

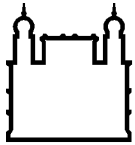
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

A IMPORTÂNCIA DOS CÃES DOMÉSTICOS COMO  
RESERVATÓRIOS DO *TRYPANOSOMA CRUZI* E DE *LEISHMANIA*  
SPP. NA ÁREA RURAL DO MUNICÍPIO DE SÃO JOÃO DO PIAUÍ (PI).

TALIHA DIAS PEREZ

RIO DE JANEIRO  
Janeiro de 2015



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Doutorado em Medicina Tropical**

*TALIHA DIAS PEREZ*

A importância dos cães domésticos como reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e de *Leishmania* spp. na área rural do município de São João do Piauí (PI).

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

**Orientador (es):** Prof. Dr. José Rodrigues Coura  
Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo

**RIO DE JANEIRO**

Janeiro de 2015.

Perez, Taliha Dias .

A importância dos cães domésticos como reservatório do *Trypanosoma cruzi* e de *Leishmania* spp. na área rural do município de São João do Piauí (PI) / Taliha Dias Perez. - Rio de Janeiro, 2015.

155 f.; il.

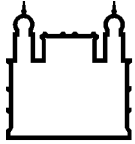
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.

Orientador: José Rodrigues Coura.

Co-orientador: Fabiano Borges Figueiredo.

Bibliografia: f. 137-147

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. *Leishmania*. 3. Cães. 4. São João do Piauí. 5. Reservatório. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***AUTOR: TALIHA DIAS PEREZ***

**A IMPORTÂNCIA DOS CÃES DOMÉSTICOS COMO RESERVATÓRIOS DO  
*TRYPANOSOMA CRUZI* E DE *LEISHMANIA* SPP. NA ÁREA RURAL DO  
MUNICÍPIO DE SÃO JOÃO DO PIAUÍ (PI).**

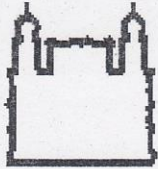
**ORIENTADOR (ES):** Prof. Dr. José Rodrigues Coura  
Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo

**Aprovada em: 30/01/2015.**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Reginaldo Brazil - Presidente** (IOC/FIOCRUZ)  
**Prof. Dr. Teresa Cristina Monte Gonçalves** (IOC/FIOCRUZ)  
**Prof. Dr. Valmir Laurentino Filho** (ENSP/FIOCRUZ)  
**Prof. Dr. Guilherme Werneck** (IESC/UFRJ)  
**Prof. Dr. Sandro Antonio Pereira** (INI/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 30 de janeiro de 2015.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de **Taliha Dias Perez**, sob orientação do Dr. José Rodrigues Coura e do Dr. Fabiano Borges Figueiredo. Ao trigésimo dia do mês de janeiro de dois mil e quinze, realizou-se às nove horas e trinta minutos, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: "**Importância dos cães domésticos como reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. na área rural do município de São João do Piauí/PI**" no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Dinâmica de Transmissão de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Reginaldo Peçanha Brazil - IOC/Fiocruz (Presidente), Dr. Valmir Laurentino Silva - ENSP/FIOCRUZ, Dr. Sandro Antonio Pereira - INI/FIOCRUZ, Dr. Guilherme Loureiro Werneck - UFRJ/RJ e Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves - IOC/Fiocruz e como suplentes: Dr. Rodrigo Caldas Menezes - INI/FIOCRUZ e Dra. Ângela Cristina Veríssimo Junqueira - IOC/Fiocruz. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de mestrado está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr<sup>a</sup> Martha Cecília Suarez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 30 de janeiro de 2015.

Dr. Reginaldo Peçanha Brazil (Presidente da Banca):

Dr. Valmir Laurentino Silva (Membro da Banca):

Dr. Sandro Antonio Pereira (Membro da Banca):

Dr. Guilherme Loureiro Werneck (Membro da Banca):

Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup> Martha Cecília Suarez Mutis (Coordenador do Programa):

Dedico este trabalho a Deus, que me permitiu renascer; a meus pais Paulo e Deise, que são toda a minha força e suporte; a meu grande companheiro e marido Diogo e a minha filha Iasmin que é um sonho realizado.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a minha Nossa Senhora Aparecida, que me permitiram continuar viva e me deram forças nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Paulo Cesar e Deise e a minha irmã Laiza, por sempre estarem presentes, me amando, apoiando e ajudando de todas as formas possíveis. Sem vocês eu nada seria!

Ao meu marido Diogo que nunca duvidou da minha capacidade, me apoiou em todos os momentos de fraqueza com bom humor e paciência.

A minha pequena princesa lasmin, você é a luz que me guia sempre. Sua alegria, amor e gracinhas me incentivam a lutar cada dia mais.

Ao Prof. Dr. José Rodrigues Coura, meu orientador, por ter me aceitado como sua aluna, por ter confiado a mim a execução desse projeto, pelos ensinamentos, companhia, incentivo, estórias e paciência. Muito brigada pela oportunidade, foi uma honra!

Ào Prof. Dr. Fabiano Figueiredo, meu co-orientador, por ter me ajudado nos momentos de dúvidas, por ter me aconselhado em vários momentos de desespero, incentivando-me sempre que tudo ia dar certo.

Ao Dr. Valmir Laurentino e a Dra. Rosemere Duarte, por terem aceitado participar desse projeto, por disponibilizar seus laboratórios para realização de parte dos ensaios sorológicos. Muito obrigada pela presteza, ensinamentos, compreensão e pela força. O mundo precisa de mais pessoas como vocês!

Ao amigo Artur Augusto pela sua grande boa vontade, sorrisos e parceria. Você fez toda a diferença durante o trabalho de campo.

À Dra. Angela Junqueira, minha amiga, pelo apoio, ajuda e companhia em parte do trabalho de campo. Você é uma terceira orientadora neste trabalho. Muito obrigada!

Às Dra Fernanda Santos e Msc. Andreia Alves, amigas conquistadas durante o desenrolar deste projeto, que me apoiaram, me ouviram e me ajudaram nos momentos mais necessários.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias do IOC, Dr. Carlos José, aluna Amanda Coutinho, técnica Laura Cristina e auxiliar Zezé, que estiveram presente durante todo o curso, sempre com boa vontade, carinho e apoio. Sem dúvida parte deste trabalho pertence a vocês!

Ao Dr. Reginaldo Brazil, Wagner Passos e Daniele que auxiliaram com presteza nas análises e capturas dos flebotomíneos.

Ao prefeito Gil Carlos e a todos os funcionários da Secretaria de Saúde SJPI, que nos cederam um espaço em seu laboratório, transporte e funcionários para a realização deste trabalho. Em especial ao Pablo, Thiene, Vanessa Oliveira, Ivana

Martins, Alex (motorista) e Adão (motorista). Esta parceria foi fundamental para o sucesso da pesquisa.

Aos agentes de endemias Alexandro (cheirinho), Vilmar e Raimundinho e as técnicas de enfermagem Luzimar e Elzelita que nos acompanharam durante todo o trabalho de campo com boa vontade e competência. Sempre ávidos por informações e com total amor e dedicação ao trabalho que realizam. Acreditem que vocês fazem toda a diferença para a população de SJPI.

A todos os moradores do município de São João do Piauí que nos receberam de forma tão gentil e acolhedora. Em especial, agradeço aos moradores das 9 localidades estudadas: Tanque, Limoeiro, Tanquinho, Lagoa da Serra, São José, Espinheiro, Jacaré, Feitoria e Curtume por toda receptividade. A humildade, alegria e generosidade que encontrei em vocês me modificou de forma intensa e definitiva, renovando valores e me fortalecendo para vida. Meu muito obrigada a cada um de vocês!

Às Dra. Fatima Madeira e Dra. Eliame, que cederam com boa vontade, seus laboratórios para a realização de parte dos ensaios.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do INI, em particular ao técnico Luis Claudio pela realização dos ensaios de histopatologia e imuno-histoquímica.

À minha turma de doutorado em Medicina Tropical. Sem vocês isso não teria sido tão especial. Tive muita sorte de encontrar uma turma animada, que mesmo nos momentos difíceis tudo era encarado com bom humor. Um beijo especial a Grazielle, Ryane, Renata e Edson.

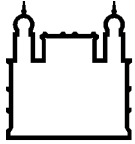
À todos os professores do curso de pós graduação em Medicina Tropical. Espero poder retribuir dentro da minha atividade profissional, com os conhecimentos adquiridos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (Capes), pela bolsa de doutorado nesses quatro anos de dedicação, que sem dúvida foi essencial para a realização do trabalho.



“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.”

Albert Einstein



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### A IMPORTÂNCIA DOS CÃES DOMÉSTICOS COMO RESERVATÓRIOS DO *TRYPANOSOMA CRUZI* E DE *LEISHMANIA* SPP. NA ÁREA RURAL DO MUNICÍPIO DE SÃO JOÃO DO PIAUÍ (PI).

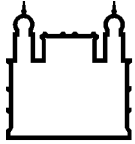
#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Taliha Dias Perez

Tanto a doença de Chagas quanto as leishmanioses são zoonoses endêmicas no estado do Piauí e de grande importância na saúde pública. Os cães domésticos representam um dos principais reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e das *Leishmania* spp. em áreas urbanas e rurais e desempenham um papel importante na manutenção destes parasitos. O presente estudo teve como objetivo estudar a prevalência do *T. cruzi* e da *Leishmania* spp. em uma amostra por conveniência de cães domésticos, assim como sua participação e influência, como reservatório, no ciclo da doença de Chagas e das Leishmanioses na área rural do município de São João do Piauí. Dos proprietários e dos seus familiares foram coletadas amostras de sangue (n=263) para a realização de *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) sendo realizado o xenodiagnóstico nos reagentes. Amostras de sangue venoso de cães (129) foram analisadas para *T. cruzi* e *Leishmania* spp. em DPP® (Dual-Path Platform technology), cultura, RIFI e ELISA. Biópsia de pele íntegra e medula óssea foram realizadas em 76 cães para exame histopatológico e cultura. Foram capturados triatomíneos no domicílio e peridomicílio e coletadas alíquotas fecais para definir a fonte alimentar por ELISA e a presença de *T. cruzi* em microscópio óptico. Armadilhas luminosas do tipo HP e Shannon foram instaladas nos domicílios, peridomicílios e mata para a captura de flebotomíneos e posterior identificação taxonômica e pesquisa de infecção natural por PCR. Se apresentaram sororeagentes para leishmaniose 5 % (ELISA/IFI) dos moradores e 7% e 4,6% dos cães nos ensaios de DPP/ELISA e ELISA/IFI respectivamente. Para DC os ensaios de ELISA/IFI 7% dos moradores e 7,7% dos

cães foram reagentes. Um cão se mostrou positivo na cultura de pele para a espécie *Trypanosoma caninum*. No xenodiagnóstico, 65% dos moradores e um cão foram positivos. Foram coletados 300 triatomíneos, todos da espécie *T. brasiliensis*, e apenas um espécime foi positivo para infecção DC. Dos flebotomíneos foram capturados 791 espécimes sendo 98% da espécie *Lu. longipalpis* e 13% positivo pela técnica PCR. Os resultados demonstram que há a circulação dos dois protozoários estudados na região e sugerem uma participação do cão como reservatório das doenças.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**THE IMPORTANCE OF DOMESTIC DOGS AS RESERVOIRS OF *TRYPANOSOMA CRUZI* AND *LEISHMANIA* SPP. IN THE RURAL AREA OF THE MUNICIPALITY OF SÃO JOÃO DO PIAUÍ (PI).**

### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN TROPICAL MEDICINE

Taliha Dias Perez

Both Chagas disease and Leishmaniasis are endemic zoonoses the State of Piauí and of great importance in public health. Domestic dogs are one of the main reservoirs of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in urban and rural areas and play an important role in maintaining these parasites. This study aims to study the prevalence of *T. cruzi* and *Leishmanias* in a convenience sample of domestic dogs as well as their participation and influence, as a reservoir, the cycle of Chagas disease and Leishmaniasis in the rural area of the municipality of São João do Piauí. The owners and their families were collected blood samples (n = 263) for performing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Reaction Immunofluorescence Assay (IFA) being held xenodiagnosis in the reactants. Venous blood samples from dogs (129) were assayed for *T. cruzi* and *Leishmania* spp. in DPP® (Dual -Path Platform technology), culture, IFA and ELISA. Full and bone marrow skin biopsy were performed in 76 dogs for histopathology and cultura. Triatomines was captured in domiciliary areas and collected fecal rates to set the food source by ELISA and the presence of *T. cruzi* in an optical microscope. Light traps HP and Shannon type were installed in households, peridomestic and kills for the capture of sandflies and subsequent taxonomic identification and natural infection by PCR. Presented reactive serum for leishmaniasis 5 % (ELISA / IFA) of residents and 7 % and 4.6 % of dogs in DPP/ELISA and ELISA/IFA respectively. For DC ELISA/IFA 7 % of residents and 7.7 % of dogs were reactive. A dog was positive skin culture for *Trypanosoma caninum*. Senoxiagnosis, 65 % of residents and one dog were positive. We collected 300 triatomine all of *T. brasiliensis* species, and only one specimen was positive for DC infection. Of the sand flies were captured 791 specimens with 98 % of *Lu. longipalpis*

species and 13% positive by PCR. The results demonstrate that there is a movement of both protozoa in the region studied and suggest that dog share a reservoir of these diseases.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 DOENÇA DE CHAGAS</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologia	1
1.1.2 Agente Etiológico	6
1.1.3 Quadro clínico	10
1.1.4 Diagnóstico	11
1.1.5 Tratamento	12
1.1.6 Controle e prevenção	13
1.1.7 Vetores da doença de Chagas	15
1.1.8 Cães como reservatório de <i>T. cruzi</i>	17
<b>1.2 LEISHMANIOSES</b>	<b>19</b>
1.2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	20
1.2.2 Leishmaniose Visceral (LV)	24
1.2.3 Vetores das Leishmanioses	31
1.2.4 Cão como reservatório das Leishmanioses	32
<b>1.3 FATORES SÓCIO-AMBIENTAIS</b>	<b>33</b>
<b>1.4 JUSTIFICATIVA</b>	<b>36</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	<b>39</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>39</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Desenho do estudo</b>	<b>40</b>
<b>3.2 Área de estudo</b>	<b>41</b>
<b>3.3 Coleta de espécimes clínicos para diagnóstico canino</b>	<b>45</b>
3.3.1 Amostra de sangue venoso	46
3.3.2 Amostra de biópsia de pele	47
3.3.3 Amostra de punção aspirativa de medula óssea	49
3.3.4 Xenodiagnóstico	51

<b>3.4</b>	<b>Exames laboratoriais para o diagnóstico e identificação de <i>T. cruzi</i> e <i>Leishmania</i> spp. nos cães.....</b>	<b>51</b>
3.4.1	Provas sorológicas .....	51
3.4.2	Histopatologia .....	54
3.4.3	Imuno-histoquímica .....	54
3.4.4	Imuno-histoquímica de aspirado de medula óssea com fixador “cell block” .....	55
3.4.5	Isolamento parasitário em meio de cultura .....	55
3.4.6	Xenodiagnóstico .....	55
<b>3.5</b>	<b>Procedimento ético .....</b>	<b>56</b>
<b>3.6</b>	<b>Coleta de espécimes clínicos para o diagnóstico Humano.....</b>	<b>56</b>
3.6.1	Amostras de sangue venoso .....	56
3.6.2	Xenodiagnóstico .....	57
<b>3.7</b>	<b>Exames laboratoriais para o diagnóstico e identificação da infecção por <i>T. cruzi</i> e <i>Leishmania</i> spp. em humanos.....</b>	<b>58</b>
3.7.1	Provas sorológicas .....	58
3.7.2	Xenodiagnóstico .....	60
3.7.3	Isolamento parasitário em meio de cultura .....	60
<b>3.8</b>	<b>Coleta de Espécimes vetores .....</b>	<b>60</b>
3.8.1	Captura de triatomíneos .....	60
3.8.2	Captura de flebotomíneos.....	65
<b>3.9</b>	<b>Exames laboratoriais das espécies vetores .....</b>	<b>66</b>
3.9.1	Avaliação da infecção natural em triatomíneos .....	66
3.9.2	Identificação da fonte alimentar dos triatomíneos.....	67
3.9.3	Identificação taxonômica dos flebotomíneos .....	69
3.9.4	Identificação de infecção por PCR em flebotomíneos .....	70
<b>3.10</b>	<b>Processamento e análise de dados .....</b>	<b>73</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>Características das Unidades Habitacionais Amostradas.....</b>	<b>75</b>
<b>4.2</b>	<b>Avaliação dos Vetores .....</b>	<b>78</b>
4.2.1	Classificação taxonômica dos vetores .....	78
4.2.2	Indicadores entomológicos .....	79
4.2.3	Fonte alimentar.....	83

<b>4.3</b>	<b>Avaliação de ensaios caninos.....</b>	<b>86</b>
4.3.1	Sorologia Leishmaniose Canina .....	86
4.3.2	Sorologia Tripanossomíase Americana .....	87
4.3.3	Ensaio de imunohistoquímica das amostras caninas .....	88
4.3.4	Cultura Parasitológica das amostras caninas.....	88
4.3.5	Xenodiagnóstico canino.....	89
<b>4.4</b>	<b>Avaliação de ensaios humanos .....</b>	<b>91</b>
4.4.1	Sorologia para Leishmaniose Humana.....	91
4.4.2	Sorologia para doença de Chagas .....	92
4.4.3	Xenodiagnóstico .....	93
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>94</b>
5.1	<b>Características das localidades, das unidades habitacionais, dos moradores e suas possíveis correlações com a infestação por triatomíneos.....</b>	<b>94</b>
5.2	<b>Triatomíneos e flebotomíneos capturados, suas distribuições nos ecótopos e infecção.....</b>	<b>96</b>
5.3	<b>Fonte Alimentar .....</b>	<b>98</b>
5.4	<b>Infecção por <i>T.cruzi</i> e Leishmaniose em cães.....</b>	<b>99</b>
5.5	<b>Infecção por <i>T.cruzi</i> e <i>Leishmania</i> em humanos .....</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>ARTIGOS PUBLICADOS</b>	<b>107</b>
8.1	Artigo 1.....	107
8.2	Artigo 2.....	113
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>116</b>
<b>10</b>	<b>APENDICES</b>	<b>127</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> - Distribuição de casos da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> , baseada em estimativas oficiais e no status da transmissão por vetor, mundial, 2006-2009 . . . . .	<b>3</b>
<b>Figura 1.2</b> - Distribuição global de casos diagnosticados e publicados de co-infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> e HIV (2006-2010).....	<b>4</b>
<b>Figura 1.3</b> - Soroprevalência da infecção chagásica. Distribuição por estado. Inquérito sorológico nacional, Brasil, 1975-1980.....	<b>6</b>
<b>Figura 1.4</b> - <i>Trypanosoma cruzi</i> em material de trato digestivo de triatomíneo capturado no município de SJPI, visto ao microscópio óptico, em lâmina corada. ....	<b>7</b>
<b>Figura 1.5</b> - Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> no vertebrado. ....	<b>9</b>
<b>Figura 1.6</b> - Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> no invertebrado.....	<b>10</b>
<b>Figura 1.7</b> - Status endêmico da leishmaniose cutânea, mundial, 2012 . . . . .	<b>20</b>
<b>Figura 1.8</b> - Status endêmico da leishmaniose visceral, mundial, 2012 . . . . .	<b>25</b>
<b>Figura 1.9</b> - Moradias precárias na área rural do município de SJPI, construídas com galhos, barro batido e telhas. ....	<b>35</b>
<b>Figura 3.1</b> - Localização do município de São João do Piauí - Piauí.....	<b>42</b>
<b>Figura 3.2</b> - Tipos de construções de casas da região rural de SJPI: A- Casa construída com tijolos e telhas; B- Casa construída com tijolos, rebocada e com telhas (assentamento); C- Casa de pau a pique e D -Cerca de galhado da vegetação típica da região.....	<b>44</b>
<b>Figura 3.3</b> - Equipe de veterinários equipados próximo a mesa de procedimento utilizada em campo para a coleta dos espécimes caninos.....	<b>45</b>
<b>Figura 3.4</b> - Coleta de sangue venoso do cão. ....	<b>46</b>
<b>Figura 3.5</b> - A – Realização do botão anestésico, B – Utilização com Punch para biópsia de pele, C – Local da biópsia após utilização do Punch. ....	<b>48</b>
<b>Figura 3.6</b> - A – Inserção da agulha na cartilagem do osso esterno para coleta da medula; B – Punção aspirativa; C – Coleta da medula. ....	<b>50</b>
<b>Figura 3.7</b> - Exame de xenodiagnóstico. A e B - Caixas com triatomíneos colocadas no abdome dos cães por trinta minutos. ....	<b>51</b>
<b>Figura 3.8</b> - Técnica de enfermagem realizando a coleta de sangue dos residentes. ....	<b>56</b>
<b>Figura 3.9</b> - Xenodiagnóstico: caixas com triatomíneos colocadas no antebraço do paciente.....	<b>58</b>

<b>Figura 3.10</b> - Investigação no domicílio: A – parede do quarto coberta de fezes de triatomíneos. B – Busca sob o colchão. C – Triatomíneo encontrado ingurgitado sob a cama do morador. ....	<b>62</b>
<b>Figura 3.11</b> - Investigação no peridomicílio: A - sob tijolos e outros materiais; B – Amontoado de materiais; C – Galinha no quintal da casa servindo de alimento para os barbeiros.....	<b>63</b>
<b>Figura 3.12</b> - A e B- Frasco de coleta e transporte dos triatomíneos capturados com rótulo de identificação, tampa perfurada e papel filtro dobrado em sanfona. ....	<b>64</b>
<b>Figura 3.13</b> - Armadilha tipo HP .....	<b>65</b>
<b>Figura 3.14</b> - Armadilhas tipo Shannon: A - armadilha tipo shannon montada em campo; B – Busca ativa e captura com aspirador manual. ....	<b>66</b>
<b>Figura 4.1</b> - <i>Trypanosoma cruzi</i> encontrado no trato digestivo do barbeiro capturado no domicilio de uma unidade habitacional na localidade Lagoa da Serra. ....	<b>81</b>
<b>Figura 4.2</b> – <i>Trypanosoma cruzi</i> encontrado em trato digestivo de barbeiro utilizado no xenodiagnóstico de cão.....	<b>90</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1</b> - Quantidade de UH existentes e amostradas em cada localidade estudada.....	<b>75</b>
<b>Tabela 4.2</b> – Distribuição das UH por tipo de parede nas 9 localidades. ....	<b>76</b>
<b>Tabela 4.3</b> – Distribuição das UH por tipo de parede em cada uma das 9 localidades estudadas.....	<b>76</b>
<b>Tabela 4.4</b> - Chefes de família que responderam ao questionário informando se já haviam sido picados pelo triatomíneo ou não. ....	<b>77</b>
<b>Tabela 4.5</b> - Localização em que foi relatado pelos moradores à presença de triatomíneos.....	<b>78</b>
<b>Tabela 4.6</b> - Local de captura e estágios dos triatomíneos capturados.....	<b>78</b>
<b>Tabela 4.7-</b> Descrição das espécies de flebotomíneos capturados em cada uma das 9 localidades, separados por sexo. ....	<b>79</b>
<b>Tabela 4.8</b> - Indicadores entomológicos de triatomíneos observados nas 9 localidades pesquisadas na área rural do município de SJPI .....	<b>80</b>
<b>Tabela 4.9-</b> Indicadores entomológicos de triatomíneos observados nas 9 localidades pesquisadas na área rural do município de SJPI .....	<b>82</b>
<b>Tabela 4.10</b> – Resultados dos ensaios sorológicos para definição de fonte alimentar. ....	<b>83</b>
<b>Tabela 4.11</b> – Resultados dos ensaios sorológicos para definição de fonte alimentar por localidade. ....	<b>84</b>
<b>Tabela 4.12</b> – Tabela de positividade de fonte alimentar por localidade.....	<b>85</b>
<b>Tabela 4.13</b> – Resultados dos ensaios sorológicos para <i>Leishmania</i> sp. ....	<b>86</b>
<b>Tabela 4.14</b> – Resultados dos ensaios sorológicos por localidade para <i>Leishmania</i> sp. ....	<b>87</b>
<b>Tabela 4.15-</b> Resultado dos ensaios sorológicos para <i>T. cruzi</i> .....	<b>87</b>
<b>Tabela 4.16</b> – Resultados dos ensaios sorológicos por localidade para <i>T. cruzi</i> . ....	<b>88</b>
<b>Tabela 4.17</b> – Resultado dos ensaios sorológicos para <i>Leishmania</i> spp.....	<b>91</b>
<b>Tabela 4.18</b> – Resultados dos ensaios sorológicos por localidade para <i>Leishmania</i> spp. ....	<b>91</b>
<b>Tabela 4.19-</b> Resultado dos ensaios sorológicos para <i>T. cruzi</i> .....	<b>92</b>
<b>Tabela 4.20</b> – Resultados dos ensaios sorológicos por localidade para <i>T. cruzi</i> . ....	<b>92</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDC – “Center of Disease Control”  
CEUA – Comitê de Ética para Utilização de Animais  
CODEVASF – Companhia de Desenvolvimento do vale do São Francisco  
D.O. - Densidade ótica  
DC – Doença de Chagas  
DCB - Departamento de Ciências Biológicas  
DCH – Doença de Chagas Humana  
DNA – “Deoxyribonucleic acid”  
DPP® - Dual-Path Platform technology  
EDTA - Etilenodiaminotetracético  
ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay  
ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública  
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz  
GDTVZ- Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses  
HE – Hematoxilia e Eosina  
HP – Histopatologia  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IDHM – Índice de Desenvolvimento Humano Municipal  
IDRM – Intradermorreação de Montenegro  
IgG – Imunoglobulina G  
IOC – Instituto Oswaldo Cruz  
IOC- Instituto Oswaldo Cruz  
IPEC (INI) – Instituto Nacional de Infectologia  
LAPCLIN-DERMZOO – Laboratório de Pesquisa Clínica de Dermatozoonoses  
LDP- Laboratório de Doenças Parasitárias  
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana  
LV – Leishmaniose Visceral  
LVC – Leishmaniose Visceral Canina  
LVH – Leishmaniose Visceral Humana  
MO – Medula Óssea  
MS- Ministério da Saúde

NNN – Novy, Macnest e Nicolle  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde  
OPD – “Ortophenilenediamine”  
PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfatos  
PBS-T – Solução Salina Tamponada com Fosfatos contendo Tween 20  
PCR – “Polymerase chain reaction”  
pH – Potencial de Hidrogênio  
PI – Piauí  
RIFI – Reação de Imunofluorescência indireta  
RPM – Rotações por Minuto  
SFM – Sistema Fagocitário Mononuclear  
SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação  
SJPI – São João do Piauí  
SVS- Secretaria de Vigilância em Saúde  
TA- Tripanossomíase Americana  
TGO – Transaminase Glutâmico-oxalacético  
TGP – Transaminase Glutâmico-pirúvica  
TMB- Tetrametilbenzidina  
UH – Unidades Habitacionais  
UV – Ultra Violeta

# 1 INTRODUÇÃO

Tanto a doença de Chagas quanto as leishmanioses são doenças parasitárias, sistêmicas e consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) como doenças tropicais negligenciadas. O termo "negligenciado", destaca que as doenças afetam as populações pobres e marginalizadas, principalmente em ambientes de baixa renda e que não possuem as ações públicas de prevenção e controle necessárias. Elas também são listadas como doenças que colocam uma em cada duas pessoas nas Américas em risco, dentre as 10 doenças transmitidas por vetores: triatomíneos, flebotomíneos, mosquitos, carrapatos, moscas e outros vetores (Coura & Albajar-Viñas 2010, OPAS 2014).

## 1.1 DOENÇA DE CHAGAS

Foi em 1909, em Lassance, Minas Gerais, Brasil, que Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, descreveu a doença de Chagas (DC) (Chagas 1910). Por esta descoberta o pesquisador, médico e sanitarista recebeu homenagens como o convite para professor catedrático de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro (hoje Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro), membro Titular da Academia Nacional de Medicina, o Prêmio Schaudinn e consta uma indicação para o Prêmio Nobel da Medicina, sendo o único pesquisador que em um mesmo momento descreveu o parasito, seu vetor, a doença e sua epidemiologia.

### 1.1.1 *Epidemiologia*

A doença apresenta-se difundida em toda a América Latina atingindo milhões de pessoas residentes de áreas rurais e urbanas com impacto sobre a morbidade e mortalidade (Dias *et al.* 2002, Coura & Albajar-Viñas 2010, OMS 2013).

A tripanossomíase americana (TA) ou DC é uma zoonose ocasionada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, que é transmitida principalmente ao ser humano por triatomíneos de três principais gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, por transfusão de sangue e hemoderivados, por via oral, por via

congênita ou no canal do parto, pela amamentação, por acidentes de laboratórios, por transplante de órgãos de doadores infectados e raramente pelas relações sexuais (Chieffi & Amato Neto 2000, Argolo *et al.* 2008, Araújo *et al.* 2009).

A doença é endêmica em 21 países nas Américas, porém a migração de pessoas infectadas com o parasito pode transportar a doença para países não endêmicos da América e do mundo. A OPAS (2014) aponta que 65 milhões de pessoas vivem expostas em áreas de risco e estima-se que 6 a 8 milhões de pessoas estão infectadas nestas áreas. A cada ano, 28.000 casos são notificados e 8.000 recém-nascidos são infectados nas Américas (OMS 2013).

A DC nas Américas pode ser distribuída em quatro grupos: o primeiro inclui a Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Equador, Paraguai, Peru e Venezuela, com a presença dos três ciclos da doença, silvestre, peridoméstico e doméstico e com alta prevalência da doença na forma cardíaca. O segundo grupo é composto pelos países: Colômbia, Costa Rica e México, caracterizado pela presença dos ciclos domésticos e peridoméstico e pela forma cardíaca crônica. O terceiro grupo inclui El Salvador, Honduras, Guatemala, Nicarágua e Panamá, com a presença dos três ciclos (silvestre, doméstico e peridoméstico) e informações limitadas das formas clínicas. E por último, o quarto grupo que inclui as Antilhas, Bahamas, Beliza, Cuba, Estados Unidos, Guiana, Guiana Francesa, Haiti, Jamaica e Suriname com a predominância do ciclo silvestre, com casos ocasionados da doença em imigrantes de países endêmicos (Schmumis 1997, Coura *et al.* 2014).

A distribuição geográfica (Figura 1.1) da infecção chagásica, incluindo seus reservatórios e seus vetores, se estende do sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina e do Chile (Coura & Dias 2009, Coura & Albajar Viñas 2010).

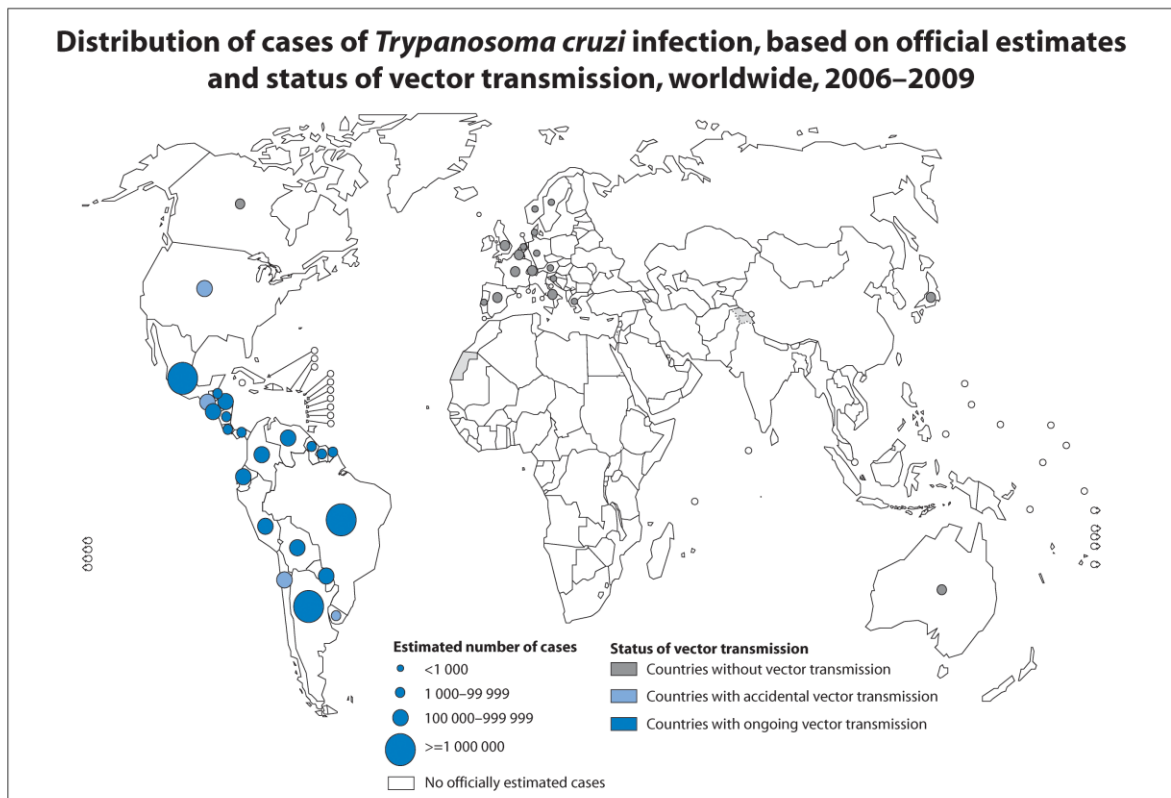


Figura 1.1 - Distribuição de casos da infecção por *Trypanosoma cruzi*, baseada em estimativas oficiais e no status da transmissão por vetor, mundial, 2006-2009 (<https://www.who.org.br> – acessado em 01 maio 2014).

No final dos anos 70, o Brasil apresentava 18 estados (AL, BA, CE, DF, GO, MA, MG, MS, MT, PB, PE, PI, PR, RN, RS, SE, SP, TO) com mais de 2.200 municípios de áreas endêmicas, com o risco da transmissão vetorial da DC, nos quais se comprovou a presença de triatomíneos domiciliados (Secretaria de Vigilância em Saúde 2005).

Na década de 80 seguindo o movimento do crescimento populacional e da urbanização houve uma mudança do padrão epidemiológico do *T.cruzi* quando combinado com a disseminação do HIV que levou a uma coinfeção e comorbidade destas duas infecções crônicas. Apesar de coinfeções, muitas vezes serem subdiagnosticadas, vários países - incluindo Argentina, Bolívia, Venezuela, Brasil, Chile, Colômbia, Itália, México, Paraguai, Espanha, Estados Unidos da América e Uruguai - têm relatado casos de coinfeção, com as maiores prevalências que ocorrem no sul da Região das Américas e no sul da Europa (Figura 1.2) (OMS 2013).



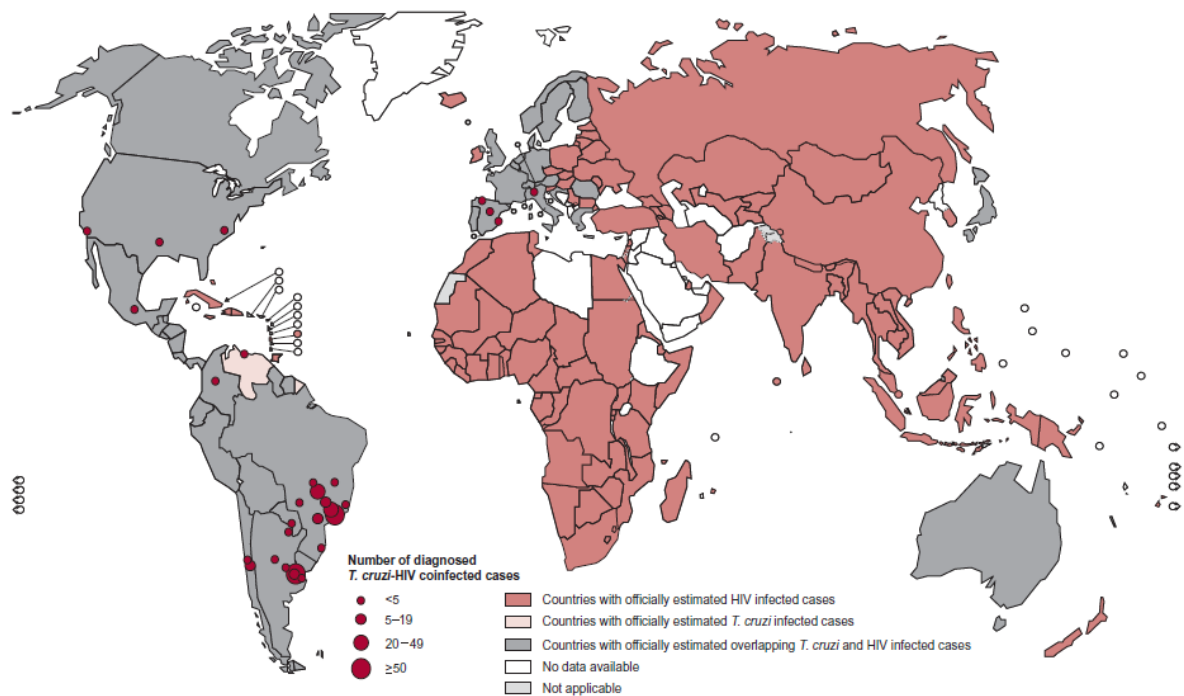


Figura 1.2 - Distribuição global de casos diagnosticados e publicados de co-infecção com *Trypanosoma cruzi* e HIV (2006-2010) (WHO Report on Neglected Tropical Diseases 2013).

Neiva & Penna (1916), fizeram os primeiros relatos sobre a possível existência da doença de Chagas no estado do Piauí. Eles mencionaram a captura de triatomíneos das espécies *Triatoma brasiliensis*, *T. maculata*, *T. sordida* e *Panstrongylus megistus* nos municípios de São Raimundo Nonato, Parnaguá e Correntes, com alguns exemplares infectados por *T. cruzi* e a presença de indivíduos com queixas de entalo e vexame, manifestações sugestivas de megaesôfago e cardiopatia.

A confirmação do diagnóstico dos primeiros casos autóctones da DC com manifestações cardíacas e digestivas ocorreram apenas seis décadas depois provenientes dos municípios de Oeiras, Castello e Bom Jesus do Gurguéia (Figueiredo *et al.* 1975). Nessa mesma ocasião, Correia-Lima *et al.* (1976) observaram a variação da soroprevalência da infecção chagásica humana de 0,88% a 11% entre moradores de 24 municípios estudados. Em 1976, Correia-Lima em estudo realizado no município de Oeiras, envolvendo as localidades de Colônia e Oitis, encontrou soropositividade para infecção chagásica em 12,1% na população

investigada com predomínio no grupo de mulheres; xenopositividade de 19% entre chagásicos crônicos.

Em 1984, Camargo *et al.* publicaram o primeiro inquérito nacional sobre a infecção chagásica abrangendo todas as unidades federativas, exceto os estados de São Paulo e Distrito Federal. Este inquérito abrangia dados entre os anos de 1975 e 1980, e mostrou uma soroprevalência estimada de 4,22% da infecção chagásica para a população geral residente em área rural no país.

No período de 1984-1985, Bento *et al.* (1989) identificaram 21,7% de soropositivos pelo teste de Imunofluorescência Indireta, nos municípios de Castelo do Piauí e Pedro II. Alves-Filho (1995), em estudo seccional no município de Oeiras, apontou uma queda da soroprevalência para 5,96% nos moradores. Nessa mesma ocasião, Junqueira *et al.* (1995) identificaram 60% de positividade do teste da PCR “polymerase chain reaction” e 34% de xenodiagnósticos indiretos positivos entre os chagásicos crônicos examinados.

Em 2011, Silveira *et al.* detalharam os resultados do inquérito nacional realizado por Camargo *et al.* (1984) em sua distribuição geográfica, onde o estado do Piauí superou em muito o esperado na avaliação da estimativa de prevalência no país, ocupando o sexto lugar, com 4,04 soropositivos por cada cem habitantes e com poucos dados entomológicos (Figura 1.3).

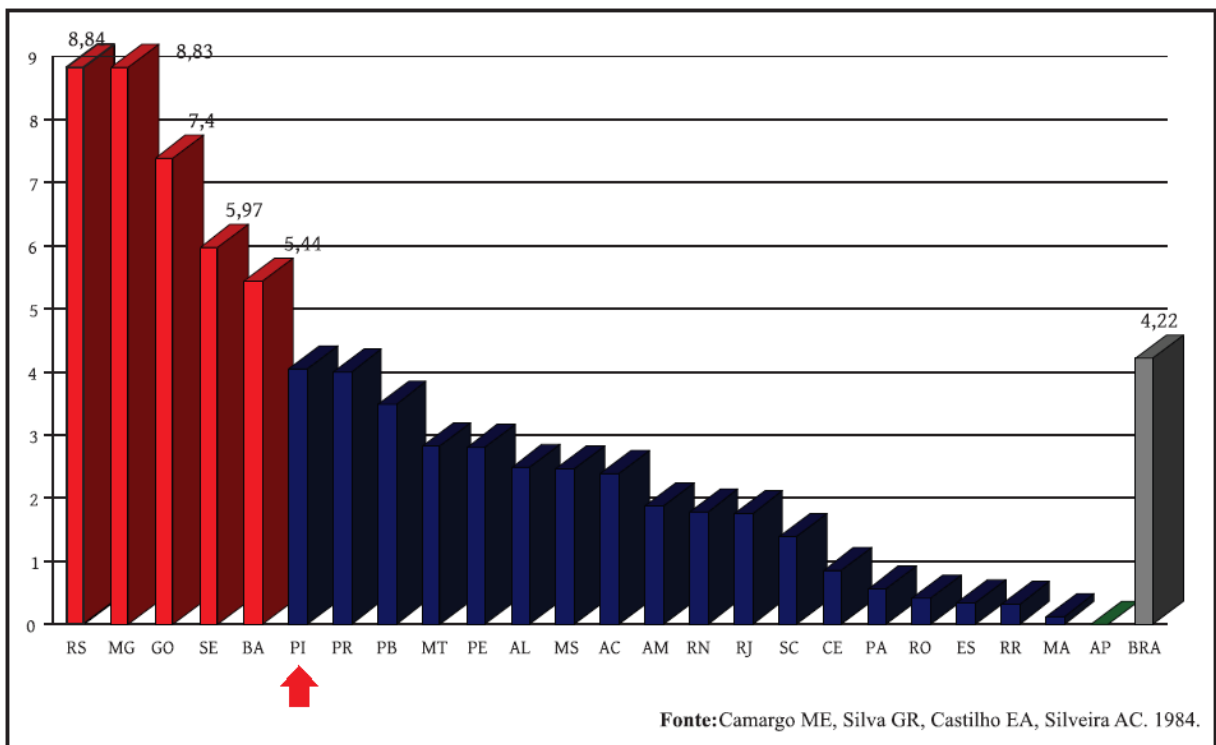


Figura 1.3 - Soroprevalência da infecção chagásica. Distribuição por estado. Inquérito sorológico nacional, Brasil, 1975-1980.

Dados obtidos pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), por meio de documento oficial enviado pela Secretaria de Saúde de São João do Piauí (SJPI), apontam para uma redução no número de casos de DC no município de 2009 a 2014. O sistema apresenta que não houveram casos da doença no ano de 2014, e que sua maior incidência ocorreu nos anos de 2010 com 117 e 2009 com 105 casos.

### 1.1.2 Agente Etiológico

*T. cruzi* (figura 1.4) pertence a ordem Kinetoplastida que é caracterizada pela presença de kDNA, um DNA extracelular que corresponde ao genoma mitocondrial do parasita e dentro desta está a família Trypanosomatidae. Caracterizada por sua importante heterogenicidade expressada por vários marcadores biológicos, bioquímicos e moleculares, o *T. cruzi* apresenta larga distribuição na natureza com cenários epidemiológicos distintos (Araújo *et al.* 2009).

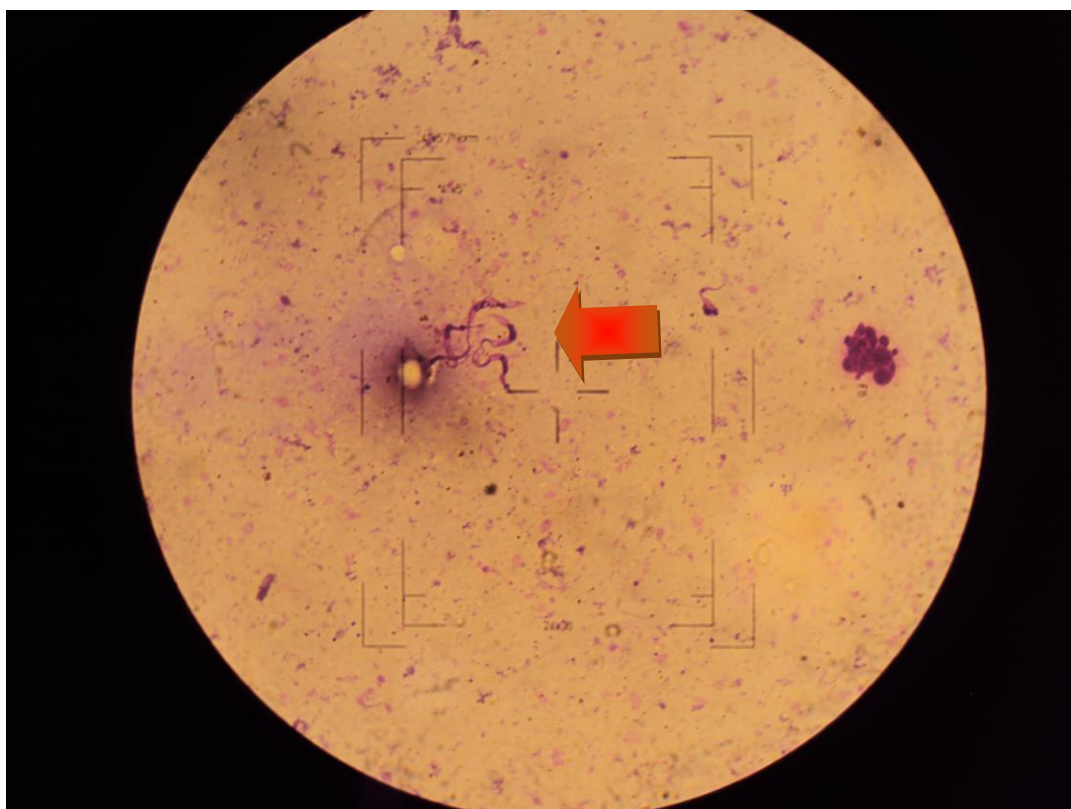


Figura 1.4 - *Trypanosoma cruzi* em material de trato digestivo de triatomíneo capturado no município de SJPI, visto ao microscópio óptico, em lâmina corada. (Foto: Taliha D. Perez)

*T. cruzi* apresentam uma estrutura populacional multiclonal, com uma grande diversidade genética. A heterogeneidade biológica dos isolados do parasito, quanto à sua morfologia, conteúdo de DNA, virulência, patogenicidade, suscetibilidade a drogas, e outros parâmetros são amplamente estudados e documentados na literatura desde a década de 70 (Zingales 2011).

Andrade (1974) propôs o primeiro critério de subdivisão das populações do *T. cruzi* em agrupamentos que apresentavam padrões de comportamento biológicos semelhantes em camundongos. Inicialmente foram definidos três grupos denominados de Tipos I, II e III, baseados em parâmetros como o predomínio das suas formas (largas ou delgadas), sua curva de parasitemia, a morfologia dos tripomastigotas sanguíneos, o tropismo tecidual, a taxa de mortalidade e lesões histopatológicas. Posteriormente, Andrade & Magalhães (1997), propuseram o termo biodema.

A variabilidade dos isolados do *T. cruzi* pode ser observada não apenas em nível biológico, mas também quanto sua composição genética com base na análise do DNA e a expressão de proteínas (Miles *et al.* 2009, Zingales *et al.* 2012).

Estudos gênicos da população de *T. cruzi* baseados na caracterização bioquímica revelaram a presença de três grupos principais, que apresentavam perfis isoenzimáticos semelhantes denominados zimodemas (ZI, ZII e ZIII). Os ZI e ZIII estão associados no Brasil ao ciclo de transmissão silvestre enquanto que o ZII foi associado ao ciclo doméstico de transmissão principalmente na Amazônia (Miles *et al.* 1977, 1978; Coura 2008).

A análise subsequente de um número maior de loci genéticos em um número maior de isolados ampliou esta diversidade para 43 zimodemas (Tibayrenc & Ayala 1988)

Em 1999 (Anonymous), ocorreu a primeira reunião para unificar a classificação do *T. cruzi* que definiu 2 linhagens principais do parasito (*T. cruzi I* e *T. cruzi II*) visando a padronização da nomenclatura.

Um segundo consenso taxonômico ocorreu em 2009 (Zingales) onde foi definida uma nova classificação da espécie *T. cruzi* subdividida em seis grupos denominados TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI de acordo com as características moleculares e biológicas do parasito.

O ciclo biológico do *T. cruzi* apresenta, dentre outras, três morfologias importantes: amastigota, epimastigota e tripomastigota. O parasito se apresenta na forma tripomastigota sanguínea com 10 a 25µm no sangue de mamíferos e ao penetrar nas células transforma-se em amastigota, que se multiplica transversalmente em divisão binária nos tecidos (Figura 1.5).

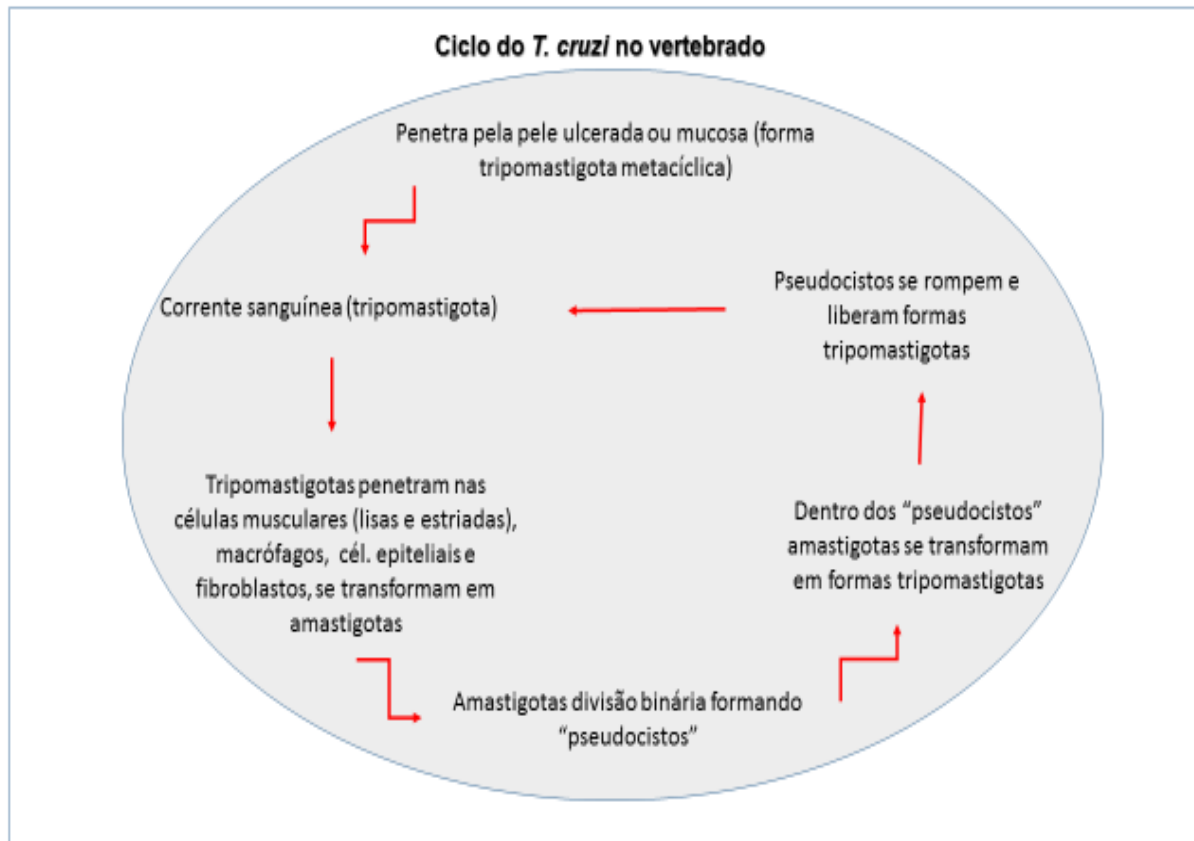


Figura 1.5 - Ciclo biológico do *T. cruzi* no vertebrado.

Ao sugar o sangue de mamíferos infectados, o inseto vetor ingere as formas sanguíneas que se transformam em epimastigotas. As formas epimastigotas dividem-se longitudinalmente com intensa multiplicação evoluindo até a forma infectante, tripomastigota metacíclica na ampola retal do vetor, sendo então eliminadas pelas fezes e urina do inseto (Figura 1.6) (Coura 2008).

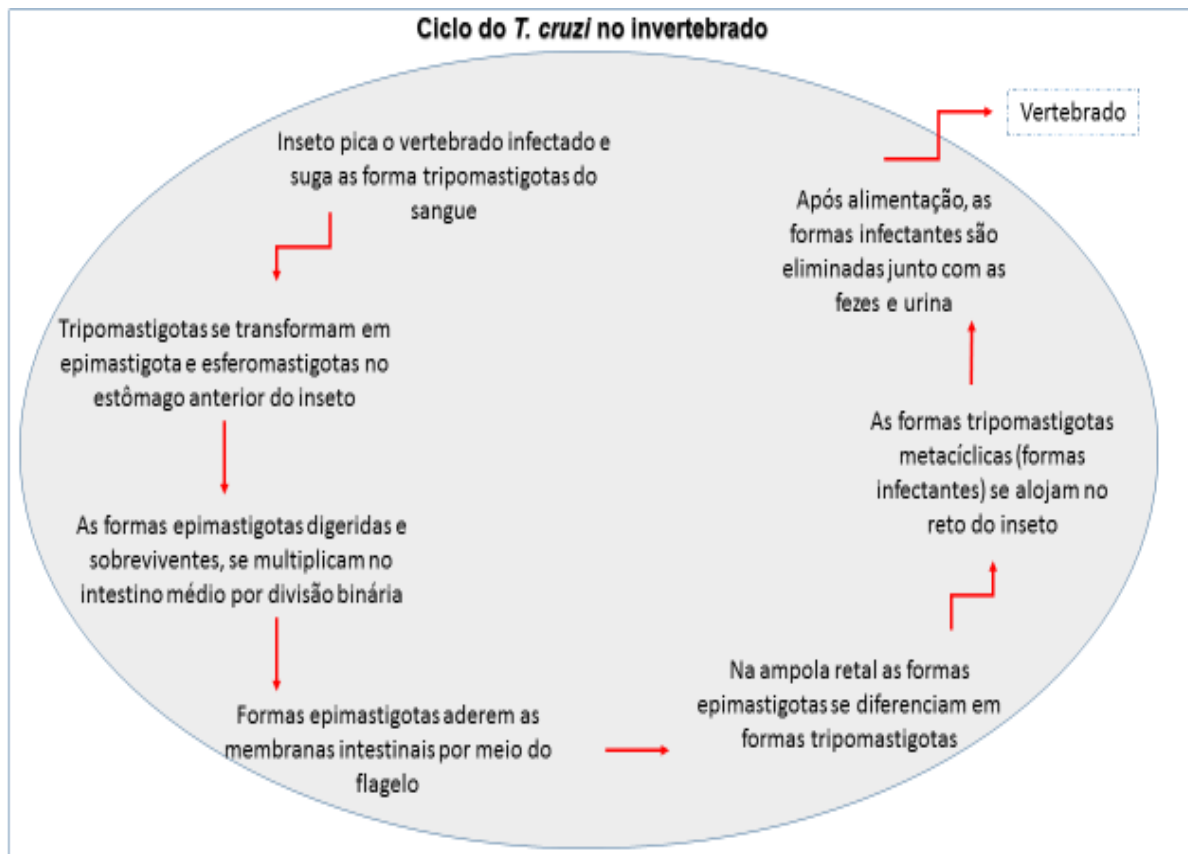


Figura 1.6 - Ciclo biológico do *T. cruzi* no invertebrado.

A transmissão do protozoário ocorre quando o triatomíneo infectado se alimenta do sangue de um mamífero e após o repasto elimina as formas infectantes (tripomastigota metacíclica) presentes nas secreções de fezes e urina, que entram em contato com a pele ulcerada ou com a mucosa. Após a auto-inoculação, o *T. cruzi* penetra na porta de entrada e se multiplica nas células locais desenvolvendo uma reação inflamatória chamado de chagoma de inoculação. Quando na mucosa ocular, pode produzir o sinal de Romaña, caracterizado por uma conjuntivite, edema palpebral e adenopatia satélite (Coura 2008).

### 1.1.3 Quadro clínico

A doença se divide em duas fases evolutivas: aguda e crônica. Após período de incubação de cerca de sete a dez dias, inicia-se a fase aguda. Esta se caracteriza pela relativa facilidade que se evidencia o *T. cruzi* no sangue periférico e pelas manifestações clínicas gerais dos sinais de porta de entrada do parasita (Chagas 1910). Apenas 35% dos indivíduos com a fase aguda apresentam a forma aparente da doença que tem sua prevalência observada em crianças na primeira

década, principalmente entre 1 e 5 anos de idade tendo potencial participação a transmissão congênita (Teixeira 1977).

Após quatro a dez semanas da infecção, o curso da doença segue um longo período sem ocorrência de manifestações clínicas classificada como fase indeterminada. Esta fase é a forma mais prevalente da DC (Dias & Coura 1997).

A forma indeterminada caracteriza-se por apresentar sorologia reagente e/ou xenodiagnóstico positivo na ausência de manifestações clínicas, cardíacas, digestivas ou nervosas, assim como inexistência de alterações eletrocardiográficas e radiológicas do coração e do tubo digestivo (I Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas 1985, Consenso 2005).

A fase crônica se desenvolve lentamente e com baixa parasitemia, e se destacam as manifestações clínicas cardíacas e digestivas. A cardiopatia chagásica crônica é de grande importância do ponto de vista médico-social, por ser a causadora básica da morbimortalidade associada a DC (Dias 1995). É importante ressaltar que a evolução para as formas digestiva ou cardíaca, com relação as manifestações mórbidas da DC, sofrem variações geográficas. Dias & Coura (1997) demonstraram que essas formas se expressam quanto a predominância de um determinado quadro clínico-patológico e ao grau de morbimortalidade em diferentes regiões. Os autores também apontam que raramente são detectadas as formas digestivas ao norte da linha do Equador, enquanto que a forma cardíaca se apresenta mais grave nas regiões sudeste e central do Brasil.

#### **1.1.4 Diagnóstico**

O Ministério da Saúde (2010) recomenda para o diagnóstico da infecção chagásica na fase aguda, o exame parasitológico direto de sangue periférico. Quando os sintomas persistem por mais de 30 dias, determinam-se os métodos de concentração devido à baixa parasitemia. Ainda na fase aguda podem ser realizados ensaios sorológicos para a pesquisa de anticorpos IgM anti *T. cruzi* quando associado a fatores clínicos e epidemiológicos.

Na fase crônica é necessário a detecção da presença de anticorpo IgG anti *T. cruzi* em pelo menos 2 testes sorológicos diferentes, sendo os recomendados: ELISA, Hemaglutinação (HE) e Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) (MS 2010).



Para a detecção de transmissão congênita, testes em mulheres gestantes com DC devem idealmente começar na fase pré-natal, a fim de acompanhar seus filhos desde o momento do seu nascimento. Isto acontece, por exemplo, em programas regionais em que há uma boa cobertura de pré-natal, como no Paraguai, algumas províncias argentinas e estados brasileiros (como Goiás e Mato Grosso do Sul). O diagnóstico destes recém-nascidos deve ser realizado utilizando meios parasitológicos (de preferência de micro-hematócrito) no sangue do cordão umbilical, a cultura de sangue e quando possível o PCR. Visando a praticidade e a viabilidade dos locais de atendimento destes recém-nascidos é utilizado para áreas endêmicas e em casos de suspeitas epidemiológicas, testes sorológicos convencionais ao nascimento (anti -*T. cruzi* IgG) (Luquetti & Rassi 2000, Carlier *et al.* 2002).

#### **1.1.5 Tratamento**

Atualmente o benzonidazol é o único fármaco disponível para o tratamento da DC no Brasil, porém em casos de intolerância a este medicamento pode ser utilizado o nifurtimox, existente na América Central. Apesar da eventual resistência cruzada que a utilização destas drogas pode causar, em caso de falha terapêutica com uma delas, o MS admite que a outra possa ser administrada (MS 2010).

O tratamento da DC é definido baseado na fase em que a doença se encontra no indivíduo. Quando na fase aguda, o tratamento deve ser iniciado de maneira rápida independente da via de transmissão. O mesmo é recomendado durante a fase crônica recente para crianças (idade igual ou inferior a 12 anos) e para adultos com sorologia positiva, embora não haja evidências que garantam o sucesso do tratamento neste último. Uma infecção é considerada recente no período de cinco a doze anos após a infecção inicial ter ocorrido. Na fase crônica, de maior duração, o tratamento é indicado para indivíduos que apresentem a forma indeterminada, digestiva e cardíacas leves. Infelizmente não há evidências de benefícios do tratamento da DC quanto a evolução clínica nas formas avançadas da doença (MS 2010).

O tratamento para as gestantes com imidazólicos (como benzonidazol) não é indicado devido à sua eficácia e efeitos secundários serem desconhecidos. Crianças com resultados positivos ao nascimento devem ser tratadas como casos agudos da doença e devem ser seguidas até os sete ou oito meses de idade, quando os testes

sorológicos devem ser repetidos (Luquetti & Rassi 2000, Carlier *et al.* 2002, Coura & Dias 2009,).

Os pacientes sororeagentes representam grande sobrecarga para os serviços de atenção médica, necessitando frequentemente de cuidados especiais nos diversos níveis de atendimento. Além disso, o impacto econômico da doença durante o estágio crônico é muito alto, se considerarmos que 30% das pessoas infectadas irão desenvolver cardiopatias graves e lesões digestivas, como arritmia cardíaca (75.000 casos), megaesôfago (45.000 casos) e mega-colon (30.000 casos) por ano, esta estimativa sugere um montante de aproximadamente 750 milhões de dólares por ano (Moncayo & Silveira 2009).

Mais recentemente, com base na patogênese da doença e sua evolução, Coura e Borges-Pereira (2011) recomendam que o tratamento deve ser ampliado para casos crônicos em estágios evolutivos iniciais, como a fase II da New York Heart Association (1973) e até a fase III, à critério do médico assistente e com a concordância do paciente.

#### **1.1.6 Controle e prevenção**

Para auxiliar no efetivo controle e prevenção da doença a Secretaria de Vigilância em Saúde por meio da Portaria SVS/MS de maio de 2006 implica que todos os casos de doença de Chagas aguda devem ser imediatamente notificados ao sistema de saúde pública, para intervenção epidemiológica.

As metas da OMS para o controle e eliminação da doença de Chagas são baseadas em dois pilares: interrupção da transmissão e prestação de cuidados aos pacientes. Os esforços para reduzir a transmissão incluem a interrupção da transmissão vetorial intradomiciliar, reduzir o risco de transmissão por via oral (América Latina) e interromper a transmissão por transfusões de sangue e transplante de órgãos (América Latina, Europa e Oeste do Pacífico). Programas de controle tradicionais da América Latina são focados em pulverizações de inseticidas nas residências e seus anexos em conjunto com a educação ambiental (Moncayo & Silveira 2009, OMS 2013).

A eliminação dos vetores domésticos em conjunto com uma vigilância permanente no controle de doadores de órgãos e de sangue, o tratamento de pacientes com casos agudos e crônicos da doença somados a educação ambiental

e sanitária da população tornam possível o controle da doença (Coura 2013, Coura *et al.* 2014).

O controle vetorial ocorre principalmente por meio da pulverização das casas com inseticidas (inseticidas residuais), mas não apenas por meio deste. A realização de melhorias das moradias, da redução do acúmulo de materiais em desuso e a promoção da higiene das casas se faz essencial para evitar a infestação de insetos. Outras medidas importantes para o controle de vetores relacionados com a transmissão, incluem a melhoria do saneamento, a implementação de medidas de controle pessoal (como o uso de mosquiteiros) e a prática de uma boa higiene na preparação, transporte, armazenamento e consumo de alimentos. A triagem de sangue de doadores e de órgãos são também métodos fundamentais para interromper a transmissão (Moncayo & Silveira 2009, OMS 2013, Coura *et al.* 2014).

Entretanto a necessidade de manter a vigilância nestes países que efetuaram a interrupção da transmissão por este vetor, é essencial para evitar a reintrodução do *T. infestans*, que ainda existe na Argentina, Bolívia, Paraguai e Peru (Abad-Franch *et al.* 2013, Coura *et al.* 2014).

Com relação ao controle da transmissão transfusional, um bom manejo é efetuado, devido ao controle sorológico rigoroso e abrangente nos bancos de sangue. Áreas sem controle do sangue, como algumas regiões da Bolívia, a quimioprofilaxia é indicada utilizando violeta de genciana ou outros pigmentos semelhantes. Estes são capazes de eliminar o parasita no prazo de 24 h (Dias & Coura 1997).

No caso da transmissão congênita, a melhor maneira de prevenir é detectar a doença e iniciar o tratamento específico o mais cedo possível (Dias & Coura 1997, Amato Neto *et al.* 2000).

Não menos importante é o controle e a prevenção dos acidentes de trabalho. É fundamental que os técnicos e pesquisadores envolvidos no trabalho com a DC em laboratório e a campo, recebam treinamentos rigorosos onde aprendam a lidar com o parasita e a se proteger de forma adequada. Ambientes e condições de trabalho adequados somados a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) e a utilização de procedimentos de higiene conferem a segurança necessária para a redução dos riscos envolvidos. (Dias & Coura 1997, Amato Neto *et al.* 2000).

### 1.1.7 Vetores da doença de Chagas

A existência de vetores da doença se estende desde o sul dos EUA a Argentina. Mais de 100 espécies são responsáveis pela transmissão natural da infecção pelo *T. cruzi* que age diretamente na sua veiculação no ciclo domiciliar ou participa na manutenção da enzootia chagásica (OMS 2013, Coura 2013).

Inquéritos de soroprevalência e entomológicos realizados no Brasil como parte da rotina de operações a partir de 1975, mostraram que 36% do território nacional integravam áreas de risco de transmissão vetorial com triatomíneos domiciliares (Vinhaes & Dias 2000).

Mais de 42 espécies de triatomíneos foram catalogadas no Brasil, e destes, 30 estavam presentes no ambiente domiciliar, porém apenas cinco mantinham participação direta na transmissão domiciliar do parasito, eram eles: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *T. pseudomaculata* e *Panstrongylus megistus* (Dias 1997, Vinhaes & Dias 2000).

Outras espécies nativas silvestres com algum potencial para invasão (*Rhodnius neglectus*, *R. ecuadoriensis*, *R. pallescens*, *T. vitticeps*, *T. rubrovaria*, *T. tibiamaculata* e *T. maculata*) podem, em algumas circunstâncias transmitir o parasito e até mesmo alcançar a colonização incipiente (Dias 1997, Coura e Dias 2009).

Triatomíneos vetores de *T. cruzi*, especialmente a espécie *T. infestans*, encontraram condições propícias em habitações humanas feitas de barro e pau a pique para a sua colonização e alimentação em humanos e seus animais domésticos (Schofield *et al.* 1994). Uma investigação entomoepidemiológica da DC realizada por Coutinho *et al.* (2014), sugere que os abrigos de animais e armazenamento inadequado de materiais no peridomicílio, bem como moradias desabitadas, contribuem para o alto índice de infestação de triatomíneos na localidade.

Uma diversidade de espécies de triatomíneos foi encontrada infectada com *T. cruzi*, porém a transmissão da DC pelo seu principal vetor, *Triatoma infestans*, foi interrompida no Uruguai, Chile e Brasil, restando apenas dois focos isolados: um no estado do Rio Grande do Sul e outro no estado da Bahia (Coura *et al.* 2014). O *T. infestans* é apontado como principal vetor devido este ser um triatomíneo exclusivamente domiciliar e alóctone (Araujo *et al.* 2009, Abad-Franch *et al.* 2013, Coura 2013).

Esta interrupção e redução da transmissão da doença por seu principal vetor no Brasil ocorreram em 2006 devido ações sistematizadas de controle químico de populações domiciliadas que foram instituídas a partir de 1975, pelo Serviço Nacional de Malária, alcançado a total cobertura das áreas endêmicas no ano de 1983 pela SUCAM. Essas ações foram mantidas em caráter regular desde então, ainda que o seu alcance em anos recentes tenha sido progressivamente menor (Moncayo & Silveira 2009, MS 2010).

Sucessivas reuniões de Comissões intergovernamentais que ocorreram entre 1993 a 1997, com o objetivo de avaliar os dados de vários países pertencentes ao Cone Sul no que diz respeito ao controle da transmissão da infecção pelo *T. cruzi* por meio de vetores e transfusão de sangue, foram fundamentais para a conquista de países como o Chile em 1999 e o Uruguai em 1997 também serem certificados pela PAHO como livres do vetor (Abad-Franch *et al.* 2013).

A transmissão vetorial hoje no Brasil é residual por algumas espécies nativas, como o *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*, e o risco de domiciliação de espécies antes consideradas de hábitos silvestres, como é o caso de *Panstrongylus lutzi* e *T. rubrovaria* potencializam os casos de infecção humana diretamente relacionada ao ciclo enzoótico de transmissão (Silveira & Dias 2011).

*Triatoma brasiliensis* e *T. pseudomaculata* são motivo de preocupação na Região Nordeste, porque eles são muitas vezes mais abundantes do que outras espécies, que infestam os ambientes domiciliares e peridomiciliares, e são caracterizados pela alta prevalência na infecção natural de *T. cruzi* (Costa *et al.* 2013, Sarquis *et al.* 2006). *Triatoma brasiliensis* foi a espécie mais abundante no estudo entomoepidemiológico no estado do Ceará (Coutinho *et al.* 2014) e apresentou a maior distribuição espacial e capacidade de infestação e colonização de domicílio (Sarquis *et al.* 2006, Alencar 1987).

Além da quantidade da espécie vetora, uma característica importante na dinâmica de transmissão é a capacidade deste vetor. A metaciclogênese do *T. cruzi* em diferentes espécies de triatomíneos é de grande importância na transmissão da infecção chagásica. Algumas espécies, tais como *T. infestans*, *R. prolixus* e *P. megistus* podem transformar 60 a 70 % das estirpes de *T. cruzi* em formas infecciosas para os seres humanos e outros vertebrados (Coura e Borges-Pereira 2012).

Um estudo experimental realizado por Perlowagora-Szunlewicz *et al.* (1998), sobre as interações de nove espécies de vetores (entre elas o *T. brasiliensis*) alimentados em cobaias infectadas com sete diferentes cepas de *T. cruzi*, demonstrou que houve grande variação nas taxas de infecção de triatomíneos de acordo com a espécie e cepa infectante do *T. cruzi*. A positividade média encontrada foi de 67,3%, e apesar da espécie *T. brasiliensis* estar abaixo dela, demonstrou índices elevados e muito próximos da média de 65,4 %.

Levantamento de informações entomológicas mostraram a presença de grandes infestações, com colonização intradomiciliar, de *T. brasiliensis* no estado do Piauí (Silveira *et al* 1984). Esta também foi a única espécie de triatomíneo capturado nos domicílios do município de Oeiras com um índice de infecção natural de 4,9% (Correia-Lima *et al* 1976). Corroborando com o quadro já descrito em outros estudos, Bento *et al.* (1989) capturaram as espécies *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Rhodnius nasutus* em ecótopos artificiais e naturais, em dez localidades situadas na área rural dos municípios de Castelo do Piauí e Pedro II. Segundo a Secretaria de Saúde de São João do Piauí (Comunicação Pessoal – Secretária de Saúde SJPI) estas três espécies são também as mais encontradas no município.

### **1.1.8 Cães como reservatório de *T. cruzi***

Na natureza, mais de 100 espécies de mamíferos domésticos e silvestres, podem abrigar o *T. cruzi*. Os mamíferos são reservatórios naturais do parasito, com papel fundamental na manutenção e interação dos ciclos domésticos e silvestres da infecção chagásica (Lauricella *et al.* 1989, Dias 2000, Schmuñis 2000, Coura 2013).

O fato é que o *T. cruzi* é capaz de infectar mais de 100 espécies de mamíferos, e neles, quase todos os seus tecidos, devido sua plasticidade biológica (Coura 2008, Coura & Dias 2009, Araujo *et al.* 2009).

O gambá (*Didelphis marsupialis*) é um dos reservatórios silvestres mais importantes, pois desempenha um papel relevante na epidemiologia da DC, visto que este marsupial circula no ambiente silvestre, peridoméstico e doméstico em busca de alimento (Zingales 2011).

Cohen & Gürtier (2001) apontam os cães como o reservatório mais importante do parasita. Montenegro *et al.* (2002) relataram que, em áreas onde o *T. infestans* é

o principal vetor domiciliar, a taxa de infecção por *T. cruzi* nos cães excedeu os valores em humanos.

Cães domésticos são um fator de risco para a DC, pois podem ser fonte de infecção pelo *T. cruzi* em seres humanos, e um estreito contato entre eles e os cães, especialmente quando estes são mantidos dentro das casas durante a noite, podem amplificar significativamente a transmissão do parasito para os seres humanos. Devido à persistência da parasitemia, os cães têm uma maior capacidade de infectar triatomíneos do que os seres humanos e têm sido utilizados como eficientes sentinelas naturais para avaliar *T. cruzi* em reinfecções (Gürtler *et al.* 1993, Castanera *et al.* 1998, Estrada-Franco *et al.* 2006).

Há relato de cães infectados por *T. cruzi* no sudeste dos Estados Unidos, que têm sido associados com a transmissão doméstica da infecção humana (Duprey *et al.* 2006, Kjos *et al.* 2008).

A soropositividade em seres humanos foi cinco vezes maior em casas habitadas por cães e gatos infectados do que em casas onde não haviam animais domésticos parasitados (Mott *et al.* 1978).

A grande importância do cão como reservatório doméstico do *T. cruzi* é representada pelo seu intercâmbio do ciclo doméstico, como o peridoméstico e silvestre, uma vez que ele vive normalmente em contato com vetores no peridomicílio ou no próprio domicílio e incursiona no ciclo silvestre muitas vezes com seus proprietários no trabalho de caça, com risco de se infectar por via vetorial ou por via oral pela caça e alimentação de animais silvestres (Zeledon 1974, Coura 2008, Coura & Dias 2009, Coura 2013).

Estudos de fonte alimentar por método da precipitina em triatomíneos da espécie *Triatoma brasiliensis* realizados no estado da Paraíba, apresentaram uma taxa significativa de 15,2% de insetos com antíssoros positivos para a presença de sangue de cães (Marzochi *et al.* 1988). Zéledon (1973), por este mesmo método, demonstrou que o animal picado mais frequentemente, seja no domicílio ou no peridomicílio, são os cães.

Souza *et al.* (2009) realizaram inquérito sorológico de cães em região rural no estado do Mato Grosso do Sul, onde os altos índices de soropositividade e a confirmação da presença do agente ressaltam a necessidade de se esclarecer a real prevalência da infecção, estabelecer a epidemiologia e identificar o papel do cão na

transmissão da doença, visto esta ter sido a primeira avaliação sorológica realizada em cães desta região.

Na zona rural do município de Patos, semiárido paraibano, Medes *et al.* (2013) apontaram uma prevalência sorológica de cães naturalmente infectados por *T. cruzi* de 4,08%.

Estudos conduzidos em áreas rurais da região nordeste brasileira, demonstraram uma alta prevalência de animais domésticos infectados por *T. cruzi*, com grande importância para cães e gatos na transmissão do ciclo doméstico (Barrett *et al.* 1979).

Assim como nos seres humanos, a TA em cães apresenta quatro formas clínicas: aguda, crônica indeterminada, subaguda e crônica determinada; podendo manifestar lesões cardíacas, digestivas e menos comumente a nervosa.

Manifestações agudas e crônicas da tripanossomíase canina já foram descritas, sendo a aguda mais facilmente observada em cães filhotes de 5 dias a 6 meses de idade (Camacho *et al.* 2003).

É assumido que os cães podem se infectar da mesma forma como os seres humanos, ou seja, pela contaminação com fezes ou urina infectadas do inseto vetor, pelas mucosas ou pele lesionada. Apesar dos relatos frequentes de cães e outros animais de mascar o inseto ou pelo menos manipulá-los com suas bocas, como um ato instintivo (Zeledón 1974), pouca atenção tem sido dada a este mecanismo de infecção. Experimentalmente, essa rota é extremamente eficaz em laboratório, para animais domésticos ou selvagens, indicando que alguns deles, em condições naturais, se tornarão mais facilmente infectados e que esse mecanismo deve ser considerado de grande importância epidemiológica (Zeledón *et al.* 1977).

## **1.2 LEISHMANIOSES**

As leishmanioses são zoonoses importantes, que acometem o ser humano e outras espécies de mamíferos silvestres e domésticos, sob a forma de doenças infecciosas crônicas com diversas manifestações clínicas. São causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e a sua principal forma de transmissão ocorre através da picada de fêmeas dos insetos vetores da subfamília Phlebotominae, que adquirem o parasito ao picar reservatórios infectados (Marzochi & Marzochi 1994, OMS 2008).



São descritas cerca de 22 espécies de *Leishmania* associadas a ambas as formas da doença, algumas relacionadas com formas clínicas particulares como à leishmaniose visceral (LV), à leishmaniose cutânea difusa e à leishmaniose cutâneo-mucosa (Shaw 1994, Ashford 2000, Silveira *et al.* 2002).

A distribuição geográfica das leishmanioses está associada às regiões tropicais e subtropicais, onde existe uma maior densidade de espécies vetoras, dos gêneros *Phlebotomus*, responsáveis pela transmissão no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (Basano & Camargo 2004).

### 1.2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

#### 1.2.1.1 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar

A doença está presente em 19 países das Américas (Figura 1.7) e o Brasil junto com a Colômbia, Peru e Nicarágua, representam 75% de todos os casos cutâneos existentes. Uma média de 60.000 casos de leishmaniose cutânea e mucosa são diagnosticados a cada ano nas Américas (OPAS 2014).

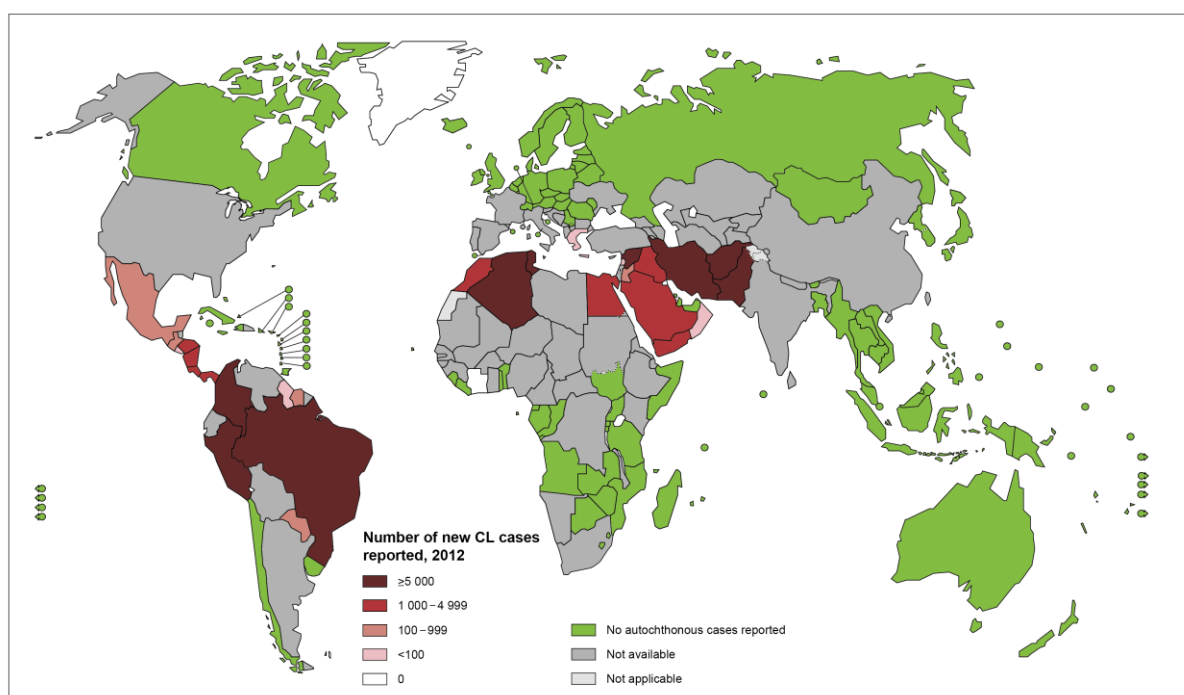


Figura 1.7 - Status endêmico da leishmaniose cutânea, mundial, 2012 ([http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis\\_CL\\_2013.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png) – acessado em 01 maio 2014).

No ano de 2003, foi confirmada autoctonia em todas as unidades federadas do país. A região Norte vem contribuindo com o maior número de casos (cerca de 36% do total de casos registrados, no período) e com os coeficientes médios mais elevados (85,4 casos por 100.000 habitantes), seguida das regiões Nordeste (43,5 casos por 100.000 habitantes) e Centro-oeste (37,5 casos por 100.000 habitantes) (OMS 2008).

Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), não houveram casos de LTA no município de SJPI de 2009 a 2014.

### **1.2.1.2 Agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana**

Há uma diversidade de espécies de leishmanias envolvidas na transmissão da LTA. Atualmente são 11 as espécies dermatrópicas reconhecidas nas Américas como causadoras da doença em humanos e 8 em animais. No Brasil 7 espécies foram identificadas, 6 do subgênero *Viannia* e 1 do subgênero *Leishmania*. As espécies mais importantes são as *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonenses* (MS 2010).

A *L. (V.) braziliensis* é o principal agente da LTA, e se destaca por apresentar os dois padrões, o silvestre, com distribuição do sul do Pará ao Nordeste e em algumas áreas da Amazônia oriental, no qual os hospedeiros naturais são desconhecidos e seu vetor é *Psychodopigus wellcomei* (MS 2007) e o urbano que com um perfil de transmissão no intra e no peridomicílio, condicionado à adaptação de algumas espécies de flebotomíneos ao meio ambiente modificado da periferia das cidades, atingido também mulheres e crianças (D'utra e Silva 1915, Cerqueira & Vasconcelos 1922, Passos *et al.* 1993, Marzochi & Marzochi 1994). Neste contexto é importante ressaltar a presença de hospedeiros domésticos como cães e equinos, criando a possibilidade, desses animais atuarem como reservatórios (Marzochi & Marzochi 1994, Ferreira *et al.* 2003).

### **1.2.1.3 Patogenia e quadro clínico da Leishmaniose Tegumentar Americana**

Quem realiza a hematofagia são os flebótomos fêmeas, que se infectam ao picar o animal portador do parasito, aspirando macrófagos ou amastigotas livres no sangue ou tecidos. No tubo digestivo do inseto, as formas amastigotas se dividem e evoluem até as formas promastigotas chegando ao aparelho bucal do flebótomo. Ao picar os mamíferos (ser humano, cão, raposa) a fêmea regurgita as formas

promastigotas metacíclicas junto com sua saliva rica em peptídeos, o que favorece a resposta inflamatória e a migração de células fagocíticas para o local da picada. Os macrófagos realizam a fagocitose do parasito que se transformam nas formas amastigotas, se multiplicando e se disseminando pelo sistema fagocítico mononuclear (Falqueto & Sessa 2005, Coura 2008).

A partir de estudos patofisiológicos foi verificado que *Leishmania* spp. se desenvolve no tubo intestinal do hospedeiro invertebrado, na forma promastigota, e essa, uma vez introduzida nos mamíferos através da picada, transforma-se na forma amastigota. Enquanto a forma promastigota é flagelada e extracelular, a forma amastigota é intracelular e sem movimento. A multiplicação dos amastigotas ocorre no interior de vacúolos parasitóforos em macrófago de diferentes tecidos, originando a doença na forma cutânea, mucocutânea e visceral (Falqueto & Sessa 2005).

No Brasil a LTA, também conhecida como Leishmaniose mucocutânea ou úlcera de Bauru (nariz de tapir, botão do Oriente), constitui um grave problema de saúde pública, podendo ocasionar deformidades destrutivas, desfigurantes e por vezes incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo. É primariamente uma infecção zoonótica que afeta outros animais que não o homem, o qual pode ser envolvido secundariamente (OPAS 2014).

A forma mucocutânea invade as membranas das mucosas principalmente do trato respiratório superior causando grandes mutilações, destruindo os tecidos moles do nariz, boca e garganta (OMS 2013). Sua epidemiologia segue dois padrões: o primeiro silvestre relacionado a surtos epidêmicos atingindo principalmente militares em incursões nas matas, trabalhadores que atuam na derrubada destas para construções de estradas e exploradores de recursos florestais, tipicamente mais associada a populações adultas do sexo masculino (Sampaio 1951, Basano & Camargo 2004) e o segundo urbano encontrado em áreas de colonização antiga com maior frequência nas regiões Sudeste e Nordeste do país, relacionado ao processo migratório com ocupação de áreas rurais, periferias urbanas (Marzochi & Marzochi 1994, Serra *et al.* 2003) e de áreas urbanas adjacentes a ambientes rurais (Oliveira *et al.* 2004).

A forma mais prevalente das leishmanioses é a forma cutânea, caracterizada pela formação de úlceras que costumam evoluir para a cura espontânea. Classicamente apresentam-se pela formação de pápulas que evoluem para úlceras com fundo granuloso, bordas infiltradas em moldura, que podem ser únicas ou

múltiplas, mas indolores. Podem também se manifestar com a formação de placas verrucosas, papulosas, nodulares, localizadas ou difusas (MS 2010).

#### **1.2.1.4 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana**

O diagnóstico da LTA é realizado por meio da suspeita clínico-epidemiológica associada à intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva e/ou demonstração do parasita no exame parasitológico direto em esfregaço de raspado da borda da lesão ou em “in print” feito com o fragmento da biópsia. O teste imunológico de primeira escolha é o IDRM, que se fundamenta na visualização da resposta de hipersensibilidade celular tardia. A IDRM geralmente persiste positiva após o tratamento, ou a cicatrização da lesão cutânea tratada, ou curada espontaneamente, podendo negatizar nos indivíduos fraco-reatores e nos precocemente tratados. Em áreas endêmicas, a IDRM positiva pode ser interpretada como leishmaniose anterior ou mesmo aplicação anterior de antígeno de IDRM, exposição ao parasito sem doença (infecção), alergia ao diluente do teste ou reação cruzada com outras doenças (doença de Chagas, esporotricose, hanseníase virchowiana, tuberculose, cromomicose, entre outras). Nas populações de área endêmica, na ausência de lesão ativa ou cicatriz, a positividade varia entre 20 e 30% (MS 2010).

A confirmação laboratorial da LTA é realizada por métodos parasitológicos, sendo esse fundamental, tendo em vista o número de doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LTA. O método direto, é considerado o procedimento de primeira escolha por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução. A probabilidade de encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após 1 ano. A infecção secundária contribui para diminuir a sensibilidade do método, e por isso, deve ser tratada previamente (MS 2010).

#### **1.2.1.5 Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana**

O primeiro medicamento utilizado com sucesso para a LTA foi realizado por Gaspar Vianna em 1912 com a utilização do tártaro emético (tartarato duplo de sódio e antimônio), fármaco eficaz no tratamento da esquistossomose (Vianna 1912). Devido sua elevada toxicidade, os antimoniais trivalentes foram substituídos pelos antimoniais pentavalentes, que apesar de menos tóxicos ainda não possuem seus efeitos totalmente elucidados (Falqueto & Sessa 2005).

Apesar dos riscos, o antimonial pentavalente comercializado como Glucantime® (Rhône-Poulenc-Rohrer) ou antimoniato de meglumina, é a droga de primeira escolha para o tratamento de todas as formas de LTA exceto em pacientes gestantes e coinfectados com o vírus HIV. Existem dois tipos de antimoniais pentavalentes: o antimoniato de N-metil glucamina e o stibogluconato de sódio, este último não é comercializado no Brasil (Rath *et al.* 2003, MS 2010).

O composto antimonial é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da N-metil-glucamina, sendo a última obtida previamente a partir da aminaçãõ redutora da glicose em presença de metilamina, possui fórmula estrutural não definida, é solúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos. O antimoniato de metilglucamina é especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. O medicamento provoca regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, assim como a esterilização do parasita (Rath *et al.* 2003).

Em pacientes com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas, deverá ser feita rigorosa avaliação clínica antes e durante o tratamento, com acompanhamento eletrocardiográfico duas vezes por semana, hemograma e exame bioquímico do sangue para avaliação das funções renal, pancreática e hepática (MS 2010).

Outros fármacos têm sido empregados no tratamento das diversas formas da leishmaniose, entre as quais se destacam: a atividade quimioterápica das substâncias do grupo das diamidas - pentamidina (Lomidina®); os antibióticos antifúngicos derivado da cepa de *Streptomyces nodosus* - anfotericina B (Fungizone, AmBisome™); o antibiótico aminoglicosídeo - paromomicina (Humatin) e a droga anti-câncer alquilfosfolipídica – miltefosine (Rath *et al.* 2003).

### **1.2.2 Leishmaniose Visceral (LV)**

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica, sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, astenia, adinamia e anemia. Quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos. Muitos infectados apresentam a forma assintomática da doença. Suas manifestações clínicas refletem o desequilíbrio entre a multiplicação dos parasitos nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), a resposta imunitária do indivíduo e o processo inflamatório subjacente (MS 2010).

### 1.2.2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral

Uma epidemia de LV no Sul do Sudão, entre 2009-2011 envolveu mais de 25.000 casos e causou mais de 700 mortes (OMS 2013). Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste. A média anual de casos no País foi de 3.156 casos, com uma incidência de dois casos por 100.000 habitantes. Entre 1984-2002 somaram-se 48.455 casos da LV e 66% ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí (MS 2006) (Figura 1.8).

No Brasil, epidemias urbanas de LV foram observadas em várias cidades (Dantas-Torres e Brandão-Filho 2006) e a doença tem sido apontada como infecção oportunista em pacientes com AIDS. Apesar dos esforços no controle de vetores e reservatórios, a LV encontra-se em rápida expansão territorial, acometendo indivíduos de diferentes grupos de idades (MS 2011).

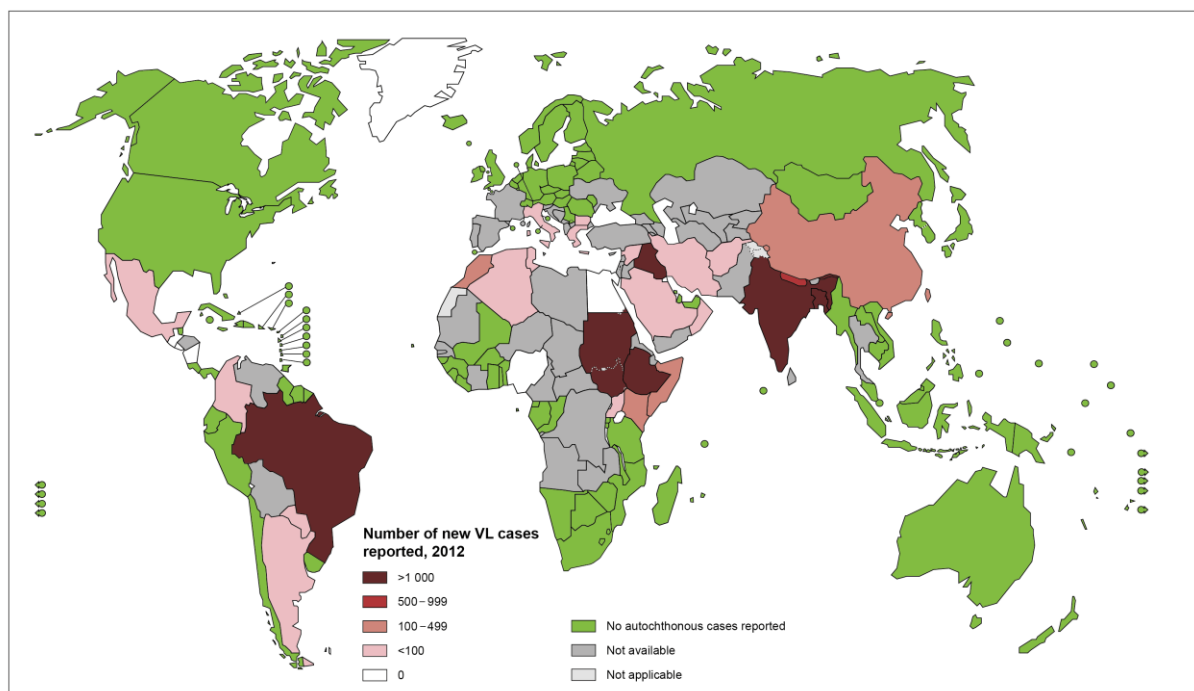


Figura 1.8 - Status endêmico da leishmaniose visceral, mundial, 2012 ([http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis\\_VL\\_2013.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png) – acessado em 01 maio 2014).

Na década de 50, o Brasil tinha uma imagem clara das zonas endêmicas de LV, que foram restritas principalmente à região Nordeste e algumas áreas específicas nos Estados do Pará e Minas Gerais. Casos esporádicos também foram

observados em outras regiões do país, onde os aspectos epidemiológicos da doença foram associados a áreas rurais e à presença de *Lutzomyia longipalpis* (Deane 1956).

Em menos de 30 anos, esse cenário começou a mudar e a doença começou a se mover para algumas áreas urbanas, tornando-se urbanizada em poucos anos. Alguns aspectos epidemiológicos da doença podem explicar parcialmente como isso acontece. Os estudos das epidemias registradas em importantes centros urbanos do País destacaram como o processo migratório, do campo para as grandes cidades, influenciou na mudança do perfil epidemiológico da LV (Monteiro 2005).

De acordo com os resultados de Werneck (2008), cenários de transmissão em áreas urbanas parecem ser altamente heterogêneos, cada um mostrando algum grau de similaridade ao padrão epidemiológico rural. No entanto, a ligação vital para a propagação da doença nesses locais urbanos é a dispersão passiva de *Lu. Longipalpis*.

A transmissão autóctone da LV foi relatada nos últimos anos em todas as regiões do Brasil. Após a primeira epidemia urbana na cidade de Teresina (PI), vários surtos têm sido relatados em áreas periféricas ou urbanas, como São Luiz, Montes Claros, Belo Horizonte, Araçatuba, Cuiabá, Campo Grande, Três Lagoas, Palmas e Brasília (Brazil 2013).

O estado do Piauí, onde a doença é conhecida desde 1934, e é um dos principais focos da doença no Brasil. No período de 1971 a 1979 a LV apresentava-se apenas como uma endemia no Piauí e a maioria dos casos era notificada como procedente de Teresina. A epidemia teve início em 1980, com o registro de 16 casos. Destes, 11 eram procedentes do interior e vinham dos vales dos rios do norte e do centro do Estado. Atingiu seu ápice em 1985 e em Teresina começou no ano de 1981 com o registro de 55 casos, a maioria procedente dos bairros novos, de assentamento de migrantes, nas áreas sul e nordeste da cidade e apenas no ano seguinte atingiu a área norte (Costa *et al.* 1990).

Uma segunda epidemia ocorreu em 1993-1994, com 1.042 casos (94,92 casos/100.000 habitantes), com 34 óbitos (letalidade de 6,32%). As tentativas de controle da LV inicialmente foram realizadas através do uso intensivo de inseticidas e eliminação de cães, sem resultados satisfatórios, porém em outras regiões do estado, borrifadas intensamente para o controle da doença de Chagas e malária, a epidemia de LV foi pouco importante e cedeu espontaneamente (Costa *et al.* 1990).

O município de SJPI, apresentou apenas um caso de LV segundo dados obtidos pelo SINAN. Avaliando os casos a partir de 2009, constatou-se que 2009 foi o ano com maior incidência da doença com nove casos notificados.

### **1.2.2.2 Agente etiológico da Leishmaniose Visceral**

A doença tem como principal agente etiológico o protozoário tripanosomatídeo do gênero *Leishmania*, espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*, parasita intracelular obrigatório sob forma aflagelada ou amastigota das células do sistema fagocítico mononuclear. Dentro do tubo digestivo do vetor, as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas (flageladas). Nas Américas, a *Leishmania (Leishmania) infantum* é a espécie comumente envolvida na transmissão da LV (MS 2010).

No Brasil, a forma de transmissão da LV é por meio da fêmea de insetos flebotomíneos das espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lu. cruzi*, infectados. A transmissão ocorre enquanto houver o parasitismo na pele ou no sangue periférico do hospedeiro. Alguns autores admitem a hipótese da transmissão entre a população canina através da ingestão de carrapatos infectados e, mesmo, através de mordeduras, cópula e ingestão de vísceras contaminadas (MS 2010).

### **1.2.2.3 Patogenia e quadro clínico da Leishmaniose Visceral**

A LV, também conhecida como calazar, é geralmente fatal dentro de dois anos se não tratada. Após o tratamento, a LV pode se transformar em uma forma cutânea conhecido como pós-kala-azar (leishmaniose tegumentar), casos esses que podem servir como fontes de infecção para os vetores e assim realizar a manutenção da transmissão (MS 2011).

A leishmaniose visceral humana (LVH) possui como características sintomáticas pacientes com febre persistente (por mais de 7 dias), palidez e hepatoesplenomegalia. Costuma ter maior incidência em pacientes menores de 10 anos de idade. Nos exames laboratoriais complementares é verificado a presença de anemia, leucopenia, plaquetopenia e aumento das enzimas transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) (Nota Técnica N°5/2012).

Os sinais clínicos da leishmaniose visceral canina (LVC) são a febre irregular, apatia, emagrecimento, lesões cutâneas (principalmente descamação, eczema e



úlceras) em grande parte dos casos no focinho, orelhas e extremidades; conjuntivite, paresia do trem posterior, fezes sanguinolentas e onicogribose (Feitosa *et al.* 2000, Paiva 2005).

#### **1.2.2.4 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral**

O diagnóstico das leishmanioses, humana ou canina, é feito pela associação entre dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Os testes laboratoriais consistem na evidenciação do parasito e em provas imunológicas. O material para o diagnóstico parasitológico das leishmanioses de cães pode ser obtido a partir de aspirado de medula óssea, de baço, de fígado ou de linfonodos e, em alguns casos, de biópsias de pele íntegra, de lesão cutânea ou de vísceras (Deane & Deane 1955, MS 2006). A partir de dezembro de 2011 os exames diagnósticos de eleição para o cão passaram a ser o teste imunocromatográfico (DPP), que uma vez positivo é feito o ELISA para confirmação (Nota técnica N°5/2012).

O Ministério da Saúde definiu em seu Manual para redução de Letalidade da LVH (2011), que todo indivíduo com febre e esplenomegalia, proveniente de área com ocorrência de transmissão de LV ou sem ocorrência de transmissão, é um caso suspeito de LV, desde que descartados os diagnósticos diferenciais mais frequentes na região. A confirmação dos casos humanos clinicamente suspeitos deve preencher no mínimo um dos seguintes critérios:

- Encontro do parasito nos exames parasitológicos direto ou cultura.
- Reação de imunofluorescência reativa com título de 1:80 ou mais, desde que excluídos outros diagnósticos.
- Testes imunocromatográficos, que utilizam antígenos recombinantes.

Os pacientes clinicamente suspeitos, mas sem uma confirmação laboratorial, quando provenientes de áreas com transmissão de LV e com resposta favorável a terapia medicamentosa também são considerados casos confirmados.

Muitas entidades clínicas podem ser confundidas com a LV, destacando-se, entre elas, a enterobacteriose de curso prolongado (associação de esquistossomose com salmonela ou outra enterobactéria), cujas manifestações clínicas se superpõem perfeitamente ao quadro da leishmaniose visceral. Em muitas situações, esse diagnóstico diferencial só pode ser concluído por provas laboratoriais, já que as áreas endêmicas se sobrepõem em grandes faixas do território brasileiro. Somam-se

a essa entidade outras doenças (malária, brucelose, febre tifóide, esquistossomose, forma aguda da doença de Chagas, entre outras) (MS 2010).

### **1.2.2.5 Tratamento da Leishmaniose Visceral**

#### **A- Humano**

O tratamento da LV no Brasil é efetuado com os medicamentos antimoniato pentavalente e a anfotericina B e deve ser considerada a faixa etária, a presença de gravidez e as comorbidades do indivíduo para a eleição da droga mais adequada.

#### **B- Canino**

Tanto para LVC quanto para a Tegumentar Canina é proibido o tratamento dos animais com produtos de uso humano, de acordo com a Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008. A razão da proibição se dá devido ao uso desses medicamentos nos animais aumentarem o risco para seleção de parasitas resistentes ao medicamento. Esse assunto foi tema de grande debate durante os últimos anos quando entidades não governamentais (ONGs) de proteção aos animais entraram com duas ações, uma cautelar e uma principal, no Tribunal Regional Federal da 3ª Região pedindo a autorização para o tratamento da leishmaniose em cães e, portanto, questionando a Portaria 1.426/2008. Porém após decisão pelo Superior Tribunal Federal se manteve válida a decisão da Portaria 1.426/2008, que impõe a proibição do tratamento e a necessidade da eutanásia de animais diagnosticados com LVC.

Diferentemente da LVC, na LTA não é recomendada a eutanásia do animal para fins de controle e prevenção, pois nesta não há comprovação científica, até o momento, de que o cão faça parte do ciclo de transmissão (Nota técnica N°5/2012)

### **1.2.2.6 Controle e prevenção da Leishmaniose Visceral**

O Brasil possui um Programa de Vigilância e Controle da LV que tem como principal objetivo a redução do número de casos e de óbitos por meio do diagnóstico e do tratamento precoces. No entanto, a letalidade aumentou de 3,4%, em 1994, para 5,7%, em 2009, o que representou um aumento percentual de 67,6%. A letalidade média nos últimos quatro anos foi de 5,8% e o Ministério da Saúde, na perspectiva de reduzi-la, tem implementado as ações de vigilância e assistência ao paciente com LV (MS 2011).

Na tentativa de controlar e atuar na vigilância da doença, a Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses (GDTVZ) desenvolve um novo documento (Nota Técnica Nº 5/2012) apontando para a manutenção e ocorrência de novos casos de LV em cães e humanos, incluindo óbito, no início de 2012. Este documento foi repassado aos profissionais da área, clínicas veterinárias e unidades de saúde.

As ações de vigilância canina compreendem investigação do foco, a busca ativa de cães sintomáticos, o monitoramento por meio de inquérito sorológico amostral e inquérito sorológico censitário (MS 2010).

Com relação aos cães, para a prevenção pode ser utilizada a vacina e o uso de coleira repelente impregnada com inseticida que deve ser trocada de acordo com a periodicidade indicada pelo fabricante. Em locais com muitos flebotomíneos, deve ser realizado o manejo do animal de forma que eles sejam colocados para dentro de casa no final da tarde, permanecendo por algumas horas da noite, que é o período de maior atividade do vetor. Os animais também devem ser periodicamente examinados por médicos veterinários e submetidos a exames laboratoriais, visto que os sinais clínicos das leishmanioses podem não ser característicos ou inaparentes (Nota Técnica Nº5/2012).

Todas as formas de prevenção devem ser tomadas tanto no ambiente, quanto no animal e no homem. Os cuidados com o meio ambiente visam diminuir a reprodução do flebotomíneo. Recomenda-se que a população limpe os quintais diariamente e não acumule entulhos, madeiras, folhas e dejetos. No Brasil, o controle do vetor *Lu. longipalpis* é uma das principais estratégias empregadas para limitar a propagação da leishmaniose visceral americana (Silva *et al* 2007).

Também é importante lembrar que governo e população devem ser parceiros para manter as cidades limpas e acondicionar lixo em locais apropriados. Em áreas não pavimentadas é recomendável arar a terra. Em casas são indicadas telas com tramas apertadas, nas janelas e portas. O comitê de especialistas reunido pelo Ministério da Saúde sugeriu a distinção entre as circunstâncias em que o uso de inseticidas está formalmente indicado daquelas situações em que medidas mais conservadoras devem ser tomadas. Recomendou-se que a aplicação de inseticidas só deva ser efetivada quando houver registro de casos humanos de leishmaniose na área (Costa 1990, MS 2011).

### 1.2.3 Vetores das Leishmanioses

Os flebótomos vetores das leishmanioses são insetos da ordem Diptera e família Psychodidae, pertencem a várias espécies e diferentes gêneros dependendo da sua localização geográfica. São pequenos, variam de 1,5 a 3mm, possuem olhos grandes e são de cor palha. Adotam postura de fácil reconhecimento quando pousados, com as asas entreabertas e ligeiramente levantadas. Também são conhecidos como mosquito palha, cangalha, cangalhinha, asa dura, orelha de veado, bererê, tatuíra, birigui, tatuquira entre outros (Rey 1992, Marzochi *et al.* 1999).

Somente as fêmeas são hematófagas. Pertencem ao tipo dos dípteros de atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e bem protegidos dos ventos. São encontrados mais facilmente em tocas de animais silvestres e buracos de pau, onde as condições de umidade e vegetação propiciam um microclima adequado (Deane & Deane 1957). Diferentemente do *Aedes aegypti*, vetor da dengue, os vetores das leishmanioses se reproduzem em material orgânico.

No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. umbratilis*, *Lu. wellcomei*, *Lu. flaviscutellata* e *Lu. migonei* (MS 2007).

A LV espalhou-se rapidamente através do Sul da América e América Central em menos de 500 anos, devido a ondas constantes de imigração europeia para o Novo Mundo e a presença de um vetor altamente permissivo, *Lu. longipalpis*. Quando os primeiros europeus chegaram acompanhados de seus cães, o inseto já tinha um grande potencial de distribuição em todo o continente. O eclético comportamento alimentar do *Lu. longipalpis* significava que estes vetores não tinham dificuldades em encontrar o cachorro recém introduzido como uma fonte fácil de alimento, tornando-se um novo vetor para o parasito (Brazil, 2013).

A espécie *Lu. longipalpis* é encontrada desde o sul do México (20°N) até a Argentina (27°S), com várias indicações de que este inseto pode englobar um complexo de espécies. *Lu. longipalpis* tem sido detectado em diversas condições ecológicas, o que pode refletir seu sucesso na dispersão e adaptação. A espécie pode não ter se originado a partir da Amazônia ou dos domínios morfoclimáticos da Mata Atlântica na América do Sul, mas a partir da vegetação aberta do cerrado brasileiro, que era mais úmido durante o Pleistoceno em comparação com a

vegetação dos dias de hoje. Neste caso, isso pode ser importante na compreensão da capacidade deste inseto para explorar novos ambientes, mesmo em áreas artificiais (Brazil, 2013).

#### **1.2.4 Cão como reservatório das Leishmanioses**

Todas as espécies de animais que garantam a circulação de leishmanias, em um tempo e espaço determinado, são consideradas espécies reservatórios do protozoário *Leishmania*, segundo o MS (2010).

Os mamíferos portadores da leishmaniose são geralmente animais silvestres como a preguiça, o tamanduá, roedores, raposas e outros, sendo que grande parte das lesões nestes não é aparente. No Brasil, os mais importantes reservatórios animais são o cão e a raposa. Infecções por leishmanias que causam a LTA foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos) (MS 2010). Já foram encontrados diversos animais domesticados incluindo cães, galinhas, suínos, bovinos, equinos, ovinos, caprinos e gatos, que podem servir como uma fonte de sangue para flebotomíneos fêmeas. Galinhas são animais considerados refratários à infecção por *Leishmania* (Bruce 2002).

A LV é a forma mais grave de leishmaniose que tem distribuição mundial. Nos dias de hoje, não restam dúvidas de que o parasita *Leishmania (Leishmania) infantum* foi introduzido no Novo Mundo no século XVI por infectar cães domésticos (*Canis familiaris*) que vieram como companheiros dos conquistadores de Portugal e da região do Mediterrâneo (Kuhls *et al.* 2011).

Em áreas urbanas, o cão doméstico é a principal fonte de infecção. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem. Já no ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (MS 2010).

Os cães são reconhecidamente elementos importantes na transmissão da LV, com uma forte associação positiva entre as áreas de maior foco de LV humana e locais com alta prevalência de animais soropositivos (Oliveira *et al.* 2001).

Almeida *et al.* (2009) avaliou a soroprevalência de leishmaniose em cães domiciliados na zona urbana de Cuiabá, por meio de ensaios de imunofluorescência indireta com títulos a partir de 1:40 e obteve a prevalência de 3,4%. Se utilizando

desta mesma técnica, Dias *et al.* (2008) apresentaram resultados significativamente mais elevados (36,84% e 16%) no município de São José de Ribamar/MA e Garanhuns/PE, respectivamente.

### 1.3 FATORES SÓCIO-AMBIENTAIS

A maioria das doenças é causada ou influenciada por fatores ambientais. Poluição, condições sanitárias, temperatura e qualidade da água estão entre os fatores que podem influenciar os estágios na cadeia de infecção. Também são determinantes fatores socioeconômicos, tais como, pobreza, densidade populacional e aglomeração (OPAS 2014).

A fauna e a flora, assim como os demais recursos ambientais, exercem uma função no ecossistema, e são indispensáveis para o seu equilíbrio. Isto quer dizer que cada um dos elementos do ecossistema tem uma missão a cumprir para mantê-lo estruturado e em harmonia. Nesse sentido, se todas as espécies são insubstituíveis nesse complexo, a ausência de qualquer uma delas altera toda a dinâmica do sistema.

A diversidade da vida é essencial ao equilíbrio ambiental, e um ambiente ecologicamente equilibrado propicia condições para que o meio ambiente permaneça saudável.

A DC e as leishmanioses são exemplos típicos de injúrias orgânicas resultante das alterações produzidas pelo ser humano ao meio ambiente e das discrepantes diferenças socioeconômicas. Os protozoários causadores destas enfermidades eram restritos aos ciclos silvestres circulando entre mamíferos e vetores no ambiente natural (Dias & Coura 1997).

A antropização e a destruição de fragmentos de matas, caatingas e qualquer outro refúgio natural dos triatomíneos e flebotomíneos influenciam diretamente no padrão de encontro destes vetores nos ambientes peridomiciliar, intradomiciliar e silvestre, indicando o risco de intercâmbio entre os ciclos.

A adaptação dos triatomíneos (domiciliação e colonização) as residências humanas mostrou-se eficiente para uma dezena de espécies e é considerada fator primordial da ocorrência e da expansão desta doença negligenciada.

A DC não possui distribuição geográfica uniforme no território nacional. Ela basicamente se apresenta em áreas rurais pobres onde ocorrem a transmissão

vetorial. O que demonstra que a doença é produto da pobreza e das condições por ela geradas, permitindo ao homem conviver com o triatomíneo infectado em moradias precárias e improvisadas pela falta de recursos (Schumñis 1997, Moncayo 1997, Dias & Coura 1997).

A LV está associada às profundas transformações ambientais que favorecem a adaptação e formação de novos criadouros de flebotomíneos, acentuadas por fatores socioeconômicos, que conduzem um expressivo contingente da população rural a migrar para as periferias urbanas, onde vivem em condições precárias de habitação sem infra-estrutura sanitária, além de baixos níveis nutricionais (oliveira 2004).

Outra condição importante e associada com os lugares de risco da transmissão de LV foram os bairros de periferia, desprovidos de rede de esgoto, com expressivo desmatamento, permitindo a observação de animais silvestres como gambás, raposas e tatus, circulando nas ruas e grandes áreas verdes com árvores frutíferas e deposição de matéria orgânica no solo, propiciando a procriação e a manutenção de flebotomíneos, favorecendo a adaptação destes vetores ao peridomicílio (Oliveira 2004).

Uma casa localizada até 25 metros de um córrego, pode favorecer a infecção humana e canina porque oferecem um habitat biologicamente ideal para flebotomíneos, proporcionando condições essenciais para desenvolvimento, tais como umidade, oxigênio e decomposição orgânica (Foratini 1973).

As ações sistematizadas de controle químico de populações domiciliadas do vetor da DC também contribuíram significativamente para a alteração do quadro epidemiológico da doença no país (MS 2006). Segundo estudos realizados durante o surto epidêmico em Teresina, regiões do interior do Piauí borrifadas intensivamente para o controle da DC e da malária, demonstraram ter colaborado no controle dos flebotomíneos, visto que a epidemia foi pouco importante e cedeu espontaneamente nestes municípios (Costa *et al.* 1990).

Além disso, a maior concentração da população em áreas urbanas, a melhor compreensão dos acontecimentos e o acúmulo de conhecimentos por parte da comunidade científica, confirmam a necessária revisão das estratégias e da metodologia de vigilância epidemiológica para as doenças negligenciadas no Brasil (OPAS 2014).

Grandes diferenças econômicas influenciam fortemente a distribuição social da parasitose, na medida em que ocorrem deficiências na qualidade de vida da população rural. No Brasil essa qualidade de vida está profundamente comprometida, principalmente quando avaliamos as condições de moradias (Figura 1.9), que estão diretamente ligadas ao fator de domiciliação dos triatomíneos (Coura e Borges-Pereira 2008, OMS 2013).



Figura 1.9 - Moradias precárias na área rural do município de SJPI, construídas com galhos, barro batido e telhas. (Foto: Taliha D. Perez)

Seguindo o modelo de crescimento das cidades pelas ações antrópicas, com grandes devastações provocadas por desmatamentos, expansão agropecuária, e o processo de urbanização, ocorrerá uma diminuição e/ou modificação dos ambientes naturais ainda existentes, seguirão concentrando reservatórios e vetores nos espaços naturais remanescentes.

Outras ações humanas como lavouras extensivas de monocultura, pastagens pisoteadas e revolvidas por maquinário pesado, o uso extensivo e intensivo de pesticidas atuarão diretamente na redução da proliferação dos vetores, porém as áreas periféricas e economicamente menos favorecidas por suas características físicas e sanitárias tendem a albergar colônias de algumas espécies de triatomíneos,



especialmente aquelas que habitam em ambientes naturais mais próximos às casas, como *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. dimidiata* (Coura 2003).

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

Estudos epidemiológicos e sociológicos têm desempenhado um papel importante na identificação de epidemias, determinando suas formas de disseminação, identificando os fatores de risco e seus determinantes, e avaliando possíveis intervenções visando a prevenção, o tratamento e o controle de doenças.

Doenças endêmicas como a leishmaniose e doença de Chagas estão entre os principais problemas de saúde em países tropicais de baixa renda. A cada alteração nas condições do hospedeiro, do agente ou do ambiente, uma doença endêmica poderá se tornar epidêmica.

As modificações que efetuamos ao meio ambiente podem aumentar a casuística de doenças como a Leishmaniose e doença de Chagas. A domiciliação de espécies vetores antes considerados de hábitos silvestres, ocorreram como consequência do desmatamento e da diminuição de suas fontes de alimentos originais, ocasionando assim a adaptação destes vetores às áreas de peridomicílio e o contato íntimo aos animais domésticos e seus proprietários.

Importante aspecto da ecologia das doenças transmitidas por vetores é a existência de uma ou mais populações de hospedeiros que sejam efetivamente responsáveis pela manutenção e dispersão da doença. Portanto, o conhecimento dos reservatórios é essencial para o efetivo controle da LV e TA (Monteiro 2005).

Tendo em vista as dificuldades de controle da doença, a metodologia proposta pelo MS (2006) para a vigilância e adoção de medidas, baseia-se em uma melhor definição das áreas de transmissão ou de risco. O novo enfoque é o de incorporar os estados e municípios silenciosos, ou seja, sem ocorrência de casos humanos ou caninos da doença, nas ações de vigilância da mesma, visando assim evitar ou minimizar os problemas referentes a este agravo em áreas sem transmissão. A identificação precoce dos pacientes que poderão evoluir com gravidade é de fundamental importância para reduzir a letalidade por meio da instituição de medidas profiláticas e terapêuticas oportunas.

Neiva & Penna em 1916, relataram o início da doença de Chagas no Estado do Piauí com indivíduos apresentando suspeita de megaloesôfago e cardiopatia, além da captura de *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, *Triatoma maculata* e *Panstrongylus megistus* infectados por *Trypanosoma cruzi*.

Em 1991, Gomes *et al.* estudou a prevalência sorológica humana da doença de Chagas no município de São Raimundo Nonato, município vizinho a São João do Piauí, nas localidades do sítio do Mocó e Borda apresentando taxas de 2,07 e 8,62% respectivamente.

Silveira *et al.* (2011) realizaram o primeiro estudo sobre a infecção chagásica com alcance nacional. Este inquérito abrangia dados entre os anos de 1975 e 1980, e apontou que o estado do Piauí, dentre outros, apresentava uma estimativa de prevalência de 4,04%, superando em muito o esperado. O estudo verificou grandes infestações, com colonização intradomiciliar, de *Triatoma brasiliensis*, favorecendo a transmissão domiciliar apesar do *T. infestans*, principal vetor da enfermidade no país, estar erradicado na área.

Estudos de soroprevalência da infecção chagásica no estado do Piauí demonstraram que 60,6% dos municípios pesquisados apresentavam registro de pessoas soropositivas para anticorpos anti *T. cruzi*. Especificamente na XI Regional de Saúde São João do Piauí, foram examinados 2.399 moradores e 216 (5,3%) resultados foram soropositivos pelo teste de imunofluorescência indireta. Quando comparado as outras regionais estudadas, este percentual se coloca bem acima da média apontada (Borges-Pereira *et al.* 2002).

A proposta do trabalho foi gerar dados para que se possa descrever a taxa de prevalência de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. em um grupo populacional de cães da cidade de São João do Piauí, assim como tentar estabelecer a posição do cão doméstico como um reservatório e potencial mantenedor da DC.

Evidenciar a infecção de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. nos cães domésticos pode ser um bom indicador de circulação e risco de infecção humana. A simples ocorrência de triatomíneos e reservatórios caninos infectados no domicílio humano levanta a hipótese de risco de transmissão do mal de Chagas e da leishmaniose.

Os cães infectados naturalmente no semiárido nordestino apresentam características relacionáveis a forma crônica indeterminada, ou seja, cães assintomáticos (Santana *et al.* 2012). A identificação dos cães infectados

naturalmente sem as características patognomônicas da doença de Chagas ressalta a importância desta enfermidade no processo diagnóstico.

Todos os dados serão publicados e repassados ao órgão de saúde responsável no sentido de ampliar o conhecimento sobre o risco da presença do *Trypanosoma cruzi* e da *Leishmania* spp. em cães domésticos como reservatórios para a população local. Este conhecimento auxiliará seus gestores no planejamento do controle e prevenção destas enfermidades no município de São João do Piauí.

Sem dúvida que o maior desafio nos dias de hoje é garantir a sustentabilidade dos programas de controle em um contexto epidemiológico com taxas mais baixas de infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* spp. e reformas no setor da saúde no contexto político-institucional. É de fundamental importância que as medidas usualmente empregadas no controle da doença sejam realizadas de forma integrada, para que possam ser efetivas.

Contextualizar o problema destas enfermidades no município de São João do Piauí trará melhor entendimento das questões epidemiológicas, das discussões entomológicas e político-administrativas a elas pertinentes.

- O estado do Piauí, apresenta elevada prevalência da DC e LV.
- O município de SJPI – prevalência 11,6% (Borges-Pereira, 2002).
- Nunca foi realizado inquérito soroepidemiológico humano ou canino para LV.
- Avaliar a existência de populações de hospedeiros responsáveis pela manutenção e dispersão da doença é fator primordial para controle das mesmas.
- MS preconiza vigilância – Tto, identificação de vetores e reservatórios, uma melhor definição das áreas de transmissão ou de risco - adoção de medidas preventivas e de controle.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar a prevalência da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. em cães domésticos, assim como sua participação e influência, como reservatório, no ciclo doméstico e peridoméstico da doença de Chagas e das leishmanioses na área rural do município de São João do Piauí, estado do Piauí, Brasil.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- 1) Avaliar a incursão dos cães da região no ambiente silvestre, peridoméstico e doméstico, que se refere ao contato com espécies vetoras.
- 2) Realizar inquérito soropidemiológico da infecção pelo *T. cruzi* e *Leishmania* spp. em amostras de cães e de seus proprietários por conglomerado familiar e avaliar a correlação entre a infecção animal e humana.
- 3) Classificar por espécie e estágio evolutivo, os triatomíneos e flebotomíneos capturados no domicílio e peridomicílio.
- 4) Avaliar os índices de infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* nos vetores capturados, assim como suas fontes alimentares.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Desenho do estudo**

O desenho de estudo utilizado foi um estudo seccional, por meio de um inquérito soroepidemiológico canino e humano na área rural do município de São João do Piauí. A amostragem utilizada foi de conveniência, por conglomerado, realizada utilizando dados fornecidos pela Secretaria Municipal de Saúde de São João do Piauí (SJPI) e informações anteriores da equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias do IOC.

Foi realizada uma primeira viagem de campo (triagem) com a duração de 25 dias para a realização de coleta de amostras humanas, caninas e de vetores. Uma segunda viagem foi realizada no intervalo de 6 meses, com a duração de 15 dias, para uma nova coleta de vetores e de amostras de sangue humano e canino das unidades habitacionais selecionadas.

Para a demarcação da área de amostragem foi traçado um raio de 90km a partir do centro da cidade. As primeiras unidades habitacionais (UH) foram selecionadas e foi considerado um intervalo de duas UH para cada nova unidade amostrada.

Segundo dados obtidos na última campanha de vacinação anti-rábica pela Secretaria Municipal de Saúde de SJPI, foi estimada a existência de 2.222 cães na região, estando sua maior porcentagem (70%) aglomerada na área urbana (centro) do município. A amostragem realizada foi por conglomerado familiar.

De acordo com o Programa e Controle da Doença de Chagas do município de São João do Piauí, o município é dividido em 2 regiões: região de baixo e região de cima, subdivididas em 35 e 42 localidades, respectivamente.

A região de estudo foi composta por 9 localidades: Tanque, Limoeiro, Tanquinho, Lagoa da Serra, São José, Espinheiro, Jacaré, Feitoria e Curtume, totalizando 241 unidades domiciliares. Não participaram do estudo localidades com menos de 10 unidades domiciliares (35 localidades), e localidades em que o acesso necessitava de transporte com tração em 4 rodas ou barco. Foram estudadas aproximadamente 30% das unidades habitacionais existentes.

Em colaboração com a Secretaria Municipal de Saúde de SJPI os Laboratórios de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos - IPEC e de Doenças Parasitárias - IOC realizaram a busca ativa de cães domiciliados para investigação epidemiológica e de diagnóstico sorológico e parasitológico por *T. cruzi* e *Leishmania spp.*

A equipe de campo contava com 2 médicos veterinários da Fiocruz, uma técnica de enfermagem e 3 agentes de endemias treinados no Programa de Prevenção da Doença de Chagas cedidos pela Prefeitura de SJPI.

Na abordagem de campo os responsáveis pelos cães foram esclarecidos sobre o estudo desenvolvido, informados sobre a doença, formas de transmissão e de prevenção. Após os esclarecimentos necessários foi assinado termo de consentimento (Anexo I e II). A anamnese, exame clínico e coleta de material canino foi registrada nos prontuários de acordo com o questionário (Anexo III) que foi previamente elaborado.

Os hábitos comportamentais dos cães no que se refere ao contato com espécies vetores e incursão nos ciclos silvestres, peri-domésticos e domésticos foi avaliado através de registros das Secretarias de Saúde e de questionários respondidos pela população humana (Anexo IV).

Seguindo o protocolo de diagnóstico laboratorial da infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* realizamos neste trabalho exames das 3 categorias: parasitológico, molecular e sorológico.

### **3.2 Área de estudo**

O estado do Piauí está localizado na região nordeste, possui 224 municípios que estão agrupados em 17 Regionais de Saúde ou Distritos Sanitários, possui 251.529 km<sup>2</sup> de extensão que são delimitados pelos estados do Maranhão, Tocantins, Bahia, Pernambuco e Ceará. Segundo o Censo do IBGE, em 2010, o estado do Piauí possui 3.140.213 habitantes e o município de São João do Piauí ocupa a 26<sup>a</sup> posição no ranking dos municípios mais populosos (Figura 3.1).

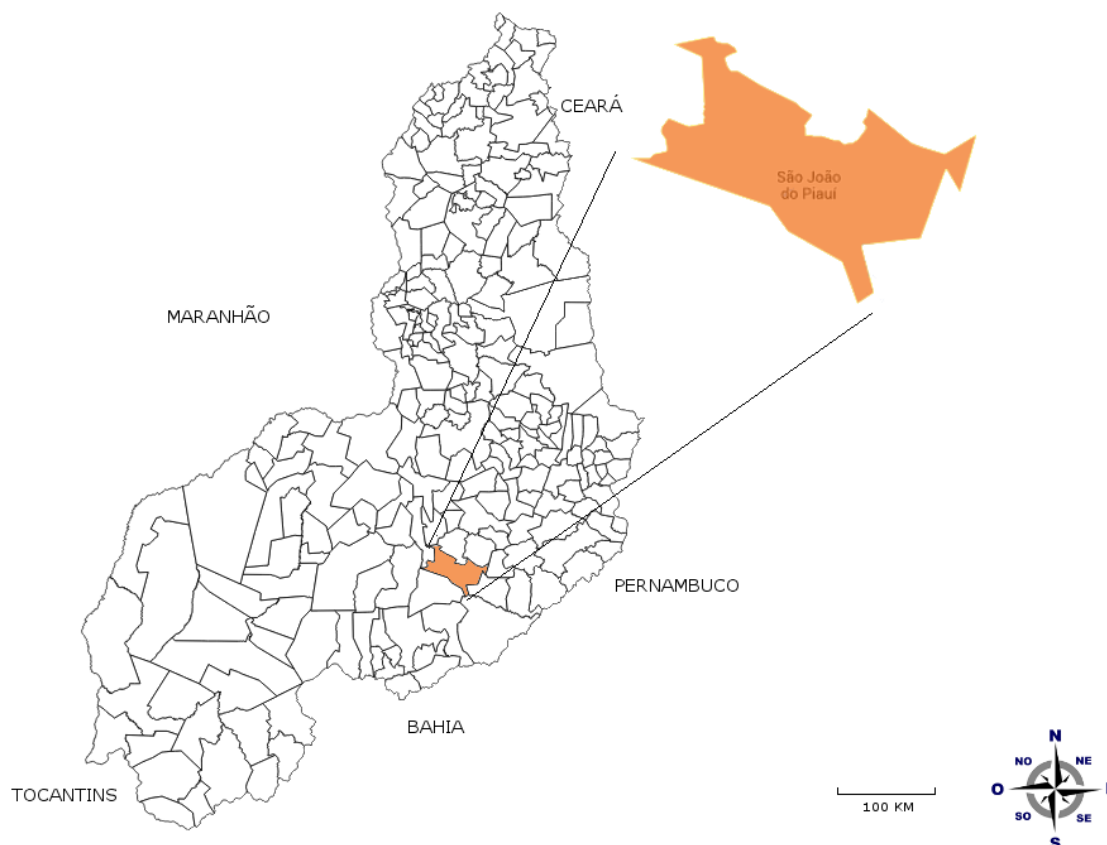


Figura 3.1 - Localização do município de São João do Piauí - Piauí.

São João do Piauí (SJPI) pertence ao grupo da XI Regional de Saúde do PI, está localizado na região sudeste do estado do Piauí, às margens do rio Piauí a aproximadamente 450 km da capital Teresina. Tem sua economia concentrada na agricultura familiar, na pecuária com ênfase na criação de caprinos e mais recentemente no comércio, sendo assim uma das cidades mais importantes do sul do estado. Localiza-se a uma latitude  $08^{\circ}21'29''$  sul e a uma longitude  $42^{\circ}14'48''$  oeste, estando a uma altitude de 222 metros (Prefeitura de SJPI 2014).

A cidade de SJPI teve sua origem em uma das fazendas de gado, doada por um dos primeiros desbravadores dos sertões do sul do estado, Domingos Afonso Mafrense, aos jesuítas sediados na Bahia, denominada Malhada do Jatobá, em 1711. O município possui uma área de 1.527,773 Km<sup>2</sup> e um total de 19.548 habitantes sendo 6.083 moradores da área rural, e uma proporção equilibrada entre homens e mulheres. A cidade tem como uma de suas principais atrações a Praça Honório Santos com mais de 34 mil metros quadrados de área, sendo a maior do estado do Piauí (IBGE 2010).

A Codevasf (Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba) implantou um projeto piloto de irrigação de uva no assentamento de Marrecas (primeiro assentamento do estado), na tentativa de impulsionar a agricultura local. A região passou a apresentar com os impactos da agricultura irrigada, a criação de empregos e o aumento da renda regional (Prefeitura SJPI 2014).

O clima do município é típico do sertão nordestino (quente e seco) com temperatura média anual entre 24°C e 26°C, com máxima de 42°C e mínima de 8°C. A umidade relativa do ar oscila de 60 a 86%. Composto por áreas de planícies de solos argiloso e arenoso e uma vegetação típica do semiárido Nordestino, a caatinga, constituída principalmente por pequenos arbustos espinhentos, plantas herbáceas e carnaubeiras. Possui 6 estabelecimentos de saúde e IDHM - Índice de Desenvolvimento Humano Municipal 0,645 (IBGE 2010).

As unidades habitacionais na zona rural, em sua maioria, são construídas com galhado de madeira, barro batido e cobertas com telhas. Uma pequena parte das residências da área rural possuem paredes rebocadas ou feitas com tijolos (Figura 3.2- A, B e C). Todas são construídas de maneira precária, com superlotação de moradores e mantendo uma indefinição de limites domiciliares e peridomiciliares com os animais domésticos e de criação (cães, gatos, caprinos, ovinos e galinhas). Todas possuem cercas limítrofes construídas com galhos secos da vegetação local (Figura 3.2- D).





Figura 3.2 - Tipos de construções de casas da região rural de SJPI: A- Casa construída com tijolos e telhas; B- Casa construída com tijolos, rebocada e com telhas (assentamento); C- Casa de pau a pique e D -Cerca de galhado da vegetação típica da região. (Fotos: Taliha D. Perez)

### 3.3 Coleta de espécimes clínicos para diagnóstico canino

Para a coleta de espécimes clínicos, os animais foram contidos por seus proprietários e orientados a colocar uma focinheira. Após a avaliação clínica, realizou-se a sedação do animal com cloridrato de quetamina (10 mg/kg) associado ao maleato de acepromazina (0,2 mg/kg) por via intramuscular. Em seguida, foi retirada a contenção. Posteriormente o animal foi colocado sobre uma mesa de aço inoxidável para a coleta de espécimes clínicos (Figura 3.3), submetidos ao exame clínico, no qual foi inspecionada a presença de lesões cutâneas e mucosas assim como o estado geral do animal.



Figura 3.3 - Equipe de veterinários paramentados próximo a mesa de procedimento utilizada em campo para a coleta dos espécimes caninos. (Foto: Taliha D. Perez)

- Fatores de exclusão:
  - ✓ Animais menores de 1 ano e maiores de 8 anos;
  - ✓ Cães em estado geral ruim, sem condições de serem submetidos à sedação;

- ✓ Cadelas prenhes;
- ✓ Cães agressivos;
- ✓ Cães errantes.

### **3.3.1 Amostra de sangue venoso**

Foram coletados por punção da veia cefálica (Figura 3.4) 5 mL de sangue, sem anticoagulante para a realização dos testes sorológicos IFI, ELISA e DPP®. As amostras foram transportadas sob refrigeração e, posteriormente após formação do coágulo, o soro foi separado por centrifugação 5000 rotações por minuto (rpm) e conservado a - 20°C até o momento da realização dos testes sorológicos. Estas amostras foram enviadas ao Laboratório de Pesquisa e Serviço em Saúde Pública (ENSP/FIOCRUZ).



Figura 3.4 - Coleta de sangue venoso do cão. (Foto: Taliha D. Perez)

Para a cultura parasitológica, amostras de sangue sem anticoagulante foram imediatamente semeadas em 2 tubos com meio bifásico NNN (Novy, MacNeal e Nicolle) /Schneider's Insect Medium (SIGMA) contendo 10% de soro fetal bovino. O cultivo foi incubado a 28°C durante um mês e a partir do 5º dia, exames a fresco

foram realizados, para verificar a presença de formas promastigotas de *Leishmania* e *T.cruzi* (Chang 1985).

### **3.3.2 Amostra de biopsia de pele**

No procedimento de biopsia de fragmento de pele íntegra, realizou-se tricotomia com lâmina de aço inoxidável descartável, antissepsia e anestesia local com cloridrato de lidocaína a 2%, sem vasoconstrictor (Figura 3.5). Foram coletados quatro fragmentos de pele íntegra da região escapular de cada animal, utilizando “punch” de 3mm para exames parasitológicos direto e indireto. Dois fragmentos foram armazenados em salina estéril acrescida de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e antifúngico (fluorocitocina), na tentativa do isolamento em cultura, e dois foram armazenados em formalina tamponada a 10%, para a realização dos exames histopatológico e imuno-histoquímico.



Figura 3.5 – Procedimento de biópsia de pele íntegra em cão: A – Realização do botão anestésico em pele tricotomizada, B – Utilização com “Punch” para biópsia de pele, C – Local da biópsia após utilização do “Punch”. (Foto: Taliha D. Perez)

Para a cultura parasitológica as amostras foram semeadas, após 24 horas em solução salina estéril sob refrigeração, em meio bifásico NNN (Novy, MacNeal e Nicolle) /Schneider's Insect Medium (SIGMA) contendo 10% de soro fetal bovino. O cultivo foi incubado a 28°C durante um mês e a partir do 5º dia exames a fresco foram realizados, para verificar a presença de formas promastigotas de *Leishmania* (Chang 1985). Os parasitos isolados foram caracterizados pela eletroforese de enzimas (isoenzimas) empregando sistemas enzimáticos utilizando como padrões amostras de referências (Cupolillo 1994).

### **3.3.3 Amostra de punção aspirativa de medula óssea**

Para a coleta de medula óssea foi realizada tricotomia, antissepsia com álcool iodado seguido de álcool a 70%, na região do manúbrio, ponta do osso esterno e anestesia local com cloridrato de lidocaína 2%, sem vasoconstrictor. Em seguida, foi introduzido uma agulha 40x12mm acoplada a uma seringa de 20 mL para a punção aspirativa do manúbrio do esterno (Figura 3.6).

O sangue obtido foi semeado diretamente em meios de cultura NNN e Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino, para tentativa do isolamento da *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi*. Parte desse material (0,5 mL) foi acondicionado em tubo estéril com EDTA, acrescido do fixador "cell block" para a realização da imuno-histoquímica, na tentativa da visualização de formas amastigotas.



Figura 3.6 – Procedimento de coleta de amostra de medula óssea de cão por punção aspirativa: A – Inserção da agulha na cartilagem do osso esterno para coleta da medula; B – Punção aspirativa; C – Coleta da medula. (Foto: Taliha D. Perez)

### 3.3.4 Xenodiagnóstico

Para o xenodiagnóstico foram utilizadas 20 ninfas de triatomíneos de 4º estágio, sendo 10 da espécie *Panstrongylus megistus* e 10 da espécie *Triatoma infestans*. Estas ninfas foram colocadas em caixas de madeira, com sanfonas de papel filtro recortadas, cobertas por filó e presas com elásticos. Cada caixa foi identificada com a espécie de triatomíneo, número de registro do cão, nome e data.

Duas caixas (uma de cada espécie) foram colocadas no abdômen dos animais para um repasto de 30 minutos (Figura 3.7). Após a alimentação sanguínea foram selecionadas as ninfas que se alimentaram (que apresentavam abdômen distendido) e colocadas em um novo recipiente. Estas ninfas receberam uma alimentação suplementar de sangue em galinhas (*Gallus gallus*) após decorrido 15 dias do exame para a manutenção do *T. cruzi* no barbeiro.



Figura 3.7 – Procedimento de xenodiagnóstico em cão para detecção de infecção por *T. cruzi*: A e B - Caixas com triatomíneos colocadas no abdome dos cães por trinta minutos. (Foto: Taliha D. Perez)

## 3.4 Exames laboratoriais para o diagnóstico e identificação de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. nos cães

### 3.4.1 Provas sorológicas

Foram empregados os testes de IFI, ELISA e DPP® para diagnóstico da LVC, utilizando os kits comerciais, ambos produzidos por BioManguinhos (FIOCRUZ; Rio de Janeiro) e distribuídos à rede pública. Os dois primeiros testes foram realizados no setor Imunodiagnóstico do Departamento de Ciências Biológicas



(DCB/ENSP/FIOCRUZ) e o DPP® realizado no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO) (IPEC/FIOCRUZ).

Para diagnóstico sorológico da TA foram utilizados ELISA e IFI. Para o ensaio imunoenzimático foi adotado o kit Chagatest ELISA recombinante v 3.0 da empresa Wiener lab modificado mediante a substituição do conjugado enzimático anti-IgG humana pelo conjugado enzimático anti-IgG canina (Sigma-Aldrich), com titulação aferida em 1:200.000. Para o ensaio imunofluorescente, seguiu-se o protocolo “in house” de IFI padronizado pelo setor de Imunodiagnóstico do Laboratório de Pesquisa e Serviço em Saúde Pública - DCB/ENSP/FIOCRUZ (Camargo & Rebonato 1969).

#### **3.4.1.1 Reação de imunofluorescência indireta (IFI) para LVC e TA**

As lâminas foram preparadas depositando-se 10µL de uma suspensão antigênica de *L. (L.) chagasi* na proporção de  $2 \times 10^6$  promastigotas/mL para o diagnóstico de LVC. Já para o diagnóstico de TA, uma suspensão antigênica de epimastigotas de *T. cruzi* de mesma concentração e volume, foi depositada sobre as áreas demarcadas das lâminas. Procedeu-se a secagem do material à temperatura ambiente.

Os soros foram diluídos em 1:40 e 1:80 em PBS e, em seguida, 10µL foram transferidos para as correspondentes marcações das lâminas. Estas, foram incubadas à 37°C por 45 minutos em câmara úmida.

Para a remoção do material não ligado ao antígeno, foram feitas 3 lavagens de 5 minutos com PBS. Após a secagem das lâminas, as mesmas foram recobertas com conjugado fluorescente anti-IgG canina (Sigma-Aldrich), diluído à 1:400 em PBS contendo 1mg% de Azul de Evans, seguido de nova incubação e lavagem como descrito anteriormente.

As lâminas foram montadas com glicerina tamponada e lamínulas e observadas em microscópio de fluorescência (ZEISS, AXIO Scope. A1) com aumento de 400 x.

#### **3.4.1.2 Ensaios imunoenzimático (ELISA) para LVC**

Foi utilizado kit fornecido por BioManguinhos (FIOCRUZ; Rio de Janeiro). Amostras séricas e controles foram diluídos a 1:100 e transferidos (100µL) para cada

poço correspondente da placa previamente sensibilizada com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major* “like”. A placa foi incubada a 37°C por 30 min. O conteúdo da placa foi removido, seguido de lavagem da mesma por seis vezes com o tampão de lavagem (200µL por orifício). A etapa seguinte foi a adição de 100µL do conjugado enzimático em cada orifício da placa e incubação como anteriormente descrito. Ao final da incubação, a placa foi novamente lavada por seis vezes com o tampão de lavagem (200µL por orifício). À placa, foi adicionada a solução reveladora (100µL por orifício), composta por diluente do substrato, tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A reação colorimétrica se desenvolveu durante 30 min até ser bloqueada com 50µL de ácido sulfúrico 2M colocado em todos os orifícios da placa. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para placas de ELISA (Testline), equipado com filtro operacional de 450nm e filtro diferencial de 620nm. A linha de corte foi estabelecida calculando-se a média das densidades óticas (D.O) dos controles negativos e multiplicando-se por 2. As amostras que apresentaram DO igual ou superior à linha de corte foram consideradas reagentes.

#### **3.4.1.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para TA**

As amostras e controles foram diluídos a 1:20, em duplicatas e transferidos (200µL) para os respectivos poços das placas previamente sensibilizadas. Estas, foram incubadas à 37°/30 min. Após incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem fornecida pelo fabricante. Ao finalizar a última lavagem, foi eliminado por completo todo o líquido residual, invertendo a placa sobre papel absorvente e golpeando-a várias vezes. Adicionou-se 100µL do conjugado enzimático Anti-IgG canina (Sigma-Aldrich - lote 088K4837) nos poços da microplaca, seguido por incubação e lavagem como anteriormente mencionado. Foi então, colocada a solução reveladora do kit, incubada por 30 min. em temperatura ambiente e, logo em seguida, adicionado uma gota da solução “stopper”. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro (Testline) com filtro operacional de 450nm e filtro diferencial de 620nm. A linha de corte foi estabelecida pela leitura da média dos controles negativos somados a um valor arbitrário de 0,300 D.O.

#### **3.4.1.4 Teste imunocromatográfico rápido em plataforma de duplo percurso (Dual Path Platform - DPP®)**

O teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma (*Dual Path Platform - DPP®*) possui tecnologia já utilizada em testes de diagnóstico rápido para outras doenças, é produzido por Biomanguinhos (FIOCRUZ) para o diagnóstico da LVC. O *kit* contém um dispositivo impregnado com antígeno recombinante rK28 (quimera combinando K9, K26 e K39) de *L. (L.) chagasi* e permite a utilização de amostras de sangue ou de soro, fornecendo uma avaliação qualitativa do diagnóstico. O resultado foi obtido em 15 minutos, onde utilizou-se 5µl de soro de cada animal e a solução tampão, presente no “kit”, seguindo as recomendações do fabricante.

#### **3.4.2 Histopatologia**

Os fragmentos teciduais (pele) foram acondicionados em tubos do tipo “Ependorff”, contendo formalina tamponada a 10%. Os fragmentos foram desidratados e parafinados e os cortes histológicos obtidos corados com hematoxilina eosina (HE) para posterior observação em microscópio óptico. O diagnóstico definitivo dependia da visualização do parasito. As formas amastigotas possuem forma ovalada ou arredondada, contendo um núcleo e um cinetoplasto, sendo visualizadas no interior de células fagocitadas ou livres. Na histopatologia (HP), o núcleo e o cinetoplasto se coram de azul escuro e o citoplasma é fracamente eosinofílico (Genaro, 1990). Para correta visualização é imprescindível o exame em grande aumento (1000 X).

#### **3.4.3 Imuno-histoquímica**

Os cortes histológicos obtidos a partir da clivagem dos blocos de parafina, foram fixados na lâmina silanizada. Os processos foram realizados, seguindo o protocolo de Quintela *et al.* (2009). A positividade foi considerada pela observação de pelo menos uma estrutura marcada em castanho e morfológicamente compatível com uma amastigota.

#### **3.4.4 Imuno-histoquímica de aspirado de medula óssea com fixador “cell block”**

O material obtido através de punção aspirativa de medula óssea foi armazenado em tubo estéril com EDTA, centrifugado 5000 rpm, durante 10 min e o sobrenadante foi descartado, sendo em seguida fixado com a solução “cell block” (850 mL de álcool absoluto, 100 mL de formaldeído e 50 mL de ácido acético). A mistura foi deixada em repouso durante 24 h para a fixação e a formação do bloco de células. O bloco de células foi então cortado e processado para inclusão em parafina. Os fragmentos foram fixados em lâminas silanizadas e posteriormente foram realizados processos similares aos da imuno-histoquímica em fragmentos de pele.

#### **3.4.5 Isolamento parasitário em meio de cultura**

Os fragmentos teciduais (pele e lesões cutâneas), logo após a biópsia, foram mergulhados em solução PBS, pH 7,4 acrescidos de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e antifúngico (fluorocitocina) e conservados à temperatura de 4°C por 24 horas. Após esse período, as amostras foram semeadas em meio bifásico NNN contendo como fase líquida o meio Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino. Cerca de 0,2mL de MO, obtida por punção, foi semeada diretamente no meio de cultura. As culturas foram conservadas em estufa biológica a 26-28°C e examinadas semanalmente durante 30 dias por exames a fresco, buscando evidenciar formas flageladas. Nos casos onde ocorreu o isolamento parasitário, as amostras foram expandidas para produção de massa parasitária para posterior caracterização molecular segundo Pinto *et al.* (2014).

#### **3.4.6 Xenodiagnóstico**

Para a realização do xenodiagnóstico foi seguido o Manual de Capacitação na Detecção de *Trypanosoma cruzi* (Junqueira *et al.* 2011) elaborado e validado pelo Laboratório de Doenças Parasitárias – IOC, e disponibilizado pelo Ministério da Saúde para a rede pública de saúde. Os resultados positivos ao microscópio óptico foram submetidos a análise molecular pela PCR segundo Junqueira *et al.* (1996) para confirmação.

### 3.5 Procedimento ético

Os procedimentos realizados nos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- FIOCRUZ), sob a licença Nº LW-43/10.

### 3.6 Coleta de espécimes clínicos para o diagnóstico Humano

#### 3.6.1 Amostras de sangue venoso

Os proprietários dos cães e todos os seus familiares residentes da unidade habitacional selecionada tiveram amostras de sangue venoso (5mL) coletados por uma técnica de enfermagem (Figura 3.8) em tubos para a sorologia.



Figura 3.8 - Técnica de enfermagem realizando a coleta de sangue dos residentes. (Foto: Taliha D. Perez)

- Fatores de exclusão:
  - ✓ Menores de 1 ano de idade;
  - ✓ Pessoas que se recusaram a participar.

### **3.6.2 Xenodiagnóstico**

O exame de xenodiagnóstico foi realizado nos participantes que tiveram resultados reagentes nos dois ensaios sorológicos (IFI e ELISA) realizados.

Para o xenodiagnóstico foram utilizadas 40 ninfas de triatomíneos de 4º estágios, sendo 20 da espécie *Panstrongylus megistus* e 20 da espécie *Triatoma infestans*. Estas ninfas foram colocadas em caixas de madeiras, com sanfonas de papel filtro recortadas, cobertas por filó e presas com elásticos. Cada caixa foi identificada com a espécie de triatomíneo, nome e data.

Quatro caixas (duas de cada espécie) foram colocadas diretamente sobre a pele nos dois antebraços dos pacientes para um repasto de 30 minutos (Figura 3.9). Após a alimentação sanguínea foram selecionadas as ninfas que se alimentaram (que apresentavam abdômen distendido) e colocadas em um novo recipiente. Estas ninfas receberam uma alimentação suplementar de sangue em galinhas (*Gallus gallus*) após decorrido 15 dias do exame para a manutenção do *T. cruzi* no barbeiro.

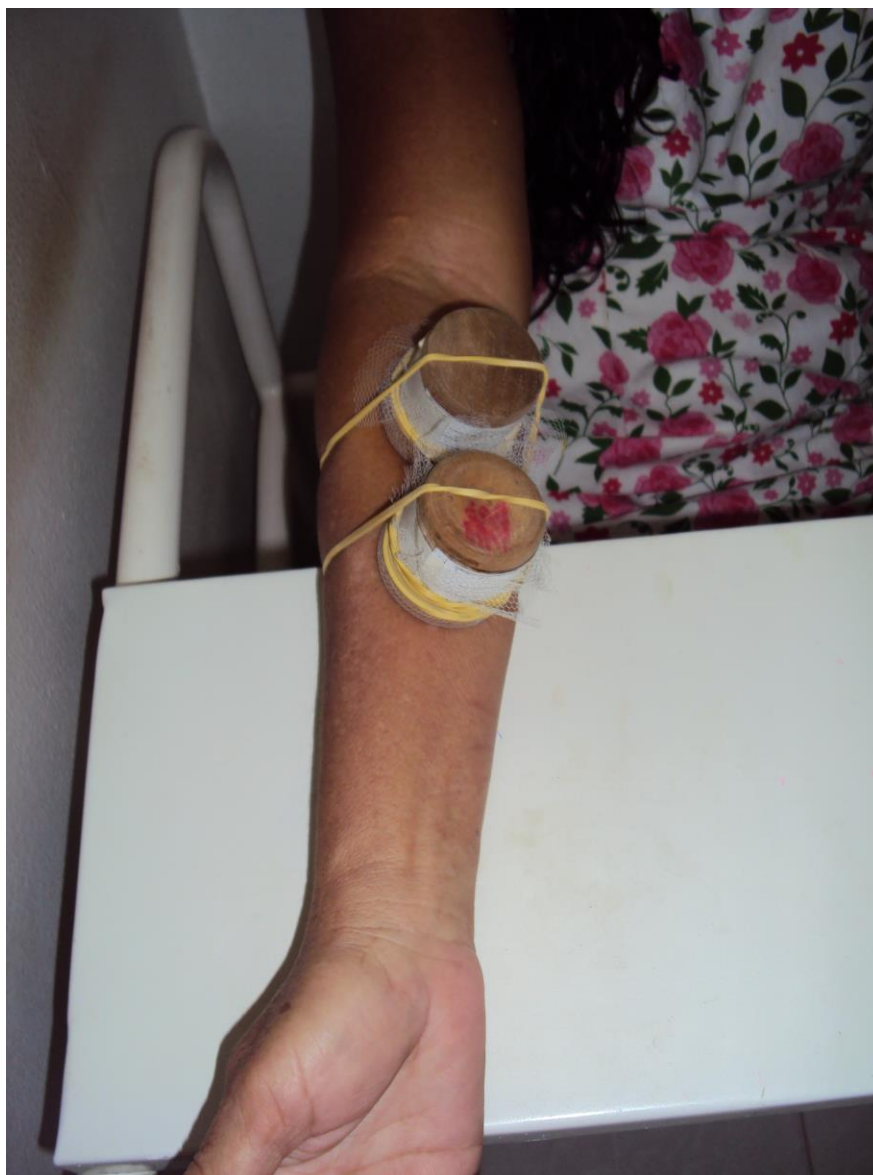


Figura 3.9 - Xenodiagnóstico: caixas com triatomíneos colocadas no antebraço do paciente. (Foto: Taliha D. Perez)

### **3.7 Exames laboratoriais para o diagnóstico e identificação da infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* spp. em humanos**

#### **3.7.1 Provas sorológicas**

Para o diagnóstico de leishmaniose os ensaios de IFI foram realizados no Laboratório de Parasitologia do IPEC com kit produzido por BioManguinhos (FIOCRUZ) e para o ELISA protocolo “in house” padronizado pelo laboratório de Imunodiagnóstico (DCB/ENSP/FIOCRUZ) (Hommel *et al.* 1978).

Para diagnóstico da doença de Chagas humana foi utilizado o kit comercial Chagatest ELISA recombinante v 3.0 da empresa Wiener lab. e protocolo “in house” para IFI realizado e padronizado pelo Laboratório de Doenças Parasitárias (IOC/FIOCRUZ).

### **3.7.1.1 Reação de imunofluorescência indireta (IFI) para leishmaniose humana**

Para a IFI, foi utilizado o kit IFI Leishmaniose Humana Bio-Manguinhos (IFI-LVH), lote 13ULH0042, com amostras diluídas em microplacas nas diluições de 1:40 e 1:80, seguindo as instruções do fabricante.

### **3.7.1.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para leishmaniose humana**

Amostras séricas humanas e controles foram diluídos a 1:20 em PBS-T com leite 1% e transferidos (100µL) para cada poço correspondente da placa previamente sensibilizada com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania chagasi*. A placa foi incubada a 37°C por 45 min. O conteúdo da placa foi removido, seguido de lavagem da mesma por 5 vezes com o tampão de lavagem PBS-T (200µL por orifício). Em seguida foi adicionado de 100µL do conjugado enzimático anti-IgG humana (Sigma-Aldrich), previamente titulado em 1:2000, em cada orifício da placa, que foi incubada como descrito anteriormente. Após a incubação, a placa foi lavada por 5 vezes com o tampão de lavagem (200µL por orifício). A etapa de revelação foi feita distribuindo-se 100µL de TMB pronto para uso (Sigma-Aldrich) em todos os orifícios da placa. A reação colorimétrica se desenvolveu durante 20 min. O bloqueio foi feito adicionando-se 50µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios da placa. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para placas de ELISA “Testline”, equipado com filtro operacional de 450nm e filtro diferencial de 620nm. A linha de corte entre amostras consideradas positivas (reatoras) e negativas (não reatoras) foi calculada tendo-se como base a média de leitura em densidade ótica dos soros negativos mais dois desvios padrão.



### **3.7.1.3 Reação de imunofluorescência indireta (IFI) para doença de Chagas**

Para a IFI, foi utilizado o mesmo procedimento já descrito para o diagnóstico de TA em cães, com amostras diluídas em microplacas nas diluições de 1:40 e 1:80, utilizando conjugado enzimático Anti-IgG humano.

### **3.7.1.4 Ensaios imunoenzimático (ELISA) para doença de Chagas**

Para diagnóstico da doença de Chagas humana foi utilizado o kit comercial Chagatest ELISA recombinante v 3.0 da empresa Wiener lab seguindo as instruções do fabricante.

### **3.7.2 Xenodiagnóstico**

Para a realização do xenodiagnóstico foi seguido o Manual de Capacitação na Detecção de *Trypanosoma cruzi* (Junqueira *et al.* 2011) elaborado e validado pelo Laboratório de Doenças Parasitárias – IOC e distribuído as redes públicas pelo Ministério da Saúde.

### **3.7.3 Isolamento parasitário em meio de cultura**

Ao material de macerado do trato digestivo dos triatomíneos, foram adicionados de 10µl de solução PBS, pH 7,4. Em seguida, as amostras foram semeadas em meio bifásico NNN contendo como fase líquida o meio Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino. As culturas foram conservadas em estufa biológica a 26-28°C e examinadas semanalmente durante 30 dias por exames a fresco, buscando evidenciar formas flageladas. Nos casos onde ocorreu o isolamento parasitário, as amostras foram expandidas para produção de massa parasitária para posterior caracterização molecular segundo Junqueira *et al* (1996).

## **3.8 Coleta de Espécimes vetores**

### **3.8.1 Captura de triatomíneos**

Três agentes de endemias treinados e experientes realizaram a busca ativa de triatomíneos no domicílio (Figura 3.10) e no peridomicílio (Figura 3.11) das residências participantes da pesquisa. O ambiente de coleta classificado como

domiciliar abrangeu todo o intradomicílio, e o ambiente peridomiciliar as áreas localizadas ao redor da residência, incluindo todos os anexos.



Figura 3.10 – Busca ativa de triatomíneos no domicílio: A – parede do quarto coberta de fezes de triatomíneos. B – Busca sob o colchão. C – Triatomíneo encontrado ingurgitado sob a cama do morador. (Foto: Taliha D. Perez)



Figura 3.11 – Busca ativa no peridomicílio: A - sob tijolos e outros materiais; B – Amontoado de materiais; C – Galinha no quintal da casa servindo de alimento para os barbeiros. (Foto: Taliha D. Perez)

As capturas foram realizadas manualmente por exaustão, com auxílio de pinças. No ambiente domiciliar a captura foi realizada em todos os cômodos, vistoriando toda a superfície interna das paredes, pisos, móveis e outros objetos que pudessem abrigar os insetos. No peridomicílio foram vistoriados cada um dos anexos (currais, chiqueiros, galinheiros), paredes externas, locais com entulhos de materiais como telhas, madeiras e em desuso, cercas construídas de troncos e galhos e cochos animais.

- Fatores de exclusão:
  - ✓ Unidades habitacionais vazias;
  - ✓ Unidades habitacionais que não possuíam cães.

Os espécimes capturados foram acondicionados e transportados em frascos de plásticos, tampa de rosca com pequenos orifícios contendo em seu interior papel filtro cortado e dobrado em sanfona para aumentar a superfície de contato (Figura 3.12- A). Cada frasco continha um rótulo de identificação com o número de registro da residência, data e local da coleta (domicílio ou peridomicílio) (Figura 3.12- B). Todos os procedimentos de captura e armazenamento seguiram o módulo III, capítulo 10 do Manual de Capacitação na Detecção de *Trypanosoma cruzi* (Junqueira *et al.* 2011).

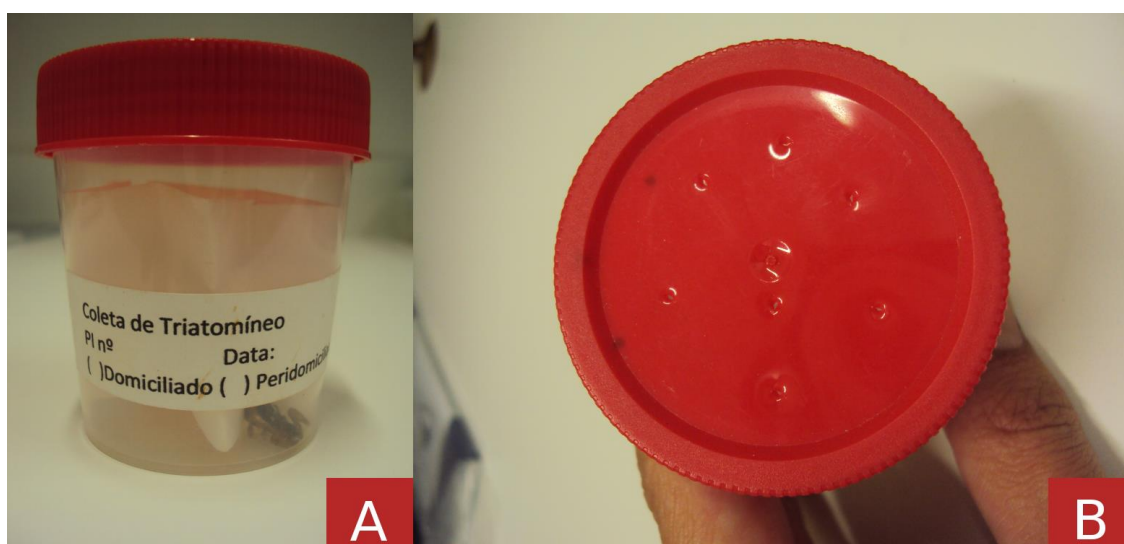


Figura 3.12 - A e B- Frasco de coleta e transporte dos triatomíneos capturados com rótulo de identificação, tampa perfurada e papel filtro dobrado em sanfona. (Foto: Taliha D. Perez)

### 3.8.2 Captura de flebotomíneos

A coleta dos flebotomíneos foi realizada no período de junho/2014 a julho/2014 com armadilhas luminosas do tipo HP alimentadas com baterias de 6 Volts cada, em cada uma das 9 localidades, das 17:00 horas às 6:00 horas, totalizando 3 armadilhas HP em cada localidade com 27 horas de captura. Essa armadilha é uma variação da armadilha luminosa CDC “Center of Disease Control” que foi desenvolvida por Sudia & Chamberlain (1967) (Figura 3.13).

Cada armadilha foi posicionada 1½ metro do nível do chão, sendo instaladas nos três diferentes ecótopos (doméstico, peridoméstico e silvestre).



Figura 3.13 - Armadilha tipo HP. (Foto: Taliha D. Perez)

Durante todas as coletas, no momento de instalação e retirada das armadilhas, foram anotados dados específicos, como: hora, temperatura, umidade relativa do ar e observações do local e do clima. Para a medição de temperatura e umidade foi utilizado um termo-higrômetro modelo Hygro-Thermometer Clock

(iNSTRUTHERM -210). Também foram utilizadas armadilhas do tipo “Shannon” também conhecida como barraca de “Shannon”, constituída por uma tenda de tecido branco com 1,3 m x 3,0 m x 2,0 m e duas abas laterais de 0,6 m x 3,0 m x 1,0 m (larg. x comp. x alt.). A estrutura foi montada de maneira a ficar cerca de 20 a 30 cm distante do solo e utilizou-se uma fonte luminosa (lâmpada a pilha) como atrativo. Os insetos foram atraídos pela fonte luminosa e ficaram presos no local pousando sobre o tecido, neste momento foram realizadas coletas manuais com tubo de sucção tipo Castro (Figura 3.14).

Os flebotomíneos capturados nos dois tipos de armadilhas descritas acima foram separados e identificados por localidade e diferentes ecótopos em eppendorfs contendo álcool 70°C até o momento da análise em laboratório.



Figura 3.14 - Armadilhas tipo Shannon: A - armadilha tipo shannon montada em campo; B – Busca ativa e captura de flebotomíneos com tubo de sucção tipo Castro. (Foto: Taliha D. Perez)

### 3.9 Exames laboratoriais das espécies vetores

#### 3.9.1 Avaliação da infecção natural em triatomíneos

Em laboratório, os vetores foram identificados quanto à espécie, fase de desenvolvimento e sexo; contados e separados entre vivos e mortos.

Foi realizado exame a fresco por meio de retirada das fezes do triatomíneo por meio da compressão abdominal, seguida do processo de retirada e maceração do trato digestivo. O material foi depositado em lâminas diluídas em solução tampão

fosfato (PBS pH 7.2), cobertas com lamínula e examinadas ao microscópio óptico em aumento de 400x. A análise para visualização do parasito seguindo o protocolo do Laboratório de Doenças Parasitárias do IOC, baseado no Manual de Capacitação na Detecção de *Trypanosoma cruzi* (Junqueira *et al.* 2011), Módulo II, Capítulo 7, subitem 7.2- Exame do tubo digestivo de triatomíneos.

### **3.9.2 Identificação da fonte alimentar dos triatomíneos**

Uma alíquota de 50 µL do macerado do trato digestivo dos triatomíneos diluído em PBS (pH 7,2 a 0,01 M) foi armazenado em mini tubos e congelados a -20°C para a Identificação da fonte alimentar por ensaio imunoenzimático (ELISA) no Laboratório de Imunodiagnóstico – Departamento de Ciências Biológicas – ENSP/FIOCRUZ. O teste de ELISA foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Burkot *et al.* (1981) e modificado por Duarte & Marzochi (1997).

Embora o material no intestino grosso tenha sido degradado, ainda contém imunoglobulinas. Uma vez que a imunoglobulina é espécie-específica, a presença destas moléculas assegura um resultado confiável na identificação do sangue colhido a partir de uma fonte residual (Gill, 1984). Assim, optamos por utilizar ELISA, porque é um método sensível e específico que requer apenas pequenas quantidades de amostra.

#### **1. Obtenção dos Antígenos:**

As proteínas utilizadas como antígenos foram obtidas a partir da coleta de sangue de animais que atuam como possíveis hospedeiros: cão, humano, ave, cabra, ovelha, cavalo, gato e roedores. Após a coleta, a amostra de sangue foi colocada à temperatura ambiente para retração do coágulo. Centrifugada a 3000 g durante 10 minutos, para separação do soro. A estocagem do soro foi feita a -20 °C até o momento do uso.

#### **2. Produção dos antissoros:**

Foi inoculado em coelhos da linhagem Nova Zelândia com peso superior a 2 kg, os antígenos do soro das espécies animais acima citados.

Foi misturado 500 µL do soro com 500µL de adjuvante de Freund completo na primeira inoculação e, incompleto nas inoculações subsequentes.



Os inóculos foram realizados a cada 10 dias, por via intramuscular pelo período de, aproximadamente, 4 semanas.

### **3. Sangria e avaliação dos soros:**

Após 30 dias do término do esquema de imunização, foi realizada a sangria do coelho através de punção da veia marginal da orelha para verificação dos títulos dos anti-soros pelo método de precipitação. Com os títulos obtidos sendo satisfatório, realizamos o dessangramento com eutanásia seguindo os protocolos aprovados pela Comitê de ética no uso de animais (CEUA – FIOCRUZ).

## **ANÁLISE**

### **A- Sensibilização das placas**

Placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas com 50  $\mu$ L de amostra diluída a 1:20 em tampão carbonato bicarbonato. Após a colocação das amostras, as placas permanecem em câmara úmida por 2 horas em estufa a 37° C.

### **B- Colocação do anti-soros**

Após o período de sensibilização, a placa foi lavada em lavadora de microplacas com PBS acrescido de Tween 20 a 0,05%.

Soro de coelho imunizado com diferentes antígenos dos soros animais (antissoro) pesquisados como fonte alimentar, foram diluídos a 1:2.000 em PBS/Tween 20 acrescidos de leite em pó desnatado na proporção a 1% (Tampão de diluição).

Foi colocado 100 $\mu$ L de anti-soro diluído em contato com a amostra diluída. Seguiu-se um período de incubação de 30 minutos a 37° C em câmara úmida.

Após a incubação, foi realizada nova lavagem da placa nas mesmas condições descritas anteriormente.

### **C- Colocação do conjugado**

Foi efetuada uma solução contendo conjugado (IgG de cabra anti-Ig total de coelho conjugada a peroxidase- Sigma Aldrich Brasil Ltda – lote 022M4811) diluído em tampão de diluição a 1:20.000. Foi colocado 100  $\mu$ L desta solução em cada poço da placa.

Novo período de incubação foi realizado como descrito na etapa anterior

#### **D- Revelação do Teste**

Após o período de incubação com o conjugado, seguiu-se nova lavagem como já descrita e iniciou-se a etapa de revelação dos resultados.

Em cada poço da placa foram colocados 100  $\mu$ L de tampão de revelação que consiste em uma solução contendo 25 mL de tampão citrato-fosfato, 10 $\mu$ L de água oxigenada 30 vol. e 10 mg de OPD (ortophenilene di-amine Sigma Chemical USA).

Um novo período de incubação de 15 minutos a temperatura ambiente foi efetuado. Em seguida foram colocados 50  $\mu$ L de solução de ácido sulfúrico 1N para bloqueio da reação e posterior leitura em leitora de microplacas utilizando filtros de 490 nm.

#### **E- Interpretação dos resultados**

Após realização de análises estatísticas, considerou-se que somente as amostras com valores de absorvância superiores ao valor de “cut off\*” foram interpretadas como positivas.

\*Valores médios de absorvância obtidos a partir dos controles negativos somados a 3 desvios padrão.

Em cada placa foram utilizados como controles positivos, os antígenos utilizados para imunização dos coelhos.

Como controles negativos foram utilizados insetos não alimentados ou soros heterólogos utilizados no teste.

#### **3.9.3 Identificação taxonômica dos flebotomíneos**

Os espécimes capturados foram identificados e separados quanto ao gênero e sexo, e armazenados em eppendorfs contendo 1,5mL de álcool 70 para extração e detecção de DNA do parasito.

Durante o processo de triagem, todos os flebotomíneos machos capturados foram montados entre lâmina e lamínula, seguindo técnicas de montagem de rotina do Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos do Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz, Belo Horizonte. Dando prosseguimento ao estudo, as lâminas foram examinadas no microscópio óptico para identificação das espécies de flebotomíneos.

O protocolo utilizado para a montagem dos flebotomíneos após triagem, seguiu as seguintes etapas:

- a) Os insetos permaneceram, em média, 16 horas no hidróxido de potássio (KOH) a 10%, para clarificação;
- b) Para neutralizar o processo de clarificação foram transferidos para ácido acético a 10% por 15 a 20 minutos;
- c) Após, passaram por uma desidratação seriada em álcool 70% - 10 minutos, álcool 90% - 10 minutos, álcool 95% - 10 minutos e álcool 100% - 10 minutos;
- d) Em seguida, foram colocados no Eugenol por no mínimo 24 horas, para a diafanização de suas estruturas;
- e) Cada inseto foi colocado em lâmina sob uma gota de bálsamo do Canadá, com o auxílio de dois estiletes de pontas finas. Nas fêmeas separou-se a cabeça, o tórax e o abdômem, a fim de visualizar as espermatecas. Os exemplares machos, foram montados inteiros;
- f) Em seguida, uma lamínula foi colocada sobre o exemplar;
- g) A lâmina montada foi levada à estufa (37°C) para secagem e após 72 horas, colocou-se esmalte incolor em volta da lamínula para sua impermeabilização.

A identificação dos flebotomíneos foi realizada segundo classificação de Young & Duncan 1994.

#### **3.9.4 Identificação de infecção por PCR em flebotomíneos**

Os flebotomíneos fêmeas coletadas nas armadilhas HP's e de "Shannon", foram divididos em "pools" contendo no máximo 10 espécimes, separados por localidade e direcionados para a técnica da PCR.

No laboratório, todos os machos foram separados e individualizados em microtubos (tipo "Eppendorfs"). As fêmeas, individualmente, foram colocadas sobre uma lâmina com uma gota de salina, onde utilizando dois estiletes estéreis, foi dissecado os dois últimos segmentos abdominais, expondo dessa forma a espermateca (genitália feminina), permitindo sua visualização. Em seguida, todo o restante do corpo dessa fêmea foi também acondicionado em microtubos, e sob o segmento abdominal extraído, colocou-se uma lamínula para a identificação da espécie.

Tanto os machos como as fêmeas foram mantidos em temperatura ambiente até serem encaminhados para o laboratório, onde foram mantidos congelados em freezer -10° C para a técnica da PCR. Apenas as fêmeas sem resíduo de alimentação foram separadas para avaliação de infecção natural através da técnica molecular. Em cada fêmea individualizada foi realizado a PCR de acordo com protocolo descrito por Pita-Pereira *et al.* (2005).

#### **3.9.4.1 Obtenção de extrato total de flebótomos**

Cada amostra continha 1 flebótomo em 100 µL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 9,2 contendo 10 mM de EDTA e 100 µg/mL de proteinase K). As preparações foram incubadas por 2 a 3 horas a 56° C, com agitações periódicas e centrifugadas (9.800g, 15 minutos, 4° C). Os sobrenadantes foram coletados e aquecidos por 15 minutos a 95° C. Posteriormente, as amostras foram mais uma vez centrifugadas (9.800g, 40 segundos, 40°C). Os volumes das preparações foram ajustados para 200µL com TE 0,1X e estocadas (-20° C) até o momento da extração do DNA total com fenol-clorofórmio.

#### **3.9.4.2 Extração de DNA**

A extração de DNA a partir dos lisados de flebotomíneos foi realizada utilizando o kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System (PROMEGA), segundo as especificações do fabricante e o DNA diluído em 50 µL TE 0,1X foi estocado a - 20°C até o momento de uso. Todas as etapas para a extração de DNA foram monitoradas pela inclusão de amostras controle negativo (insetos machos capturados no campo). Os fluxos laminares próprios para extração de DNA, assim como todo o material utilizado nesta etapa foram devidamente descontaminados com a utilização de cloro e exposição a raios UV.

#### **3.9.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase**

“Hot-start PCR multiplex” - Para a PCR foi utilizado dois pares de primers por reação. O primeiro par amplificou a região constante do minicírculo do kDNA: A: 5' (G/C)(G/C)(C/G) CC(A/C) CTA T(A/T)T TAC ACC AAC CCC 3' e o B: 5' GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA 3 (Passos *et al.* 1996); o segundo par amplificou um gene constitutivo específico de flebótomos (cacophany): 5Llcac 5'GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3'e 3Llcac 5'CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3'(Lins *et al.* 2002). As

reações ocorrerão em um volume final de 100µL nas seguintes condições: solução tampão da PCR 10x [100mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500 mM de KCl], MgCl<sub>2</sub> (4,5 mM), dNTPs (15 mM), primers (5 pmol/µL), Taq Gold (5 U/µL) e 10 µL do DNA total extraído. A ciclagem térmica (36 ciclos) foi realizada no aparelho modelo DNA Thermal Cycler 9600, com a seguinte programação, por ciclo: desnaturação (30 segundos, 94°C), anelamento dos primers (30 segundos, 55°C) e extensão (30 segundos, 72°C). Este programa foi precedido de um ciclo (12 minutos, 94°C) para ativação da enzima (Hot Start) e após os 36 ciclos foi adicionada uma etapa de extensão final (10 minutos, 72°C).

#### **3.9.4.4 Eletroforese em gel de agarose**

Os ensaios de eletroforese foram realizados em cuba horizontal com géis de agarose a 1,5% preparados em TBE 1X, por 2 horas à 70V. Os géis foram analisados e as imagens registradas através de um sistema fotográfico de documentação em gel – UVP Bioimaging Systems.

#### **3.9.4.5 Dot-Blot**

O produto amplificado na PCR também foi analisado por hibridização em fase sólida. Inicialmente, as amostras (10 µL dos amplicons diluídos em 90µL de água) foram submetidas a um processo de desnaturação (100°C, 3 minutos) seguido de um rápido resfriamento (40°C) e a adição de solução desnaturante (4N NaOH contendo 25mM EDTA pH 8.0). O material desnaturado foi adsorvido por vácuo à membrana de náilon em aparelho Bio-Dot™.

Após a adsorção dos amplicons, as áreas de aplicação da membrana foram tratadas com 100µL/poço de água destilada, seguida de 100µL/poço de solução desnaturante. A membrana foi lavada em SSC 2X e seca à temperatura ambiente. O DNA foi covalentemente fixado a membrana por irradiação com luz UV em aparelho Stratalinker™, durante dois minutos. Para a reação de hibridização, as membranas contendo o DNA foram pré-tratadas com solução BLOTTO e incubadas com 25 pmol/µL da sonda subgênero-específica ou espécie-específica, marcadas com biotina na extremidade 5´.

Em seguida da hibridização, as membranas foram lavadas (5 vezes/5 minutos cada) com PBS contendo 0,05% de Tween-20 à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas (1 hora, 25°C) com o conjugado Streptavidina-

Peroxidase diluído em tampão de lavagem. Após nova lavagem das membranas, a reação de hibridização foi revelada usando reagente luminol (Santa Cruz Biotechnology, CA, E.U.A.).

### 3.10 Processamento e análise de dados

As informações obtidas com levantamentos demográficos, socioeconômico e ambiental foram armazenadas em um banco de dados no excel.

Todos os dados obtidos sobre o número de triatomíneos capturados nos domicílios, bem como o número dos naturalmente infectados, permitiram calcular os seguintes indicadores entomológicos (OMS 2013), em cada área de estudo.

**Índice de infestação domiciliar:** (número de casas infestadas/ número de casas examinadas) x 100

**Índice de infestação intradomiciliar:** (número de intradomicílios infestados/ número de casas investigadas) x 100

**Índice de infestação peridomiciliar:** (número de peridomicílios infestados/ número de casas investigadas) x 100

**Índice de infecção natural:** (número de triatomíneos infectados por *T. cruzi*/ número de insetos examinados) x 100

Seguindo as recomendações do Ministério da Saúde, para os ensaios sorológicos, serão considerados positivos neste estudo os indivíduos/animais que apresentarem os seguintes resultados:

**Positivo para doença de Chagas** – pessoas com resultados reagentes em duas técnicas sorológicas diferentes (ELISA e IFI – títulos a partir de 1:80)

**Positivo para leishmaniose humana** – pessoas com resultados reagentes em duas técnicas sorológicas diferentes (ELISA e IFI – títulos a partir de 1:80).

**Positivo para tripanossomíase americana canina** – animais com resultados reagentes em duas técnicas sorológicas diferentes (ELISA e IFI – títulos a partir de 1:80)

**Positivo para leishmaniose canina** – animais com resultados reagentes nos testes DPP® e ELISA.

**Taxa de co-positividade** – nº de casos positivos para DC e leishmaniose/ nº total de casos positivos.

No caso avaliação entomológica para flebotomíneos, a pesquisa é considerada positiva quando se encontra, pelo menos, uma espécie de importância médico-sanitária, em um ou mais método de coleta (*Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei*, *Lu. migonei*, *Lu. whitmani*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei*, *Lu. reducta*, *Lu. olmeca nociva*), quer seja para a confirmação da autoctonia, como para confirmação de transmissão no ambiente domiciliar.

## 4 RESULTADOS

Por meio deste trabalho foi promovida uma conscientização e educação da população local com relação às zoonoses estudadas e sua importância no contexto da saúde pública. Duas aulas foram ministradas aos agentes de endemias, de saúde e funcionários da Secretaria de Saúde do município.

Um treinamento para a captura de flebotomíneos e para a coleta de amostra de sangue canino foi realizado com os agentes de endemias com o objetivo de capacitá-los para a manutenção das ações de investigação, controle e prevenção da leishmaniose.

### 4.1 Características das Unidades Habitacionais Amostradas

Nas 9 localidades existem, ao todo, 241 unidades habitacionais (UH). Foram selecionadas 70 UH que representam aproximadamente 30% das UH existentes em cada região (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1** - Quantidade de UH existentes e amostradas em cada localidade estudada.

<b>Localidade</b>	<b>N de casas existentes</b>	<b>N de casas amostradas</b>
<b>Tanque</b>	21	5*
<b>Limoeiro</b>	37	6*
<b>Tanquinho</b>	10	3
<b>Lagoa da Serra</b>	41	12
<b>São José</b>	32	9
<b>Espinheiro</b>	17	5
<b>Jacaré</b>	14	4
<b>Feitoria</b>	21	6
<b>Curtume</b>	48	14
<b>Total</b>	241	64

\*Não foi possível amostrar as 6 e 11 UH das localidades Tanque e Limoeiro, respectivamente, por estarem desabitadas ou sem moradores no momento do estudo.



O tipo de domicílio predominante na região é de paredes de tijolos sem reboco, coberto com telhas, estando também presentes as UH construídas de tijolo com reboco e de taipa em menor proporção (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2** – Distribuição das UH por tipo de parede nas 9 localidades.

<b>Tipo de parede</b>	<b>Número de UH</b>	<b>%</b>
<b>Taipa (madeira e barro)</b>	3	5
<b>Tijolos sem reboco</b>	35	55
<b>Tijolos com reboco</b>	26	40
<b>Total</b>	64	100

A distribuição das casas por tipo de construção de paredes, nas 9 localidades, se apresentou de forma desigual. A localidade Lagoa da Serra e Espinheiro foram as únicas localidades que apresentaram UH de taipa (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3** – Distribuição das UH por tipo de parede em cada uma das 9 localidades estudadas.

<b>Localidade</b>	<b>UH de taipa (%)</b>	<b>UH de tijolos sem reboco (%)</b>	<b>UH de tijolos com reboco (%)</b>
<b>Tanque</b>	0	80	20
<b>Limoeiro</b>	0	67	33
<b>Tanquinho</b>	0	100	0
<b>Lagoa da Serra</b>	8	59	33
<b>São José</b>	0	33	67
<b>Espinheiro</b>	40	0	60
<b>Jacaré</b>	0	0	100
<b>Feitoria</b>	0	50	50
<b>Curtume</b>	0	79	21
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>55</b>	<b>41</b>

Nas 9 localidades, foram encontrados 263 moradores, com média de 5 pessoas por residência. Destes 121 eram mulheres e 142 homens. Dos 64 chefes de família entrevistados, apenas 4 deles não trabalhavam com agricultura/pecuária (servente, operador de motosserra, monitora de capoeira e vigia). Todos os entrevistados (100%), responderam conhecer o vetor da DC e o identificaram como do gênero *Triatoma*, quando apresentados em placa de petri no questionário (Anexo IV). A tabela 4.4 abaixo apresenta o número de chefes de família que responderam ao questionário (Anexo IV) informando que já haviam sido picados pelo triatomíneo.

**Tabela 4.4** - Chefes de família que responderam ao questionário informando se já haviam sido picados pelo triatomíneo ou não.

<b>Chefes de família que informaram já terem sido picados pelo barbeiro</b>	<b>Quantidade</b>	<b>%</b>
<b>Sim</b>	20	31
<b>Não</b>	18	28
<b>Não sabia informar</b>	26	41
<b>Total</b>	64	100

A infestação de triatomíneos quanto a informação de localização dos mesmos, declarada pelos chefes de família durante a arguição em questionário demonstrou um índice mais elevado da presença do vetor no domicílio como apresentado na tabela 4.5.

A correlação entre o índice de infestação de triatomíneos calculada neste estudo por ecótopo difere dos valores descritos pelos moradores no questionário. O índice de infestação encontrado foi muito maior no peridomicílio enquanto que durante questionário a população demonstrou uma presença muito maior no domicílio (56%).

**Tabela 4.5** - Localização em que foi relatado pelos moradores à presença de triatomíneos.

<b>Localização em que foi relatado pelos moradores a presença de triatomíneos</b>	<b>Quantidade</b>	<b>%</b>
<b>Domicílio</b>	36	56
<b>Peridomicílio</b>	6	9
<b>Domicílio e peridomicílio</b>	13	20
<b>Mata</b>	7	11
<b>Domicílio, peridomicílio e Mata</b>	2	3
<b>Total</b>	64	100

Das 64 UH investigadas, em 100% foi identificada a presença de animais domésticos (cães, gatos, galinhas, caprinos, ovinos, bovinos, suínos e/ou equinos). Foi verificada a presença de cães, galinhas, caprinos e ovinos em maior quantidade.

## 4.2 Avaliação dos Vetores

### 4.2.1 Classificação taxonômica dos vetores

Foram capturados 300 triatomíneos, todos (100%) da espécie *T. brasiliensis*, 142 (47%) adultos, 80 (26%) ninfas de 5º estágio, 51 (17%) de 4º estágio, 24 (8%) de 3º estágio e 3 (1%) de 2º estágio (tabela 4.6). O peridomicílio foi o local com a maior presença do vetor, totalizando 210 insetos (70%).

**Tabela 4.6** - Local de captura e estágios dos triatomíneos capturados.

<b>Local de captura</b>	<b>Adultos</b>	<b>5º estágio</b>	<b>4º estágio</b>	<b>3º estágio</b>	<b>2º estágio</b>	<b>1º estágio</b>
<b>Domicílio</b>	43	26	12	9	0	0
<b>Peridomicílio</b>	99	54	39	15	3	0
<b>Total</b>	<b>142 (47%)</b>	<b>80 (26%)</b>	<b>51 (17%)</b>	<b>24 (8%)</b>	<b>3 (1%)</b>	<b>0</b>

Foram capturados 791 flebotomíneos, 262 fêmeas, 529 machos. Destes 522 vetores foram analisados e identificados quanto a espécie (tabela 4.7) e 269 fêmeas foram separadas em “pools” contendo de 1 a 10 espécimes, por localidade, para posterior análise de infecção por PCR. Um total de 509 (98%) insetos foram identificados como da espécie *Lu. longipalpis*, principal vetor da LV na região.

**Tabela 4.7-** Descrição das espécies de flebotomíneos capturados em cada uma das 9 localidades, separados por sexo.

Localidade	Espécies	Machos	Fêmeas	TOTAL
Tanque	<i>Lutzomia longipalpis</i>	261	3	264
	<i>Lu. lenti</i>	1	4	5
	<i>Lu. intermedia</i>	4	0	4
Limoeiro	<i>Lu. longipalpis</i>	73	1	74
	<i>Lu. lenti</i>	1	1	2
	<i>Lu. Intermedia</i>	1	0	1
São José	<i>Lu. migonei</i>	1	0	1
São José	<i>Lu. longipalpis</i>	16	0	16
Lagoa da Serra	<i>Lu. longipalpis</i>	71	0	71
Tanquinho	<i>Lu. longipalpis</i>	21	0	21
Espinho	<i>Lu. longipalpis</i>	4	0	4
Jacaré	<i>Lu. longipalpis</i>	19	0	19
Feitoria	<i>Lu. longipalpis</i>	2	0	2
Curtume	<i>Lu. longipalpis</i>	38	0	38
<b>TOTAL</b>		<b>513</b>	<b>9</b>	<b>522</b>

#### 4.2.2 Indicadores entomológicos

Das 64 casas, o índice de infestação domiciliar foi de 47% (30) para a captura de triatomíneos, sendo 5 (17%) exclusivamente no domicílio, 14 (47%) exclusivamente no peridomicílio e 11 (36%) concomitante no domicílio e peridomicílio. A tabela 4.8 apresenta os índices de infestação de triatomíneos das localidades estudadas, com destaque para uma maior presença do vetor na localidade Lagoa da Serra onde foi identificado o único triatomíneo com infecção por *T. cruzi* (Figura 4.1).

<b>Indicadores entomológicos (triatomíneos)</b>	<b>Tanque</b>	<b>Limoeiro</b>	<b>Tanquinho</b>	<b>Lagoa da Serra</b>	<b>São José</b>	<b>Espinheiro</b>	<b>Jacaré</b>	<b>Feitoria</b>	<b>Curtume</b>
<b>Índice de infestação domiciliar</b>	33%	17%	25%	83%	33%	60%	75%	50%	21%
<b>Índice de infestação intradomiciliar</b>	17%	0	33%	67%	11%	20%	25%	33%	7%
<b>Índice de infestação peridomiciliar</b>	33%	17%	67%	67%	33%	40%	50%	33%	14%
<b>Índice de infecção natural</b>	0	0	0	1,23	0	0	0	0	0

Tabela 4.8 - Indicadores entomológicos de triatomíneos observados nas 9 localidades pesquisadas na área rural do município de SJPI

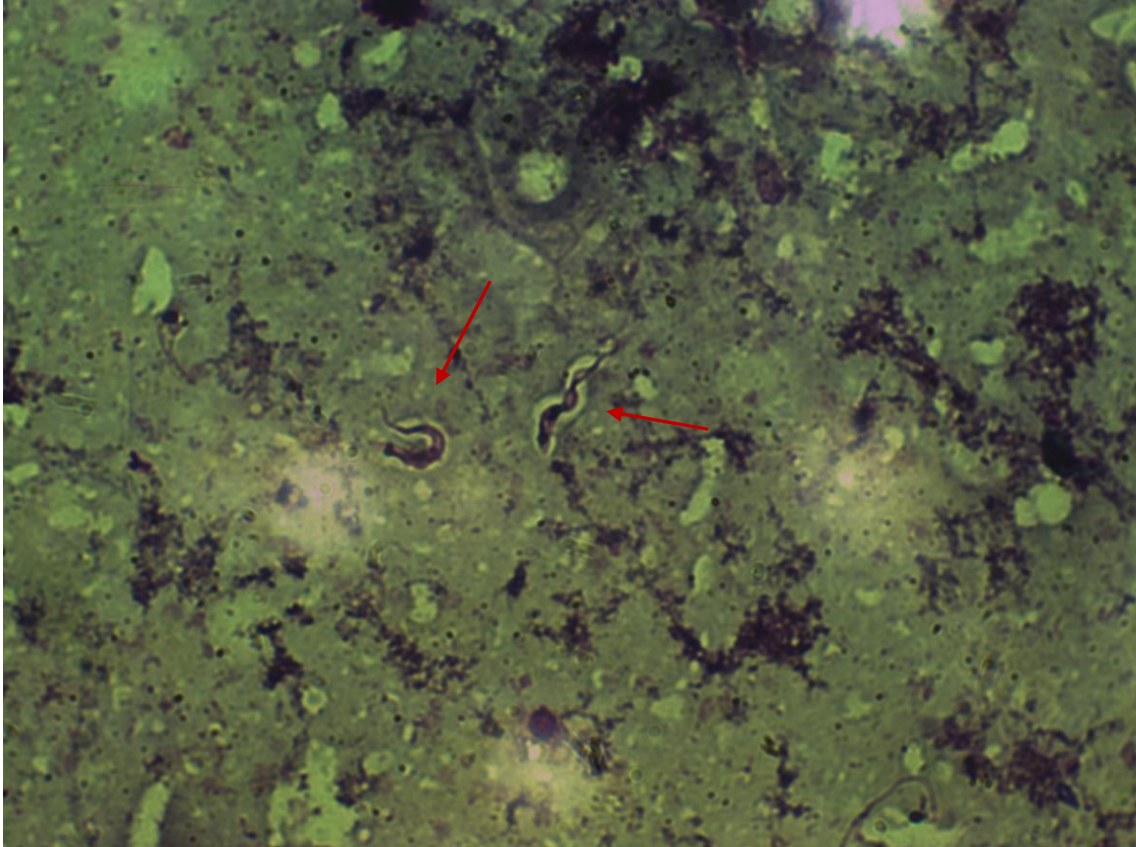


Figura 4.1 – Forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* encontrados no exame direto do trato digestivo do barbeiro capturado em região domiciliar, de uma UH, na localidade Lagoa da Serra.

As armadilhas HP instaladas nos domicílios não capturaram flebotomíneos, entretanto as armadilhas localizadas no peridomicílio foram as que efetuaram a maior quantidade de capturas totalizando 17 “pools” nas 9 localidades estudadas. As armadilhas do tipo Shannon que foram armadas nas regiões mais próximas a área de mata, apresentaram um total de 14 “pools” com uma densidade predominante na localidade do Jacaré conforme descrito na Tabela 4.9.

Não houve captura de flebotomíneos no intradomicílio, porém na área de peridomicílio o índice de infestação de flebotomíneos encontrado nas localidades foi de 77%.

**Tabela 4.9-** Indicadores entomológicos de flebotomíneos observados nas 9 localidades pesquisadas na área rural do município de SJPI

<b>Tipos de capturas de flebotomíneos</b>	<b>Geral</b>	<b>Tanque</b>	<b>Limoeiro</b>	<b>Tanquinho</b>	<b>Lagoa da Serra</b>	<b>São José</b>	<b>Espinheiro</b>	<b>Jacaré</b>	<b>Feitoria</b>	<b>Curtume</b>
<b>Armadilha HP domicílio</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Armadilha HP peridomicílio</b>	17 pools	1 pool	1 pool	3 pools	0	0	3 pools	0	4 pools	5 pools
<b>Armadilha Shannon</b>	14 pools	0	0	0	3 pools	2 pools	0	9 pools	0	0
<b>Total</b>	31 pools	1 pool	1 pool	3 pools	3 pools	2 pools	3 pools	9 pools	4 pools	5 pools

A avaliação de infecção natural por *Leishmania* spp. nos flebotomíneos realizada por técnica molecular (PCR), demonstrou um índice de infecção natural de flebotomíneos em 1 “pool” na localidade do limoeiro, 1 “pool” em São José e de 3 “pools” na localidade do Jacaré. Avaliando todas as localidades estudadas o índice de infecção natural de flebotomíneos na região da área rural do município de SJPI é de 13% para *Leishmania* spp.

#### 4.2.3 Fonte alimentar

Cento e oitenta e cinco (185) espécimes capturados foram analisados para verificar a fonte alimentar. A descrição dos percentuais encontrados está apresentada na tabela 4.10.

**Tabela 4.10**– Resultados dos ensaios sorológicos para definição de fonte alimentar.

<b>Espécies</b>	<b>N de reagentes</b>	<b>%</b>
<b>Cão</b>	5	<b>2,7</b>
<b>Humano</b>	3	<b>1,6</b>
<b>Ave</b>	110	<b>59,5</b>
<b>Cabra</b>	2	<b>1,1</b>
<b>Ovelha</b>	9	<b>4,9</b>
<b>Cavalo</b>	1	<b>0,5</b>
<b>Gato</b>	0	<b>0</b>
<b>Roedor</b>	3	<b>1,6</b>
<b>TOTAL</b>	<b>133</b>	<b>71,9</b>

O maior percentual encontrado foi em aves (59,5%) seguido por ovelhas (4,9%) e cão (2,7%). Não houve insetos reagentes para identificação de fonte alimentar em gatos.

A tabela 4.11 apresenta o número de amostras testadas para fonte alimentar em cada uma das 9 localidades estudada e a tabela 4.12 apresenta a positividade por localidade e por espécies animais testadas.



**Tabela 4.11**– Resultados dos ensaios sorológicos para definição de fonte alimentar por localidade.

<b>Localidade</b>	<b>No. de amostras testadas</b>
<b>Lagoa da Serra</b>	71
<b>Tanquinho</b>	26
<b>Curtume</b>	26
<b>Feitoria</b>	12
<b>Tanque</b>	16
<b>Espinheiro</b>	10
<b>Jacaré</b>	8
<b>Limoeiro</b>	6
<b>TOTAL</b>	175

**Tabela 4.12**– Tabela de positividade de fonte alimentar por localidade.

	Lagoa da Serra	Tanquinho	Curtume	Feitoria	Tanque	Espinheiro	Jacaré	Limoeiro
Ave	33	10	13	5	11	8	4	1
Humano	1	-	-	-	-	-	-	-
Ovelha	1	-	-	-	-	-	-	-
Ave/ ovelha	2	1	5	-	1	-	-	-
Ave/ roedor	1	-	-	-	-	-	-	-
Cão/ ave	1	-	-	-	1	-	-	-
Humano/ave/ovelha	2	-	-	-	-	-	-	-
Cão/ave/ovelha	2	-	1	-	-	-	-	-
Ave/ovelha/cavalo	1	-	-	-	-	-	-	-
Ave/cabra/ovelha	-	-	-	-	-	-	1	-
Total reagentes	44	11	19	05	13	8	5	1
Total Não reagentes	27	15	7	7	3	2	3	5
Total geral	71	26	26	12	16	10	8	6

### 4.3 Avaliação de ensaios caninos

Nenhum animal apresentou sinais característicos da LVC como hepatomegalia, esplenomegalia, lesões cutâneas, caquexia, apatia, onicogrifose, alopecia local e generalizada, edema de membros ou adenite regional. Outras desordens clínicas como perda de apetite, perda de peso e pêlo opaco estavam presentes em alguns casos.

Todos os cães estudados mantinham íntima relação com outros animais como galinhas, suínos, caprinos, ovinos, cães e gatos.

#### 4.3.1 Sorologia Leishmaniose Canina

Cento e vinte e nove (129) soros caninos foram analisados, 49 destes (38%) foram reagentes no DPP, 9 (6%) ELISA e 19 (14,7%) na IFI (Tabela 4.13).

**Tabela 4.13**– Resultados dos ensaios sorológicos para *Leishmania* sp.

Ensaio	Reagentes	Não Reagentes
DPP	49 (38%)	80
ELISA	9 (7%)	120
IFI	19 (14,7%)	110
DPP e ELISA	9 (7%)	120
ELISA e IFI	6 (4,6%)	123
DPP, ELISA e IFI	6 (4,6%)	123

Destas 129 amostras, 6 (4%) se mostraram reagentes em todos os ensaios sorológicos realizados para pesquisa de *Leishmania* sp. e 9 (7%) foram concordantes positivamente nos ensaios preconizados pelo MS (DPP® e ELISA).

Quando analisamos os animais positivos nos ensaios sorológicos ELISA/IFI e DPP®/ELISA por localidade estudada, verificamos que em ambas associações sorológicas, a localidade do Espinheiro seguida da localidade do Tanque, obtiveram o maior número de animais soropositivos (Tabela 4.14).

**Tabela 4.14**– Resultados dos ensaios sorológicos por localidade para *Leishmania sp.*

Localidade	N de cães examinados	Reagentes ELISA/IFI	Reagentes DPP®/ELISA
Tanque	8	1 (14%)	1 (14%)
Limoeiro	9	0	0
Lagoa da Serra	28	2 (7%)	3 (11%)
Tanquinho	8	0	0
Espinheiro	13	2 (17%)	2 (17%)
Jacaré	14	0	0
Feitoria	10	0	0
Curtume	23	1 (5%)	2 (9%)
São José	16	1 (7%)	1 (7%)

Apenas 31 (24%) animais estudados, apresentaram sorologia negativa para *Leishmania spp.*

#### 4.3.2 Sorologia Tripanossomíase Americana

Cento e vinte e nove (129) cães foram analisados, 36 (28%) apresentaram resultado reagente para ELISA e 21 (16,3%) para ensaio de IFI. Um total de 10 (7,7%) amostras demonstraram concordância nos dois ensaios realizados (Tabela 4.15).

**Tabela 4.15**- Resultado dos ensaios sorológicos para *T. cruzi*

Ensaio	Reagentes	Não Reagentes
ELISA	36 (28%)	93
IFI	21 (16,3%)	108
ELISA e IFI	10 (7,7%)	119

Quarenta e oito por cento (N=62) dos cães avaliados, apresentaram resultados negativos nos ensaios sorológicos para pesquisa de *T. cruzi*.

Ao avaliarmos estes animais soropositivos por localidade, observamos que as localidades Limoeiro (22%), Lagoa da Serra (18%), Tanque (14%) e São José (13%), foram respectivamente as mais prevalentes (Tabela 4.16).

**Tabela 4.16**– Resultados dos ensaios sorológicos por localidade para *T. cruzi*.

Localidade	N de cães examinados	Reagentes ELISA/IFI	%
Tanque	7	1	14%
Limoeiro	9	2	22%
Lagoa da Serra	27	5	18%
Tanquinho	8	0	0
Espinheiro	12	0	0
Jacaré	14	0	0
Feitoria	10	0	0
Curtume	22	0	0
São José	15	2	13%

Ao considerarmos a condição de dois resultados sorológicos reagentes, DPP/ELISA para leishmaniose e ELISA/IFI para a tripanossomíase americana, verificamos que o índice de co-positividade é de 0,3%, ou seja, dos 15 animais com resultados positivos para qualquer uma das duas injúrias, apenas 4 deles são coincidentes para TA e LV.

#### **4.3.3 Ensaios de imunohistoquímica das amostras caninas**

Não houveram resultados positivos em nenhum dos ensaios imunohistoquímicos realizados nas 76 amostras coletadas.

#### **4.3.4 Cultura Parasitológica das amostras caninas**

Das 76 amostras coletadas, apenas 1 (3,03%) amostra viável de pele apresentou resultado positivo para a espécie *Trypanosoma caninum*. Nas culturas realizadas para pele, medula óssea e sangue, 33 (43%), 25 (33%) e 29 (38%) amostras respectivamente, apresentaram contaminação por fungos e/ou bactérias tornando inviável a leitura dos mesmos.

#### **4.3.5 Xenodiagnóstico canino**

No exame de xenodiagnóstico, dos 76 animais submetidos ao exame, 1 (1,3%) animal obteve resultado parasitológico positivo para *T. cruzi* (Figura 4.1) e confirmado por PCR (Junqueira *et al.* 1996).

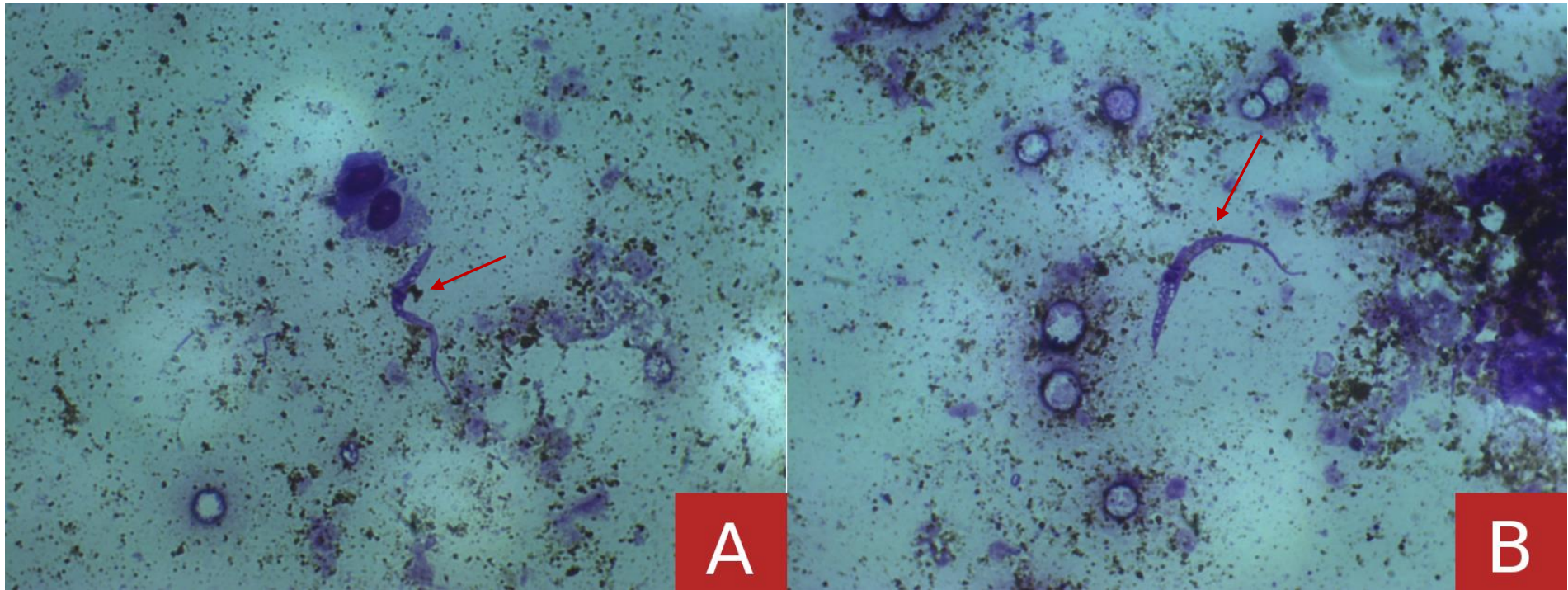


Figura 4.2 – Forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* encontrado em trato digestivo de barbeiro utilizado no xenodiagnóstico de cão. (Foto: Taliha D Perez)

#### 4.4 Avaliação de ensaios humanos

Todos os moradores das UH amostradas, presentes no momento da visita e que estavam dentro das características anteriormente descritas para a participação, realizaram a coleta de sangue (263).

##### 4.4.1 Sorologia para Leishmaniose Humana

Das 263 amostras de sangue coletadas, 39 (15%) foram reagentes no ensaio sorológico ELISA e 16 amostras (6%) foram reagentes nos ensaios de IFI nos títulos de 1:80. Considerando as definições de positividade, 14 (5%) dos moradores da região estudada demonstraram resultados positivos na sorologia (ELISA e IFI) para leishmaniose (tabela 4.17).

**Tabela 4.17**– Resultado dos ensaios sorológicos para *Leishmania* spp.

Ensaio	Reagentes	Não Reagentes
ELISA	39 (15%)	224
IFI	16 (6%)	247
ELISA e IFI	14 (5%)	249

A localidade Tanquinho apresentou a maior prevalência de soropositivos por localidade, conforme dados apresentados na tabela 4.18.

**Tabela 4.18**– Resultados dos ensaios sorológicos por localidade para *Leishmania* spp.

Localidade	N de moradores examinados	Reagentes ELISA/IFI	%
Tanque	21	2	10
Limoeiro	29	0	0
Lagoa da Serra	57	4	7
Tanquinho	13	4	31
Espinheiro	14	0	0
Jacaré	14	1	7
Feitoria	28	1	4
Curtume	48	0	0
São José	39	2	5



#### 4.4.2 Sorologia para doença de Chagas

Dos 263 moradores avaliados nas 9 localidades, 18 (7%) foram reagentes em todos os ensaios realizados (Tabela 4.19).

**Tabela 4.19-** Resultado dos ensaios sorológicos para *T. cruzi*.

Ensaio	Reagentes	Não Reagentes
ELISA	19 (7%)	244
IFI	24 (9%)	239
ELISA e IFI	18 (7%)	245

Ao analisarmos os participantes soropositivos para DC por localidade, observamos que a maior prevalência está na localidade do Tanquinho com 31%, seguida pela localidade do Tanque com 10% e da Lagoa da Serra com 9%. Todos os percentuais estão descritos na tabela 4.20 abaixo:

**Tabela 4.20–** Resultados dos ensaios sorológicos por localidade para *T. cruzi*.

Localidade	N de moradores examinados	Reagentes ELISA/IFI	%
Tanque	21	2	10
Limoeiro	29	0	0
Lagoa da Serra	57	5	9
Tanquinho	13	4	31
Espinheiro	14	0	0
Jacaré	14	1	7
Feitoria	28	1	4
Curtume	48	3	6
São José	39	2	5

A taxa de co-positividade para DC e LVH/LTA nos moradores foi de 69% (13). 26% (5) dos moradores foram sororeagentes exclusivamente para DC e 5% (1) apenas para LVH/LTA.

#### **4.4.3 Xenodiagnóstico**

Apenas 1 morador soropositivo nas duas técnicas sorológicas (ELISA e IFI) não foi submetido ao xenodiagnóstico por motivo de mudança. Os 17 moradores restantes, realizaram o exame e destes 11 (65%) participantes foram positivos para a infecção quando avaliados ao microscópio óptico.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Características das localidades, das unidades habitacionais, dos moradores e suas possíveis correlações com a infestação por triatomíneos.

As 9 localidades estudadas da zona rural do município de SJPI, foram as que se localizavam dentro do raio de 30 km, traçado a partir do centro, com mais de 10 unidades habitacionais e com presença de vias de acesso terrestre. A escolha da dimensão do raio de trabalho foi aleatória, com o objetivo de investigar aspectos da cadeia epidemiológica da DC e das leishmanioses na região.

A percepção dos moradores quanto a presença do vetor foi relatada ser maior no domicílio (56%) e apenas 30% dos insetos capturados se encontravam neste mesmo ambiente. Estes diferentes percentuais de percepção de presença e da efetiva captura dos insetos, se deve provavelmente a maior facilidade em visualizá-los dentro de casa, visto ser essa uma área de menor metragem, menor quantidade de objetos e por se passar uma maior quantidade de tempo no mesmo.

Com relação as construções locais, predominaram as UH cujas paredes são de tijolos sem reboco, piso de cimento e coberto com telhas (55%). Todas as residências com esse tipo de construção apresentavam piso de cimento apenas parcialmente (alguns cômodos). A literatura mostra que esse tipo de construção é pouco adequado do ponto de vista higiênico-sanitário e estão diretamente ligadas ao fator de domiciliação dos triatomíneos (Schofield *et al.* 1994, Schumñis 1997, Moncayo 1997, Dias & Coura 1997). De fato, esse tipo de construção está presente em maior quantidade na localidade que apresentou o segundo maior índice de infestação intradomiciliar (Tanquinho), perdendo apenas pra localidade Lagoa da Serra. Isso sugere que o tipo de paredes dessas moradias, com muitas reentrâncias e espaços entre os tijolos deixados pela escassez de massa de reboco, propicia a formação de abrigos e conseqüentemente à formação de colônias.

As casas construídas com tijolos com reboco representaram o segundo tipo de habitação mais encontrado na região, com destaque pra localidade do Jacaré que possui 100% de suas UH construídas com este material.

As UH de taipas se apresentaram em maior quantidade na localidade Espinheiro (40%). Embora esse tipo de construção tenha representado um menor número de casas infestadas em relação as de tijolo sem reboco, constatou-se aí a existência de pequenas colônias no intradomicílio. Estas evidências contrariam todas os fatores que consideramos estarem diretamente relacionados com a colonização e densidade de triatomíneos no domicílio, sendo moradias de baixo padrão e com muitos locais adequados para abrigar os triatomíneos, e assim oferecendo maior risco de infecção aos seus moradores. Entretanto esse tipo de construção é muito reduzido, representando somente 4% do total estudado nas 9 localidades, e pode não ser representativo da região.

A utilização de troncos, telhas e folhagem na estrutura do telhado, assim como o armazenamento e acúmulo destes e outros materiais como braçada de madeira para fornos no peridomicílio, podem se tornar importantes meios de transportes passivos desta espécie (*T. brasiliensis*), de seu ecótopo natural, para as moradias (Sarquis *et al.* 2006, Alencar 1987)

Outros fatores a serem considerados no processo de infestação intradomiciliar é a baixa luminosidade, o baixo padrão de higiene das casas, a proximidade das carnaubeiras, a presença de animais domésticos e peridomiciliares.

A área do peridomicílio das localidades estudadas concentram as criações de animais domésticos com alta densidade e diversidade de espécies, o abrigo destes animais e o grande acúmulo de madeiras, telhas, tijolos, lixo e poucas plantações. Os abrigos dos animais são basicamente construídos por cercas de galhos secos, folhagem e telhas. É quase indefinível o limite entre o domicílio e o peridomicílio, exceto para os animais de grande porte (bovinos e equinos) que se apresentam em franca minoria. Existe uma promiscuidade no relacionamento de quase todas as espécies de animais domésticos presentes e os moradores das UH. O complexo formado por abrigo e disponibilidade de fonte alimentar propicia a formação e manutenção de colônias, como demonstram os resultados deste estudo. A importância epidemiológica do peridomicílio na manutenção da DC vem ganhando a cada dia mais espaço, desde a interrupção e redução da transmissão pelo seu principal vetor (*T. infestans*) extritamente domiciliar.

Dias (2000) e Forattini *et al.* (1971) mencionam que o peridomicílio pode funcionar como uma barreira à infestação dentro do domicílio, quando puder oferecer condições favoráveis à sobrevivência dos triatomíneos, mas também serve

como porta de entrada para a colonização de casas que estão em condições desfavoráveis. Essa hipótese poderia explicar os resultados encontrados neste estudo, onde o índice de infestação peridomiciliar se apresentou maior em 7 das 9 localidades avaliadas, com exceção das localidades Lagoa da Serra e Feitoria que apresentaram índices de infestação iguais no intra e no peridomicílio.

## **5.2 Triatomíneos e flebotomíneos capturados, suas distribuições nos ecótopos e infecção.**

Os objetivos das investigações entomológicas são levantar informações de caráter quantitativo e qualitativo em áreas de transmissão, bem como naquelas sem transmissão, de forma a obter novos conhecimentos da bioecologia das espécies de flebotomíneos de importância médico-sanitária. As investigações visam definir áreas a serem trabalhadas ou acompanhadas; direcionar as ações de controle do vetor; avaliar as ações de controle químico. As atividades compreendem o levantamento, investigação e monitoramento de flebotomíneos, conforme metodologias indicadas para cada uma das diferentes áreas (MS 2010).

Em todas as nove localidades estudadas foram capturados triatomíneos da espécie *T. brasiliensis*. A ocorrência desta espécie no estado do Piauí vem sendo registrada conforme mostram Figueiredo *et al.* (1975), Correia-Lima (1976), Camargo *et al.* (1984), Bento *et al.* (1989) e Borges-Pereira *et al.* (2006).

Esses autores registraram também a presença de *T. maculata*, *T. pseudomaculata*, *Rhodnius nasutus* e *T. sórdida*, porém nenhum exemplar foi capturado durante o estudo.

A espécie encontrada, *T. brasiliensis*, é uma das mais prevalentes na região Nordeste. É uma espécie nativa do Brasil e considerada como uma das principais espécies vetores na região Nordeste. Não está restrita a essa região apresentando ampla distribuição nos estados de Goiás, Minas Gerais e Tocantins (Silveira *et al.* 1984, Sarquis 2010). É uma espécie doméstica, ubiquista, com alta infestações em ambiente peridomiciliar (Dias *et al.* 2000) e a com maior potencial de invasão e colonização (Silveira *et al.* 1984).

Ao analisarmos o total de triatomíneos capturados nos dois ambientes, das nove localidades do estudo, observamos que o maior índice de infecção natural foi proporcional ao maior índice de infestação domiciliar (Lagoa da Serra). O local de

captura (domicílio e peridomicílio), não demonstrou influenciar estes valores, discordando dos resultados apresentados por Coura *et al.* em 1996. Contudo, índices de infecção tão reduzidos (1,23) podem não ser representativos.

Em relação ao estágio evolutivo dos triatomíneos capturados, foi verificada uma maior prevalência de espécimes adultos, tanto no intradomicílio (30%) quanto no peridomicílio (70%). Estes valores foram diferentes do estudo realizado por Bento *et al.* (1986) nos municípios de Castelo do Piauí e Pedro II, que apresentou uma predominância de ninfas nestes dois ambientes.

Quanto as capturas de flebotomíneos, a maior prevalência em todas as localidades avaliadas, foi da espécie *Lu. Longipalpis* que é reconhecidamente a espécie de maior importância na transmissão da LV. Também foram identificadas em menor proporção, as espécies *Lu. lenti* (1,3%), *Lu. intermedia* ( 1%) e *Lu. migonei* (0,2%), sendo as duas últimas espécies envolvidas na transmissão da LTA segundo o Ministério da Saúde (2007).

Silva *et al* (2007) realizou um estudo com o objetivo de avaliar a infecção natural de *Lu. Longipalpis* por *Leishmania* sp. em ambiente peridomiciliar na cidade de Teresina. Foram realizadas 180 capturas, sendo obtido um total de 27.540 fêmeas, vinte (1,1%) fêmeas de *Lu. longipalpis* apresentaram formas promastigotas de *Leishmania* sp. Esses resultados estão de acordo com os outros trabalhos realizados no Brasil, que encontraram positividade variando em torno de 1% (Miranda 2002).

Não há evidência de correlação entre os fatores temperatura, umidade relativa do ar e a proporção de insetos capturados, provavelmente justificado pela baixa variação das medidas observadas.

Deane & Deane (1957) descreveu que a espécie *Lu. Longipalpis* embora mais freqüente nos abrigos de animais domésticos, é numerosa no interior das habitações, entretanto neste estudo não foram capturados flebotomíneos na área intradomiciliar em nenhuma das 9 localidades.

Não foi observada diferença quantitativa de captura nos dois tipos de armadilhas utilizadas (HP e Shannon), quando avaliados os percentuais gerais. Porém, ao analisarmos estas formas de capturas por localidade, verificamos que as localidades em que houve captura nas armadilhas de Shannon, não houve capturas nas armadilhas HP e vice-versa.

A avaliação de infecção natural nos flebotomíneos capturados, demonstrou a presença de infecção natural em três das 9 localidades avaliadas e um índice de infecção natural na região (13%) significativamente mais elevado do que os valores apresentados em outros estudos como os realizados por Silva *et al.* (2007) e por Miranda (2002), que encontraram positividade variando em torno de apenas 1%.

### 5.3 Fonte Alimentar

Cinquenta e duas amostras não reagiram com qualquer um dos anti-soros testados, o que sugere que estes espécimes se alimentaram de outros vertebrados para os quais o anti-soro não foi testado ou que o conteúdo no estômago destes insetos não estava disponível. Apesar da detecção de algum conteúdo no intestino do inseto, muitas vezes não foi possível identificar a fonte alimentar específica devido os resíduos estarem em estágios avançados de digestão e com isso causando uma redução da sensibilidade do ensaio.

Provavelmente o expressivo percentual apresentado para a identificação das aves como principal fonte alimentar se dê pela constante presença destes animais nas residências (intra e peridomiciliar) e por seus hábitos de montar ninhos e chocar seus ovos o que facilita e aumenta a oportunidade de contato com o vetor. Sarquis *et al.* (2010) em estudo realizado com a espécie *T. brasiliensis* no estado do Ceará também demonstram o maior percentual (44,4%) de reagentes para aves mesmo em populações capturadas em ambiente silvestre.

Alencar (1987) observou, corroborando com nossos resultados, que as galinhas e ovinos foram as principais fontes alimentares de *T. brasiliensis*. O autor também encontrou uma taxa muito baixa de reatividade ao anti-soro de roedor, similar aos nossos dados em São João do Piauí.

Observou-se neste estudo, que ovinos aparecem como segunda fonte principal na manutenção do ciclo de triatomíneos nas localidades estudadas correspondendo a 15,64 % (17 de 92 amostras reagentes). Esta espécie, bem adaptada ao semiárido nordestino se configura em uma importante fonte de repasto sendo frequentemente observada a colonização por triatomíneos nos ambientes de criação de ovinos.

Resultados apresentados por Coutinho *et al.* (2014) em estudos realizado no município de Russas, estado do Ceará, onde a espécie *Triatoma brasiliensis*

também predominou, demonstram um índice de infestação em abrigos de ovelhas e cabras de 21,9% na localidade estudada (7 de 32 abrigos analisados). Em abrigos de bovinos e cavalos esses autores não observaram colonização (zero de 22 abrigos). Estes dados sugerem nesta localidade também um comportamento preferencial de proximidade com ovinos.

Segundo dados do IBGE de 2012, 55,4% do rebanho ovino brasileiro encontra-se na região nordeste. O estado do Piauí é o quarto colocado em número de animais nesta região e o quinto colocado nacionalmente. Certamente, os ovinos são um elo importante da manutenção da cadeia de transmissão da doença de Chagas no estado e na região.

Cães foram a terceira fonte alimentar mais frequente (2,7%), sendo observado a alimentação nesta fonte somente na localidade de Lagoa da Serra e sempre associada a positividade para ave e ovelha. Das cinco amostras que apresentaram positividade para esta fonte, três foram capturadas no intradomicílio.

Três amostras analisadas também procedentes de Lagoa da Serra, apresentaram reatividade para sangue humano, sendo que uma das amostras coletada em triatomíneo capturado no intradomicílio apresentou positividade somente para esta fonte, e nas demais a alimentação estava associada também ao sangue de ave e ovelha.

Estes resultados corroboram o que foi observado com relação as características das UH visitadas, onde os animais circulavam livremente nas áreas peri e intradomiciliares muitas vezes permanecendo nesta última. Este comportamento contribui para o transporte (no caso das galinhas e seus ninhos) e a colonização dos domicílios pelos triatomíneos.

#### **5.4 Infecção por *T. cruzi* e leishmaniose em cães**

Em todos os casos os cães mantinham íntima relação com outros animais como galinhas, suínos, caprinos, ovinos, cães e gatos.

Os resultados da pesquisa de anticorpos anti - *T. cruzi* e anti-*Leishmania* em amostras de sangue dos cães indicam a circulação destes dois parasitas, uma vez que foi detectada a positividade de ambos.

Apesar da constatação da presença de *Leishmania* spp. na região estudada, nenhum animal apresentou sinais característicos da TA e da LV neste estudo, o que



reforça os resultados apresentados por Santana *et al.* (2012) onde cães infectados naturalmente por *T. cruzi* no semiárido nordestino apresentam características relacionáveis a forma crônica indeterminada, ou seja, cães assintomáticos. Na LV, geralmente a maioria dos cães são assintomáticos em área endêmica.

Como já descrevemos anteriormente, o município de SJPI não possui dados sobre a Leishmaniose canina (Comunicação Pessoal - Secretária de Saúde do município). O município nunca realizou senso ou inquérito sorológico dos animais, e não possui registros do diagnóstico da doença na região, o que justifica a falta de notificação nos centros de Controle de Zoonoses.

Observamos valores significativos de prevalência 7,7% e 7%, para TA e LV respectivamente, quando usado o protocolo do MS para diagnóstico, que utiliza 2 técnicas sorológicas diferentes (ELISA/IFI para TA e DPP/ELISA para LV). Almeida *et al.* (2009) e Medes *et al.* (2013) demonstraram soroprevalência menor para TA (3,4% e 4,08%) em trabalhos realizados em Cuiabá/MT e na zona rural do município de Patos.

Entretanto, quando comparamos nossos resultados com outros autores, para a pesquisa de Leishmaniose e para TA (Sousa *et al.* 2009), podemos dizer que encontramos resultados muito reduzidos.

Vale ressaltar que os valores descritos por Souza *et al.* (2009) foram baseados na técnica de IFI e resultados divergentes foram apontados quando utilizadas outras técnicas diagnósticas. Apenas 13% das amostras reagentes na IFI, foram coincidentes para o teste imunocromatográfico. Isso ressalta que a escolha da técnica diagnóstica é determinante para uma funcional associação entre os valores de prevalência.

A técnica de IFI, que foi inicialmente desenvolvido para testes sorológicos em infecção por *T. cruzi* e é um bom teste quanto à sua sensibilidade. No entanto, assim como a subjetividade das leituras, frequentemente apresenta reações cruzadas com outras doenças, especialmente com títulos de 1/40 e 1/80. O teste de ELISA desenvolvido por Voller *et al.* apresenta sensibilidade semelhante à de IFI, com a vantagem da possibilidade de leitura automática. Isto evita a subjetividade e torna possível a aplicação do teste em um grande número de amostras de forma mais rápida, como é feito em bancos de sangue (Coura & Borges 2012).

Nosso estudo também apresentou resultados diferentes, quando comparamos algumas técnicas sorológicas. O teste rápido foi o que apontou o maior

percentual (38%) de sororeagentes em nosso estudo, divergindo do encontrado por Santos *et al.* (2010).

O achado parasitológico de *Trypanosoma caninum* neste estudo, foi obtido pelo isolado de pele íntegra. A presença de *T. caninum* pode ser outro fator de confusão no diagnóstico porque reatividade cruzada em soros é comum entre diferentes membros da família Tripanosomatidae. Esse resultado reforça a importância de estudos relacionados ao encontro e a epidemiologia dessa nova espécie como discutido por Barros *et al.* (2012).

Não foi possível evidenciar a infecção de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. nos cães domésticos através da cultura parasitológica, entretanto a soroconversão nos testes das duas doenças contribui junto com a alta densidade de vetores, para o elevado número de casos humanos na região. Outros autores (Duprey *et al.* 2006; Kjos *et al.* 2008) corroboram com esta versão e apresentam relatos de cães infectados por *T. cruzi* no sudeste dos Estados Unidos, que têm sido associados com a transmissão doméstica da infecção humana. Assim como, em Mott *et al.* (1978) demonstrou que a soropositividade em seres humanos foi cinco vezes maior em casas habitadas por cães e gatos infectados do que em casas onde não haviam animais domésticos parasitados.

Todos os cães da área estudada demonstram estarem expostos ao ciclo de transmissão da Tripanossomíase Americana e das Leishmanioses, condição essa reforçada pelo registro de cães positivos em todas as unidades habitacionais amostradas. É importante ressaltar que foi possível observar 0,3% (4) de animais copositivos para *T. cruzi* e *Leishmania* spp., o que configura a possível reação cruzada de resultados obtidos nos ensaios sorológicos que são preconizados pelo MS para o diagnóstico das duas doenças.

Infelizmente a ausência de dados anteriores em cães nesta região nos impedem de realizar uma comparação para avaliarmos o incremento ou a redução do risco de transmissão para a população humana.

Em áreas endêmicas da doença de Chagas, como é o caso do município de SJPI, assim como outras áreas em que haja a sobreposição de ação do *T. cruzi* e *Leishmania* spp., os ensaios diagnósticos de rotina devem ser sempre avaliados com muita cautela possivelmente se utilizando de ferramentas mais precisas, como é o caso das técnicas moleculares.

A tentativa de isolamento do *T. cruzi* por meio do xenodiagnóstico resultou em positividade para apenas um cão, em 1 triatomíneo da espécie *Panstrongylus megistus*. Este cão também apresentou resultados reagentes para todos os ensaios sorológicos realizados, tanto pra TA quanto para Leishmaniose. O material do trato digestivo do espécime positivo na visualização ao microscópio óptico, foi fixado e corado em lâmina com visualização positiva de características morfológicas da espécie. A análise molecular por PCR também foi efetuada para fins comprobatórios e corroborou com as identificações visuais. O material semeado em meio de cultura para expansão de massa parasitária não foi eficiente, reduzindo exponencialmente após o terceiro repique. Quanto ao inoculado em camundongo, não foi verificada a infecção podendo ser justificado pela maturidade da cobaia utilizada, apesar das técnicas de imunossupressão realizadas.

### **5.5 Infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* spp. em humanos**

A importância epidemiológica da região nordeste na manutenção e controle da DC é bastante conhecido e amplamente demonstrada em estudos realizados na região (Dias *et al.* 2000; Borges-Pereira *et al.* 2002; Silveira *et al.* 2011; PAHO 2014). Em 1984, Camargo *et al.*, publicaram o primeiro inquérito de soroprevalência da doença no âmbito nacional entre os anos de 1975 e 1980, e em 2011, Silveira *et al.* detalhou estes resultados em sua distribuição geográfica, onde o estado do Piauí superou em muito o esperado na avaliação da estimativa de prevalência no país, ocupando o sexto lugar, com 4,04 soropositivos por cada cem habitantes.

Dados obtidos em estudo realizado por Borges-Pereira *et al.* (2006) ao serem comparados com os apresentados durante o inquérito sorológico nacional (1975-1980) mostraram significativa queda da soroprevalência da infecção chagásica no Estado do Piauí (4,04% para 1,9%), indicando uma provável eficácia das medidas de controle vetorial implementadas no período 1975-2002.

Entretanto, a soroprevalência humana da infecção chagásica especificamente na XI Regional de Saúde São João do Piauí, apresentou 216 resultados soropositivos pelo RIFI em 2.399 moradores examinados, um percentual de 5,3% soropositivos. Quando comparado as outras regionais estudadas, este percentual se coloca acima da média apontada pelo autor, principalmente ao analisarmos individualmente o município, que demonstrou estar ainda mais acima da média

esperada, apresentando 11,6% de sororeagentes para DC (Borges-Pereira *et al.* 2002).

Estes dados se mostram em congruência aos valores apresentados em nosso trabalho, onde a soroprevalência de DC encontrada nos moradores do município foi de 7% para os ensaios ELISA e ELISA/IFI.

Fortalecendo estes dados, Gomes *et al.* (1991) observou a prevalência sorológica humana da DC no município de São Raimundo Nonato, município vizinho a São João do Piauí, nas localidades do sítio do Mocó e Borda e observou taxas de 2,07 e 8,62% respectivamente.

A ocorrência de casos de leishmanioses, principalmente nas áreas das Regionais de Saúde de Parnaíba, Barras, Piri-piri, Teresina e Campo Maior (norte do estado), pode determinar reações cruzadas no teste de IFI utilizado na pesquisa, superestimando os valores das prevalências para essas áreas.

Considerando as definições de positividade, 5% dos moradores da região estudada demonstraram resultados positivos na sorologia (ELISA e IFI) para leishmaniose. Ao discriminarmos estes valores por técnica aplicada, observamos que 15% foram reagentes no ensaio sorológico ELISA e 6% foram reagentes nos ensaios de IFI nos títulos de 1:80.

A influência da reação cruzada na prevalência das infecções é possivelmente apresentada pelos valores de co-positividades de 5,3%, o que significa que 14 indivíduos se mostraram positivos em todos os ensaios realizados tanto para DC quanto para leishmaniose.

O exame de xenodiagnóstico foi aplicado em todos os moradores que apresentaram resultados reagentes nas duas técnicas sorológicas empregadas. O exame funcionou como uma ferramenta, na tentativa de minimizar a influência de reações cruzadas e atuar na avaliação confirmatória para os casos de DC. Este procedimento se mostrou eficiente visto que o índice de infecção encontrado foi de 65%.

Outra ferramenta que poderia nos auxiliar nesta discussão, seriam as técnicas moleculares que são muito dispendiosas, especializadas e demoradas. Optamos por nos utilizar de técnicas mais fáceis, menos onerosa e que atuam funcionalmente nas redes públicas de saúde.

## 6 CONCLUSÕES

1. Com este trabalho foi promovida uma conscientização e educação da população local com relação às zoonoses, assim como o treinamento da equipe de saúde local para a captura de vetores e coleta de amostras caninas;
2. O modelo predominante de construção das casas estudadas é o de paredes de tijolos sem reboco e com telhas o que permite e facilita a infestação dos triatomíneos. Corroborando com a literatura, um total de 53% das unidades habitacionais estudadas, apresentaram-se positivas na captura do vetor no domicílio e na associação de domicílio/peridomicílio.
3. O índice de infestação domiciliar de triatomíneos apresentados neste estudo é 47%, sendo 100% dos triatomíneos pertencentes a espécie *Triatoma brasiliensis* e um índice de 77% para flebotomíneos, sendo 98% da espécie *Lu. longipalpis*, principais vetores das duas doenças na região nordeste.
4. A avaliação do índice de infecção natural dos vetores capturados no estudo aponta percentuais de 13% para os flebotomíneos e de apenas 0,3% para *T. cruzi*, indicando a circulação dos parasitos nesta região;
5. Durante a avaliação canina, não foram achados sinais característicos de TA ou LVC/LTC. Entretanto 7% dos cães estudados se mostraram positivos para LVC/LTC e 7,7% para TA, segundo critérios de ensaios estabelecidos pelo MS. A ausência de sintomas patognomônicos nos cães dificulta a suspeita diagnóstica mas não caracteriza a ausência da infecção. O índice de co-positividade foi de 0,3% apontando uma reação cruzada reduzida nos ensaios realizados;
6. Ensaios parasitológicos caninos demonstraram percentuais de 2,3% de positividade para *T. cruzi* ao exame de xenodiagnóstico. Estes resultados apoiam a baixa sensibilidade (30%) do exame citado em literatura.
7. Um percentual 2,3% foi positivo para cultura de pele íntegra para a espécie *T. caninun*, atestando a presença deste parasito pela primeira vez nesta região.
8. Os ensaios sorológicos preconizados pelo MS para diagnóstico de DC e LVH/LTA em humanos, demonstraram uma prevalência de 5% para

leishmaniose e de 7% para DC nos moradores da região demonstrando que as duas doenças estão presentes e acima da média registrada para o Estado do Piauí.

9. O exame de xenodiagnóstico confirmou 65% dos diagnósticos para *T. cruzi*, indicando que a taxa de co-positividade (69%) nos moradores sororeagentes se deve provavelmente, em seu maior percentual, a uma reação cruzada devido a presença de anti-*T. cruzi* circulante na população.
10. A análise de fonte alimentar dos triatomíneos mostrou ecletismo de espécies, demonstrando que o vetor mantém seu ciclo de vida por meio da alimentação nestas espécies, com predileção pelas aves.
11. A confirmação por sorologia de fonte alimentar dos triatomíneos capturados em cão e humano, associados aos ensaios sorológicos e parasitológicos positivos nos cães e moradores das UH estudadas, sugerem a ação dos cães domésticos como reservatórios e mantenedores da DC nesta região.

## 7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste estudo temos o propósito de verificar, por meio de ensaios moleculares a genotipagem das cepas de *T. cruzi* circulantes na região. Desta forma fortaleceremos a sugestão do cão como reservatório para a transmissão da doença de Chagas.

Realizar o teste de fonte alimentar nos flebotomíneos das 9 localidades estudadas para reforçar a importância do cão como reservatório e sentinela na leishmaniose visceral no município.

Manter a captura e a análise entomológica e de infecção, de triatomíneos e flebotomíneos nas localidades. Tais abordagens possibilitarão investigar e identificar biomarcadores de progressão nas leishmanioses e na DC, permitindo melhor compreensão dos perfis de resistência e suscetibilidade e até mesmo a proposição de medidas de vigilância epidemiológica.

Manutenção da parceria com o município de São João do Piauí, principalmente com o serviço de saúde local, auxiliando na instrução e no planejamento da vigilância epidemiológica.

Realizar uma avaliação epidemiológica geográfica, utilizando os dados coletados por georreferenciamento das unidades habitacionais amostradas.

Trabalhar todos os dados clínicos e epidemiológicos que foram coletados nos questionários, com o objetivo de produzir um trabalho maior, visto a riqueza de dados coletados e que não foram analisados, visando auxiliar o entendimento destas questões no município de São João do Piauí.

## 8 ARTIGOS PUBLICADOS

### 8.1 Artigo 1

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo  
2016;58:79  
<http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201658079>

#### ORIGINAL ARTICLE

### PREVALENCE OF AMERICAN TRYPANOSOMIASIS AND LEISHMANIASIS IN DOMESTIC DOGS IN A RURAL AREA OF THE MUNICIPALITY OF SÃO JOÃO DO PIAUÍ, PIAUÍ STATE, BRAZIL

Taliha Dias PEREZ(1), Fabiano Borges FIGUEIREDO(2), Artur Augusto Mendes VELHO JUNIOR(2), Valmir Laurentino SILVA(3),  
Maria de Fátima MADEIRA(4), Reginaldo Peçanha BRAZIL(1) & José Rodrigues COURA(1)

#### SUMMARY

Chagas disease and the leishmaniasis are endemic zoonoses of great importance to public health in the state of PiauÍ, Brazil. The domestic dog (*Canis familiaris*) is a major reservoir, host of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in both urban and rural areas, playing an important role in the transmission of these parasites. The present study evaluated the prevalence of both infectious diseases in dogs of a rural area in the municipality of São João do PiauÍ, PiauÍ State. One hundred twenty-nine blood samples were collected for serological assessment: for the leishmaniasis, 49 (38%) animals tested positive by the Dual-Path Platform technology (DPP), nine (6%) by the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), and 19 (14.7%) by the Indirect Fluorescent Antibody test (IFA); while for American Trypanosomiasis, 36 (28%) dogs were reagent by ELISA and 21 by IFA. Of the 129 dogs sampled, 76 were submitted to xenodiagnosis, bone marrow aspiration and skin biopsy to perform parasitological tests whose results showed only one (2.3%) positive skin sample for *Trypanosoma caninum* and one positive xenodiagnosis for *T. cruzi*, both results confirmed by molecular assays. Three hundred triatomines of the species *Triatoma brasiliensis* and 552 phlebotomines - 509 (97%) of the species *Lutzomyia longipalpis*, were also captured.

**KEYWORDS:** Chaga's disease; *Trypanosoma cruzi*; Leishmaniasis; Canine reservoir; São João do PiauÍ.

#### INTRODUCTION

Chagas disease (CD) as well as the leishmaniasis are chronic, systemic diseases that are considered by the World Health Organization (WHO) and the Pan American Health Organization (PAHO) as neglected tropical diseases. The term 'neglected' highlights that these diseases affect poor and marginalized populations, especially in low-resource settings<sup>1</sup>.

American Trypanosomiasis (AT), also called Chagas disease, is a zoonosis produced by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, and it is transmitted to humans by three different triatomine genera: *Triatoma*, *Rhodnius* or *Panstrongylus*, mainly by the vector through contact with infected feces<sup>2,3</sup>. Mammals are natural reservoirs of the parasite, and they play a key role in the maintenance and interaction of the domestic and sylvatic cycles of Chagas infection<sup>4,5</sup>. Persistence of parasitemia in dogs provides them with the opportunity to infect triatomines, then humans, and they have been used as efficient natural sentinels to assess *T. cruzi* reinfections<sup>6-8</sup>.

The leishmaniasis are zoonoses that affect humans and other species

of wild and domestic mammals with diverse clinical manifestations. They are caused by protozoa of the genus *Leishmania*, and their main form of transmission occurs through the bite of insect vectors of the Phlebotominae subfamily<sup>3,9,10</sup>. Dogs are admittedly the main reservoirs of Visceral Leishmaniasis (VL), with a strong positive association between areas of major concentration of human VL and places with high prevalence of seropositive animals<sup>11</sup>.

The World Health Organization (WHO) relies on two main stays for the control and elimination of Chagas disease: interruption of transmission and care to patients. Efforts to reduce transmission include mainly the interruption of intra-domiciliary vectorial transmission<sup>12</sup> and the identification of domestic reservoir hosts. The main tools used by the Brazilian Visceral Leishmaniasis Control and Surveillance Program are canine surveillance measures that comprise the investigation of the focus, the active search for symptomatic dogs, and monitoring, which includes sample and census serological surveys<sup>13</sup>.

Both in Chagas disease and in the leishmaniasis, the domestic dog is a risk factor for the population health, because it can be a source of

(1) Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Laboratório de Doenças Parasitárias. Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mails: talihavet@gmail.com; brazil.reginaldo@gmail.com; coura@ioc.fiocruz.br  
(2) Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (FIOCRUZ), Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses. Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mails: fabiano.figueiredo@ini.fiocruz.br; artur.velho@ini.fiocruz.br

(3) Escola Nacional de Saúde Pública (FIOCRUZ), Setor Imunodiagnóstico do Laboratório de Pesquisa e Serviço em Saúde Pública do Departamento de Ciências Biológicas. Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: valmir@ensp.fiocruz.br

(4) Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (FIOCRUZ), Laboratório de Vigilância em Leishmanioses. Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: fatima.madeira@ini.fiocruz.br

**Correspondence to:** Taliha Dias Perez, Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Brasil 4365 Manguinhos 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel.: 55.21.2562-1204; 55.21.99625-0054. E-mail: talihavet@gmail.com



infection by *T. cruzi* and *Leishmania* spp. to humans, and the close contact between them, especially when dogs are kept indoors during the night, can significantly intensify the transmission of disease to human beings<sup>14</sup>. The interchanges among sylvatic, peridomestic and domestic cycles of the disease performed by these pets increase the contact with vector species and, consequently, the risk of vectorial infection or oral infection through the hunting and eating of wild animals<sup>14</sup>. Persistence of parasitemia in dogs provides them with the opportunity to infect triatomines, then humans, and they have been used as efficient natural sentinels to assess *T. cruzi* reinfections<sup>6-8</sup>.

Camargo *et al.* (1984)<sup>15</sup> carried out the first study on Chagas infection with nationwide reach. This survey included data collected between 1975 and 1980, and indicated that the state of Piauí, among others, presented sparse entomological data and the record of a few cases of infection<sup>16</sup>.

Evidence of infection with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in domestic dogs can be a good indicator of circulation and risk of human infection. The mere occurrence of triatomines and infected canine reservoirs in human dwellings hypothesizes the risk of transmission of Chagas disease and leishmaniasis.

## MATERIAL AND METHODS

### Study Area

The municipality of São João do Piauí (SJPI) belongs to the 11<sup>th</sup> Sanitary Region of Piauí State; it is located in the southeast region of the state, along the banks of the Piauí river, 450 km from the state capital - Teresina. Its economy is concentrated in family farming and livestock and, more recently, in commerce; SJPI is one of the most important cities in the south of Piauí State (Fig. 1).



Fig. 1 - Map

Covering an area of 1,527,773 km<sup>2</sup>, the municipality of SJPI has a population of 19,553 inhabitants, with 6,083 residents living in rural areas<sup>17</sup>.

### Sampling

A cross-sectional study was conducted on a convenience sample, through active search for dogs in the rural area of the municipality, between December 2013 and July 2014.

For this survey, dogs that lived in the area longer than six months, aged eight months or older, were included in the study after the informed consent of owners. Only blood sampling was performed in animals that did not present good general health or conditions to sedation, as well as in pregnant bitches, aggressive dogs and stray dogs. The procedures used in this animal study, were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA- FIOCRUZ), under the license number LW-43/10.

The dogs (76) were sedated with ketamine hydrochloride (10 mg/kg) associated with acepromazine maleate (0.2 mg/kg) and submitted to physical examination, blood collection, bone marrow aspiration and biopsy of intact skin fragments obtained from the scapular region. Xenodiagnosis was also conducted at this moment.

Dog blood samples (129) were collected by puncture of the cephalic vein, without anticoagulant, for the performance of serological tests.

For collection of skin fragments through biopsy (76), trichotomy was performed using disposable stainless steel blades, antiseptis and local anesthesia with 2% lidocaine without vasoconstrictor. Two intact skin fragments of the scapular region of each animal were collected using a 3-mm punch for parasitological tests. The fragments were stored in sterile physiological saline with antifungal and antibiotics for further processing in culture.

Bone marrow aspirates (76) were obtained from the sternum manubrium, using a 20 mL syringe with a 40x12 mm needle, after trichotomy, antiseptis and local anesthesia with 2% lidocaine. Approximately 0.2 mL of the sample obtained in the aspirate was placed in a tube containing culture medium.

### Capture of insect vectors

Three trained and experienced endemic surveillance agents conducted an active search for triatomines in the domiciliary and peridomestic areas of the participating residences between December 2013 and July 2014. The specimens captured were placed and transported in plastic vials with screw caps with small holes, containing filter paper cut and folded into an accordion shape. Each vial contained an identification label with the registration number of the residence, date, and place of collection (domiciliary or peridomestic area).

Collection of phlebotomines was conducted from June to July 2014, with CDC light traps, between 5 pm and 6:00 am, totaling 27 hours of capture time. Each light trap was positioned 1½ meter above the ground, and were installed in the three different ecotopes (domestic, peridomestic and sylvatic). Shannon type traps mounted approximately 20 to 30 cm off the ground were also used; a battery lantern was utilized to attract

the sandflies. The insects were captured by hand vacuum aspirators and stored in vials containing alcohol 70 GL.

#### Serologic Assays

The following tests were employed in the diagnosis of Visceral Leishmaniasis (VL): Indirect Fluorescent Antibody test (IFA), using *L. (L.) chagasi* promastigotes as antigens, following the methodology described by Camargo & Rebonato (1969)<sup>12</sup>; Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Dual-Path Platform technology (DPP®), using commercial kits produced by BioManguinhos (FIOCRUZ; Rio de Janeiro, Brazil), distributed through the public health system.

The following tests were used in the diagnosis of American Trypanosomiasis (AT): Chagatest ELISA recombinant version 3.0 (Wiener lab.) with anti-human IgG antibody replaced with anti-dog IgG (Sigma-Aldrich); and an in-house IFA protocol standardized by the Immunodiagnostic Department of the Public Health Research and Service Laboratory (ENSP/FIOCRUZ)<sup>12</sup>.

#### Parasitological test

Twenty triatomine fourth-instar nymphs, ten nymphs of the *Panstrongylus megistus* species and ten of the *Triatoma infestans* species were used in the xenodiagnosis. These nymphs were placed in wooden boxes, with filter paper cut and folded into an accordion shape, covered with tulle, and fastened with rubber bands. Each box was labeled with the triatomine species, dog registration number, name and date.

Two boxes (one of each type) were placed on the abdomen of the animals for a 30-minute repast. After blood feeding, the nymphs that fed (which presented distended abdomen) were selected and placed in a new container. These nymphs received supplementary chicken blood (*Gallus gallus*) feeding, 15 days after the test, in order to maintain *T. cruzi* in the kissing bug.

When the xenodiagnosis was positive, the material was seeded in Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) culture medium for isolation and identification by a molecular technique (Polymerase chain reaction - PCR)<sup>18</sup>.

Parasite visualization was performed in the triatomines following the protocol of the Laboratory of Parasitic Diseases of Instituto Oswaldo Cruz - IOC, also based on the Training Manual on *Trypanosoma cruzi* Detection<sup>19</sup>.

Identification of isolates of *Trypanosoma caninum* characteristic forms were categorized according to Pinto *et al.* (2014)<sup>20</sup>.

Immediately after biopsy, the tissue samples (skin and skin lesions) were dipped in PBS solution, pH 7.4, supplemented with antibiotics (penicillin and streptomycin) and antifungal (fluorocytosine), and kept at 4 °C for 24 h. After this period, the samples were seeded in biphasic NNN culture medium containing Schneider medium supplemented with 10% fetal bovine serum as liquid phase. Approximately 0.2 mL of OM, obtained by puncture was seeded directly into the culture medium. The cultures were kept in organic greenhouse at 26-28 °C; they were examined weekly for 30 days by fresh examination in search for flagellate forms.

## RESULTS

None of the animals investigated showed characteristic signs of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL), such as hepatomegaly, splenomegaly, skin lesions, cachexia, apathy, onychogryphosis, local and generalized alopecia, edema of the limbs, or regional adenitis.

#### Serology - Leishmaniasis

One hundred twenty-nine (129) dog serum samples were analyzed: 49 of them (38%) were positive by DPP, nine (6%) by ELISA and 19 (14.7%) by IFA (Table 1).

**Table 1**  
Results of the serological tests for *Leishmania* sp.

Assays	Reagent	Non-reagent	Total
DPP	49 (38%)	80	129
ELISA	09 (7%)	120	129
IFA	19 (14.7%)	110	129
DPP and ELISA	09 (7%)	120	129
ELISA and IFA	06 (4.6%)	123	129
DPP, ELISA and IFA	06 (4.6%)	123	129
<b>Total</b>	<b>98 (75.9%)</b>	<b>676</b>	

Of the 129 samples, six (4%) were positive in all serological tests performed for *Leishmania* sp. and nine (7%) were positively concordant in the tests advocated by the Ministry of Health (MH) (DPP and ELISA).

#### Serology - American trypanosomiasis

One hundred twenty-nine (129) dogs were analyzed: 36 (28%) were positive by ELISA and 21 (16.3%) by IFA.

Of the 129 specimens analyzed, 10 (7.7%) showed agreement in the two (2) tests (Table 2). Considering the condition of two positive serological results: DPP and ELISA for Leishmaniasis, and ELISA and IFA for American trypanosomiasis, a co-positivity rate of 0.3% was observed, i.e., of the 15 animals with positive results for either one of the two conditions, only four were coincident for AT and VL.

**Table 2**  
Results of the serological tests for *T. cruzi*

Assays	Reagent	Non-reagent	Total
ELISA	36 (28%)	93	129
IFA	21 (16.3%)	108	129
ELISA and IFA	10 (7.7%)	119	129
<b>Total</b>	<b>67 (53%)</b>	<b>320</b>	

#### Parasitological culture

Only one (2.3%) skin sample tested positive for the species *Trypanosoma caninum*.

In the xenodiagnosis, one (1.4%) animal presented a positive parasitological result for *T. cruzi*, which was confirmed by PCR<sup>21</sup>. This animal also showed positive results in all the serological tests carried out for AT and VL.

#### Taxonomic classification of the vectors

All the triatomines captured (300) belonged to the species *Triatoma brasiliensis*. Five hundred twenty-two phlebotomines of the following species were captured: 509 (97.50%) *Lutzomyia longipalpis*, one (0.2%) *L. migonei*, seven (1.34%) *L. lenti* and five (0.96%) *L. intermedia*.

#### DISCUSSION

The epidemiological importance of the Brazilian northeast region for the maintenance and control of Chagas disease (CD) is well known, and it has been widely demonstrated in studies conducted in the region<sup>1,4,16,22</sup>. In 1984, Camargo *et al.*<sup>15</sup> conducted the first survey on the prevalence of CD at national level between 1975 and 1980; in 2011, Silveira *et al.*<sup>22</sup> detailed these results in their geographical distribution, where the Piauí State far surpassed the expected prevalence estimation in the country, being the sixth most prevalent State, with 4.04 seropositive individuals per one-hundred inhabitants.

Studies on the human seroprevalence of *T. cruzi* infection, specifically in the 11<sup>th</sup> Sanitary Region of São João do Piauí, presented 216 seropositive results by IFA considering the 2,399 residents examined, a percentage of 5.3%. When compared with the other Sanitary Regions studied, this percentage stands well above the average noted by the author<sup>16</sup>.

The municipality of SJPI is defined as an endemic area for CD, it presents an archaic basic structure for the control of this disease, and had only one case of human VL notified in 2014 (Communication of the Municipal Health Secretary). There are no studies providing information on LV either on the human population or on the canine population.

In view of the difficulties in controlling these diseases, the Brazilian Ministry of Health proposes an innovative methodology for surveillance and adopted preventive measures based on a better definition of areas of transmission or risk of transmission.

The new approach aims to incorporate the 'silent' states and municipalities, i.e., without human or canine cases of the disease, in the surveillance, thus aiming to avoid or minimize problems regarding aggravations in areas without transmission<sup>23</sup>.

The lack of characteristic signs and symptoms of AT and VL in the dogs investigated in this study is similar to the results presented by Santana *et al.*(2012)<sup>24</sup>, where naturally infected dogs in the northeastern semiarid region presented characteristics related to the undetermined chronic form, that is, asymptomatic dogs. This difficulty in the identification of naturally infected dogs, with no pathognomonic characteristics of CD and VL, complicates the diagnostic process and the prevention and control measures.

CD and VL are typical examples of organic injuries resulting from anthropic changes in the environment and of discrepant socioeconomic

differences. The protozoa which are the causative agents of these diseases were restricted to sylvatic cycles, circulating among mammals and vectors in the natural environment<sup>25</sup>, and the promiscuity described in this study regarding the interaction between animal species in households and their owners are also factors that increase the risk of transmission of these diseases.

The high levels of prevalence of AT and VL, 77% and 7%, respectively, when the protocol of the Brazilian Ministry of Health that adopts two different serological techniques (ELISA and IFA for AT; DPP and ELISA for VL) for the laboratory diagnosis, exceed the values shown in previous studies<sup>16</sup> for human CD serology.

Unfortunately, the lack of previous data on dogs in this region prevents us from making a comparison to assess whether there has been an increase or a decrease in the risk for the human population.

A study conducted by Mendes *et al.*(2013)<sup>26</sup> with dogs naturally infected by *Trypanosoma cruzi* showed a prevalence of 4.08% in the rural area of the municipality of Patos, located in the semiarid region of the nearby Paraíba State, a significantly lower prevalence in comparison with that found in SJPI (7.7%). The contextualization of the problem and the production of data on these diseases in the municipality of SJPI will bring a better understanding of epidemiological issues and pertinent entomological, political and administrative discussions.

In the present study, we were unable to demonstrate infection by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in domestic dogs by parasitological cultures due to the high contamination rate (60%) in this methodology, which can probably be explained by the very precarious laboratory structure of the municipality, as well as the long distance between sampling housing units.

However, the seropositivity of the tests performed to investigate the two diseases have confirmed, along with the high density of vectors, the high number of human cases in the region. Other authors<sup>27,28</sup> have also reported dogs infected by *T. cruzi* in the southeast region of the USA and these cases have been associated with the domestic transmission of human infection. In 1978, Mott also demonstrated that seropositivity in human beings was five times higher in domiciles inhabited by infected dogs and cats than in those where there were no infected domestic animals<sup>29</sup>. In 2014, Curi *et al.*<sup>30</sup> showed that dogs may be useful as sentinels for zoonotic leishmaniases in areas with uncertain epidemiological status.

Studies in areas of Atlantic forest fragments have presented some significant variables related to dog management and vector attractiveness (presence of other animals) as being negatively associated with seropositivity<sup>30</sup>. However, it was not possible to assess the exposure to risk factors in the dogs of this study because all of them were equally exposed to the same conditions, with access to the household, peridomicile and wild environment, and in close interaction with the other existing animals in the housing units.

The fact that one dog parasitized with *Trypanosoma caninum* was found, reinforces the importance of studies that search for these new species, and also investigate their epidemiology, as others authors have discussed<sup>31</sup>.

The Municipal Health Secretary of SJPI has no records of cases of canine leishmaniasis in its database or notification log, but the region is recognized as endemic for Chagas disease.

All of the dogs in the study area were exposed to the cycle of transmission of American trypanosomiasis and leishmaniasis, a condition that is reinforced by the finding of positive dogs in all the housing units sampled. It is worth mentioning that 0.3% (four) of the animals were co-positive for *T. cruzi* and *Leishmania* spp., which configures a possible cross-reaction of the results obtained in the serological tests recommended by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of both diseases. Nevertheless, even though we know that serological tests are not the most suitable for the confirmation of overlapping infections, the low co-positivity rate observed suggests a good specificity of the methods used.

In endemic areas for Chagas disease, such as the municipality of SJPI, as well as in other areas where there is an overlapping of the action of *T. cruzi* and *Leishmania* spp., routine diagnostic tests must always be evaluated with caution, possibly using more precise tools, such as molecular techniques.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Municipal Secretary of São João do Piauí and its endemic surveillance agents for their support and participation, the Laboratory of Parasitic Diseases (IOC/Fiocruz) and Laboratory for Clinical Research on Dermatozoonoses in Domestic Animals (LAPCLIN-DERMZOO) (INI/FIOCRUZ), the Immunodiagnostic Department of the Public Health Research and Service Laboratory (ENSP/FIOCRUZ), namely Dr. Valmir Laurentino Filho, and to the entire team of the Leishmaniasis Surveillance Laboratory - Vigileish INI/FIOCRUZ for their contribution to this study. The present study was financially supported by UNIVERSAL – MCTI/CNPq Nº 14/2013, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES, and Rio de Janeiro Research Foundation (FAPERJ) - “Jovem Cientista do Nosso Estado” project. Fabiano Borges Figueiredo holds a grant from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development - CNPq for productivity in research.

#### REFERENCES

1. Pan American Health Organization. 10 vector-borne diseases that put the population of the Americas at risk. [cited 2014 Apr 5]. Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=9438&Itemid=1926&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9438&Itemid=1926&lang=en)
2. Amato Neto V, Chieffi PP, Nisida IV, Umezawa ES, Sabino EC, Ruocco RM, et al. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. *Rev Med*. 2000;79:12-26.
3. World Health Organization. Department of Neglected Tropical Diseases. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: WHO; 2013.
4. Dias JC, Machado EM, Fernandes AL, Vinhaes MC. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Cad Saude Publica*. 2000;16 Supl 2:13-34.
5. Lauricella MA, Sinagra AJ, Paulone I, Riarte AR, Segura EL. Natural *Trypanosoma cruzi* infection in dogs of endemic areas of the Argentine Republic. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1989;31:63-70.
6. Castañera MB, Lauricella MA, Chuit R, Gürtler RE. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. *Ann Trop Med Parasitol*. 1998;92:671-82.
7. Estrada-Franco JG, Bhatia V, Diaz-Albiter H, Ochoa-Garcia L, Barbabosa A, Vazquez-Chagoyan JC, et al. Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:624-30.
8. Gürtler RE, Cécere MC, Petersen RM, Rubel DN, Schweiggmann NJ. Chagas disease in north-west Argentina: association between *Trypanosoma cruzi* parasitaemia in dogs and cats and infection rates in domestic *Triatoma infestans*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1993;87:12-5.
9. Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1962;4:198-212.
10. Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica*. 1994;10 Supl 2:359-75.
11. Oliveira CD, 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;17:1231-9.
12. Camargo ME, Rebonato C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Am J Trop Med Hyg*. 1969;18:500-5.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8ª ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
14. Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Supl 1:31-40.
15. Camargo ME, da Silva GR, de Castilho EA, Silveira AC. Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1984;26:192-204.
16. Borges-Pereira J, de Castro JA, da Silva AG, Zauza PL, Bulhões TP, Gonçalves ME, et al. Soroprevalência da infecção chagásica no Estado do Piauí, 2002. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39:530-9.
17. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010: características gerais da população, religião e pessoas com deficiência. [cited 2014 Jan 1]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>
18. Junqueira AC, Chiari E, Whicker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996;90:129-32.
19. Junqueira AC, Gonçalves TC. Curso de capacitação dos microscopistas de malária e dos laboratoristas da rede pública na detecção do *Trypanosoma cruzi* (módulos I, II e III). Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2014. [cited 2016 Jun 2]. Available from: <http://brasil.campusvirtualsp.org/node/198026>
20. Pinto AG, Toma HK, Figueiredo FB, Madeira MF. Evaluation of 18S rDNA PCR assay using skin fragments as a diagnostic test for *Trypanosoma caninum*. *Vet Parasitol*. 2014;205:343-6.
21. Madeira MF, Sousa MA, Barros JH, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology*. 2009;136:411-23.
22. Silveira AC, Silva GR, Prata A. O inquérito de soroprevalência da infecção chagásica humana (1975-1980). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44 Supl 2:33-9.

23. 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.
24. Santana VL, Souza AP, Lima DA, Araújo AL, Justiniano SV, Dantas RP, et al. Caracterização clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* no semiárido nordestino. *Pesq Vet Bras*. 2012;32:536-41.
25. Dias JC, Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1997.
26. Mendes RS, Santana VL, Jansen AM, Xavier SC, Vidal IF, Rotondano TE, et al. Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas canina no semiárido paraibano. *Pesq Vet Bras*. 2013;33:1459-65.
27. Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, et al. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:440-6.
28. Kjos SA, Snowden KF, Craig TM, Lewis B, Ronald N, Olson JK. Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. *Vet Parasitol*. 2008;152:249-56.
29. Mott KE, Mota EA, Sherlock I, Hoff R, Muniz TM, Oliveira TS, Draper CC. *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and cats and household seroreactivity to *T. cruzi* in a rural community in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1978;27:1123-7.
30. Curi NH, Paschoal AM, Massara RL, Marcelino AP, Ribeiro AA, Passamani M, et al. Factors associated with the seroprevalence of leishmaniasis in dogs living around Atlantic Forest fragments. *PLoS One*. 2014;9:e104003.
31. Barros JH, Almeida A, Figueiredo FB, Sousa VR, Fagundes A, Pinto AG, et al. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106:419-23.

Received: 11 February 2015

Accepted: 02 June 2016



## Report of new cases of *Trypanosoma caninum* in Brazil

Tatiana da Silva Fonseca de Oliveira<sup>[1]</sup>, Juliana Helena Silva Barros<sup>[2]</sup>,  
 Taliha Dias Perez<sup>[3]</sup>, Fabiano Borges Figueiredo<sup>[4]</sup>,  
 Artur Augusto Velho Mendes Júnior<sup>[4]</sup> and Maria de Fátima Madeira<sup>[1]</sup>

[1]. Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. [2]. Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. [3]. Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. [4]. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatoozoonoses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

### ABSTRACT

**Introduction:** *Trypanosoma caninum* is a protozoan species recently described in dogs, whose occurrence has been reported in areas of overlap with visceral leishmaniasis. **Methods:** *Trypanosoma* sp. were isolated from nine dogs and characterized by molecular methods. **Results:** PCR and sequencing confirmed the presence of *T. caninum* in all dogs, revealing two new areas of transmission: Barra Mansa and São João do Piauí. **Conclusions:** The nine new cases described, when added to those already published, account for 62 cases of natural infection by *T. caninum* and show the geographical spread of this species to new areas, where other trypanosomatids circulate.

**Keywords:** *Trypanosoma caninum*. São João do Piauí. Barra Mansa.

Domestic dogs are naturally infected with different species of trypanosomatids<sup>(1) (2) (3) (4)</sup>. These animals are of particular interest with regard to the transmission cycle of *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi*, because they are considered reservoirs for both agents and enhancers of transmission in the peridomicile, and consequently a risk factor for the human population<sup>(3) (4)</sup>. *Trypanosoma caninum* is the most recently described species of the *Trypanosoma* genus affecting dogs<sup>(5)</sup>, with 53 cases confirmed in different regions of Brazil<sup>(6)</sup> prior to this present study. The species has unique biological characteristics, including its isolation exclusively from intact skin fragments<sup>(5) (7)</sup> and the presence of aflagellate epimastigote forms in axenic cultures<sup>(8)</sup>. It appears to be nonpathogenic to dogs, in which the infection triggers a mild humoral immune response<sup>(7) (9)</sup>. However, the presence of *T. caninum* in areas overlapping with those affected by canine visceral leishmaniasis (CVL) has been identified as a possible confounding factor for the accurate diagnosis of CVL. Thus, such overlap may have a negative impact on the control of this disease<sup>(6)</sup>. Culture-based testing has been an important tool for the diagnosis of *T. caninum* infection, although recent studies have demonstrated that polymerase chain reaction (PCR)-based tests that amplify specific regions of the 18S ribosomal DNA (rDNA) gene may

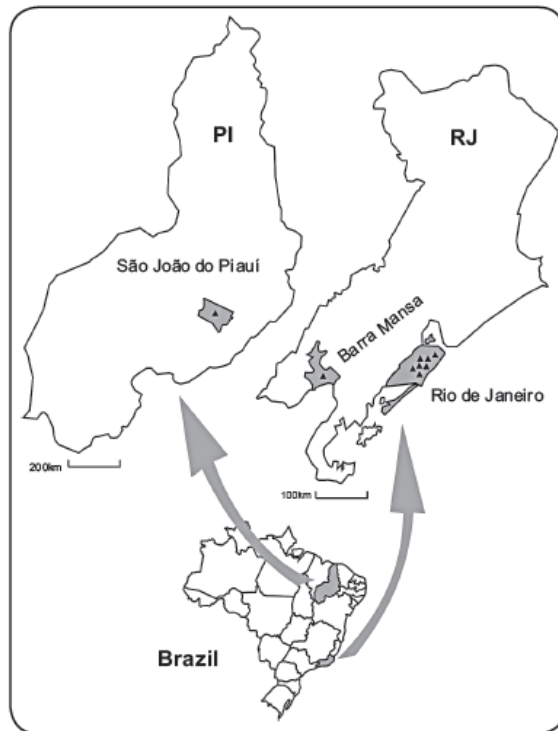
be a valuable additional tool for diagnosis, particularly in areas overlapping with those affected by *Leishmania chagasi*<sup>(10)</sup>.

Herein we report nine new cases of natural infection by *T. caninum* in dogs, in the States of Rio de Janeiro and Piauí. Dogs from areas endemic for Chagas disease in Piauí (municipality of São João do Piauí) and CVL-endemic areas in Rio de Janeiro (municipalities of Barra Mansa and Rio de Janeiro) were evaluated from March 2013 to December 2014.

For clinical examinations and the collection of biological samples including blood, intact skin fragments, lymph nodes, and bone marrow aspirates, dogs were sedated with an intramuscular injection of ketamine hydrochloride (10mg/kg) and acepromazine (0.2mg/kg). All samples were transferred to screw-cap tubes containing blood agar slants (Novy-MacNeal-Nicolle) overlaid with 1.5mL of Schneider's *Drosophila* medium (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum<sup>(5)</sup>. The culture-isolated strains were identified using nested PCR with specific oligonucleotides to amplify a partial region of the 18S rDNA gene. Nucleotide sequences were analyzed as previously described<sup>(6)</sup>. Six months later, an active search for infected dogs was performed with the aim of re-isolating parasites from skin fragments in the same region where the previous isolations were performed.

Nine samples of *Trypanosoma* sp. were isolated from nine dogs and analyzed in this study. The parasites were isolated exclusively from intact skin fragments. The dogs ranged in age from 3-5 years, and all were deemed to be asymptomatic and in good general health. Seven animals were from the municipality of Rio de Janeiro, one from the municipality of Barra Mansa, and another from the municipality of São João do Piauí (Figure 1). All isolates were identified as *T. caninum* and exhibited 100% homology with *T. caninum* sequences from previous studies<sup>(6)</sup>.

**Corresponding author:** Dra. Tatiana da Silva Fonseca de Oliveira. Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses/TNI/FIOCRUZ. Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21040-360 Rio de Janeiro, Brasil.  
 Phone/Fax: 55 21 3865-9541  
 e-mail: tatiana.fonseca@ini.fiocruz.br  
 Received 11 December 2014  
 Accepted 25 February 2015



**FIGURE 1** - Geographic locations of new cases of *Trypanosoma caninum* infection identified in the municipalities of São João do Piauí (PI), Barra Mansa, and Rio de Janeiro (RJ), in Brazil. PI: State of Piauí; RJ: State of Rio de Janeiro.

Six months after the initial isolation, four dogs previously diagnosed with *T. caninum* infection were found and re-evaluated. *T. caninum* was only re-isolated in one of these dogs; the remaining three were negative. The data on animals and samples processed for diagnostic purposes are summarized in **Table 1**, and the distribution of cases of *T. caninum* infection by municipality is shown in **Table 2**.

*Trypanosoma caninum* is a recently described species, and its occurrence has been reported in different States of Brazil<sup>(6)</sup>. Herein, we describe new cases of infection with this agent in two new transmission areas: Barra Mansa, in the State of Rio de Janeiro, and São João do Piauí, in the State of Piauí. All cases of *T. caninum* infection described to date have occurred in CVL-endemic areas, which highlights the need to assess the potential impact of the overlap of these species on CVL control<sup>(6)</sup>. Seven cases described in this study originated in the Atlantic forest region in the municipality of Rio de Janeiro, on the eastern slope of the Pedra Branca massif, in the lowlands in the Jacarepaguá district, where cases of CVL have been described since the 1980s<sup>(11)</sup>. On the other hand, in Barra Mansa, a municipality located in the southern region of the State of Rio de Janeiro, CVL was only recently diagnosed<sup>(12)</sup> and one of the cases described in this study came from this region.

The present study reports, for the first time, a case of *T. caninum* infection in dogs in the municipality of São João do Piauí, which is an endemic area for *T. cruzi*<sup>(13)</sup>. In areas where the endemic diseases overlap, diagnosis using serological tests is unfeasible because their specificity may not be sufficient. The geographical dispersion of *T. caninum* into areas in which other trypanosomatids (*i.e.*, *Leishmania* sp. and *T. cruzi*)

**TABLE 1** - Diagnosis of *Trypanosoma caninum* in nine dogs determined by culture.

Dog number	Sample	Gender	Municipality/State	Culture			
				skin	bone marrow	lymph node	blood
1	A	M	Rio de Janeiro/RJ	+	-	-	-
1	B	M	Rio de Janeiro/RJ	-	ND	ND	ND
2	A	F	Rio de Janeiro/RJ	+	-	-	-
2	B	F	Rio de Janeiro/RJ	-	ND	ND	ND
3	A	M	Rio de Janeiro/RJ	+	ND	ND	ND
4	A	M	Rio de Janeiro/RJ	+	-	-	ND
4	B	M	Rio de Janeiro/RJ	+	ND	ND	ND
5	A	M	Rio de Janeiro/RJ	+	-	-	ND
5	B	M	Rio de Janeiro/RJ	-	ND	ND	ND
6	A	F	São João do Piauí/PI	+	-	ND	-
7	A	M	Barra Mansa/RJ	+	-	-	ND
8	A	M	Rio de Janeiro/RJ	+	-	ND	ND
9	A	F	Rio de Janeiro/RJ	+	-	-	ND

A: culture performed at baseline; B: culture performed after six months; M: male; F: female; +: positive culture; -: negative culture; ND: note done.

**TABLE 2 - Cases of *Trypanosoma caninum* infection (as percentages) by each municipality studied.**

Municipality (State)	Number	Percentage
Rio de Janeiro municipality (RJ)	103	6.8
Barra Mansa municipality (RJ)	234	0.4
São João do Piauí municipality (PI)	80	1.25

RJ: State of Rio de Janeiro; PI: State of Piauí.

circulate is a phenomenon that should be acknowledged and duly considered during diagnostic and epidemiological surveillance studies and interventions in these regions.

Our results are concordant with those previously published in the literature, in that to date *T. caninum* infection has only been found in intact skin fragments, as assessed by culture and PCR-based tests<sup>(7)</sup> (10). Moreover, the absence of clinical signs in the dogs studied, and the re-isolation of *T. caninum* in only one of the four dogs re-evaluated months later support the hypotheses that infection with this agent is asymptomatic, and can be transient<sup>(7)</sup>. The nine new cases described in this study, when added to those already published<sup>(6)</sup>, constitute a total of 62 cases of natural *T. caninum* infection reported in six states of Brazil. The identification of these new isolates, in addition to improving the knowledge-base with regard to the geographical distribution of this species in Brazil, is a warning sign for the relevant epidemiological surveillance sectors in the municipalities of Barra Mansa and São João do Piauí.

#### Ethical considerations

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Oswaldo Cruz Foundation [*Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz* (CEUA/FIOCRUZ), license LW-54/13].

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Arlene BM Paula Ferreira de Almeida for her inestimable help with preparation of the map. We also thank Genomic Platform-DNA Sequencing (PDTIS-FIOCRUZ) for assistance with the sequencing of the samples in this study.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### FINANCIAL SUPPORT

The present study was partially financed by the National Council of Research Development [*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) - Program PAPES VI, process 407700/2012-9] and Research Support

Foundation of Rio de Janeiro State [Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) - Program Young Scientist from our State, process E26/201.537/2014]. Maria de Fatima Madeira and Fabiano Borges Figueiredo hold a grant from CNPq for their productivity in the research.

#### REFERENCES

1. Franke CR, Greiner M, Mehlitz D. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). *Acta Trop* 1994; 58:159-169.
2. Pifano F, Penálver LM, Medina R, Dominguez E. La infección natural del perro por el *Trypanosoma rangeli*. Primera comprobación de un reservorio extra humano vertebrado del protozoario en la naturaleza. *Gac Med* 1948; 56:130-134.
3. Dantas-Torres F. Canine leishmaniasis in South America. *Parasit Vectors* 2009; 2:1-8.
4. Enriquez GF, Bua J, Orozco MM, Wirth S, Schijman AG, Gürtler RE, et al. High levels of *Trypanosoma cruzi* DNA determined by qPCR and infectiousness to *Triatoma infestans*: support dogs and cats are major sources of parasites for domestic transmission. *Infect Genet Evol* 2014; 25:36-43.
5. Madeira MF, Sousa MA, Barros JH, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology* 2009; 136:401-413.
6. Barros JHS, Almeida ABPF, Figueiredo FB, Sousa VRF, Fagundes A, Pinto AGS, et al. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106:419-423.
7. Madeira MF, Almeida ABPF, Barros JHS, Oliveira TSF, Sousa VRF, Alves AS, et al. *Trypanosoma caninum*, a new parasite describe in dogs in Brazil: Aspects of natural infection. *J Parasitol* 2014; 100:231-234.
8. Barros JHS, Fonseca TS, Macedo-Silva R, Côrte-Real S, Toma HK, Madeira MF. Aflagelar epimastigote forms are found in axenic culture of *Trypanosoma caninum*. *Acta Trop* 2014; 137:147-151.
9. Alves AS, Mouta-Confort E, Figueiredo FB, Oliveira RVC, Schubach AO, Madeira MF. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Res Vet Sci* 2012; 93: 1329-1333.
10. Pinto AGS, Toma HK, Figueiredo FB, Madeira MF. Evaluation of 18S rDNA PCR assay using skin fragments as a diagnostic test for *Trypanosoma caninum*. *Vet Parasitol* 2014; 205:343-346.
11. Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42:570-580.
12. Mello CX, Figueiredo FB, Mendes-Júnior AAV, Furtado MC, Miranda LCF, Madeira MF. Outbreak of canine visceral leishmaniasis in Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014; 47:788-790.
13. Borges-Pereira J, Castro JAF, Silva AG, Zauza PL, Bulhões TP, Gonçalves ME, et al. Soroprevalência da infecção chagásica no Estado do Piauí, 2002. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39:530-539.



## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad-Franch F, Diotaiuti L, Gurgel-Gonçalves R, Gürtler RE. Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono? Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2013; 108:251-254.

Alencar JE. História natural da doença de Chagas no Estado do Ceará. Fortaleza: Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará; 1987.

Almeida AB, Faria RP, Pimentel MF, Dahroug MA, Turbino NC, Sousa VR. Seroepidemiological survey of canine leishmaniasis in endemic areas of Cuiaba, State of Mato Grosso. Ver. Soc. Bras. Medicina Tropical. 2009; 42:156-159.

Alves Filho FI. Morbidade da doença de Chagas em áreas endêmicas dos municípios de Oeiras e Colônia do Piauí. Dissertação [Mestrado- Saúde Pública] - Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro; 1995.

Amato VS, Padilha ARS, Nicodemo AC, Duarte MIS, Valentini M, Uip DE, Boulos M and Amato. Use of Itraconazole in the Treatment of Mucocutaneous Leishmaniasis: a Pilot Study. International Journal of Infectious Diseases. [S.I.]. 2000; 4(3):153-157.

Andrade SG & Magalhães JB. Biodemes and zimodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. Rev.Soc.Bras.Med.Trop.1997; 27-35.

Andrade SG. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. Rev.Patologia Tropical.1974; 65-121.

Anonymous. Recommendations from a satellite meeting. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1999; 94 (suppl.II): 429-432.

Araújo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF. Paleoparasitology of Chagas disease – A Review. Rio de Janeiro: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009;104 (Suppl.I): 9-16.

Argolo AM, Felix M, Pacheco R & Costa J. Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil. Imperial Novo Milênio, PIDC, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro; 2008; 16-17.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology. 2000; 30(12-13):1269-81.

Basano SA, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Rev. Brasileira de Epidemiologia. 2004; 7(3).

Barret TV, Hoff R, Mott KE, Guedes F, Sherlock IA. An outbreak of acute Chagas disease in the São Francisco Valley region of Bahia Brazil: triatomine vectors and animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1979; 73: 703-709.

Barros JH, Almeida AB, Figueiredo FB, Sousa VR, Fagundes A, Pinto AG, Baptista C, Madeira MF. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control? *Trans Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2012 Jul; 106(7):419-23. doi: 10.1016/j.trstmh.2012.03.014. Epub 2012 May 10.

Bento DNC, Freitas M, Pinto AS. Epidemiologia da doença de Chagas nos municípios de Castelo do Piauí e Pedro II, Estado do Piauí, Brasil. *Rev. da Soc. Bras. de Medicina Tropical.* 1989; 22:73-79.

Borges-Pereira J, Castro JAF, Silva AG, Zauza PL, Bulhões TP, Gonçalves ME, et al. Soroprevalência da infecção chagásica no Estado do Piauí. *Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical.* 2006; 39(6): 530-539.

Borges-Pereira J, Castro JAF, Campos JHF, Nogueira JS, Zauza PL, Marques P, Cardoso MA, Britto C, Araújo AJG. Estudo da infecção e morbidade da doença de Chagas no município de João Costa Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil. *Ver. da Soc. Bras. de Medicina Tropical.* 2002; 35: 315-322.

Brazil RP. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban áreas. *Rev. Soc. Bras. de Medicina Tropical.* 2013; 46(3): 263-264.

Bruce A, Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8: 1480–1485.

Burkot TR, Goodman WG, De Foliartt GR. Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1981; 30: 1336–1341.

Camacho AA, Mucha CJ & Belerenian GC. Afecções Cardiovasculares em Pequenos Animais. Interbook. Sao Paulo; 2003: 328.

Camargo ME, Rebonato C. Cross-Reactivity in Fluorescence Tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* Antibodies A Simple Inhibition Procedure to Ensure Specific Results. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1969; 18(4):500-5.

Camargo ME, Silva GR, Castilho EA, Silveira AC. Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. *Ver. Inst. Medicina Tropical de São Paulo.* 1984; 26:192-204.

Carlier Y, Dias JCP, Luquetti AO, Hontebeyrie M, Torrico F, Truyens C. Trypanosomiase americaine ou maladie de Chagas. *Enciclop Med-Chirurgic.* 2002; 8:505-520.

Castanera MB, Lauricella MA, Chuit R, Gürtler RE. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1998; 92: 671-683.

- Cerqueira AGC, Vasconcelos A. A leishmaniose nesta capital. Boletim Sanitário. 1922; 1:35.
- Chang, KP, Hendricks LD. Leishmaniasis. Elsevier, Amsterdam; 1985.
- Chagas, C. Tripanossomíase Americana; forma aguda da moléstia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1910; 8(2): 37-69.
- Chieffi PP, Neto V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Inst. Medicina Tropical de S.P. 2000.
- Cohen JE, Gürtler RE. Modeling household transmission of American trypanosomiasis. Science. 2001; 293: 694-698.
- Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Secretaria de vigilância em saúde do Ministério da Saúde. 2005; 38(supl. III).
- Correia-Lima FG. Doença de Chagas no município de Oeiras, Piauí – estudo seccional nas localidades de Colônia e Oitis. Dissertação [Mestrado Saúde Pública] - Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ; 1976.
- Correia-Lima FG, Figueiredo PZ, Portella-Nunes JN. Prevalência da infecção chagásica na população humana determinada pelo teste de imunofluorescência indireta em 24 municípios do Piauí. Rev. da Soc. Bras. de Medicina Tropical. 1976; 10: 17-25.
- Costa CHN, Pereira HF, Araújo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. Rev. Saúde Pública. São Paulo. 1990; 24(5).
- Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhaes M, Silveira AC, et al. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2003; 98: 443-9.
- Coura, JR. Síntese das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2008.
- Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. Rev. Soc. Bras. Medicina de Uberaba. May/June 2012; 45(3).
- Coura JR, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2011; 106: 641-645.
- Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its Discovery. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2009; 104 (Supl. I): 31-40.
- Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge Affiliations. Nature 465, S6–S7 doi:10.1038/nature09221. Published online 23 June 2010.

Coura JR. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2013; 108(8).

Coura JR, Viñas PA, Junqueira AC. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2014

Coutinho CFS, Souza-Santos R, Teixeira NFD, Georg I, Gomes TF, et al. Investigação entomoepidemiológica da doença de Chagas no Estado do Ceará, Nordeste do Brasil. Cad. Saúde Pública. Rio de Janeiro. 2014; 30(4).

Cupolillo E, Grimaldi JG, Momen H. A general classification of new world *Leishmania* using numeral zymotaxonomy. American Journal Tropical Medicine Hygiene. 1994; 50: 296-311.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco. Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical. 39(4), 352-356.

Deane LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária. 1956.

Deane LM, Deane MP. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Geographical Distribution and Transmission. Rev. Inst. Medicina Tropical. São Paulo. 1962; 4: 198-212.

Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. O Hospital. 1955; 47(1): 75-87.

Deane LM, Deane MP. Observações sobre abrigos e criadouros de flebotomos no noroeste do Estado do Ceará. Rev. bras. Malar. 1957; (9): 225-46.

Dias JCP. Controle da doença de Chagas. In JCP Dias, JR Coura (eds), Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Um manual prático para o clínico geral. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro. 1997; 453-468.

Dias EL, Batista ZS, Guerra RMS, Lima TB, Abreu-Silva AL. Canine visceral leishmaniasis (cvl): seroprevalence, Clinical, hematological and biochemical findings of dogs Naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar Municipality, Maranhão state, Brazil. Ciência Animal Brasileira. 2008; 9(3): 740-745.

Dias JCP. História Natural da doença de Chagas. Arquivo Brasileiro de Cardiologia. 1995; 65(4): 358-366.

Dias JCP. Epidemiologia. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Ed Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2000; 48-74.

Dias JCP, Machado EMM, Fernandes AL, Vinhaes MC. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. Caderno de Saúde Pública. Rio de Janeiro. 2000; 16 (Supl. II): 13-34.

Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas Disease Control in Latin America – A Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002; 97(5): 603- 612.

Dias JCP, Coura JR. Epidemiologia. In: Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro. 1997; 33-66.

Duarte R, Marzochi MCA. Enzyme immunoassay for the identification of food-source of hematophagous insects. Mem do Inst Oswaldo Cruz. 1997; 92: 273–274.

Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JÁ, Kirchoff L, Jackson V, Rowton JE, Schantz EDPM. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada 2000-2003. Emerg. Infect. Dis. 2006; 12: 440-446.

D'Utra e Silva O. Sobre a leishmaniose tegumentar e seu tratamento. Mem. do Inst. Oswaldo Cruz. 1915; 7: 213-248.

Estrada-Franco JG, Bathia V, Diaz-Albiter H, Ochoa-Garcia L, Barbabosa A, Vazquez-Chagoyan JC, et al. Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs. Emerg. Infect. Disease. México. 2006; 12: 624-630.

Falqueto A.; Sessa PA. Leishmaniose tegumentar americana. In: Veronesi R.; Focaccia R. Tratado de Infectologia. (3ª Ed). São Paulo: Atheneu. 2005; 1543-1557.

Feitosa, MM, Ikeda FA, Luvizotton MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). Clínica Veterinária. 2000; (28): 36-44.

Ferreira WA, Mayrink W, dos Mares-Guia ML, Tavares CA. Detection and characterization of *Leishmania* antigens from an American cutaneous leishmaniasis vaccine for diagnosis of visceral leishmaniasis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2003; 45(1): 35-43

Figueiredo PZ, Correia-Lima FG, Portella-Nunes JN. Doença de Chagas: primeiros casos autóctones no estado do Piauí. Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical. 1975; 9: 105-107.

Forattini OP. Entomologia médica. Editora Edgard Blücher. São Paulo. 1973: 658 .

Forattini OP, Ferreira AO, Rocha e Silva EO, Rabello EX, Santos JLF. Aspectos ecológicos da tripanossomose americana. II — Distribuição e dispersão local de triatomíneos em ecótopos naturais e artificiais. Rev. Saúde pública. São Paulo. 1971; 5:163-91.

Genaro O, da Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL, Mayrink W. [Occurrence of kala-azar in the urban area of Grande Belo Horizonte, Minas Gerais]. Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical. 1990; 23: 121.

Gerencia de doenças transmitidas por vetores e zoonoses. Nota Técnica N°5/2012. Intensificação da Vigilância para Leishmaniose Visceral no Estado do Rio de Janeiro.

Gill GS. Production of antisera for the serological identification of blood meals of Arthropods. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1984; 78: 233–234.

Gomes MAT, Silva VL, Marzochi MCA. Prevalência e resultados da sorologia para doença de Chagas na localidades do sítio do Mocó e Borda, município de São Raimundo Nonato, sudeste do Piauí. Rev. Inst. Medicina Tropical. 1991; 33(8).

Gürtler RE, Cecere MC, Petersen RM, Rubel DN, Schweigmann NJ. Chagas disease in north-west Argentina; association between *Trypanosoma cruzi* parasitaemia in dogs and cats and infection rates in domestic *Triatoma infestans*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1993; 87: 12-15.

Hommel M, Peters W, Ranque J, Quilici M, Lanotte G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol. 1978; 72: 213-218.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>; censo demográfico de 2010, acessado em 25/09/2014.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Produção da Pecuária Municipal. 2012. Volume 40. 71 páginas link:[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2012/ppm2012.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/ppm2012.pdf), acessado em 02/12/2014.

Junqueira ACV, Chiari E, W incker P. Comparison of the polymerase chain with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas' disease patients in Northeastern region of Brazil. Transaction of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg. 1996; 90.

Junqueira ACV, Gonçalves TCM, Moreira CJC. Manual de Capacitação na Detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscopistas de Malária e Laboratoristas da Rede Pública. 2° edição – Rio de Janeiro. 2011; SCV/ICICT.

Kjos SA, Snowden KF, Craig TM, Lewis B, Ronald N, Olson JK. Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. Vet. Parasitol. 2008; 152: 249-256.

Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, et al. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5: e1155.

Lauricella MA, Sinagra Aj, Paulone I, Riarte AR, Segura EL. Natural *Trypanosoma cruzi* infection in dogs of endemic areas of the Argentine Republic. Rev. do Inst. de Medicina Tropical de São Paulo. 1989; 21(2): 63-70.

Luquetti AO, Rassi A. Diagnosis and treatment of the infection by *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000; 95: 37-47.

Marzochi MCA, Fuentes-Castillo A, Marques de Brito CM, Ferraz FA, Rodrigues V, Pereira TG, et al. Study of the *Triatoma brasiliensis* blood feed source associated to the shelter of goats in a natural area of the state of Paraíba. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 1988; 83(1): 197.

Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cad. Saude Publica. 1994; 10(2): 359-75.

Marzochi MC, Schubach AO, Marzochi KBF. Leishmaniose tegumentar Americana, In: Cimerman B, Cimerman S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. São Paulo. Atheneu. 1999; 375: 39-64.

Membrive NA, Rodrigues G, Gualda KP, Bernal MVZ, Oliveira DM, et al. Environmental and Animal Characteristics as Factors Associated with American Cutaneous Leishmaniasis in Rural Locations with Presence of Dogs, Brazil. PLoS ONE. 2012; 7(11): e47050. doi:10.1371/journal.pone.0047050.

Mendes RS, Santana VL, Jansen AM, Xavier SCC, Vidal IF, Rotondano TEF, Souza AP. Aspectos epidemiológicos da Doença de Chagas canina no semiárido paraibano. Pesq. Vet. Bras. Rio de Janeiro. 2013; 33(12).

Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Tøye PJ. Isozymic heterogeneity of *T. cruzi* in the first autochthonous patients with Chaga's disease in Amazonian Brazil. Nature. 1978; 272: 819-821.

Miles MA, Tøye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *T. cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg. 1977; 71: 217-225.

Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. Parasitology. Epub 2009 Aug 20; 136(12): 1509-28.

Miranda JC, Reis E, Schiriefer A. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002; 97:185-8.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília-DF. 2006.

Ministério da Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Fundação Nacional de Saúde, Brasília. 2007: 62.

Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias. Guia de bolso, Brasília-DF. (8 ed). 2010.

Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral. Recomendações Clínicas para a redução da letalidade. Brasília-DF. 2011.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil). Portaria interministerial Nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União

Moncayo A. Progress towards the elimination of transmission of Chagas disease in Latin America. *World Health Statist.* 1997; 50: 195-198.

Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro. 2009; 104(Suppl. I): 17-30.

Monteiro EM, Silva JCF, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV *et al.* Leishmaniose Visceral: Estudo de Flebotomíneos e Infecção Canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Ver. da Soc. Brás. de Medicina Tropical.* 2005; 38: 147-152.

Montenegro VM, Jiménez M, Dias JCP, Zeledón R. Chagas disease in dog dogs from endemic areas of Costa Rica. *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz.* 2002; 94(4): 491-494.

Moraes-correia, V.R.; Monteiro, A.M.V.; Carvalho, M.S.; Werneck, G.L. Uma aplicação do sensoriamento remoto para a investigação de endemias urbanas. *Cad. de Saúde Pública.* Rio de Janeiro. 2007; 23(5).

Mott KE, Mota EA, Sherlock I, Hoff R, Muniz TM, Oliveira TS, Draper CC,. *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and cats and household seroreactivity to *T. cruzi* in a rural community in northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1978; 27: 1123-1127.

Neiva A, Penna B. Viagem científica pelo norte da Bahia, sudoeste de Pernambuco, sul do Piauí e de norte a sul de Goiás. *Mem do Inst Oswaldo Cruz.* 1916; 8: 74-224.

New York Heart Association. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels. 7th edition. Boston: Little and Brown Company; 1973.

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. Saúde Pública.* 2001; 17: 1231-1239.

Organização Mundial da Saúde. World Health Organization Control of Leishmaniasis. Technical Report Series. 2008; 793.

Organização Mundial da Saúde. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. Department of Control of Neglected Tropical Diseases. 2013.



Paiva Cavalcante M., Faustino MAG, Silva LBG, Alves LC. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral. *Clínica Veterinária*. 2005; (58): 36-42.

Passos VM, Falcao AL, Marzochi MC, Gontijo CM, Dias ES, Barbosa-Santos EG. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz*. 1993; 88(1): 103-10.

Perlowagora-Szunlewicz A, Muller CA, Moreira CJC. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of host with Chagas disease. III - On the observation of vector species and parasitic strain in the reaction of bugs to infection by *Trypanosoma cruzi*. *Rev Saude Publica*. 1998; 24: 390-400.

Pinto AG, Toma HK, Figueiredo FB, Madeira MF. Evaluation of 18S rDNA PCR assay using skin fragments as a diagnostic test for *Trypanosoma caninum*. *Vet Parasitol*. 2014 Sep 15; 205(1-2):343-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.07.028. Epub 2014 Aug 7.

Pita-pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho A, Barbosa A, Britto C. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 2005; 99: 905-913.

FD, Impreatriz-Fonseca VL, Lencioni Neto F. *Biomes of Brazil*. Sofi a: Pensoft Publisher; 2005.

Rath S, Trivelin LA, Imbrunite TR, Tomazela DM, Jesús MN, Marzal PC, H F de Andrade Jr; AG Tempone. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *São Paulo. Quím. Nova*. 2003; 26(4).

I Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas. Validade do conceito da forma indeterminada da doença de Chagas – Ver. da Soc. Bras. de Medicina Tropical. 1985; 18:46.

Rey L. *Bases da Parasitologia Médica*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1992; 349.

Santana VL, Souza AP, Lima DASD. Araujo AL, Justiniano SV, Dantas RP, Guedes PMM & Melo MA. Caracterização clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* no semiárido nordestino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2012; 32(6): 536-541.

Sampaio LF. O aparecimento, a expansão e o fim da leishmaniose no Estado de São Paulo. *Ver. Bras. de Medicina*. 1951; 8(10): 717-721.

Sarquis O, Sposina R, Oliveira TG, MacCord JR, Cabello PH, Borges-Pereira J. Aspects of peridomestic ecotopes in rural areas of Northeastern Brazil associated to triatomine (Hemiptera, Reduviidae) infestation, vectors of Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2006; 101:143-7.

Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Oliveira LS, Duarte R, D'Andrea OS, Oliveira TG. Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas na zona rural de Jaguaruana, Ceará, Brasil. Journal of Vector Ecology. Agosto 2010; (2) 35.

Schmuñis GA. Tripanossomíase Americana: seu impacto nas américas e perspectivas de eliminação. Em: Dias JCP, Coura JR (eds). Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro. Fiocruz editora. 1997; 11-23.

Schmuñis GA. A tripanosomíase americana e seu impacto na saúde pública da Américas, p.84-98. In: Brener Z., Andrade Z. A. & Barral-Neto M. (Eds), *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2000.

Schoefield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP. The process of domestication in Triatominae. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1994; 89(Suppl. I): 375-378.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical. 2005; 38(III).

Serra CM, Leal CA, Figueiredo F, Schubach TM, Duarte R, Uchoa CM. Canine tegumentary leishmaniasis in Morada das Aguias (Serra da Tiririca), Marica, Rio de Janeiro, Brazil. Cadernos de Saúde Pública. 2003; 19(6): 1877-80.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. Mem. do Inst. Oswaldo Cruz. 1994; 89(3): 471-8.

Silva JGD, Guilherme L, Werneck, Cruz MSP, Costa CHN, Mendonça IL. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. Cad. Saúde Pública. Rio de Janeiro. 2007; 23(7): 1715-1720.

Silveira AC, Feitosa VR, Borges R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período de 1975-83, Brasil. Rev. Bras. Malariol. D. Trop. 1984; 36:15-312.

Silveira AC, Silva GR, Prata A. O Inquérito de soroprevalência da infecção chagásica humana (1975-1980). Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Uberaba. 2011; 44 (supl.2).

Silveira AC, Dias JCP. O controle da transmissão vetorial. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Uberaba 2011; 44 (supl.2).

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

Souza AI, Oliveira TMFS, Machado RZ; Camacho AA. Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 2009; 29(2): 150-152.

Sudia WD & Chamberlain RW. Collection and processing of medically important arthropods for arbovirus isolation. Atlanta, GA: Communicable Disease Center. 1967; 29.

Teixeira MGLC. Doença de Chagas. Estudo da forma aguda inaparente. Tese. Mestrado. Curso de pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias. Fac. Med UFRJ. Rio de Janeiro. 1977; 51.

Tibayrenc M, Ayala FJ. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetically, taxonomic and epidemiological significance. *Evolution.* 1988; 42: 277-292.

Vianna G. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar por Injeções Intravenosas de Tártaro Emético. IN: 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia, 4, 1912, [S.I.]. 1912; 426-428.

Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 2000; 16 (2): 7-12.

Werneck GL. Forum: Geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction *Cad. Saúde Pública.* 2008; 24: 2937-2940.

Zeledón R. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. In *Trypanosomiasis and Leishmaniasis with Special Reference to Chagas Disease*, Ciba Foundation Symposium 20 (new series). 1974; 51-77.

Zeledón R, Solano G, Zúñiga A, Swartzwelder JC. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreillie, 1811). III. Habitat and blood sources. *J. Med. Entomol.* 1973; 10: 363-370.

Zeledón R, Trejos de M, Chinchilla M. Experimental infection of mice with blood, culture and insect forms of *Trypanosoma cruzi* by diferents routes. *Protozoology* 3: 95-101.

Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Revista da Biologia.* 2011; 6b: 44-48.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro. November 2009; 104(7): 1051-1054.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution.* 2012; 12(2): 240-253.

## 10 APENDICES

### ANEXO I

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. A finalidade desta pesquisa é avaliar se você, sua família e o seu cão estão infectados ou se têm risco de se infectar com um parasita de animais chamado *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania spp.* que pode infectar o homem e seu animal doméstico e causar a chamada doença de Chagas e Leishmaniose (Calazar) respectivamente.
2. Esses parasitas vivem no sangue e nos órgãos de animais silvestres e podem ser transmitidos aos animais domésticos (cães e gatos) e às pessoas diretamente por insetos que se chamam barbeiros (bicudos) ou por alimentos contaminados com suas fezes e transmitidos por flebotomíneos (mosquito palha) no caso da Leishmaniose.
3. Para verificar se você está infectado com os parasitas mencionados, temos que retirar um pouco do seu sangue para exame com material esterilizado. Você sentirá apenas uma pequena picada no braço como se fosse de um mosquito, sem nenhum risco.
4. Se você estiver infectado com um desses parasitas no sangue nós vamos encaminhá-lo para tratamento. Vamos também procurar o barbeiro em sua casa e nos lugares próximos e ensinar como se evita a infecção.
5. Você tem a nossa garantia de ser informado de todos os resultados dos exames e a liberdade de participar ou não da pesquisa e de se retirar dela quando quiser, sem nenhum prejuízo, inclusive da assistência à sua saúde.
6. Os dados desta pesquisa são confidenciais para outras pessoas, mas você receberá todas as informações e terá direito a saber tudo sobre a evolução da infecção ou doença, se for o caso.
7. Não haverá pagamento para participar da pesquisa, apenas o tratamento e o acompanhamento das pessoas envolvidas e a orientação individual e da comunidade para evitar a infecção.
8. Qualquer problema de saúde que ocorrer com você, relacionado a infecção ou doença objeto desta pesquisa será solucionado pelos serviços médicos locais ou pelos agentes de saúde da localidade, que estarão acompanhando você.
9. O agente de saúde de sua localidade e você mesmo terá acesso ao coordenador da pesquisa por telefone, email, carta ou qualquer outra forma de comunicação para qualquer esclarecimento. Coordenador do Projeto: Dr. José Rodrigues Coura, Laboratório de Doenças Parasitárias do IOC/Fiocruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, Telefones (21) 2280-3740, e-mail: coura@ioc.fiocruz.br ou pela Dra Taliha Dias Perez Mendonça, no mesmo endereço e telefone.
10. Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP FIOCRUZ/IOC Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 (Expansão) Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360 Tel.: (21) 3882-9011 e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

#### CONSENTIMENTO APÓS INFORMAÇÃO

Declaro que após ter sido devidamente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo em participar da pesquisa nos termos do que me foi esclarecido.

Local:

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

## ANEXO II



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



### AUTORIZAÇÃO PARA SEDAÇÃO

Paciente: \_\_\_\_\_

Espécie: \_\_\_\_\_

Raça: \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_,  
identidade nº \_\_\_\_\_, proprietário(a) do animal  
acima descrito, autorizo que nele sejam aplicadas **técnicas anestesiológicas**  
(sedação, anestésias – local e/ou geral), ciente de todos os riscos advindos  
desses procedimentos.

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Proprietário

IPEC-LAPCLINZOO-20

### ANEXO III

#### IDENTIFICAÇÃO

<b>No:</b>	<b>Data:</b>	<b>Nome Animal:</b>	
<b>Proprietário:</b>			<b>Tel.</b>
<b>Endereço:</b>  			

#### ANIMAL

<b>Raça:</b> ( ) SRD ( ) Outra _____		<b>Sexo:</b> ( ) M ( ) F
<b>Tipo de Pelagem:</b> ( ) curto ( ) longo	<b>Peso:</b> Kg	<b>Idade:</b>
<b>Castrado:</b> ( ) Sim ( ) Não	<b>Vacinação:</b> ( ) Sim ( ) Não Qual: _____	

## EXAME CLÍNICO

<b>Estado Geral:</b> ( ) Bom ( ) Regular ( ) Ruim	<b>Temperatura:</b>
<b>Condição corporal:</b> ( ) Muito Magro ( ) Magro ( ) Normal ( ) Obeso	
<b>Mucosas:</b> ( ) Hipocoradas ( ) Normocoradas ( ) Hiperemicas ( ) Ictéricas	
<b>Nodulos linfáticos cervicais:</b> ( ) Normais ( ) Aumentados ( ) Diminuídos	
<b>Desidratação:</b> ( ) Ausente ( ) Leve ( ) Severa	<b>Prenhez:</b> ( ) Sim ( ) Não
<b>Ectoparasitos:</b> ( ) Não ( ) Piolhos ( ) Pulgas ( ) Carrapatos ( ) Outros_____	
<b>Início das Lesões:</b>	<b>Nº de Lesões:</b>
<b>Localizações das Lesões:</b> ( ) Orelha ( ) Nariz ( ) Escroto ( ) NA ( ) Outras_____	
<b>Uso de Medicamentos:</b> ( ) Sim ( ) Não	
<b>Qual Medicamento:</b>	

## SINAIS CARACTERÍSTICOS

<input type="checkbox"/> Perda de Apetite	<input type="checkbox"/> Emagrecimento	<input type="checkbox"/> Caquexia	<input type="checkbox"/> Apatia
<input type="checkbox"/> Distúrbio Urinário	<input type="checkbox"/> Alopecia Local	<input type="checkbox"/> Alopecia Generalizada	<input type="checkbox"/> Epistaxe
<input type="checkbox"/> Descamação cutânea furfurácea		<input type="checkbox"/> Pêlo Opaco	<input type="checkbox"/> Onicogribose
<input type="checkbox"/> Úlcera Croscosas	<input type="checkbox"/> Adenite regional	<input type="checkbox"/> Alterações oftálmica	<input type="checkbox"/> Artralgia
<input type="checkbox"/> Esplenomegalia	<input type="checkbox"/> Hepatomegalia	<input type="checkbox"/> Adenite generalizada	
<input type="checkbox"/> Edema de Membros		<input type="checkbox"/> Dor apalpação renal	
<input type="checkbox"/> Paresia dos Membros Posteriores		<input type="checkbox"/> Edema de Membros	

## DADOS EPIDEMIOLÓGICOS:

<b>Domicílio</b> <input type="checkbox"/> Zona Urbana <input type="checkbox"/> Rural <input type="checkbox"/> Outra	<b>Convive com Outros Animais</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
<b>Ambiente do Animal:</b> <input type="checkbox"/> Dentro de casa <input type="checkbox"/> Quintal <input type="checkbox"/> Solto	
<b>Algum Morador com Leishmaniose:</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
<b>Algum Morador com Doença de chagas:</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
<b>Algum Animal já recolhido com suspeita de <i>Leishmania</i>:</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
<b>Hábitos comportamentais:</b> <input type="checkbox"/> Ciclo domiciliar <input type="checkbox"/> Ciclo peridomiciliar <input type="checkbox"/> Ciclo silvestre	



**MATERIAL COLETADO:**

<b>Biopsia:</b> ( ) Orelha ( ) Lesão ( ) Pele Escápula ( ) Não Coletada	
( ) PCR	( ) Sangue
( ) Medula	( ) Xenodiagnóstico

## ANEXO IV

### FICHA FAMILIAR E DOMICILIAR

<b>No:</b>	<b>N° registro animal:</b>	<b>Data:</b>
<b>Nome do chefe:</b>		
<b>Idade:</b>	<b>Sexo ( ) F ( ) M</b>	
<b>Endereço:</b>		
<b>Tempo de residência neste local:</b>		
<b>Atividade profissional atual:</b>		
<b>Residências anteriores:</b>		
<b>Atividade profissional anterior:</b>		

### RESIDÊNCIA

<b>Tipo de residência:</b> ( ) Taipa ( ) Tijolo ( ) Rebocada	
<b>Tipo de piso:</b>	
<b>Tipo de teto:</b>	
<b>N° de cômodos:</b>	<b>Anexos:</b> ( ) Sim ( ) Não
<b>Observações:</b>	

### CONHECIMENTO E CONTATO COM O VETOR

<b>Conhece este inseto?</b> ( ) Sim ( ) Não	
<b>Local em que viu o triatomíneo:</b> ( ) Dentro de casa ( ) Peridomicílio ( ) No mato	
<b>Já foi picado por este inseto?</b> ( ) Sim ( ) Não	
<b>Local onde foi picado:</b> ( ) Dentro de casa ( ) Peridomicílio ( ) No mato	
<b>Algum morador já apresentou suspeita ou diagnóstico de Leishmaniose?</b> ( ) Sim ( ) Não Quem: _____	<b>Algum morador já apresentou suspeita ou diagnóstico de Chagas?</b> ( ) Sim ( ) Não Quem: _____

**REGISTRO DE MORADORES:**

<b>Nº 1</b>	<b>Nome:</b>	<b>Idade:</b>	
	<b>Grau de parentesco:</b>	<b>Coletado sangue:</b> Sim ( ) Não ( )	<b>Sexo</b> ( )M ( ) F
<b>Nº 2</b>	<b>Nome:</b>	<b>Idade:</b>	
	<b>Grau de parentesco:</b>	<b>Coletado sangue:</b> Sim ( ) Não ( )	<b>Sexo</b> ( )M ( ) F
<b>Nº 3</b>	<b>Nome:</b>	<b>Idade:</b>	
	<b>Grau de parentesco:</b>	<b>Coletado sangue:</b> Sim ( ) Não ( )	<b>Sexo</b> ( )M ( ) F
<b>Nº 4</b>	<b>Nome:</b>	<b>Idade:</b>	
	<b>Grau de parentesco:</b>	<b>Coletado sangue:</b> Sim ( ) Não ( )	<b>Sexo</b> ( )M ( ) F
<b>Nº 5</b>	<b>Nome:</b>	<b>Idade:</b>	
	<b>Grau de parentesco:</b>	<b>Coletado sangue:</b> Sim ( ) Não ( )	<b>Sexo</b> ( )M ( ) F
<b>Nº 6</b>	<b>Nome:</b>	<b>Idade:</b>	
	<b>Grau de parentesco:</b>	<b>Coletado sangue:</b> Sim ( ) Não ( )	<b>Sexo</b> ( )M ( ) F
<b>Nº 7</b>	<b>Nome:</b>	<b>Idade:</b>	
	<b>Grau de parentesco:</b>	<b>Coletado sangue:</b> Sim ( ) Não ( )	<b>Sexo</b> ( )M ( ) F
<b>Nº 8</b>	<b>Nome:</b>	<b>Idade:</b>	
	<b>Grau de parentesco:</b>	<b>Coletado sangue:</b> Sim ( ) Não ( )	<b>Sexo</b> ( )M ( ) F
<b>Nº 9</b>	<b>Nome:</b>	<b>Idade:</b>	

	<b>Grau de parentesco:</b>	<b>Coletado sangue:</b> Sim ( ) Não ( )	<b>Sexo</b> ( )M ( ) F
<b>Nº 10</b>	<b>Nome:</b>	<b>Idade:</b>	
	<b>Grau de parentesco:</b>	<b>Coletado sangue:</b> Sim ( ) Não ( )	<b>Sexo</b> ( )M ( ) F
<b>Nº 11</b>	<b>Nome:</b>	<b>Idade:</b>	
	<b>Grau de parentesco:</b>	<b>Coletado sangue:</b> Sim ( ) Não ( )	<b>Sexo</b> ( )M ( ) F
<b>Nº 12</b>	<b>Nome:</b>	<b>Idade:</b>	
	<b>Grau de parentesco:</b>	<b>Coletado sangue:</b> Sim ( ) Não ( )	<b>Sexo</b> ( )M ( ) F

**MATERIAL COLETADO:**

( ) Triatomíneos / Caixa nº: \_\_\_\_\_

**Placa para reconhecimento do triatomíneo**

