39 antigen has been found to be highly sensitive and specific, and is rather inexpensive (about 1 to 1.5 US $).

SURVEILLANCE METHODOLOGY IN THE DOG POPULATION

Active detection of clinical cases of VL in dogs should be performed, but it is believed that only 10% of infected dogs develop overt clinical disease.[11] Usually, clinical signs include local or generalized lymphadenopathy (93%), alopecia and dermitis (90%), splenomegaly, cutaneous lesions, epistaxis (9%), onychogryphosis (75%), emaciation (26%), ocular lesions (18%), diarrhea and lameness (23%).[12] These signs develop on average after 2-4 months incubation. Recognition of such clinical signs need the support of local veterinary services and may not be feasible in very poor areas, especially in uncontrolled urban development zones. Surveillance of VL in dog populations is largely based on serosurveys in VL endemic areas. Serological tests mainly include IFAT ("gold standard") and ELISA, dot-ELISA using crude *Leishmania* antigens or direct agglutination tests (DAT). However, the lack of sensitivity of most diagnostic tests for canine leishmaniasis is a major limiting factor for the detection and elimination of positive dogs.[13] Interpretation of results obtained by detection of specific antibodies in dogs from endemic areas is often difficult. When dealing with asymptomatic animals in endemic areas, immunological techniques do not discriminate between infected and resistant animals.[14] In northeast Brazil an overall incidence of 6.55 cases for every 100 dogs per year was found.[12] Seroprevalence often underestimates the real number of infected dogs in endemic areas, as many dogs that were seronegative were found to be PCR positive.[12] Even though asymptomatic dogs are highly infective to sandflies, symptomatic dogs are even more infective to insect vectors and a strong positive correlation between infectivity and serological response has been evidenced.[11] Therefore, dog population control should target mainly dogs with clinical signs of the disease. Several studies have shown the limited impact of mass elimination of dogs in VL control;[13, 15] whereas some studies suggested a positive effect.[16] Nevertheless, the efficacy of such programs is still controversial.[16] Two studies concluded that dog culling programs do not reduce the incidence of VL, even in optimized intervention, because of high incidence of infection and infectiousness, lack of sensitivity and specificity of serologic methods to accurately identify all infected dogs and time delays (on average 80 to 180 days) between diagnosis and culling.[13, 15] The use of deltamethrin-impregnated collars or topical permethrin (spot-on) to protect dogs from a significant number of sand fly bites represents a new control strategy for canine leishmaniasis.1,5 Deltamethrin collars decrease sand fly bites by 80 to 96%.[11] The first field evaluation of the efficacy of these collars against canine leishmaniasis showed that their impact on the incidence could be negligible during low transmission seasons, but could be strong when the level of transmission is high, with a reduction of seroconversion rates from 50% to 86%.[11,12] In Brazil, mass application of deltamethrin collars led to a 50% reduction in canine seroreactors after 5 months of collar use.[5] Therefore, monitoring the distribution of such collars and evaluating the percentage of dogs wearing such collars on a regular basis should be implemented in appropriate surveillance systems.

SURVEILLANCE METHODOLOGY IN SANDFLIES AND THE ENVIRONMENT

The third component of a visceral leishmaniasis program is to monitor the level of infection in the vector population by random trapping and sampling of phlebotomine flies and evaluating the infection rate of these insects in key locations, especially in human habitats and in recently urbanized areas that encroach on rural endemic zones. Infection rates in sandfly vectors are typically low even when transmission is high. Traditionally infected flies are identified by dissection and microscopic examination of individual flies. A more efficient method of surveying for infection rate in sandfly populations is needed. This may be based on the use of a PCR assay and examination of sandfly pools rather than individual insects.

The sandfly vector, mainly *Lutzomyia longipalpis* in South America is nocturnal, anthropophilic and reproduces best between 23 ˚C and 28 ˚C in a relative humidity of 70% to 100%. It has a short flight range and completes its life cycle in 5-8 weeks under ideal conditions.[17] A major limiting factor in the surveillance and control of visceral leishmaniasis is our very limited knowledge of the life cycle of these sandflies. We do not know where immature forms develop; what

type of habitat they develop in and how long their development to adult forms takes. Vector control measures are therefore mainly limited to the use of residual insecticide (usually pyrethroids) house spraying or individual protection based on pyrethroid impregnated bednets.[1] House spraying is efficient but difficult to sustain due to logistic constraints and high cost.[1] Major progress has been made recently in getting more efficient long-lasting bednets (US$ 5 for family size, 5 year duration) and bednets have shown to be of major importance in areas endemic for both leishmaniasis and malaria. House to house surveys are essential to the success of disease control and need to be conducted regularly.

An important component of VL surveillance that is readily available with modern technology is landscape epidemiology using remote sensing technology and geographic information systems. These systems can evaluate and then monitor the climatic and vegetation parameters associated with increased abundance of vectors and consequently increased number of infections and clinical cases in both dogs and humans. Such a system has been applied in Brazil recently.[17] A Landsat Thematic Mapper scene covering Caninde, Ceara in northeastern Brazil (September 25, 1986) was spectrally enhanced and classified using ERDAS (Atlanta, GA) Imagine for 873 4-km^2 areas. The population and number of cases of American visceral leishmaniasis (AVL) were determined for each 4-km^2 area. Relative risk (RR) ratios were calculated for climate, demographic, and case data recorded for 17 years by the Municipality of Conide. The RR of AVL for a child less than 10 years old from the foothills relative to non-foothill residency was 4.0 (95% confidence limit = 3.5, 4.5). The RR of AVL in children was 9.1 during a time when the three-year rolling rain average (current year plus two previous year's precipitation) was between 40 and 60 cm relative to rain greater than 100 cm. The results suggest that features detected by RS techniques combined with climatic variables can be used to determine the risk of AVL in northeastern Brazil.[17] A similar study in Bahia, Brazil was very useful to determine that areas with low difference vegetation index values were related to high numbers of sand flies and high numbers of human and canine VL positive cases.[18] Caatinga vegetation type was the dominant vegetation type in the endemic area.

RECOMMENDATIONS

1. Active surveillance of clinical cases in both humans and dogs is required in endemic zones to allow appropriate control measures.

2. Detection of human and animal infections within the large population of non-symptomatic individuals is a major priority for effective surveillance system and requires the development of better serological diagnostic tests that are sensitive, specific and applicable in the most remote areas. Improvement of diagnostic tests is required not only for humans but also for dog populations.

3. Distribute insecticide impregnated collars at the time of annual rabies vaccination control campaigns and monitor regularly the percentage of the dog population wearing insecticide impregnated collars.

4. Evaluate the level of infection of sandflies in endemic areas as well as in uncontrolled urbanized areas that are encroached into endemic rural areas.

5. Establish an early warning system based on climate data, vegetation coverage and population dynamics using GIS and remote sensing to predict and prevent epidemics is highly recommended.

REFERENCES

01. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004;27:305-318.

02. Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. Lancet Infect Dis. 2002;2:494-501.

03. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001;95:239-243.

04. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Available at: http://www.who.int/leishmaniasis/en/ Accessed October 17, 2005.

05. Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. Int J Parasitol. 2005;35:1169-1180.
06. Thacker SB, Stroup DF. Future directions for comprehensive public health surveillance and health information systems in the United States. Am J Epidemiol. 1994;140:383-397.
07. Declich S, Carter AO. Public health surveillance: historical origins, methods and evaluation. Bull World Health Organ. 1994;72:285-304.
08. Jeronimo SM, Teixeira MJ, Sousa A, Thielking P, Pearson RD, Evans TG. Natural history of Leishmania (Leishmania) chagasi infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. Clin Infect Dis. 2000;30:608-609.
09. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 ;9:951-958.
10. Melby PC. Recent developments in leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis. 2002;15:485-490.
11. Rosypal AC, Zajac AM, Lindsay DS. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2003;33: 921-937.
12. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol. 2002;18:399-405.
13. Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. J Infect Dis. 2002;186:1314-1320.
14. Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. Vet Parasitol. 1998;76:173-180.
15. Moreira ED Jr, Mendes de Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG, Pontes de Carvalho L. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. Vet Parasitol. 2004;122:245-252.
16. Palatnik-de-Sousa CB, Batista-de-Melo LM, Borja-Cabrera GP, Palatnik M, Lavor CC. Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. An Acad Bras Cienc. 2004;76:583-593.
17. Thompson RA, Wellington de Oliveira Lima J, Maguire JH, Braud DH, Scholl DT. Climatic and demographic determinants of American visceral leishmaniasis in northeastern Brazil using remote sensing technology for environmental categorization of rain and region influences on leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2002;67:648-655.
18. Bavia ME, Carneiro DD, Gurgel Hda C, Madureira Filho C, Barbosa MG. Remote Sensing and Geographic Information Systems and risk of American visceral leishmaniasis in Bahia, Brazil. Parassitologia. 2005;47:165-169.

Vigilância da Co-infecção *Leishmania*/HIV

Dra. Ana Rabello

Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz

Av. Augusto de Lima, 1715
Belo Horizonte, MG - CEP: 30190-002
Tel: (31)3349-7708 - Fax: (31)3295-3115 - ana@cpqrr.fiocruz.br

RESUMO

A co-infecção *Leishmania*/HIV é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como doença emergente. Aumento considerável do número de casos de co-infecção foi observado na década de noventa e mesmo com os avanços obtidos com a terapia antiretroviral, há projeções de seu crescimento, devido à superposição geográfica das duas infecções, decorrente da urbanização das leishmanioses e da ruralização da infecção por HIV[1]. A situação ainda é preocupante no sudoeste da Europa, no sul da Ásia, no sudeste e no sudoeste da África e nas Américas, tendo sido a co-infecção relatada em 34 países: Espanha, França, Portugal, Itália, Argélia, Burkina Fasso, Brasil, Camarões, Costa-Rica, Croácia, República do Djibuti, Etiópia, Grécia, Guadalupe, Guiania Francesa, Guiné-Bissau, Índia, Kênia, Malawi, Mali, Malta, Marrocos, Mônaco, México, Panamá, Peru, Senegal, Sudão, Sultanato de Oman, Tunísia, Ucrânia, Bolívia, Venezuela e Rússia.

Provavelmente, os números oficiais da co-infecção são subestimados, por resultarem de notificação passiva e da leishmaniose não ser oficialmente considerada doença definidora de AIDS (CDC, 1993). As principais informações sobre aspectos epidemiológicos da co-infecção vêm da Europa. Em avaliação de 2.000 casos notificados à OMS até 2001, é notável o predomínio de homens (89%), usuários de drogas endovenosas (72%) e do grupo de etário de 30 a 50 anos. Naquele continente, nas áreas onde a leishmaniose visceral é endêmica, a Aids aumenta o risco de leishmaniose visceral em 10 a 1.000 vezes e os usuários de drogas injetáveis apresentam risco 2,5 a 3,6 vezes maior de adquirir leishmaniose visceral do que outras categorias de exposição ao HIV[2]. A transmissão da leishmaniose através do uso compartilhado de agulhas é favorecida pelo elevado número de parasitos circulantes observados em pacientes imunocomprometidos. A taxa de infecção de flebotomíneos, através de xenodiagnóstico artificial, ocorre em 95% dos pacientes co-infectados e em 3 a 4% dos portadores imunocompetentes, sendo a taxa de positividade inversamente correlacionada com os valores de células TCD4+/µl)3. Ao diagnóstico da co-infecção, 42 a 72% dos pacientes, em ausência de terapêutica anti-retroviral, já tem diagnóstico de Aids e 42 a 68% apresentam outras doenças oportunistas[2]. Estes dados se referem predominantemente à experiência européia, sendo escassa a informação de outros países.

A co-infecção *Leishmania*/HIV impõe dificuldades específicas em termos de diagnóstico e tratamento. A avaliação do conjunto de manifestações clínicas das leishmanioses em pacientes portadores de HIV indica que não existe um perfil definido de manifestações clínicas que possa ser indiscutivelmente associado com a co-infecção. Embora as mais freqüentes sejam as apresentações clássicas da doença, as mais variadas formas de apresentação foram descritas na co-infecção *Leishmania*-HIV, sendo as principais formas de apresentações não-usuais o acometimento dos tratos gastro-intestinal e respiratório e as disseminações em órgãos múltiplos. A dificuldade do diagnóstico clínico também é agravada pela presença de outras doenças como criptosporidiose, criptococose, micobacterioses e infecção por citomegalovirus. O diagnóstico sorológico pela pesquisa de anticorpos apresenta sensibilidade próxima de 60%. O diagnóstico parasitológico apresenta elevada positividade, mas exige procedimentos médicos de alta complexidade para obtenção de amostras, como a punção aspirativa de medula óssea ou baço. A reação em cadeia da polimerase permite a detecção de DNA de *Leishmania spp*. em sangue periférico com elevada sensibilidade, mas requer estrutura laboratorial complexa e tem custo relativamente elevado.

Os pacientes co-infectados apresentam maior freqüência de efeitos adversos ao tratamento com as drogas usualmente empregadas, sendo também mais comuns as falhas terapêuticas e as recidivas. Em pacientes que não recebem

terapêutica anti-retroviral, a sobrevida média em portadores de leishmaniose visceral é de quatro a 12 meses, sendo observada recidiva em 90% dos pacientes em 12 meses. A letalidade durante o primeiro episódio de leishmaniose visceral é de 19%. A terapêutica anti-retroviral reduziu a incidência anual de leishmaniose visceral na Espanha, de 4,8 casos/100 para 0,8 casos/100, mas 70% dos pacientes tratados ainda apresentam recidivas[4].

No Brasil, uma revisão de 90 casos publicados ou apresentados em congressos científicos, mostrou perfil distinto ao da Europa, em termos de apresentação clínica e de categoria de exposição ao HIV. Foram identificados casos em 12 estados brasileiros. A maioria dos pacientes (63%) apresentou a forma tegumentar, sendo que em 43% havia acometimento de mucosas. A média de idade foi de 37 anos, com predomínio do sexo masculino (93%). A categoria de exposição heterossexual foi a mais freqüente, ocorrendo em 49% dos casos. O encontro do parasito foi relatado em 94% dos casos de leishmaniose visceral e em 91% dos casos de leishmaniose tegumentar[5]. Em apenas dez casos, a espécie de *Leishmania* foi caracterizada, sendo sete identificadas como *L.(V.) braziliensis*, uma como *L. (V.) guyanensis*, uma como sub-gênero *Viannia* e uma como *L (L.) chagasi*. A inclusão de um campo para informação de infecção por HIV na ficha de notificação de leishmaniose visceral para o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) em 2000, permitiu a identificação de 211 casos de co-infecção, no período de 2000 a setembro de 2004, com predomínio do grupo etário de 20 a 59 anos (72%) e do sexo masculino (69,2%)[6].

Uma avaliação detalhada da co-infecção *Leishmania*/HIV no mundo tornou-se possível devido à iniciativa da Divisão de Controle de Doenças Tropicais da OMS, que estabeleceu em 1996, o Centro de Registros Internacionais em Co-infecção *Leishmania*/HIV (CRI-L/HIV), a partir de 1998, co-coordenado pelo "Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)". O Centro de Registros foi criado com o objetivo de coletar, processar e difundir mundialmente informações e elaborar recomendações sobre a co-infecção. Parte das atividades do Centro de Registros foi organizada através do estabelecimento de uma Rede de Vigilância Mundial, com o envolvimento de 28 centros nacionais. Estes centros incluem laboratórios e hospitais com infra-estrutura para diagnóstico e manuseio de pacientes co-infectados[7].

Como participante do CRI-L/HIV, a Rede Brasileira de Estudos sobre a Co-infecção *Leishmania*/HIV, constituída por membros da comunidade científica, da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e dos Programas de Controle de DST/AIDS e de Leishmanioses do Ministério da Saúde, realizou oficinas de trabalho, que definiram as seguintes ações prioritárias: 1) divulgar os conhecimentos existentes sobre a co-infecção *Leishmania*/HIV; 2) elaborar material informativo sobre manejo clínico da co-infecção; 3) estabelecer a rede de vigilância de co-infecção *Leishmania*/HIV nos estados endêmicos para as leishmanioses, utilizando o sistema de serviços de referência para HIV e leishmanioses do país, integrando a rede mundial de vigilância da Organização Mundial da Saúde, estabelecendo pelo menos um Centro de Referência para co-infecção *Leishmania*/HIV em cada estado onde a co-infecção tenha sido relatada ou seja prevista; 4) estimular a pesquisa em aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e taxonômicos; 5) discutir critérios para inclusão de leishmanioses como doença oportunista na Aids.

Atendendo às recomendações 1 e 2 acima mencionadas, em 2003, um grupo de participantes da Rede Brasileira de Estudos sobre a Co-infecção e consultores elaborou o "Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Co-infecção *Leishmania*/HIV", editado pelo Ministério da Saúde. Vinte mil exemplares foram distribuídos aos Serviços de Saúde do país. A Rede de vigilância está em fase de implementação, através do estabelecimento da Vigilância Aprimorada para a Co-infecção *Leishmania*/HIV, com previsão de inclusão de onze centros. Outra estratégia é a integração das bases de dados das duas infecções. Esta iniciativa está sendo realizada com em parceria pelo Programa de Controle de Leishmanioses, a Coordenação Nacional de DST/AIDS e a Rede Brasileira de Estudos sobre a Co-infecção *Leishmania*/HIV. O escopo da vigilância aprimorada no Brasil contempla a possibilidade de fortalecer a capacidade de detecção e acompanhamento dos indivíduos co-infectados assim como de aninhar pesquisas consideraras prioritárias destinadas a identificar: a magnitude da co-infecção na população de pessoas vivendo com HIV-aids; o curso natural da leishmaniose e da infecção pelo HIV nos pacientes co-infectados; e os fatores de prognóstico após tratamento específico, com ênfase especial naqueles preditores de recidiva.

No contexto atual da co-infecção *Leishmania*/HIV, a organização de redes de Vigilância é uma prioridade. Há necessidade de informação sobre sua ocorrência e seus aspectos epidemiológicos e clínicos. O conhecimento sobre estes aspectos (e suas especificidades regionais) é o único instrumento capaz de permitir o delineamento de estratégias de manejo e de controle baseadas em evidências, que ainda faltam exatamente (e não por acaso) aos países onde as duas infecções são mais prevalentes e acarretam os maiores sofrimentos às populações já expostas à pobreza, com acesso

limitado aos sistemas de saúde. Os objetivos das Redes de Vigilância são: 1) mapeamento da distribuição geográfica da co-infecção; 2) sistematização da informação sobre aspectos demográficos, epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e terapêuticos; 3) estabelecimento de centros de referência com aumento da disponibilidade de métodos diagnósticos e de isolamento de parasitos; 4) estabelecimento de fluxo para centro de tipagem; 5) ampliação da capacitação dos serviços de atenção básica à saúde; 6) geração de informação/conhecimento relevantes para o planejamento e a avaliação de medidas de controle; 7) constante avaliação e re-avaliação das normatizações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Leishmaniasis and HIV co-infection. World Health Organization. Disponível em http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/ burden_hiv_coinfection/en/index.html - acesso em 14 Novembro 2005
2. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. Annals of Tropical Medicine & Parasitology. 2003;97:3-15
3. Molina R, Canavate C, Cercenado E, Laguna F, Lopez-Velz R, Alvar J. Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV-infected patients using colonized Phlebotomus perniciosus. AIDS. 1994;8:277-281
4. Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velz R, Molina R, Moreno J. Leishmania and Human Immunodeficiency Virus coinfection: the first 10 years. Clinical of Microbiology Reviews. 1997;10:298-319
5. Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. Annals of Tropical Medicine & Parasitology. 2003;97:17-28.
6. Maia ANS, Alves W, Sousa M, Costa W, Oliveira G, Bonfim R. Estudo descritivo do perfil epidemiológico dos casos de co-infecção *Leishmania chagasi*/HIV no Brasil no período de 2000 a 2004. Anais do Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, 2004
7. Conclusions and recommendations of the 4th joint meeting on *Leishmania*/HIV co-infection, Parasite, 2001, p.376-378.

Vigilância da Leishmaniose Visceral nas Américas a partir da Caracterização de Unidades Territoriais de Relevância Epidemiológica

Dr. Paulo Sabroza

Pesquisador Titular

Escola Nacional de Saúde Pública

Fundação Oswaldo Cruz

Rua Leopoldo Bulhões 1480 - Rio de Janeiro, RJ
Tel: (21) 25982683 - sabroza@ensp.fiocruz.br

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma zoonose amplamente difundida, ocorrendo na Ásia, na Europa, na África e nas Américas. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990)

Nesta, é mais freqüente no Brasil, e numa escala menor na Venezuela e na Colômbia, mas também foram registrados casos humanos na Bolívia, Paraguai, Peru, Argentina, Equador, Suriname, Honduras, El Salvador, Guatemala e México. (ACHA & SZYFRES, 2003)

Nos EUA já foram confirmados vários cães infectados, embora até agora não tenham sido diagnosticados casos humanos autóctones.

Na sua forma clínica clássica em humanos é uma enfermidade sistêmica grave, que apresenta grande letalidade quando não tratada de modo adequado e oportuno. Isto acontece frequentemente quando os profissionais de saúde não pensam nesta doença ao proceder o diagnóstico diferencial, mesmo porque não tem conhecimento da possibilidade de transmissão na sua área de trabalho.

Por isto, e por sua recente tendência à difusão territorial, a vigilância epidemiológica deste problema é uma ação que precisa ser amplamente reforçada nos diferentes níveis dos sistemas de saúde dos países americanos.

A vigilância desta enfermidade transmissível precisa considerar as características da endemia em cada país e suas diferenças regionais, e sua implementação depende do conhecimento sobre seus ciclos de transmissão, da caracterização dos padrões epidemiológicos nas populações humanas e caninas e da consistência dos sistemas de informação em saúde.

FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS PARA A VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NAS AMÉRICAS

Nas Américas, a leishmaniose visceral tem como agente etiológico um único parasita, a Leishmania chagasi, considerada distinta dos agentes etiológicos dessa endemia nos outros continentes. Formas clínicas com comprometimento sistêmico também podem, muito raramente, ser observadas em processos infecciosos causados por outras espécies de leishmanias, mas com características epidemiológicas muito diferentes.

Embora ainda permaneçam várias dúvidas quanto aos ciclos que mantém estas parasitas na natureza, tanto marsupiais como canídeos selvagens já foram encontrados infectados com freqüência suficiente para serem considerados seus reservatórios. A ocorrência de infecção em ambientes naturais tem sido relatada em diversos ecossistemas, como a floresta equatorial ombrófila densa, a floresta tropical úmida e diversos tipos de savanas americanas. (LAINSON. & RANGEL, 2003)

A questão dos vetores responsáveis pela transmissão nos ciclos naturais ainda não está suficientemente esclarecido, mas é provável, considerando a variedade de condições ambientais onde eles ocorrem, que diferentes espécies de flebotomíneos possam ter papel relevante.

Na Amazônia, *Lutzomyia longipalpis* é uma espécie presente na floresta, e pode ser considerada como vetor da leishmaniose visceral no seu foco natural, mas em outros biomas das Amériças os vetores dos ciclos silvestres podem ser outros.

A introdução e dispersão de cães domésticos pelos colonizadores europeus no território americano, seguida pelo aumento das populações destes carnívoros, acompanhando a tendência de crescimento das populações humanas, permitiu a instalação de um segundo ciclo, já em ambientes transformados pelas atividades humanas.

Neste outro ciclo zoonótico, são os cães domésticos que tem a função de reservatório, sendo capazes de manter a enzootia sem a participação de animais selvagens. Os cães se infectam facilmente, são capazes de manter o estado infeccioso por um tempo prolongado, muitas vezes com carga parasitária elevada na pele. Não sendo difícil infectar experimentalmente flebotomíneos durante repasto em cães parasitados.

Existem evidências que sugerem que os cães domésticos também podem transmitir a leishmaniose visceral diretamente, por contato entre uma cadela e seus filhotes, e ao menos um registro de possível transmissão continuada entre cães adultos, da variedade foxhound, sem a exposição a vetores, nos EUA. Mas não se reconhece a relevância deste modo de transmissão para a manutenção da transmissão nas áreas enzoóticas.

Acredita-se seja importante para a movimentação dos parasitas entre localidades e regiões dentro de uma área enzoótica seu transporte por cães domésticos e, em certos casos, por canídeos selvagens, assegurando uma estrutura espacial de focos restritos territorialmente mas interligados em redes.

Neste ciclo os vetores são sempre flebotomíneos capazes de freqüentar o ambiente modificado, alcançando densidades expressivas nos peridomicílios, onde conseguem abrigo e fonte de alimentação, pela disponibilidade de animais domésticos, incluindo cães.

Na maior parte das Américas a espécie responsabilizada pela transmissão da leishmaniose visceral no ambiente antropizado é a *Lutzomyia longipalpis*. Mas existem áreas da Venezuela e Colômbia onde *Lu. evansi* é considerada o vetor e localidades da Região Centro-Oeste do Brasil onde a transmissão foi atribuída a *Lu. cruzi*, mostrando que pode haver uma diversidade de vetores participando dos ciclos maior do que se acreditava..

Nas Américas a infecção em humanos não parece ser capaz de assegurar a transmissão de modo continuado, ao contrário do que ocorre em outras regiões. Mas o registro de parasitismo na pele, inclusive com a possibilidade de infectar os vetores, não permite excluir um papel ocasional nem uma possível adaptação do processo de parasitismo no futuro, passando do ciclo zoonótico peridomiciliar atual para um novo ciclo antroponótico, sem precisar mais contar com a participação de cães.

(1) Pesquisador Titular da Fundação Oswaldo Cruz / Ministério da Saúde / Brasil

Padrões epidemiológicos e distribuição territorial da LV nas Américas

O conhecimento sobre a distribuição territorial da leishmaniose visceral está ainda centrado na localização dos casos humanos conhecidos, o que certamente é muito insatisfatório para descrever o processo de espacialização de uma zoonose.

Em muitas áreas onde não são registrados casos humanos confirmados pode estar ocorrendo problemas com o diagnóstico, por acesso inadequado aos serviços de saúde, por falta de informação sobre a doença ou por dificuldade em se realizar os procedimentos indicados para a confirmação clínico-laboratorial.

Isto deve ser mais comum onde só ocorre o ciclo natural silvestre e nas áreas nas quais a enzootia canina foi instalada recentemente, mas também pode ser problema em áreas onde o ciclo peridimiciliar já está instalado, mas faltam informações e recursos adequados para o diagnóstico. Por isto, quando ainda não foram realizados estudos de infecção em populações de reservatórios animais, estas áreas devem ser consideradas silenciosas, e não negativas.

Onde são conhecidos casos autóctones em humanos ou caninos domésticos, três padrões epidemiológicos distintos podem ser identificados atualmente nas Américas, podendo haver a superposição de mais de um deles na mesma área: o padrão silvestre, o rural e o urbano.

Padrão silvestre da leishmaniose visceral:

O padrão epidemiológico decorrente da exposição de pessoas ao ciclo silvestre se destaca pela ocorrência de casos humanos ou caninos isolados ou em pequenos grupos, pela ausência de vetores adaptados ao peridomicílio e pela descontinuidade da transmissão na população canina.

A fragmentação dos ecossistemas naturais pelas ações humanas tem criado, em toda a região, mosaicos de vegetação nativa intercalados por áreas ocupadas por núcleos habitacionais e exploração agropecuária.

Algumas espécies de marsupiais e pequenos carnívoros selvagens conseguiram se adaptar bastante bem às áreas de transição, utilizando as fontes de alimentos aí concentradas, aumentado à densidade de suas populações e o grau de contato com humanos, cães e vetores da leishmaniose visceral.

Casos humanos deste padrão têm sido encontrados, distribuídos de forma dispersa, por grande extensão do território americano, na faixa intertropical.

Na medida em que aumenta o contato entre populações humanas, de reservatórios e de vetores da doença, e ainda melhora nossa capacidade de detecção do problema, pode-se esperar que um número crescente de casos decorrentes deste ciclo venha a ser detectados em novas áreas, colocando questões específicas para a vigilância e a organização das ações de controle.

Padrão rural da leishmaniose visceral:

Este é o padrão epidemiológico mais conhecido e responsável, até recentemente, pela grande maioria dos casos registrados nas Américas.

Seu reservatório é o cão doméstico, a transmissão é intra ou peridomiciliar, e as habitações precárias, localizadas frequentemente em vales ou vertentes de serras, e com abrigos de animais domésticos nas proximidades são uma característica constante das paisagens das localidades com transmissão. (ALENCAR,1961)

A maior parte dos casos das Américas com este padrão foi registrada, até a década de oitenta do século passado, no Brasil, e neste País, no sertão da Região Nordeste, uma região semi-árida, vegetação do tipo savana estépica (caatinga) e população muito rarefeita na área rural e concentrada em alguns poucos núcleos urbanos de pequeno ou médio porte.

Os casos humanos deste padrão predominam em crianças menores de cinco anos, havendo associação da doença com desnutrição e condições precárias de moradia. A enzootia canina mostra acentuada focalização, com elevada prevalência de animais infectados, frequentemente acima de 20%, em algumas localidades. Mas os casos humanos ocorrem de modo bem menos concentrado, em função do grau de imunidade e do pequeno tamanho das populações das localidades mais atingidas. Isto prejudica a utilização da incidência de casos humanos como critério para definir as localidades consideradas prioritárias para as ações de controle, levando a que se tenha de trabalhar o conjunto da área enzoótica, com grandes dificuldades operacionais.

Na área rural da Região Nordeste do Brasil a distribuição de freqüência de casos humanos apresentava um padrão cíclico bem definido, com incrementos importantes a cada cinco ou seis anos, associados aos períodos de seca, aumento da desnutrição e êxodo rural. (ALENCAR, 1983)

A distribuição territorial focal, característica deste padrão da leishmaniose visceral decorre de certas condições locais que favorecem a concentração do seu vetor, a *Lutzomyia longipalpis*, principalmente alguma umidade e vegetação capaz de assegurar abrigo.

A dispersão do parasito, de uma localidade para outra, é assegurada pela circulação de cães domésticos acompanhando os deslocamentos humanos, inclusive durante as migrações sazonais e romarias religiosas. Possivelmente algumas espécies de pequenos canídeos selvagens, encontrados infectados com freqüência nas proximidades dos domicílios, também podem ter algum papel na dispersão da zoonose no sertão do nordeste do Brasil.(DEANE & DEANE., 1962)

Uma variante deste padrão, registrada em certas áreas da Amazônia, decorreu da introdução recente da leishmaniose visceral nas populações caninas de comunidades indígenas, com ocorrência de casos e mortes em humanos e muitas dificuldades para a vigilância, o tratamento dos casos e o controle da enzootia canina.

Um desafio para a vigilância da leishmaniose visceral onde predomina o padrão rural é assegurar o diagnóstico precoce e a investigação epidemiológica dos casos, reunindo informação adequada sobre o endereço do doente e onde, no nível de localidade, provavelmente ocorreu a transmissão. Um outro problema é a integração das ações de vigilância entomológica e de monitoramento da infecção em populações caninas com os serviços locais de saúde.

Padrão urbano da leishmaniose visceral

Com o grande deslocamento das populações das áreas rurais para as cidades, no último quartil do Século XX, muitas cidades tiveram suas periferias expandidas sem que este crescimento tenha sido acompanhado da consolidação de sua estrutura de serviços urbanos. Estas periferias mantiveram algumas características de áreas rurais de origem dos migrantes, como a presença de mosaicos de vegetação em áreas ainda não completamente ocupadas, a criação de animais domésticos nos peridomicílios e as condições precárias das habitações, permitindo, em certas áreas do Brasil, a presença de *Lu. longipalpis* no espaço urbano. (COSTA, PEREIRA, & ARAÚJO., 1990)

Isto aconteceu principalmente na Região Nordeste, onde grandes epidemias urbanas passaram a ocorrer desde a década de oitenta, sem que as ações de controle tenham conseguido contê-las. Estas epidemias progressivamente se expandiram para áreas urbanas contíguas, vindo a constituir grandes pólos de concentração de casos humanos e caninos. (SILVA. et al., 1997)

Ao contrário do que se observou nas localidades rurais, a população humana não parece alcançar um nível de imunidade capaz de limitar a ocorrência de casos novos. A população canina recupera-se com rapidez após a alta mortalidade causada pela zoonose e pelas ações de controle, reativando o ciclo de transmissão sempre que as condições climáticas favorecem densidades elevadas do vetor.

Um outro tipo de ocupação do espaço urbano pela leishmaniose visceral vem sendo observado mais recentemente no Brasil, atingindo principalmente cidades das Regiões Sudeste e Centro-Oeste. Neste caso a progressão do processo endêmico-enzoótico vem se fazendo de modo progressivo de cidade a cidade, acompanhando as rodovias, em conseqüência do aumento da mobilidade das populações, mas sem relação direta com a migração rural. Atingindo cidades de porte médio e até grandes metrópoles, inclusive chegando aos bairros bem consolidados dos centros urbanos, constituindo novos circuitos urbanos integrados de produção da doença.

Algumas formas clínicas particularmente graves foram relatadas nestas áreas, tanto em humanos como em cães domésticos, mas os determinantes desta maior virulência ainda não foram esclarecidos.

A grande expansão territorial da área de transmissão da leishmaniose visceral no Brasil certamente resultou da adaptação de *Lu. longipalpis* ao espaço urbano, primeiro nas Regiões Nordeste e Norte, e depois nas Regiões Sudeste e Centro-Oeste, fazendo com que um número muito maior de pessoas estejam atualmente expostas ao risco de se infectar e adoecer do que em qualquer outra época.

Este padrão emergente foi reconhecido a relativamente pouco tempo, menos de vinte anos, e não parece que já esteja sendo contido pelas ações de saúde pública tradicionais, fazendo com que seja urgente a implantação de ações de vigilância e controle mais efetivas, orientadas para as diferentes dimensões deste complexo problema de saúde. (ARIAS, MONTEIRO & ZICKER, 1996)

Uma proposta de vigilância integrada da leishmaniose visceral nas Américas

A vigilância em saúde é um conjunto de práticas que articulam conhecimentos científicos acumulados sobre agravos com informações sobre situações de saúde nas populações e as estratégias de contenção e controle dos problemas de saúde.

No caso da leishmaniose visceral, ainda existem lacunas importantes em relação ao conhecimento dos ciclos básicos, tanto sobre características do agente e das relações parasita-hospedeiro nas populações humanas e caninas, como sobre as espécies que atuam como reservatórios silvestres e sobre o papel e capacidade vetorial de diferentes flebotomíneos nos ciclos silvestre e peridomiciliar.

Os sistemas de informação sobre esta endemia também apresentam problemas. Mesmo quando existe notificação de casos com registros contínuos dos dados, estes bancos apresentam deficiências importantes, seja no critério de

confirmação de caso, no preenchimento de variáveis relevantes, como a autoctonia e a localização do lugar provável de transmissão e a ocupação do doente. Também se observa demora na consolidação das informações, prejudicando sua utilização como instrumento para vigilância.

As informações resultantes da vigilância de caso não são integradas nos serviços de vigilância com aquelas da vigilância ambiental, relativas ao vetor, aos reservatórios, as características das áreas de transmissão e as ações de controle executadas. Assim, não existem bancos de dados consolidados por unidades territoriais, nos diferentes níveis de agregação político-administrativos: país, estado, região administrativa e localidade, indispensáveis para a vigilância orientar as ações relativas ao controle de uma enzootia focal com sua dinâmica e complexidade.

A vigilância da leishmaniose visceral precisa contemplar diferentes dimensões deste problema de saúde, permitindo categorizar cada área de ocorrência de casos segundo os diferentes padrões epidemiológicos da zoonose e orientar as ações de controle de acordo com os resultados das análises das informações regionais e locais.

Nas nossas condições, as seguintes linhas de trabalho podem ser destacadas, recebendo diferentes ênfases em função da situação do problema em cada país ou região:

- Vigilância da mortalidade por LV
- Vigilância epidemiológica de casos humanos de LV
- Vigilância territorial dos espaços de transmissão de LV
- Vigilância ambiental de focos silvestres
- Vigilância de reações adversas aos medicamentos utilizados no programa

Neste texto procuramos comparar algumas características dos componentes da vigilância mais diretamente relacionado com a programação das ações de controle, a partir de algumas observações acumuladas durante o acompanhamento, nos últimos cinco anos, da reestruturação do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral do Sistema de Saúde do Brasil. (- BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003)

Uma proposta de vigilância integrada da leishmaniose visceral nas Américas, considerando as diferentes dimensões e níveis de intervenção frente ao problema.

1 - Vigilância da mortalidade por LV

- Justificativa: A leishmaniose visceral nos humanos é um processo infeccioso que pode apresentar um amplo espectro de formas clínicas, desde a infecção assintomática até manifestações muito graves, que podem levar rapidamente para a morte. Mas a maior parte dos casos com manifestações clínicas evolui bem, quando o tratamento adequado é feito oportunamente. Os óbitos por LV devem, portanto, ser considerados, em princípio, evitáveis, e uma mortalidade elevada é um marcador tanto de baixa efetividade do programa como de qualidade insuficiente do modelo assistencial do sistema de saúde.
- Objetivo social: O primeiro objetivo social da vigilância e das ações de controle da LV é a eliminação, ou ao menos a redução a um nível mínimo, dos óbitos por este agravo.
- Objetivos operacionais: Analisar se os casos de LV estão sendo diagnosticados precocemente e se o tratamento vem apresentando a eficácia esperada. As informações devem permitir atribuir os óbitos a uma destas classes:
- Devidos ao diagnóstico tardio
- Atribuídos a tratamento incorreto
- Devidos a outras patologias concomitantes
- Decorrentes de evoluções excepcionalmente graves
- Atribuídos a falhas medicamentosas
- Aqueles que não puderam ser classificados

- Sistema de informação: Sistema de informação sobre mortalidade e fluxo de dados consolidados a partir de ficha clínico-epidemiológica de investigação de óbitos por LV.
- Procedimentos:

  Análise dos dados sobre óbitos de LV disponíveis nos sistemas de informação de mortalidade, considerando município de residência, local de ocorrência e idade. Elaboração e divulgação de lista com os municípios com as maiores freqüências de mortes por LV.

  Preenchimento obrigatório de ficha padronizada com informações sobre o intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico, o encaminhamento do caso na rede de serviços de saúde, sua evolução clínica, a presença de marcadores de gravidade e de doenças concomitantes e a conduta terapêutica.

2 - Vigilância epidemiológica de casos humanos de LV

- Justificativa: A notificação e registro dos casos humanos por unidades político-administrativas permitem proceder à investigação epidemiológica dos casos e identificar os locais prováveis de transmissão e aqueles onde devem ser implantadas as atividades de diagnóstico e tratamento na rede de serviços de saúde. A análise das características epidemiológicas dos casos registrados é essencial para o monitoramento do problema de saúde, para a programação das ações de controle e também contribui para a avaliação do impacto das ações de controle.
- Objetivo social: Subsidiar as atividades de atenção aos doentes e orientar a programação das ações locais de controle, de modo a reduzir a ocorrência de novos casos e diminuir a freqüência de formas graves. Também pode viabilizar a estratificação da área de ocorrência de casos humanos, identificando as unidades político-administrativas que concentram a maior parte deles, possibilitando definir áreas prioritárias para ações estratégicas de intervenção sobre o processo de transmissão.
- Objetivos operacionais: Descrever e comparar a magnitude, tendência e características clínicas e epidemiológicas dos casos conhecidos de LV, por unidades político-administrativas e estratificar as unidades político-administrativas segundo a freqüência de casos:
  - Alta prioridade (acumulando mais de 70% dos casos)
  - Média prioridade (acumulando entre10 e 30% dos casos)
  - Baixa prioridade (acumulando menos de 10% dos casos)
- Sistema de informação: Sistema de registro de enfermidades de notificação compulsória, integrado com a vigilância de outros agravos e padronizado para o conjunto do território nacional. É fundamental a padronização do conceito de caso humano de LV e a definição de um conjunto mínimo de variáveis essenciais.
- Procedimentos: Os casos diagnosticados precisam ser notificados e investigados pelos serviços locais. Durante a investigação deve-se atentar para a sua autoctonia, a localização do lugar provável de transmissão, a ocupação, a data do início dos sintomas e a presença no local de residência de outros casos suspeitos. Em uma área com transmissão devem ser considerados casos de LV todos com febre de mais de quinze dias e esplenomegalia, a menos que seja confirmada por exame laboratorial uma outra doença.

  A análise dos dados deve ser realizada nos níveis local, regional e nacional. Neste se faz anualmente a estratificação territorial para delimitar a área endêmica e se compara os casos registrados com os valores esperados (a média de período anterior)

3 - Vigilância territorial dos espaços de transmissão de LV

- Justificativa: Nas áreas onde há registro de casos humanos ou caninos autóctones é fundamental que se tenha informação sobre os ciclos da LV e sobre os riscos de transmissão para a população exposta. Em uma zoonose transmitida por vetor como a leishmaniose visceral, o conhecimento das características epidemiológicas dos casos humanos diagnosticados é insuficiente para a análise de situação do problema, impondo também o monitoramento da enzootia canina e da população do vetor, além da caracterização das condições ambientais das áreas de transmissão.

- Objetivo social: Monitorar as condições de transmissão da LV de modo a identificar a população sob risco e reduzir a força de transmissão desta zoonose para a população humana.
- Objetivos operacionais:
  - Identificar unidades territoriais de relevância epidemiológica para a transmissão de LV: focos, pólos e circuitos espaciais integrados.
  - Identificar o vetor, seu padrão de distribuição espacial e o período de sua maior presença no peridomicílio nas unidades territoriais relevantes.
  - Monitorar a densidade populacional e a prevalência de infecção por LV nas populações de cães domésticos nas unidades territoriais relevantes.
  - Classificar as unidades territoriais de interesse epidemiológico para a LV nos diferentes padrões: silvestre, rural e urbano, como estratégia para orientar as ações de vigilância ambiental e de controle dos processos de transmissão da parasita.
- Sistema de informação: Uma base de dados integrando informações procedentes de diferentes fontes, como o sistema de informação de mortalidade, o sistema de notificação de doenças, bancos de dados sobre infecção canina e resultados de estudos entomológicos, além de informações sócio-ambientais relativas à dinâmica demográfica e ao processo de ocupação e uso do território.
- Procedimentos: Utilizando os registros de casos humanos de técnicas interpolação para dados georreferenciados são identificadas isolinhas que delimitam áreas com diferentes gradientes de densidade. São definidas como pólos aquelas áreas bem delimitadas e que se destacam como atratores do restante da superfície. Um conjunto de pólos interligados por uma via de comunicação é denominado circuito integrado e unidades territoriais menores que os pólos, que se diferenciam quando se altera a escala, são consideradas focos. Os focos podem ser encontrados isolados ou integrando, junto com outros, um determinado pólo.

Circuitos, pólos e focos de leishmaniose visceral são então classificados pelo tipo de padrão, a partir dos dados epidemiológicos e ambientais do sistema de informação integrado, em silvestre, rural e urbano.

A dinâmica atual da transmissão da LV impõe que a estratificação espacial da área endêmica seja revisada com periodicidade ao menos anual, e com ma menor defasagem possível entre a análise e a ocorrência dos casos.

Isto exige uma modalidade de sistema de informação completamente diferente daquele tradicionalmente considerado adequado para zoonoses e endemias focais.

No Brasil, podem ser observados atualmente diversos exemplos de situações que articulam as dimensões epidemiológica e espacial da leishmaniose visceral, como esquematizado no quadro abaixo.

PADRÕES DE ESPACIALIZAÇÃO DO PROCESSO DE TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Unidade Territorial	Padrão Epidemiológico		
	Silvestre	Rural	Urbano
Foco restrito	XX	XXX	
Pólo	X	XX	XXX
Circuito integrado			XXX

A classificação de situações possibilitará então, de forma recursiva, reorientar os procedimentos de vigilância de casos, vigilância entomológica e monitoramento da infecção em populações de reservatórios, considerando as especificidades de cada tipo.

Da mesma forma, as ações de controle deverão ser descentralizadas, apoiadas nos serviços locais, mas precisam ser orientadas pelo conhecimento das dimensões ecológica e espacial da zoonose.

- Discussão:

O texto procurou mostrar como a leishmaniose visceral é uma zoonose que apresenta atualmente diversos padrões nas Américas, e que a diversidade de situações observadas reflete tanto aspectos ambientais dos vários biomas naturais onde ela pode ocorrer como etapas no processo de adaptação da *Leishmania chagasi* aos espaços antropizados. Aparentemente apenas no Brasil até agora foi identificado o padrão de circuito integrado urbano, mas não existe nenhuma razão para que este comportamento não se estenda além das fronteiras brasileiras.

Na medida em que a leishmaniose visceral vem deixando de ser uma zoonose focal, e emerge o padrão de enzootia de circuitos urbanos integrados, as práticas e o modelo organizacional da vigilância precisam apresentar importantes transformações.

O maior acesso por parte da população aos serviços de saúde e a crescente capacitação de profissionais de saúde em conceitos e técnicas básicas de vigilância epidemiológica certamente aumentou nossa capacidade de detecção e diagnosticar os casos humanos.

Também passaram a estar muito mais disponíveis recursos de computação e programas de análise de dados estatísticos e georreferenciados para os serviços de vigilância.

Entretanto, as atuais disponibilidades de pessoal técnico e de equipamentos e procedimentos padronizados para a vigilância de vetores e reservatórios da leishmaniose visceral continuam sendo muito insuficientes, trazendo prejuízo tanto as ações de vigilância como para a avaliação das ações de controle.

Os principais obstáculos para o desenvolvimento do modelo de vigilância integrada de base territorial continuam sendo a fixações das instituições de saúde na proposta tradicional da vigilância de casos centrada na notificação compulsória e a baixa disponibilidade de pessoal para as atividades de análise de dados, comunicação social e articulação intersetorial.

Mas, como vários processos de produção de doenças adquiriram uma nova dinâmica e repercussão social, pode-se esperar que os modelos de vigilância também venham a evoluir, de modo a estar em condição de conter as pressões destes processos emergentes.

BIBLIOGRAFIA

- ACHA & SZYFRES, 2003. Zoonosis y Enfermedades Transmissibles Comunes al Hombre y a los Animales. Organización Panamericana de la Salud. Washington. V.3.
- ALENCAR, J.E.,1961. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 3:175-180,1961.
- ALENCAR, J.E., 1983. Expansão do calazar no Brasil. Ceará Médico, 5: 86-92.
- ARIAS,J.R, MONTEIRO, P.S., ZICKER, F., 1996. The remergence of visceral leishmaniasis in Brazil., 1996. Emerging Infectious Diseases, 2:145-146.
- BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde, Brasília.
- COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F. & ARAÚJO, M. V., 1990. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. Revista de Saúde Pública, 24: 361-371.
- DEANE, L. M. & DEANE, M. P., 1962. Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 4: 108-212.
- LAINSON, R. & RANGEL, E., 2003. Lutzomyia longipalpis e a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana no Brasil . In Lainson, R. e Rangel, E. (org.) Flebotomíneos do Brasil. Edirora Fiocruz, Rio de Janeiro, 311-336.
- SILVA, A. R. et al., 1997 Leishmaniose visceral (calazar) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. Rev. Soc. Brás. Med. Trop. 30: 359-368.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990. Control of Leishmaniasis. Technical Report Series, v. 793, p. 50-52.

O uso da informação geo-referenciada para a vigilância da leishmaniose visceral. Experiência do município de Jequié-Bahia-Brasil

Eliane Góes Nascimento

Sanitarista, Diretora do Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva - CERDEPS/PIEJ

Secretaria de Saúde do Estado da Bahia

Centro de Referencia em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva

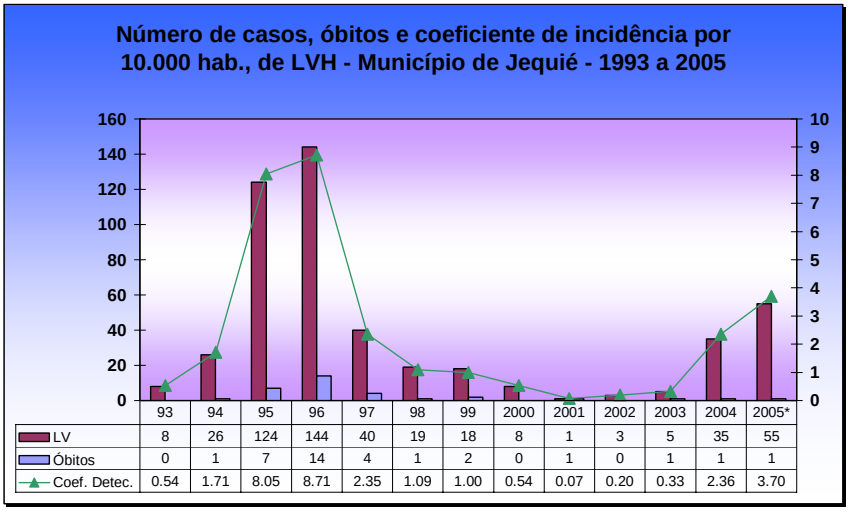
Rua 31 Urbis I – Casas Populares
E-mail: eliane.piej@saude.ba.gov.br e cerdeps.piej@saude.ba.gov.br

As Leishmanioses constituem atualmente uma das principais endemias mundiais [1].

A Leishmaniose Visceral por sua magnitude e expansão crescente em áreas antes indenes[2] ocupa local de destaque, tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade.

O Brasil ocupa o primeiro lugar na ocorrência de LVA na América Latina com 90% dos casos (cerca de 3.500 casos por ano) 3. Dentre esses casos 66% estão concentrados na Região Nordeste, onde o Estado da Bahia ocupa o 2º lugar em ocorrência de LVA. Dos 417 municípios, 211 apresentam endemicidade[4]. Durante o período 2000 a 2004, a Bahia apresentou 2284 casos 4-6. Jequié é um desses municípios, com relato de casos humanos de LV desde a década de 1960 7. Localizada no Sudoeste da Bahia, distante 112 Km do litoral e 360 Km da capital – Salvador, possui uma área de 3.113 km2 e população de 148.449 hab., distribuídos em uma população urbana de 131.971 hab., e população rural de 16.478 hab. O clima é tropical semi-árido, com temperatura média anual de 28º C e índice pluviométrico de 500mm anuais. A vegetação é de transição entre caatinga e mata atlântica. As condições climáticas e de vegetação, aliadas a um processo migratório rural intenso ocorrido nas duas últimas décadas propiciaram um crescimento desordenado da área urbana, com surgimento de várias invasões e loteamentos populares, e consequentemente novas áreas focais de LV.

A ocorrência de LVA no município vem apresentando caráter cíclico como podemos observar na Figura 1. A ocorrência de um surto epidêmico nos anos de 1995 e 1996 e um outro iniciado em 2004, apresentando tendência de crescimento no ano de 2005. Todos os casos têm ocorrido nas periferias da área urbana. No período de 2001 a 2005 ocorreram 99 casos, sendo que 56% do sexo masculino e 44% do sexo feminino, 51,5% dos casos ocorreram em menores de quatro anos, com limites na faixa etária de seis meses e 67 anos de idade.



	93	94	95	96	97	98	99	2000	2001	2002	2003	2004	2005*
LV	8	26	124	144	40	19	18	8	1	3	5	35	55
Óbitos	0	1	7	14	4	1	2	0	1	0	1	1	1
Coef. Detec.	0.54	1.71	8.05	8.71	2.35	1.09	1.00	0.54	0.07	0.20	0.33	2.36	3.70

Figura 1 – Série histórica da LVA no município de Jequié – 1993 a 2005 (Fonte CERDEPS/PIEJ)

No município de Jequié, está sediado o Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva. Este é um centro de excelência da Secretaria da Saúde do Estado da Bahia, com abrangência de aproximadamente 70 municípios. Atua no controle da LVA no município de Jequié sendo responsável pelo diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos casos humanos, diagnóstico da leishmaniose visceral canina, vigilância entomológica e epidemiológica, além da capacitação de profissionais envolvidos no controle da doença e do desenvolvimento de pesquisas em parceria com CPqGM FIOCRUZ-Ba.

As ações de controle vetorial e canino são realizadas através da Secretaria Municipal de Saúde do município e da 13ª Diretoria Regional de Saúde (DIRES/SESAB).

A necessidade de uma nova ferramenta a ser utilizada na vigilância epidemiológica, que proporcionasse resultados mais eficazes no acompanhamento do surto epidêmico que hora vivenciamos, levou-nos a implantação em agosto de 2005 do Sistema de Informação Geo-Referenciada para Vigilância da LVA.

Para a operacionalização do projeto foi instalado em meio digital o mapa da sede do município, estratificado em 28 bairros, contendo cada um quadras, ruas e casas com os respectivos números. Em seguida foram referenciados todos os casos humanos ocorridos no período de 2001 a 2005, e incluídos dados referentes à entomologia, ao controle químico (borrifação) e inquérito canino. Esses dados são atualizados semanalmente.

RESULTADOS OBTIDOS

- Visualização da distribuição espacial dos casos humanos em diferentes períodos;
- Identificação do perfil epidemiológico de cada bairro;
- Priorização das áreas de maior risco;
- Otimização da aplicação de recursos humanos e financeiros;
- Acompanhamento das ações de controle químico e inquérito canino de forma dinâmica;
- Avaliação do impacto das ações desenvolvidas no controle da LV.

REFERÊNCIAS

1. WHO-TDR. TDR Strategic emphasis matrix for tropical disease research October 2002 2002.
2. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. Sep 2004;27(5):305-318.
3. FUNASA. Leihmaniose visceral no Brasil: Situação atual, principais aspectos epidemioógicos, clínicos e medidas de controle. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil; 13/12/2002 2002.
4. SVS-DASIS. Vigilância em Saúde: Dados e indicadores selecionados. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil; nov 2004 2004.
5. FUNASA. Casos confirmados por unidade da Federação de 1980-2001. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil; 2003.
6. SVS-DASIS. Vigilância em Saúde: Dados e indicadores selecionados. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil; 2003 2003.
7. Sherlock IA, Santos AC. [Visceral leishmaniasis in the region of Jequie, state of Bahia]. Rev Bras Malariol Doencas Trop. Oct-Dec 1964;16(4):441-448.

ANEXO 2

LISTA DE PARTICIPANTES

LISTA DE PARTICIPANTES

NOMBRE COMPLETO	FUNCIÓN	INSTITUCIÓN	DIRECCIÓN	TELÉFONO	FACSMILE	E-MAIL
ARGENTINA						
Oscar Daniel Salomón		Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación en Endemo-Epidemias, CeNDIE-ANLIS Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación	Av. Paseo Colón 568, 1263, Buenos Aires	54 11 4331 2536	54 11 4331 2536	danielsalomon@hotmail.com
BRASIL						
Allan Pires		CERDEPS-PIEJ	Urbis 3 Caminho II, nº 17/ Casas populares – Jequiezinho Jequié – Bahia - CEP: 45200-000	73 3525 6871		piejba@hotmail.com allanmcknight@hotmail.com
Ana Nilce Silveira Maia Elkhoury	Gerente Técnica de Leishmaniasis Tegumentar Americana	Secretaria de Vigilância en Salud Ministerio de Salud	SHS Quadra 06 Conj. A, Complexo Brasil XXI Sala 727 70322-915 - Brasília, Brasil	(61) 2107-4435/4434		ana.elkhoury@saude.gov.br
Ana Rabello		Centro de Pesquisas René Rachou Fiocruz	Av. Augusto de Lima, 1715 Belo Horizonte, MG CEP: 30190-002	(31)3349-7708 (31)3295-3115		ana@cpqrr.fiocruz.br
Antonio Augusto Silva		WSPA – Sociedade Mundial de Proteção Animal	Rua Marechal Cantuária, 156 Urca, Rio de Janeiro - CEP: 22291-060	(21) 2295-9232	(21)2295-9232	wspabr@wspabr.org
Carlos Henrique Nery Costa.	Diretor Geral	Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella Universidade Federal do Piauí	Rua Governador Artur de Vasconcelos 151- Centro CEP: 64001-450 - Teresina-PI	86 3221 3413 86 9482-8930	86 3221 2424	chncosta@gmail.com
Christina Zackiewicz	Coord. de Pesquisa e Projetos para América Latina	DNDi – Drugs for Neglected Diseases Initiative	Rua Santa Luzia 651, 11º. And Rio de Janeiro, RJ	(21) 2220-3523	(21) 2215-0195	christina@dndi.org.br
Dorcas Lamounier Costa	Profesora	Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella	Rua Artur de Vasconcelos 151 Sul - Teresina, Piauí - 64001-450	(86) 3221-2424		dorcas.lc@gmail.com
Eduardo Hage Carmo		Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde			(61)322 66682	eduardo.carmo@saude.gov.br

Eduardo Luiz A. Mota		Inst. de Saúde Coletiva/UFBA	Rua Basílio da Gama, s/n Canela, BA - CEP: 40.110-040	(71)3263-7400	(71)32637460	lis@ufba.br
Eliane Góes Nascimento		Secretaria de Saúde do Estado da Bahia Centro de Ref. em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva	Rua 31 Urbis I – Casas Populares Jequiezinho – Jequié – Bahia CEP: 45206-510	73 3525 6871	73 3525 6871	eliane.preje@saude.gov.br elianegoes@hotmail.com
Elisa Cupolillo	Pesquisadora Titular	Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ	Av. Brasil 4365, Pav. Leônidas Deane 5509 - Manguinhos CEP: 21045-900 - Rio de Janeiro	(21) 3865 8177	(21) 2209 4110	ecupoli@ioc.fiocruz.br
Elizabeth Ferreira Rangel	Pesquisadora Titular Chefe do Depart. de Entomologia	Instituto Oswaldo Cruz Fiocruz	Av. Brasil, 4365 CEP: 21045-900 Rio de Janeiro	21-2290-9339 25984321/22 R.: 115		elizabethrangel@fiocruz.br
Elza Ferreira Noronha		Universidade de Brasília, UNB	Campus Universit. Darcy Ribeiro Brasília, DF - CEP: 70904-970	(61)3273-5008	(61) 3273-2811	elzafer@unb.br
Expedito Luna	Diretor do Dept. de Vigilância Epidemiológica	Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde	Esplanada dos Ministérios, Bloco G, Edf. Sede, Sobreloja, Sala 112 70.058-900 Brasília, DF	(61) 3315-3646	(61) 3315-2835	eluna@saude.gov.br
Flavya Mendes de Almeida		WSPA – Sociedade Mundial de Proteção Animal	Rua Marechal Cantuária, 156 Urca, Rio de Janeiro CEP: 22291-060	21) 2295-9232	(21)2295-9232	flavyamendes@wspabr.org fma@centroim.com.br
Geane Maria de Oliveira	Coordenação Geral de Laboratórios Departamento de Vig. Epidemiológica	Secretaria de Vig. em Saúde Ministério da Saúde	SHS, Quadra 06, conj. A, bloco C, sala 719 Edificio Business Center Tower CEP: 70322-915 Brasília/DF	(61) 2107.4360	(61) 2107.4368	geane.oliveira@saude.gov.br
Guilherme Loureiro Werneck		Univ. Federal do Rio de Janeiro NESC	Av. Brigadeiro Trompovsky S/N Rio de Janeiro	(21)2598-9323	(21)2264-1142	gwerneck@nesc.ufrj.br guilhermewerneck@aol.com
Gustavo Adolfo Sierra Romero		Núcleo de Medicina Tropical Universidade de Brasília	Universidade de Brasília CEP: 70904-970 Brasília, DF	(61)3273-5008	(61)3273-2811	gromero@unb.br
Laura Ney Marcelino Passerat de Silans		Secretaria de Estado de Saúde da Paraíba	Rua Prof. Geraldo Von Shostem, 285 Bairro Jaguaribe – João Pessoa, PB CEP: 58038-232	83 3241 4545		lauraney@jpa.neoline.com.br

Luciana Hardt Gomes	Diretora	Centro de Controle de Zoonoses Secretaria Municipal de Saúde	Rua Santa Eulália, 86 – Santana São Paulo, SP	(11) 6224 5589/5592	(11) 6221 9823	lucianah@prefeitura.sp.gov.br hardtgomes@terra.com.br
Luis Jacintho da Silva		UNICAMP Faculdade de Ciências Médicas	Campus Universitário “2GFEZINO VAZ” - 13081-970 - Campinas, SP	(19)3788-7451	(19)3788-7451	ljsilva@unicamp.br
Márcia Leite de S. Gomes	Técnica do Programa de Leishmanioses	COVEV/CGDT/ DEVEP/SVS/MS	SHS Q. 6 Bloco C, Conj. A, 7º andar, Sala 727 Edifício Business Center Tower Complexo Brasil XXI CEP: 70322-915 - Brasília/DF	(61) 2107-4462	(61)2107-4436	marcia.sousa@saude.gov.br
Marco Ciampi	Presidente	ARCA Brasil – Assoc. Humanitária de Proteção e Bem-Estar Animal	Rua Wisard 273 – Casa 3 Vila Madalena CEP: 05434-080 São Paulo, SP	(11) 3031-6991		mciampi@arcabrasil.org.br www.arcabrasil.org.br
Marcos Vinícius de S. L. Jr.	Médico Veterinário	DPB/CPV	Esplanada dos Ministérios, Bl. D, anexo A sala 447 CEP 70043-900 Brasília - DF.	(61) 3218-2230 3218-2704 3218-2732	(61) 3323-5936	mvleandro@agricultura.gov.br
Paulo Sabroza	Pesquisador Titular	Escola Nac. de Saúde Pública Fundação Oswaldo Cruz	Rua Leopoldo Bulhões 1480 Rio de Janeiro, RJ	(21) 25982683		sabroza@ensp.fiocruz.br
Reynaldo Dietze	Núcleo de Doenças Infecciosas Lab. de Leishmaniose	Centro Biomédico Universidade Federal do Espírito Santo	Av. Marechal Campos 1468 Maruipe - CEP: 29040-091 Vitória, ES	(27) 3335-7210	(27) 3335-7204	rdietze@ndi.ufes.br
Rosely Cerqueira de Oliveira	Coordenadora de vigilância epid. das zoonoses	Secretaria de Vigilância en Salud Ministerio de Salud	SHS Quadra 06 Conj. A, Complexo Brasil XXI Sala 727 70322-915 - Brasília, Brasil	(61) 2107-4435/4434 (61)8131-7808		
Vera Lucia F. de Camargo-Neves	Grupo de Estudos em Leishmanioses Superintendência de Controle de Endemias SUCEN	Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo	Av. Dr. Arnaldo, 351, 1º andar, sala 130 Cerqueira César CEP: 01246-902 São Paulo	11-3066-8906 3066-8905	11-3066-8904	veracamargo@saude.sp.gov.br
Victor Márcio Ribeiro		ANCLIVEPA	Av. Amazonas, 2218 Belo Horizonte - Minas Gerais			vitor@pucminas.br
Waneska A. Alves	Consultora Técnica Gerência Nacional das Leishmanioses	Secretaria de Vigilância em Saúde Ministério da Saúde	Ed. Business Center Tower Complexo Brasil XXI SHS Quadra 6, Conj. A, Bloco C, Sala 727 70322-915 - Brasília/DF	61-2107-4436	61-2107-4439	waneska.alves@saude.gov.br

Wagner A. Costa	SVS/MS	Ministério de Salud	SHS Quadra 06 Conj. A Bloco C, Complexo Brasil XXI Sala 727 - Brasília,DF	(61)2107-4431	61-2107-4436	wagner.costa@saude.gov.br
EUA						
Bruno Chomel	WHO/PAHO Collaborating Center on New and Emerging Zoonoses	Veterinary Public Health Laboratory Department of Population Health & Reproduction School of Veterinary Medicine University of California at Davis	1021 Haring Hall, 95616 Davis, California, USA	(530) 752-8112	(530) 752-2377 (530) 752-5842	bbchomel@ucdavis.edu
ESPAÑA						
Javier Encinas Aragón	Jefe de Sección de Sanidad Ambiental Dirección General de Salud Pública y Alimentación	Instituto Salud Pública de Madrid	Madrid, España	34 649574026		javier.encinas@madrid.org
MEXICO						
Ingeborg Becker		Universidad Nacional Autónoma de México Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, U.N.A.M.	Dr. Balmis 148, Colonia Doctores Mexico City, D.F., 06726, Mexico	52 55 56232674		becker@servidor.unam.mx
PARAGUAY						
Andrés Canese		Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nac. de Asunción	Edificio Kinball. Rodi 2253 entre Dr. Montero y Guillermo Arias Asunción, Paraguay	(595 21) 493295/421380		acanese@sce.cnc.una.py
Blanca Cousiño	Coordin. Técnica de Programas de Control Vectorial	Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo (SENEPA-MSPBS) Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social	Manuel Dominguez y Brazil Asunción, Paraguay	595 21 215 169	595 21 215 169	blancousino@hotmail.com
Humberto Recalde Gamarra		Ministerio de Salud Publica SENEPA	Manuel Domínguez c/Brasil Asunción, Paraguay	595 21 215 168	595 21 215 168	dgsenepa@rieder.net.py hgrecalde@yahoo.com.ar

OPAS/OMS

Albino Belotto	Chefe da Unidade de Saúde Pública Veterinária	Organização Pan-Americana da Saúde	525 23rd Street Washington, DC	(1202) 974-3191	(1202) 974-3331	belottoa@paho.org
Cátia Marques	Secretária Unidad Família e SAN	OPAS/OMS en Brasil	Setor de Embaixadas Norte, Lote 19 - Brasília - DF	+55 61 3426-9511	+55 61 3426-9591	catia@bra.ops-oms.org
Celsa Sampson	Assessora Regional de Lepra	OPAS/OMS	Setor de Embaixadas Norte – Lote 19 - Brasília, DF	(61) 3426-9595	(61) 3426-9591	celsa@bra.ops-oms.org
Daniela Fernandes da Silva	Temporary Consultant	Veterinary Public Health Unit Disease Prevention and Control Area Pan American Health Organization World Health Organization (PAHO/WHO)	Washington, D.C.	(202) 974-3665		fernandd@paho.org
Luis Fernando Leanes	Consultor	Centro Panamericano de Febre Aftosa – OPS/OMS	Av. Presid. Kennedy 7778 Duque de Caxias, RJ	55 21 3661 9012	5521 3661 9001	leanes@panaftosa.ops-oms.org

COMITÉ EDITORIAL
Secretaria de Vigilancia en Salud – Ministerio de Salud de Brasil
Expedito Luna; Rosely Cerqueira de Oliveira; Ana Nilce Silveira Maia Elkhoury;
Waneska A. Alves & Márcia Leite de Sousa. Gomes

Organización Panamericana de Salud – Organización Mundial de Salud
Albino Belotto; Miguel Ángel Genovese; Cristina Schneider;
Daniela Fernandez da Silva; Celsa Sampson & Luis Fernando Leanes

RELATORÍA
Dra. Ingeborg Becker; Dra Vera Lucia Camargo da Fonseca-Neves;
Elza Noronha; Gustavo Adolfo Sierra Romero

COORDENAÇÃO DOS TRABALHOS DE GRUPO

Diagnóstico e tratamento: Gustavo Adolfo Sierra Romero e Ana Lucia Rabello
Vigilância e Controle: Elizabeth Ferreira Rangel, Vera Lucia Camargo da Fonseca-Neves e Waneska Alexandra Alves.
Fortalecimento dos Programas Nacionais: Ana Nilce Silveira Maia Elkhoury e Blanca Cousino

REVISORES
Bruno Chomel; Javier Encinas Aragon &
Departamento de edición de la SVS del MS de Brasil

COMPAGINACIÓN Y EDICIÓN
Catia Marques Ferreira
Gustavo Deslandes Carbalho
Verônica Pereira Costa

DIAGRAMACIÓN
Cely Ávila
Rosane Hansen Lopes

Editado en febrero de 2006.

CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA
Unidad de Salud Pública Veterinaria – OPS/OMS