

## INQUÉRITO SOROEPIDEMIOLÓGICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM MUNICÍPIOS DA GRANDE VITÓRIA, ESPÍRITO SANTO - BRASIL

Joyce Daniela Francisco Bittencourt<sup>1</sup>

Emy Hiura<sup>2</sup>

Raquel Cuba Gaspar<sup>3</sup>

Suellen Gonçalves Lima<sup>3</sup>

Benedito Donizete Menozzi<sup>4</sup>

Hélio Langoni<sup>5</sup>

### RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecto-parasitárias causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania*. A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é causada pela espécie *Leishmania chagasi* e é transmitida por flebotomíneos hematófagos, sendo os mosquitos da espécie *Lutzomyia longipalpis* os principais vetores no Brasil. A LV é uma zoonose que ocorre em mamíferos, principalmente caninos e humanos. A apresentação clínica varia de acordo com a cepa do agente e da relação hospedeiro-parasita. Muito animais podem ser assintomáticos, entretanto, os sinais clínicos observados nos cães acometidos são principalmente lesões e descamações na pele, linfadenomegalia, onicogribose e emagrecimento progressivo, podendo progredir ao óbito. O objetivo do projeto foi realizar um estudo transversal na população canina dos municípios da Região da Grande Vitória, Espírito Santo - Brasil. Avaliou-se a soroprevalência da leishmaniose visceral canina (LVC) nessa região, por meio de testes sorológicos (RIFI), em amostras de um banco de soros do Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Vila Velha, Espírito Santo. Foram analisadas 154 amostras, selecionadas pela amostragem por conveniência. Destas, 61,8% dos animais eram oriundos do município de Vila Velha, 27,9% do município de Vitória, 5,8% do município de Serra e 4,5% do município de Cariacica. Os cães tinham idades variando de um mês a 17 anos, com a média de 6,5 anos. Não foi evidenciada a presença de anticorpos anti-*Leishmania* na população de estudo. Sugere-se que, até o momento, a região de pesquisa é não endêmica para a LVC.

**Palavras chaves:** Leishmaniose Visceral Canina, Vigilância, RIFI, Cães, *Lutzomyia longipalpis*, Zoonose.

### SEROEPIDEMIOLOGICAL SURVEY FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN MUNICIPALITIES OF GRANDE VITÓRIA, ESPÍRITO SANTO - BRAZIL

### ABSTRACT

The leishmaniasis are a group of infectious and parasitic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Visceral leishmaniasis (VL), or Calazar, is caused by the species *Leishmania chagasi* and is transmitted by hematophagous sandflies, the main vectors in Brazil being the *Lutzomyia longipalpis* sandfly. VL is a zoonosis that occurs in mammals, mainly canines and humans. The clinical presentation varies according to the strain of the agent and the host-

<sup>1</sup> Universidade Vila Velha. jdanielfbittencourt@gmail.com

<sup>2</sup> Docente da Universidade Vila Velha. emy.hiura@uvv.br

<sup>3</sup> Docente da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", FMVZ – Botucatu. raquel.cuba@unesp.br

<sup>4</sup> Docente da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", FMVZ – Botucatu. benedito.menozzi@unesp.br

<sup>5</sup> Docente da FMVZ, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu. \*Correspondência: helio.langoni@unesp.br

parasite relationship. The clinical signs observed in affected dogs are mainly skin lesions and scaling, lymphadenomegaly, onychogryphosis and progressive weight loss, which may progress to death. The objective of the project was to carry out a cross-sectional study in the canine population of the municipalities of the Grande Vitória Region, Espírito Santo - Brazil. To evaluate the seroprevalence of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL), in this region, through serological tests (IFAT), from a serum bank at the Clinical Pathology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine at the University Vila Velha, Espírito Santo. Were analyzed 154 samples, selected by convenience sampling. Of these, 61.8% of the animals were from Vila Velha, 27.9% from Vitória, 5.8% from Serra and 4.5% from Cariacica. The dogs' ages ranged from one month to 17 years, with an average age of 6.5 years. The presence of the anti-Leishmania antibodies was not evidenced in the study population to date. It is suggested that the researched region is non-endemic for CVL.

**Keywords:** Canine Visceral Leishmaniasis, Surveillance, IFAT, *Lutzomyia longipalpis*, Zoonosis.

## INQUERITO SEROEPIDEMIOLÓGICO PARA LEISHMANIOSIS VISCERAL CANINA EM MUNICÍPIOS DE GRANDE VITÓRIA, ESPÍRITO SANTO - BRASIL

### RESUMEN

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades infeccioso-parasitarias causadas por protozoarios del género *Leishmania*. La leishmaniasis visceral (LV), o Kala-azar, es causada por la especie *Leishmania chagasi* y se transmite por flebótomos hematófagos, siendo los mosquitos de la especie *Lutzomyia longipalpis* los principales vectores en Brasil. La LV es una zoonosis que se presenta en mamíferos, principalmente perros y humanos. La presentación clínica varía según la cepa del agente y la relación huésped-parásito. Los signos clínicos observados en los perros afectados son principalmente lesiones y descamación de la piel, linfadenopatía, onicogriphosis y pérdida progresiva de peso, que puede progresar hasta la muerte. El objetivo del proyecto fue realizar un estudio transversal sobre la población canina de los municipios de la Región de la Gran Vitória, Espírito Santo - Brasil. Se evaluó la seroprevalencia de leishmaniasis visceral (LVC) canina en esta región mediante pruebas serológicas (IFAT), en muestras de un banco de suero del Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Vila Velha, Espírito Santo. Se analizaron 154 muestras, seleccionadas por muestreo por conveniencia. De estos, el 61,8% de los animales procedían del municipio de Vila Velha, el 27,9% del municipio de Vitória, el 5,8% del municipio de Serra y el 4,5% del municipio de Cariacica. Los perros tenían edades comprendidas entre un mes y 17 años, con una edad media de 6,5 años. La presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* no fue evidente en la población de estudio. Se sugiere que, hasta la fecha, la región de investigación no es endémica para CVL.

**Palabras clave:** Leishmaniasis Visceral Canina, Vigilância, IFAT, Perros, *Lutzomyia longipalpis*, Zoonosis.

### INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. No Brasil, ocorrem dois tipos de apresentação: a tegumentar e a visceral. A Leishmaniose Tegumentar provoca lesões na pele e/ou mucosas. A Visceral, chamada de Calazar, tem caráter crônico, sistêmico – acomete fígado, baço,

linfonodos e medula óssea – e apresenta alta letalidade de indivíduos não tratados (cerca de 90% dos casos resultam em óbito) (1;2).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica o agravo como doença infecciosa negligenciada (DIN) e estima-se que mais de um bilhão de pessoas vivam em áreas endêmicas e susceptíveis à infecção, com cerca de 30.000 novos casos de leishmaniose visceral registrados anualmente. As DIN estão associadas a fatores ambientais e socioeconômicos, como vulnerabilidade social, destruição do meio ambiente, dificuldades de acesso ao sistema de saúde e outros (2;3;4).

A leishmaniose visceral está amplamente distribuída no mundo e ocorre predominantemente na África, América Latina e Ásia. Em 2021, a OMS registrou casos da doença em 81 países, em que 89% destes eram oriundos do Brasil, Eritreia, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (2). É considerada dentro do conceito de saúde única, pois está relacionada à doença animal, humana e com aspectos do meio ambiente, pois é transmitida por insetos flebotomíneos, os seus vetores.

É causada por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. Estes são caracterizados pela presença de uma mitocôndria única, denominada cinetoplasto, que alberga o DNA mitocondrial (kDNA). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros, *Leishmania* (que inclui os complexos tropica, major, donovani e mexicana) e *Viannia* (que compreende os complexos braziliensis, guyanensis e lainsoni) (5;6;7). No Brasil, a espécie mais encontrada nos isolados de pacientes com leishmaniose visceral é *Leishmania chagasi* (1).

O patógeno apresenta um ciclo heteroxeno. É encontrado na forma de amastigota nas células do sistema fagocítico mononuclear (macrófagos) de mamíferos e na forma promastigota no intestino de fêmeas de flebotomíneos hematófagos (1). As promastigotas possuem formato elipsóide ou alongado, um núcleo de dimensões variáveis (15 – 25 µm) e um flagelo na porção anterior. Enquanto, as amastigotas apresentam formato esférico à oval com diâmetro entre 2 µm e 10 µm e flagelo rudimentar. Em ambos os estágios é possível a visualização microscópica do cinetoplasto (7).

A transmissão do agente ocorre no momento do repasto sanguíneo pelas fêmeas de flebotomíneos infectadas, *Lutzomyia longipalpis*, popularmente conhecido como mosquito palha, birigui dentre outros nomes dependendo da região, considerado o principal vetor no Brasil (1). Pertencem à ordem Diptera, apresentam de 2 a 3 mm de comprimento, coloração acastanhada, corpo piloso, voam em pequenos saltos e pousam com asas entreabertas. Possuem como característica o desenvolvimento holometábolo, ou seja, possuem uma metamorfose completa com quatro estágios no seu ciclo de vida (ovo, pupa, larva e adulto) (1;8).

Está amplamente disperso no território nacional, presente em 24 dos 27 estados brasileiros (9). Apresenta caráter endofílico e alta adaptabilidade ao ambiente peridomiciliar, favorecendo a sua distribuição tanto na zona rural quanto urbana. Possuem hábitos crepusculares e noturnos, e necessitam de açúcares como fonte energética. Entretanto, as fêmeas de *L. longipalpis* são hematófagas, alimentando-se principalmente em mamíferos a fim de realizar a maturação dos seus ovos. No período diurno, encontram-se abrigados em locais como folhas caídas ao solo, toca de animais, galinheiros, fendas em troncos de árvores, protegidos de condições climáticas desfavoráveis e de predadores naturais (1;8;10).

A interação entre a *Leishmania* sp. e o seu vetor se inicia quando a fêmea do flebotomíneo ingere amastigotas do parasita durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado. No intestino do vetor, diferencia-se e passa a apresentar a morfologia flagelada, denominada promastigota metacíclica, forma infectante do parasito, que ficam alojadas na probóscide do vetor, até serem inoculadas em um novo hospedeiro (10). Após a inoculação, o agente é fagocitado por macrófagos e diferencia-se em amastigota, que se multiplica até o rompimento

celular. Estas são fagocitadas continuamente e distribuem-se pelo organismo via hematogênica, colonizando tecidos como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (1).

Segundo informe divulgado pela Organização Pan-Americana da Saúde, a LV é considerada endêmica em 13 países das Américas. No período entre 2001 e 2020 foram registrados 67.922 novos casos. Em 2020, o Brasil foi responsável por 97% (1933) dos casos humanos (2). Esse aspecto deve ser levado em consideração ao se observar o aumento de casos, sendo registrado em 2019 a maior taxa de letalidade por LV em humanos (11).

Inicialmente, a LV era caracterizada como uma epidemia rural tendo os animais silvestres como reservatórios. Porém, na década de 1980 com o processo de peri-urbanização e urbanização da doença, o cão passa a ter um papel fundamental na epidemiologia da doença. Visto que é a principal fonte de infecção no ambiente urbano e que a leishmaniose visceral canina (LVC) precede os casos em humanos, a espécie canina caracteriza-se como um importante reservatório (1).

Até a década de 1990, a maioria dos relatos de LVC eram feitos na região Nordeste, que concentra cerca de 90% dos casos registrados (4;12). Entretanto, a doença apresenta uma onda crescente de casos em todo país, principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, com ênfase para os municípios dos estados de Minas Gerais (Belo Horizonte), Mato Grosso do Sul (Campo Grande) e São Paulo (Araçatuba e Bauru), que registraram altas taxas da LVC e posterior relatos em humanos (13).

No Espírito Santo, foram reportados os cinco primeiros casos de leishmaniose visceral em humanos no ano de 1966 (14). Segundo a Secretaria Estadual de Saúde (SESA) os municípios com maior quantidade de casos confirmados são Baixo Guandu, Pancas e Cariacica. A LV é endêmica em 10 municípios localizados nas regiões centro-oeste e noroeste do estado do Espírito Santo (15).

Em decorrência do elevado potencial de expansão, visto a proximidade à regiões endêmicas e a ausência de controle do trânsito de animais dessas áreas, severidade da doença e da sua importância para a saúde pública, é necessário que sejam promovidas medidas de vigilância – entomológica, do reservatório e humana – como inquéritos soropidemiológicos, a fim de caracterizar a disseminação da doença e auxiliar a traçar estratégias de prevenção e controle de acordo com a realidade encontrada em tais municípios (11).

No Brasil, o primeiro relato da leishmaniose visceral ocorreu em 1913, quando Mignone descreveu os achados de necropsia de um paciente que havia trabalhado na construção da Estação Ferroviária de Porto Esperança – Corumbá, Mato Grosso do Sul. Em 1934, o Calazar surgiu como um problema de saúde pública, após a identificação de amastigotas do parasito em 41 amostras histológicas de pacientes das regiões Nordeste (92,7%) e Norte (7,3%), durante estudos para diagnóstico de Febre Amarela (1;13).

Entre 1978 e 1983 houve uma intensa seca nos estados do Piauí e Ceará e em consequência, iniciou-se o processo de migração de pessoas com seus cães da zona rural para os centros urbanos. Assim, o perfil epidemiológico da doença sofre mudanças com o início da urbanização da LV em 1980, com o estado do Piauí registrando a primeira grande epidemia urbana entre os anos de 1980 e 1986 (12). Nas décadas seguintes, a LV surge como doença emergente em grandes cidades como Campo Grande e Três Lagoas na região Centro-Oeste; Belo Horizonte, Rio de Janeiro, e municípios de Araçatuba e Bauru, na região Sudeste (13).

Sugere-se que a expansão geográfica da doença esteja relacionada ao fluxo migratório populacional, ocupação intensa e desordenada, condições socioeconômicas precárias, aspectos de vulnerabilidade social, adaptabilidade do vetor ao meio ambiente, mobilização dos reservatórios para áreas livres da doença e alterações antrópicas ambientais, como o desmatamento e construções civis (16;17).

Atualmente, a leishmaniose visceral está distribuída em todo o território nacional, presente em 21 unidades federativas (1;18;19). De acordo com o Ministério da Saúde, 3.500

peessoas são acometidas anualmente e estima-se que para cada caso humano haja 200 cães infectados (20).

No Mato Grosso do Sul, entre os anos de 1913 e 1993, a doença limitava-se aos municípios de Ladário e Corumbá, localizados no extremo oeste do estado. A sua expansão ocorreu no sentido oeste-leste, atingindo várias regiões chegando a Três Lagoas. A urbanização da doença coincidiu com as rotas de três grandes construções civis: estradas de ferro (1909 a 1952); rodovia federal BR-262, finalizada na década de 1980; a construção do gasoduto Bolívia-Brasil, iniciado em 1998. Desde então, municípios que eram livres da doença, como Campo Grande e Três Lagoas, passaram a apresentar casos autóctones em humanos (13). Na década de 2000, a capital do estado torna-se o principal foco da doença. Segundo estudos realizados em Campo Grande, no período de 2002 a 2006 foram confirmados 568 casos de leishmaniose visceral em humanos (21).

No Estado de São Paulo, a LVC foi detectada em cães no ano de 1998 e em humanos em 1999, ambos relatados na cidade de Araçatuba (22). Entre os anos de 1999 e 2011, foram registrados casos autóctones de leishmaniose visceral humana em 73 municípios do estado. O principal eixo de disseminação da doença seguiu a rodovia Marechal Rondon, a ferrovia Novoeste e o Gasoduto Bolívia-Brasil, na direção noroeste-sudeste rumo à Bauru. Os municípios com altas taxas de incidência e mortalidade foram Araçatuba, Presidente Prudente e Marília, que apresentam temperaturas elevadas e baixo índice pluviométrico (17;23). Além dos fatores elencados anteriormente, a substituição da criação de gado pelo plantio de cana-de-açúcar impactou na expansão da LV no estado de São Paulo. A mão-de-obra migrante, geralmente proveniente da região Nordeste, reconhecidamente endêmica para a infecção (17;24), deve ter contribuído também com a expansão da LVC.

A ocupação da Região do Vale do Rio Doce, localizada no leste de Minas Gerais e parte do Espírito Santo, ocorreu de forma definitiva com a construção da Estrada de Ferro Vitória-Minas em 1901. Fator este que favoreceu o processo de industrialização iniciado na década de 1930, com a implantação de grandes empresas do setor siderúrgico, com seu auge na década de 1970 marcando um período de grande crescimento econômico no estado de Minas Gerais (25;26). A região sofreu intensa devastação das matas nativas, dando lugar às ferrovias, pastagens, plantações de café e eucalipto, além de crescimento desordenado das áreas urbanas (26).

Em Minas Gerais, a primeira ocorrência da leishmaniose visceral foi descrita em 1943 por Versiani, em um paciente proveniente da região Nordeste do país. Em 1953, evidenciou-se o primeiro caso autóctone em um paciente oriundo do município de Itanhomi localizado no Vale do Rio Doce (27). Em Belo Horizonte, Rezende e Barros (28), identificaram o primeiro caso autóctone da doença em uma criança, entretanto, a ausência de evidências que comprovassem a presença do vetor e de cães positivos na região levaram às suspeitas de outras formas de transmissão da doença. Assim como na região do Vale do Rio Doce, a Região Metropolitana de Belo Horizonte teve sua urbanização intensificada na década de 1970 e consolidada nos anos de 1980 e 1990. A LV passa a ser notificada nesta região no ano de 1989, no município de Sabará, e nos anos subsequentes, expande por vasta região (29;30).

Em 1966, são relatados os cinco primeiros casos em humanos no Espírito Santo, quatro no município de Baixo Guandu e um no município de Colatina. Além disso, registrou-se o primeiro caso de LVC em animal que coabitava a residência do doente, em Colatina (14). A doença tornou-se endêmica no estado nas décadas de 1980 e 1990, com envolvimento de vários municípios (31).

Segundo o SINAN, de 2008 a 2021 foram registrados 91 casos de leishmaniose visceral em humanos no Espírito Santo, sendo 71% pacientes oriundos da Microrregião Geográfica de Colatina. No ano de 2012, têm-se o primeiro possível registro de um foco de LVC autóctone na Região Metropolitana de Vitória, que se sucedeu a um caso humano relatado (32).

Segundo o Ministério da Saúde (2019), os responsáveis pela manutenção do ciclo da doença no ambiente silvestre são os canídeos silvestres (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No meio urbano o cão (*Canis lupus familiaris*) é o principal reservatório da forma visceral da doença, sendo observado que a enzootia na população canina antecede à ocorrência de casos humanos e que a infecção em cães é mais prevalente do que em humanos.

Nesse aspecto, a interação ser humano-cão ganha ainda mais importância para a saúde pública quando observamos o aumento crescente da população de cães domiciliados em todo o território nacional. De acordo com dados do IBGE, as estimativas populacionais indicavam que havia a presença de pelo menos um cão em 46,1% dos domicílios do País, equivalente a 33,8 milhões de unidades domiciliares.

Os métodos de diagnóstico da LVC, preconizados pelo Ministério da Saúde para inquéritos em saúde pública, são os testes sorológicos. A partir de 2002 e até 2012, para o diagnóstico laboratorial da LV canina foi empregado o protocolo que incluía o Ensaio imunoenzimático (EIE) como teste de triagem e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) como teste confirmatório, entretanto, o Ministério da Saúde substituiu o protocolo de diagnóstico da LVC, sendo utilizado atualmente o Teste Imunocromatográfico DPP (Dual Path Platform, Biomanguinhos) como teste de triagem e o ELISA® - (Kit EIE Leishmaniose Visceral Canina - Biomanguinhos) como teste confirmatório, no lugar da reação de imunofluorescência indireta - Biomanguinhos (RIFI®).

A RIFI apresenta sensibilidade variando entre 98,8 e 100% e especificidade de 94,7 a 100% (33). A especificidade pode ser comprometida por reações cruzadas por outros tripanossomatídeos, principalmente os da leishmaniose tegumentar e doença de Chagas (34). Observa-se que a técnica apresenta melhor sensibilidade quando utilizada em cães de regiões endêmicas e melhor especificidade quando aplicada em populações caninas de área não-endêmica (35).

Atualmente, recomenda-se o teste de imunoensaio cromatográfico Dual Path Platform (DPP®) para triagem e teste de ELISA® - (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para confirmação do diagnóstico, que identificam a presença de anticorpos contra *Leishmania* sp. O animal é considerado infectado quando a amostra é reagente aos dois testes (36).

Considerando-se a importância dos inquéritos soroepidemiológicos e a disseminação da LVC em amplas áreas geográficas no país, o presente estudo avaliou a soroprevalência em cães domiciliados na Região da Grande Vitória do estado do Espírito Santo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado previamente pela Comissão de Ética, Bioética e Bem Estar Animal da Universidade Vila Velha sob o Número de protocolo 611-2021.

A população de estudo, selecionada pela amostragem por conveniência, foi composta por 154 cães que passaram por atendimento clínico no Hospital Veterinário “Prof. Ricardo Alexandre Hippler” da Universidade Vila Velha (HV-UVV), de janeiro de 2022 a novembro de 2022. Os animais foram classificados quanto a idade, sexo, raça e local de origem.

O HV-UVV está localizado no município de Vila Velha no Estado do Espírito Santo, atendendo a comunidade no entorno e cidades vizinhas, principalmente Cariacica, Fundão, Guarapari, Serra, Viana e Vitória. Os municípios descritos pertencem à região metropolitana da Grande Vitória (Figura 1), que está situada no bioma da Mata Atlântica, ocupa a extensão de 2.331 km<sup>2</sup>, abriga 1.687.704 habitantes e estima-se que 42,6% dos domicílios tenham pelo menos um cão, de acordo com os dados do IBGE.

As amostras sorológicas utilizadas na pesquisa permaneceram acondicionadas na temperatura de -20 °C e armazenadas no Laboratório de Patologia Clínica do HV-UVV até a

realização da RIFI no Serviço de Diagnóstico de Zoonoses (SDZ) do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ UNESP Botucatu - SP.

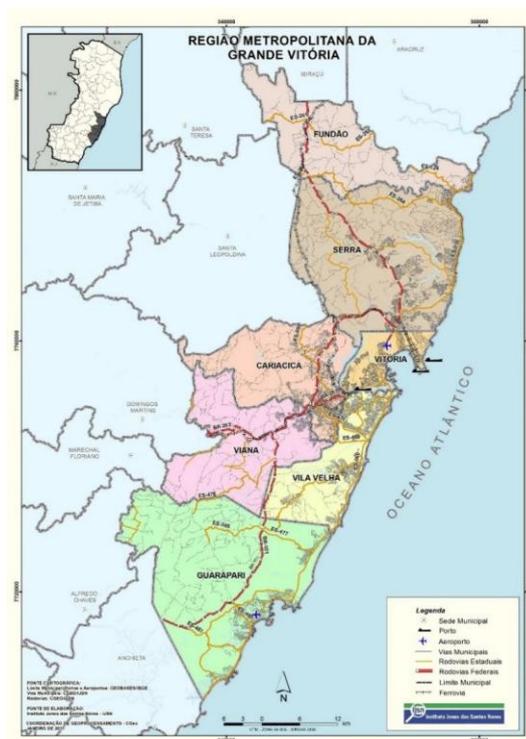


Figura 1. Região Metropolitana da Grande Vitória – Espírito Santo.

Fonte: Instituto Jones dos Santos Neves

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, foi realizada de acordo com Camargo (37), utilizando-se lâminas sensibilizadas e padronizadas no Serviço de Diagnóstico de Zoonoses.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 154 amostras avaliadas, 95 (61,8%) eram de animais provenientes do município de Vila Velha, 43 (27,9%) do município de Vitória, 9 (5,8%) do município de Serra e 7 (4,5%) do município de Cariacica. Os cães possuíam idades variando de um mês a 17 anos, com idade média de 6,5 anos.

Não encontraram-se resultados sororreagentes para *Leishmania major*. Tais resultados corroboram com os encontrados por Tonini et al. (30), que embora tenham demonstrado sorologia positiva no teste ELISA *in house*, nos ensaios de ELISA associado a RIFI todas as amostras foram negativas para a presença de anticorpos anti-*Leishmania*. Sugere-se a ocorrência de reação falso-positiva com outros agentes infecciosos disseminados na região, como *Ehrlichia canis* e *Babesia* sp. (38;39;40;41).

Estudos de vigilância epidemiológica relacionados à soroprevalência da LVC, revelam resultados variáveis, desde nenhum animal reagente, ou positivo o que significa provável região indene para a doença, até situações de endemia e de epidemia. Apresentamos resultados de algumas pesquisas cujos resultados são coincidentes com os obtidos no presente estudo (42;43;44;45).

Durante a campanha de vacinação antirrábica canina, no município de Botucatu, região indene para LVC, foram colhidas 689 amostras de sangue de cães, e todas revelaram resultados negativos na RIFI (42). Avaliando ainda, a possível presença da LVC no mesmo município, foi

obtida uma amostragem de 676 cães que participaram da campanha de vacinação antirrábica de 2004, perfazendo 4% dos 17.910 cães vacinados, em 20 postos de vacinação, distribuídos homogeneamente, em cinco regiões da área territorial urbana. Apesar de uma amostra ter sido positiva na RIFI, tratava-se de um animal de dois anos de idade, proveniente de outro município, e se encontrava em Botucatu há três meses, tratando-se, portanto, de um caso alóctone ou importado. Este aspecto confirma a importância das ações de vigilância na LVC (46).

Frehse et al. (43) avaliaram a soroprevalência para LVC em 364 cães do Centro de Controle de Zoonoses de São José dos Pinhais/PR, também área indene para LVC. Encontraram somente uma amostra reagente no ELISA (0,002%), entretanto, negativa na RIFI. O animal era assintomático e baseado no resultado obtido, os autores concluíram que Curitiba e área metropolitana poderiam ser consideradas de baixo risco para a doença, naquele momento.

Atividades de vigilância para LVC realizada por Coiro et al (44), com 516 amostras séricas de cães atendidos no Ambulatório de Dermatologia da Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da FMVZ, UNESP, Botucatu, com dermatopatias, revelaram resultado negativo para LVC, tanto na RIFI como no ELISA. Corroborando com Langoni et al. (42), que também trabalharam com amostras de soro de cães, obtidas em campanha de vacinação antirrábica no mesmo município, e todas foram negativas na RIFI para LVC.

Mantovan et al. (45) pesquisaram a resposta humoral, frente a diferentes agentes infecciosos de caráter zoonótico em 181 cães no município de Pardinho, região de Botucatu, incluindo entre eles *Leishmania* spp, e também não encontraram resultado positivo na RIFI, especificamente para este patógeno. Apesar dos resultados apresentados, que corroboram os obtidos no presente estudo, serem de regiões diferentes, não invalidam a importância da adoção de programas de controle a partir de atividades de vigilância, para tomada de decisão frente a resultados positivos, para minimizar os efeitos desta grave zoonose tanto nos animais como em humanos.

Um dos aspectos limitantes do presente estudo pode ser considerado o número de amostras avaliadas. A ideia inicial era realizar busca ativa domiciliar, em diferentes locais da região, com uma amostragem estratificada, entretanto, fatores alheios impediram esta possibilidade. A falta de parceria com órgãos oficiais do município, dificultou a logística para a obtenção das amostras. Devemos destacar ainda a pandemia do Covid-19, no momento do estudo.

Ainda como fator limitante, poderia ser citada a impossibilidade de coleta pareada, o que seria o ideal, para a confirmação dos resultados negativos obtidos, bem como a realização de outras técnicas diagnósticas nos animais, para complementação das técnicas sorológicas, como a realização de testes moleculares.

Supõe-se que a ausência de evidências da LVC esteja diretamente associada com a não observação do vetor *Lutzomyia longipalpis*, na região de estudo. Este vetor já foi identificado nas regiões Centro-Oeste e Noroeste do estado, ambas fazem divisa com o estado de Minas Gerais, e apresentam relevo acidentado, temperaturas elevadas e baixo índice pluviométrico (15;47).

Apesar do histórico de depleção das florestas ser um fator predisponente para a proliferação do vetor no ambiente, o desmatamento da Mata Atlântica não parece favorecer a disseminação do mosquito na Região Metropolitana da Grande Vitória. Diferente do que ocorre no estado do Rio de Janeiro, que apresenta condições climáticas e ambientais semelhantes, ainda assim, é possível observar a presença de *L. longipalpis* até mesmo nas regiões litorâneas (48;49).

A espécie *L. longipalpis* apresenta quatro variedades genéticas envolvidas na produção de feromônios sexuais: (S)-9- metilgermacreno-B (9MGB), 3-metil- $\alpha$ -himacaleno (3M $\alpha$ H), cembreno-1 e cembreno-2. A variante presente no Espírito Santo é a 9MGB, comumente encontrada no estado de Minas Gerais. Enquanto no Rio de Janeiro, *Lutzomyia longipalpis*

cembreno-1 é a mais observada, estando disseminada nos estados do Nordeste brasileiro, como o Ceará. (50;51;52;53).

Além das diferenças relacionadas ao processo reprodutivo, sugere-se que as variantes do flebotomíneo possuam necessidades ecológicas distintas, conferindo adaptabilidade às condições ambientais no local de incidência (54;55). Cogita-se ainda a possibilidade de migração da variante genética presente no Rio de Janeiro para áreas com características similares no Espírito Santo.

Assim, ressalta-se a necessidade da implementação de medidas de prevenção e de vigilância, para controle e acompanhamento da disseminação da LVC, envolvendo o monitoramento do vetor e da doença na população canina, a partir de inquéritos soropidemiológicos, periodicamente, com número de amostras representativo em função da população canina local, bem como com abrangência, procurando-se pontos estratégicos do local a ser estudado. Importante, ainda ressaltar, que na presença de caso de animal positivo, deve-se acionar imediatamente o Serviço de Vigilância local, pois trata-se de doença de notificação compulsória.

## CONCLUSÕES

O presente estudo revelou animais sorologicamente não reagentes ao protozoário *Leishmania* sp. na população canina da Região Metropolitana da Grande Vitória – Espírito Santo, sugerindo-se que a área de pesquisa não é endêmica para a LVC, até o presente momento. Apesar do resultado obtido, aconselha-se pela continuidade de estudos a partir não somente de inquéritos sorológicos, mas também de inquéritos entomológicos, na busca do vetor responsável pela transmissão.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. Disponível em: [https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_vis\\_ceral\\_1edicao.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_vis_ceral_1edicao.pdf) [12 Jul 2022]
2. Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses - Informe Epidemiológico das Américas [Internet]. Washington: OPAS; 2018. Disponível em: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34857/LeishReport6\\_por.pdf?sequence=5](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5) [14 Fev 2023]
3. Morel CM. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. Cad Saude Publica [Internet]. 2006 [citado 12 Jan 2024];22(8):1522-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2006000800001>
4. Werneck GL. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. Cad Saude Publica. 2010;26(4):644-5.
5. Magill AJ. *Leishmania* species: visceral (Kala-Azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In: Bennet JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Amsterdam: Elsevier Health Sciences; 2019. p. 3091-107.
6. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and

- Sandflies. Bañuls AL, editor. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2016 Mar 3;10(3):e0004349.
7. Melby PC, Travi BL, Yaneth Osorio E. Leishmania. In: UTMB Health Research Expert Profiles. Encyclopedia of microbiology [Internet]. Philadelphia: Elsevier; 2019 [citado 8 Nov 2023]. p. 769-79. Disponível em: <https://researchexperts.utmb.edu/en/publications/leishmania-3>
  8. Brazil RP, Brazil BG. Bionomy: biology of neotropical phlebotomine sand flies. In: Rangel EF, Shaw JJ, editors. Brazilian sand flies. [Internet]. Edimburgh: Springer Cham; 2018 [citado 18 Jun 2024]. p. 299-318. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_5) [12 Jul 2022]
  9. Sousa-Paula LC, Otranto D, Dantas-Torres F. *Lutzomyia longipalpis* (Sand Fly). Trends Parasitol [Internet]. 2020 [citado 18 Jan 2021];36(9):796-7. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922\(20\)30135-5](https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922(20)30135-5)
  10. Pimenta PFP, Freitas VC, Monteiro CC, Pires ACMA, Secundino NFC. Biology of the *Leishmania*–Sand fly interaction. In: Rangel E, Shaw J, editors. Brazilian Sand Flies [Internet]. Edimburgh: Springer Cham; 2018. p. 319-39. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_6) [12 Jun 2022]
  11. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Número Especial, mar.2021 - Doenças Tropicais Negligenciadas [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2021. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2021/boletim\\_especial\\_doencas\\_negligenciadas.pdf/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf/view) [14 Fev 2023]
  12. Costa CHN, Pereira HF, Araújo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. Rev Saude Publica. 1990;24(5):361-72.
  13. Correa Antonialli SA, Torres TG, Paranhos Filho AC, Tolezano JE. Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. J Infect. 2007;54(5):509-14.
  14. Martins J, Souza JC, Silva E. Primeiros casos autóctones de calazar no Espírito Santo. Hospital. 1968;73:69-97.
  15. Pinto IS, Ferreira AL, Valim V, Carvalho FS, Silva GM, Falcão AL, et al. Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of american visceral leishmaniasis areas in the atlantic forest, state of Espírito Santo, southeastern Brazil. J Vector Ecol [Internet]. 2012 [citado 8 Nov 2023];37(1):90-6. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/11443>
  16. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol [Internet]. 2004;7(3):338-49. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbepid/a/R8mCHPzNCQw6n4npXBRxCtt/?lang=pt> [14 Fev 2023]
  17. Cardim MFM, Rodas LAC, Dibo MR, Guirado MM, Oliveira AM, Chiaravalloti Neto F. Introdução e expansão da Leishmaniose visceral americana em humanos no estado de São Paulo, 1999-2011. Rev Saude Publica. 2013;47(4):691-700.

18. Moura AS, Rocha RL. Endemias e epidemias: dengue, leishmaniose, febre amarela, influenza, febre maculosa e leptospirose e leptospirose [Internet]. Belo Horizonte: Nescon UFMG; 2012. Disponível em: <https://www.nescon.medicina.ufmg.br/biblioteca/imagem/3285.pdf> [14 Fev 2023]
19. Elkhoury ANSM, Albuquerque R, Salomón OD. Leishmaniasis-Vector surveillance and control in Brazil: a challenge to control programs [Internet]. Buenos Aires: Conicet; 2018 [citado 8 Nov 2023]. Disponível em: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/114753>
20. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Boletim epidemiológico [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/ptbr/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/lv-casos.pdf> [14 Fev 2023]
21. Furlan MBG. Epidemia de leishmaniose visceral no Município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. *Epidemiol Serv Saude*. 2010;19(1):15-24.
22. Galimberti MZ, Katz G, Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Casanova C, Costa IP, et al. Leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32 Supl:217-8.
23. Sevá AP, Mao L, Galvis-Ovallos F, Lima JMT, Valle D. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. *PLOS Negl Trop Dis*. 2017;11(2):e0005353.
24. Barata RB. Cem anos de endemias e epidemias. *Cienc Saude Colet* [Internet]. 2000;5:333-45. Disponível em: <https://www.scielo.org/article/csc/2000.v5n2/333-345/> [14 Fev 2023]
25. Fernandes CLL. Economia e planejamento em Minas Gerais nos anos de 1960 e 1970. *Rev Gest Technol*. 2007;8(1):11-39.
26. Coelho ALN. Bacia hidrográfica do Rio Doce (MG/ES): uma análise socioambiental integrada. *Geografares*. 2009;9(7):131-46.
27. Martins AV, Brener Z, Mourão OG, Lima MM, Souza MA, Silva JE. Calazar autóctone em Minas Gerais. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*. 1956;8(4):75-86.
28. Rezende CL, Bastos O. Calazar infantil. Relato de 1 caso ocorrido em Belo Horizonte. *J Pediatr*. 1959;24:324-31.
29. Genaro O, Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL, et al. Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1990;23(2):121-1.
30. Oliveira CL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad Saude Publica*. 2001;17(5):1231-9.

31. Falqueto A, Ferreira AL, Santos CB, Porrozzi R, Costa MVS, Teva A, et al. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine leishmania infantum visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2009 [citado 8 Nov 2023];80(4):559-65. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/28333>
32. Tonini MAL, Lemos EM, Reis AB, Vital WC, Dias ES, Dietze R. Primeira descrição de leishmaniose visceral canina autóctone na Região Metropolitana de Vitória, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Tropical* [Internet]. 2012 [citado 8 Nov 2023];45:754-6. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/QL8BRJYnKg7L6N3C3zkVwPM/abstract/?lang=pt>
33. Machado JG. Comparação do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina entre laboratórios de Belo Horizonte, 2003 - 2004 [Internet]. Belo Horizonte: UFMG; 2004 [citado 8 Nov 2023]; Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-8BZH4K>
34. Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Saude Publica*. 2004;20(1):259-65.
35. Peixoto HM, Oliveira MRF, Romero GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health*. 2014;20(3):334-52.
36. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de vigilância em saúde - volume único [Internet]. 3a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2019. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_3ed.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf) [12 Jul 2022]
37. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 1966 [citado 8 Nov 2023];8(5):227-34. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rimtsp/article/view/202002>
38. Leandro MVS Jr. Análise comparativa do teste imunocromatográfico DPP-Biomanguinhos com ELISA e RIFI no diagnóstico da leishmaniose visceral canina [dissertação] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2014 [citado 8 Nov 2023]. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-05082014-153256/pt-br.php>
39. Nagata WB, Oliveira BCM, Viol MA, Panegossi MFC, Ferrari ED, Bresciani KDS, et al. Reatividade cruzada entre *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp. por meio de técnicas sorológicas e moleculares. *Rev Educ Contin Med Vet Zootec CRMV SP* [Internet]. 2018 [citado 8 Nov 2023];16(3):84-4. Disponível em: <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/37835>
40. Vieira FT, Acosta ICL, Martins TF, Moraes Filho J, Krawczak FS, Barbieri ARM, et al. Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. *Vet Parasitol*. 2018;249:43-8.

41. Bittencourt J, Hiura E, Sobral SA, Vieira FT, Braga FR, Tobias FL, et al. A ocorrência de *Babesia* sp., *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* em cães domiciliados, em dois municípios do estado do Espírito Santo – Brasil. Vet Zootec [Internet]. 2022;29:1-9. Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/611/436> [15 Mar 2022]
42. Langoni H, Modolo JR, Souza LC, Araujo WN, Shimabukuro FH, Mendonça AO, et al. Epidemiological vigilance for canine leishmaniasis in the county of Botucatu, SP, Brazil. ARS Vet. 2001;17(3):196-200.
43. Frehse MS, Greca H Jr, Ullman LS, Camossi LG, Machado JG, Langoni H, et al. Surveillance of canine visceral leishmaniasis in a disease-free area. Rev Bras Parasitol Vet. 2010;19(1):64-6.
44. Coiro CJ, Vincenzi M, Corrêa APL, Guimarães FF, Langoni H. Sistemática de vigilância para leishmaniose visceral canina no município de Botucatu/SP. Vet Zootec [Internet]. 2014 [citado 8 Nov 2023];21(1):108-16. Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/1371>
45. Mantovan KB, Luiz CGS, Menozzi BD, Nilsson MG, Latosinski GS, Silva RC, et al. Pesquisa de anticorpos para *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* spp. e *Leishmania* spp. em cães no município de Pardinho, São Paulo. Vet Zootec [Internet]. 2021 [citado 14 Ago 2022];28:1-10. Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/429/303>
46. Carvalho JLB. Leishmaniose visceral canina: busca ativa de casos e estudo sobre o conhecimento da doença em proprietários de cães na área urbana de Botucatu [dissertação] [Internet]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2007 [citado 13 Nov 2023]. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/98343>
47. Del Carro KB, Leite GR, Oliveira Filho AG, Santos CB, Souza Pinto I, Fux B, et al. Assessing geographic and climatic variables to predict the potential distribution of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* in the state of Espírito Santo, Brazil. PloS One [Internet]. 2020 [citado 12 Jan 2024];15(9):e0238198. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238198>
48. Novo SPC, Souza MB, Villanova CB, Meródio JC, Meira AM. Survey of sandfly vectors of leishmaniasis in Marambaia Island, municipality of Mangaratiba, State of Rio de Janeiro, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46(2):231-3.
49. Fuzari AA, Delmondes AFS, Barbosa VDA, Marra FA, Brazil RP. Presence of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in the Parque Estadual da Serra da Tiririca, State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2016 [citado 8 Nov 2023];49:616-9. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/nrxJntjSPrTP4k35Y5vqNFD/abstract/?lang=en>
50. Ward RD, Phillips A, Burnet B, Marcondes CB. The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. In: Service MW, editor. Biosystematics of *haematophagous insects*. Oxford: Systematics Association Special by Clarendon Press; 1988. p. 257-69.

51. Maingon RDC, Ward RD, Hamilton JGC, Noyes HA, Souza N, Kemp SJ, et al. Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceará State, Brazil. *Mol Ecol*. 2003;12(7):1879-94.
52. Hamilton JGC, Maingon RDC, Alexander B, Ward RD, Brazil RP. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. *Med Vet Entomol*. 2005;19(4):480-8.
53. Spiegel CN, Dias DBS, Araki AS, Hamilton JGC, Brazil RP, Jones TM. The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):580.
54. Bauzer LGSR, Gesto JSM, Souza NA, Ward RD, Hamilton JGC, Kyriacou CP, et al. Molecular divergence in the period gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2002 [citado 12 Jan 2024];19(9):1624-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004224>
55. Bottecchia M, Oliveira SG, Bauzer LGSR, Souza NA, Ward RD, Garner KJ, et al. Genetic divergence in the cacophony IVS6 intron among five Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *J Mol Evol*. 2004;58(6):754-61.

**Recebido em: 22/01/2024**

**Aceito em: 27/06/2024**