

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**Diagnóstico Sorológico e Aspectos Epidemiológicos da  
Leishmaniose Canina na Microrregião de Itaguaí,  
Rio de Janeiro**

**Claudia Bezerra da Silva**

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS  
DA LEISHMANIOSE CANINA NA MICRORREGIÃO DE ITAGUAÍ,  
RIO DE JANEIRO**

**CLAUDIA BEZERRA DA SILVA**

*Sob a orientação do professor*  
**Carlos Luiz Massard**

*e Co-orientação do professor*  
**Argemiro Sanavria**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2012

636.708969364

S586d

T

Silva, Claudia Bezerra da, 1984-  
Diagnóstico sorológico e aspectos  
epidemiológicos da leishmaniose canina na  
microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro /  
Claudia Bezerra da Silva - 2012.  
89 f.: il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.

Dissertação(mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 52-67.

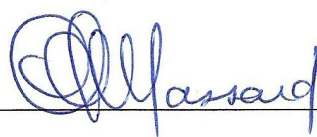
1. Cão - Doenças - Itaguaí (RJ) - Teses.  
2. Leishmaniose - Epidemiologia - Itaguaí  
(RJ) - Teses. 3. Sorologia veterinária -  
Teses. I. Massard, Carlos Luiz, 1947-. II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CLAUDIA BEZERRA DA SILVA**

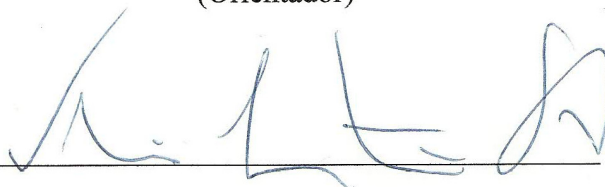
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/02 /2012



Carlos Luiz Massard, DSc, UFRRJ

(Orientador)



Valmir Laurentino Silva, DSc, FIOCRUZ-RJ



Adivaldo Henrique da Fonseca, DSc, UFRRJ

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação a Deus que tanto me abençoou, e aos meus queridos pais Jane Bezerra da Silva e Claudio Severino da Silva, que foram fontes de inspiração para que eu superasse as dificuldades, exemplos de seres humanos dirigindo a vida com dignidade e respeito ao próximo, lembrando-me sempre nos momentos difíceis que “não há glória, sem esforço”. Agradeço em especial a minha irmã e amiga Glaucia Bezerra da Silva e minha avó Dirací Nogueira Bezerra que sempre carinhosas me ajudaram. Amo muito vocês!*



“Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais e, neste dia, um crime contra um animal será um crime contra a humanidade”.

Leonardo da Vinci

“Temer o futuro é tingir com tintas escuras o dia de amanhã; encarar o futuro com esperança é bordar o horizonte com fios de ouro do sol nascente... Se eu não puder ser uma fonte de água pura e cristalina a margem de uma estrada, que eu seja uma simples gotinha de orvalho que brilha na pétala da flor, ou na folha da planta quando desponta o sol no horizonte”.

Frei Anselmo Fracasso

## AGRADECIMENTOS

À Deus, ser tão sublime, que me deu força e determinação, sendo meu sustento durante o desenvolvimento deste projeto de pesquisa, assim como em todos os momentos de minha vida.

Com carinho, agradeço à minha família, em especial minha mãe Jane Bezerra da Silva, meu pai Claudio Severino da Silva, minha irmã Glaucia Bezerra da Silva, e minha avó Dirací Nogueira Bezerra, que foram fundamentais ao me apoiarem, estarem presentes com sua dedicação, compreensão, orações e amor incondicional.

Ao Jonas Mendes da Silva, sempre companheiro, amigo e compreensivo nos momentos de dificuldades e alterações de humor, sabendo relevar as dificuldades e me ajudando a caminhar com muito amor e paciência.

Ao meu orientador prof. Dr. Carlos Luiz Massard, que me acolheu em seu grupo de pesquisa como uma filha, confiou em meu trabalho, dando-me liberdade em dar novos passos, sempre apoiando e sendo fonte de aprendizado constante com sua vasta experiência como pesquisador e como amigo.

Ao meu co-orientador e grande amigo prof. Dr. Argemiro Sanavria, o qual esteve acompanhando minha caminhada desde a Iniciação Científica nesta Universidade, estando sempre presente e solícito às minhas necessidades, ajudando-me a trilhar uma trajetória de crescimento como aprendiz no mundo da Ciência. Da mesma forma, sempre esteve disponível como amigo ao ouvir minhas lamúrias, com muita atenção e sendo bom conselheiro.

Ao Dr. Valmir Laurentino Silva, da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP-FIOCRUZ), que além de colaborador essencial para a realização deste trabalho, mostrou-se sempre solícito, nas orientações e disponibilização de material para realização dos exames sorológicos, estando nas ocasiões em que mais precisei, apoiando-me inclusive nos momentos de “choro”. Foi uma dádiva conhecer essa pessoa incrível e sinto-me honrada em conquistar sua amizade.

Ao Dr. Marcos Barbosa de Souza (ENSP-FIOCRUZ), sempre amigo e incentivador na realização deste estudo. Agradeço também à Dra. Roseme Duarte (ENSP-FIOCRUZ) que na condição de chefe do Departamento de Ciências Biológicas (ENSP-FIOCRUZ), acolheu-me com muito carinho e colocou-se à disposição quando precisei de ajuda.

Aos técnicos de laboratório: Luiz Carlos da Paz e Cléa de Castro do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública (DESP/IV-UFRRJ), Wagner Moura do Laboratório de Imunodiagnóstico (DCB/ENSP - FIOCRUZ-RJ), e Paulo César (FUNASA) que ajudaram prazerosamente nas tarefas em nível de laboratório, partilhando experiência e momentos de alegria em meio às tensões dos trabalhos.

À equipe do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores do Departamento de Parasitologia Animal (DPA/IV-UFRRJ), que com certeza sem seu apoio não conseguiria dar continuidade aos trabalhos. Em especial, gostaria de agradecer à minha amiga Joice Aparecida Rezende Vilela que muito me ajudou nas coletas à campo, em dias de sol e de chuva, e com certeza, sem ela teria muita dificuldade em concluir essa etapa; a Marcus Sandes Pires, que junto a Joice foram fontes de inspiração para seguir a pós-graduação, amigo em todas as horas, desde os “puxões-de-orelha” até os conselhos sutis e muito úteis, sem contar com os auxílios nas análises estatísticas. Agradeço também a Huarrisson Azevedo Santos, Aline Falqueto Duarte, Thais de Andrade Oliveira, Maristela Peckle Peixoto, Tiago Marques Santos, Antônio Amélia Mucalane Tembue, Cristiane Divan Baldani e Pedro Ivan Fazio Júnior, grandes amigos que sempre me apoiaram e me ajudaram a superar as dificuldades de trabalho e emocionais encontradas no caminho. Agradeço também aos bolsistas e estagiários do Laboratório de Doenças Parasitárias (DESP/IV - UFRRJ), que doaram seu tempo e suor nas

coletas a campo.

Ao Otacílio que por vezes se aventurou conosco durante as viagens para realização das coletas, levando-nos com o transporte cedido pela UFRRJ aos locais selecionados para efetuarmos as coletas.

Agradeço a Dr<sup>a</sup>. Fernanda Nunes Santos, que tive o prazer de conhecer e ver na sua espontaneidade e dedicação, um exemplo de profissional durante as etapas dos trabalhos realizados na Fiocruz-RJ, sendo solícita quando precisei de sua ajuda nas leituras das lâminas ao microscópio de Imunofluorescência.

Agradeço a Médica Veterinária Maria Aparecida Barbosa e à Rossana Virgílio de Barros, mulheres de “fibra”, podendo reconhecê-las como exemplo de vida e superação, e que tanto nos ajudaram ao fazerem os contatos com os moradores nas localidades visitadas. Da mesma forma, agradeço a Carlos José (“Zé Boreba”) que nos acompanhou em muitas coletas a campo, ajudando-nos a conter os animais, sendo sempre amigo e divertido durante as saídas de trabalho.

Aos representantes e equipes das Vigilâncias em Saúde de Itaguaí, de Seropédica, de Mangaratiba e à Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro (SESDEC-RJ) pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos animais que foram à essência para esse estudo e sem eles não haveriam resultados.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que nos acolhe como mãe, tanto na graduação como no mestrado, uma segunda casa para mim.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz - RJ, pela excelente convivência durante a realização dos exames sorológicos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que pela concessão da bolsa durante o Mestrado, ajudou-me a desenvolver este projeto.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.



## BIOGRAFIA

Claudia Bezerra da Silva, filha de Jane Bezerra da Silva e Claudio Severino da Silva, nasceu em 16 de setembro de 1984, na cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro. Iniciou o ensino fundamental na Escola Santa Clara, localizada em Guaratiba, dando continuidade na Escola Rural São Vicente de Paulo; e no Colégio Nossa Senhora do Rosário, em Campo Grande, concluiu o Ensino Médio, em 2002.

No ano de 2004 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), concluindo o curso em 2009.

Durante a graduação realizou estágios na área de Clínica médica no Hospital Veterinário de Grandes Animais (HVGA), assim como no Laboratório de Doenças Parasitárias no Instituto de Veterinária, e Laboratório de criação de Dípteros da Estação para Pesquisas Parasitológica W.O.Neitz, na UFRRJ. Participou de diversos projetos de pesquisa no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública.

Em 2007 foi aprovada como acadêmica bolsista em Medicina Veterinária no Esquadrão Escola de Cavalaria (EEC) da Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro, exercendo atividade na área de Clínica Médica de equinos.

Entre os anos de 2007 e 2009, foi bolsista de Iniciação Científica (Pibic/Balcão - CNPq) com projeto visando controle de *Haematobia irritans* em sistemas de produção orgânica e convencional de bovinos de aptidão leiteira.

Obteve o X Prêmio de Iniciação Científica da XVII Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ, 2007, com o trabalho intitulado por “Ação *in vitro* de extratos etanólico e hexânico da cutieira (*Joannesia princeps*) sobre as larvas de terceiro estágio de estrogilídeos de equino”.

Em março de 2010 ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Parasitologia Veterinária, ao nível de Mestrado, da UFRRJ, sendo contemplada com Bolsa do CNPq.

## RESUMO

SILVA, Claudia Bezerra da. **Diagnóstico sorológico e Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Canina na Microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro**, 2012. 74p. Dissertação (Master Science in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

O objetivo deste estudo foi realizar o diagnóstico sorológico de cães da microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, e avaliar os fatores epidemiológicos associados à soropositividade canina. Amostras de soro de 524 cães da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, foram examinadas através de imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático para *Leishmania* spp. A frequência e fatores associados com a soropositividade foram avaliados. Foram consideradas reagentes as amostras positivas em ambos os testes sorológicos (titulação 1:40). As mesmas amostras foram submetidas ao teste rápido (TR DPP<sup>®</sup>) para leishmaniose canina. A frequência de cães soropositivos para *Leishmania* spp. foi 28,24% (n=148/524), com maior frequência (p<0,05) em Seropédica (59,46%) quando comparados aos municípios de Itaguaí (29,05%) e Mangaratiba (11,49%). Cães na faixa etária  $\geq 2$  anos a 5 anos (p<0,05) e sem raça definida (p<0,05) foram mais prováveis de serem soropositivos para *Leishmania* spp. Além disso, cães alimentados com comida caseira, que recebiam tratamento contra ectoparasitos (p<0,05), e aqueles animais que vivem em ambiente em que as fezes não são recolhidas (p<0,05) eram mais prováveis de serem expostos a *Leishmania* spp. Cães provenientes de área rural (p<0,05) estão mais susceptíveis à infecção por *Leishmania* spp., assim como os animais que vivem fora da residência (p<0,05), tem acesso à mata, córregos e pastagens (p<0,05), ficam soltos (p<0,05) e não possuem abrigo (p<0,05) apresentaram maior chance de serem soropositivos à *Leishmania* spp. As dermatopatias e outras alterações dermatológicas (p<0,05) foram fatores intimamente associados à soropositividade à *Leishmania* spp. A partir dos resultados obtidos no TR DPP<sup>®</sup>, observou-se que somente 0,03% dos animais amostrados foram positivos. Leishmaniose canina é uma enfermidade com elevada ocorrência nas áreas rurais da microrregião de Itaguaí e afeta principalmente cães sem raça definida, entre dois e cinco anos de idade, e que vivem soltos, com acesso às matas, córregos e pastagens. O controle de ectoparasitos, a presença de abrigo e condição de limpeza no ambiente onde o cão passa mais tempo são aspectos identificados nesse estudo como medidas preventivas que podem ser usadas para reduzir a probabilidade de infecção por parasitos do gênero *Leishmania* em cães.

**Palavras-chave:** sorologia, epidemiologia, canino.

## ABSTRACT

SILVA, Claudia Bezerra da. **Serological Diagnosis and Epidemiological Aspects of Canine Leishmaniasis in the Itaguaí Microregion, Rio de Janeiro**, 2012. 74p. Dissertação (Master Science in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The aim of this study was the serological diagnosis of dogs of Itaguaí microregion, state of Rio de Janeiro, and assesses the epidemiological factors associated with seropositivity in dogs. Serum samples from 524 dogs of Itaguaí microregion were examined by indirect immunofluorescence and enzyme linked immunosorbent assay for *Leishmania* spp. The frequency and factors associated with seropositivity were evaluated. Reactive samples were considered positive in both serological tests (titer 1:40). The same samples were subjected to rapid test (TR DPP<sup>®</sup>) for canine leishmaniasis. The frequency of seropositive dogs for *Leishmania* spp. was 28.24% (n=148/524), more often (p<0.05) in Seropédica (59.46%) when compared to Itaguaí (29.05%) and Mangaratiba (11.49%) counties. Dogs in the age group  $\geq 2$  years to 5 years (p<0.05) and mongrel (p<0.05) were more likely to be seropositive for *Leishmania* spp. In addition, dogs fed with homemade food (p<0,05), that receiving treatment against ectoparasites (p<0.05), and those animals who live in an environment in which feces are not collected (p<0.05) were more likely to be exposed to *Leishmania* spp. Dogs from rural areas (p<0.05) are more susceptible to infection with *Leishmania* spp., as well as animals living outside the home (p=0.05), have access to forests, streams and pastures (p<0,05), are loose (p<0.05) and have no shelter (p<0.05) were more likely to be seropositive for *Leishmania* spp. The dogs who have skin diseases and other skin changes (p<0.05) had a greater chance of exposure to *Leishmania* spp. The dermatopathies and other skin changes (p <0.05) were factors closely associated with seropositivity to *Leishmania* spp. From the results obtained in the TR DPP<sup>®</sup>, there was only 0.03% of the sampled animals were positive. Canine leishmaniasis is a disease with high occurrence in the rural parts of the Itaguaí microregion and mainly affects dogs without defined breed, aged between two to five years old and that roam free, with access to forests and streams. The control of ectoparasites, the presence of shelter and clean condition in the environment where the dog spends most of the time are aspects identified in this study like preventive measures that can be used to reduce the likelihood of infection by parasites of the *Leishmania* genus in dogs.

**Key-words:** serology, epidemiology, canine.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Relações de concordância entre os testes de IFI e EIE sob a titulação $\geq$ 1:40.....	28
<b>Tabela 2.</b>	Frequência de cães sorreagentes à <i>Leishmania</i> spp., em função do sexo, faixa etária, raça, cor da pelagem, tamanho do pêlo, porte do animal, escore corporal, comportamento do animal e presença de ectoparasitos na Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro no período de abril de 2010 a 2011.....	31
<b>Tabela 3.</b>	Frequência de cães sorreagentes à <i>Leishmania</i> spp., em função dos caracteres extrínsecos que envolvem a origem dos animais amostrados na Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, no período de abril de 2010 à abril de 2011.....	32
<b>Tabela 4.</b>	Frequência de cães sorreagentes à <i>Leishmania</i> spp., em função dos caracteres extrínsecos que envolvem os hábitos dos animais amostrados na Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, no período de abril de 2010 à abril de 2011.....	33
<b>Tabela 5.</b>	Frequência de cães sorreagentes à <i>Leishmania</i> spp., em função dos caracteres extrínsecos que envolvam o manejo estabelecido pelo proprietário aos animais amostrados na Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, no período de abril de 2010 à abril de 2011.....	34
<b>Tabela 6.</b>	Frequência de cães sorreagentes à <i>Leishmania</i> spp., em função dos aspectos clínicos observados nos animais na Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, no período de abril de 2010 à abril de 2011, durante a realização do estudo.....	36
<b>Tabela 7.</b>	Características inerentes aos proprietários e às residências localizadas na Microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, associados aos resultados sorreagentes à <i>Leishmania</i> spp. de cães residentes no período de abril de 2010 à abril de 2011, durante a realização do estudo.....	37

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização geográfica da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, evidenciando os municípios de Seropédica, Itaguaí e Mangaratiba. Baseado no mapa multimodal desenvolvido pelo DNIT (Departamento Nacional de Infraestrutura de Transportes) em 2009..... 22
- Figura 2.** Esquema do ensaio imunoenzimático, baseado no manual do conjunto diagnóstico EIE – Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos..... 24
- Figura 3.** Esquema do teste de imunofluorescência indireta (reação positiva), baseado no manual do conjunto diagnóstico IFI – Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos..... 25
- Figura 4.** Platarforma plástica com dois poços por onde são conduzidas amostra e solução tampão, ocorrendo a reação do TR DPP® ..... 26
- Figura 5.** a) Observação de amostra positiva (titulação de 1:160), através de microscopia de imunofluorescência. b) Demonstração de amostra negativa (titulação 1:160)..... 28
- Figura 6.** Leitura positiva dos testes rápidos TR DPP®. Observar a intensidade de cor e definição das linhas formadas no momento da reação de diferentes amostras (73, 52, 165)..... 30
- Figura 7.** Imagem demonstrativa de resultados negativos encontrados durante a realização da leitura dos testes rápidos TR DPP® ..... 30
- Figura 8.** a) Cadela sororreagente à *Leishmania* spp. encontrada na localidade de Mazomba no município de Itaguaí, Rio de Janeiro, apresentando lesão ulcerativa e hiperqueratose no focinho. b) Extermidade distal do membro anterior direito apresentando lesão com aspecto ulcerativo úmido, e sinal de onicogribose..... 35
- Figura 9.** a) Animal sororreagente à *Leishmania* spp. encontrado na localidade de Mazomba no município de Itaguaí, Rio de Janeiro, apresentando lesão na mucosa nasal e início de ulceração na pálpebra esquerda (seta). b) Fêmea apresentando-se com escore corporal magro..... 35
- Figura 10.** a,b) Lesões no pavilhão auricular de dois animais pertencentes ao município de Itaguaí, RJ. c) Animal do município de Mangaratiba, RJ, com lesão ulcerativa no pavilhão auricular esquerdo (seta)..... 36
- Figura 11** À esquerda, lesão em processo de cicatrização, após submissão a tratamento, na face posterior da perna de um senhor. À direita, lesão também em processo de cicatrização na região costal de um senhor. Em

ambos os casos, observaram-se animais sororreagentes nas residências.... 39

## LISTA DE ABREVIACOES

LVA	Leishmaniose visceral americana
EIE	Ensaio Imunoenzimático
IFI	Imunofluorescência indireta
LTC	Leishmaniose tegumentar canina
LVC	Leishmaniose visceral canina
TR DPP®	Teste Rápido Imunocromatográfico de Duplo Percurso
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphisms</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
LV	Leishmaniose visceral
NNN	<i>Neal, Novy e Nicolle</i>
LIT	<i>Live Infusion Triptose</i>
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
ATP	Trifosfato de adenosina
GTP	Guanosina Trifosfato
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
TMB	tetrametilbenzidina
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
FICT	isotiocianato de fluoresceína
TRALd®	Teste Rápido Antígeno para <i>L. donovani</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
E.E.P.P.	Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 Breve histórico sobre as leishmanioses.....	3
2.2 Sistemática e Agentes Etiológicos.....	4
2.2.1 Questões Taxonômicas.....	5
2.3 Ciclo Biológico e Formas de Transmissão.....	6
2.4 Hospedeiro invertebrado.....	7
2.5 Principais Reservatórios.....	9
2.6 Situação Epidemiológica .....	10
2.6.1 Nas Américas.....	11
2.6.2 Leishmaniose Canina no Brasil.....	12
2.7 Manifestações clínicas das leishmanioses.....	13
2.7.1 Humanos.....	14
2.7.2 Cães e outros reservatórios.....	15
2.8 Diagnóstico laboratorial.....	16
2.8.1 Parasitológico.....	16
2.8.2 Imunológico.....	17
2.8.3 Molecular.....	19
2.9 Tratamento.....	19
2.10 Prevenção e Métodos de Controle.....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
3.1 Descrição das áreas estudadas.....	22
3.2 Inquérito Canino.....	23
3.2.1 Tamanho da amostra e amostragem.....	23
3.2.2 Visita às residências e aplicação de questionário epidemiológico.....	24
3.2.3 Coleta de amostras de sangue.....	24
3.2.4 Inquérito Sorológico.....	25
3.3 Princípios éticos.....	28
3.4 Avaliação dos resultados e análise estatística.....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	30
4.1 Inquérito Sorológico.....	30
4.1.1 Imunofluorescência indireta (IFI) e Ensaio Imunoenzimático (EIE).....	30
4.1.2 Teste Rápido DPP® para leishmaniose visceral canina.....	31
4.2 Fatores associados às características inerentes aos cães sororreagentes à <i>Leishmania</i> spp.....	32
4.3 Fatores associados aos caracteres extrínsecos aos cães (origem, hábitos, comportamento e manejo) sororreagentes à <i>Leishmania</i> spp.....	34
4.4 Fatores associados aos aspectos clínicos observados nos cães sororreagentes à <i>Leishmania</i> spp.....	37
4.5 Características inerentes aos proprietários e às residências localizadas na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, associados aos cães residentes com resultado sororreagente à <i>Leishmania</i> spp.....	40
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	40



5.1 Inquérito Sorológico.....	40
5.1.1 Imunofluorescência indireta (IFI) e Ensaio Imunoenzimático (EIE).....	40
5.1.2 Teste Rápido DPP® para leishmaniose visceral canina.....	41
5.2 Fatores associados às características inerentes aos cães sororreagentes à <i>Leishmania</i> spp.....	42
5.3 Fatores associados aos caracteres extrínsecos aos cães (origem, hábitos, comportamento e manejo) sororreagentes à <i>Leishmania</i> spp.	44
5.3.1 Origem dos animais.....	44
5.3.2 Hábitos dos animais.....	46
5.3.3 Manejo estabelecido pelo proprietário aos animais.....	47
5.4 Fatores associados aos aspectos clínicos observados nos cães sororreagentes à <i>Leishmania</i> spp.....	48
5.5 Características inerentes aos proprietários e às residências localizadas na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, associados aos cães residentes com resultado sororreagente à <i>Leishmania</i> spp.....	48
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>68</b>
Anexo I – Questionário epidemiológico estruturado e aplicado aos moradores visitados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.....	69
Anexo II – Critério utilizado para a leitura do teste rápido, de acordo com as recomendações descritas no manual de treinamento TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina, por Bio-Manguinhos, Fiocruz/RJ.....	73
Anexo III – Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP.....	74

# 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose, doença causada pelo protozoário *Leishmania* spp., é uma antroponose re-emergente, considerada um grande problema de saúde pública, representando um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (NUNES, 2008). Infecções por *Leishmania* foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos, domésticos (canídeos, felídeos e equídeos) e o homem (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). As infecções caninas por *Leishmania* spp. representam um considerável problema para a medicina veterinária e saúde pública (WHO, 2012), sendo o cão (*Canis familiaris*) o principal reservatório no ambiente doméstico (ALBUQUERQUE et al., 2007). O agente etiológico dessa enfermidade pertence à ordem Kinetoplastida e família Tripanosomatidae, e no Brasil, as principais espécies são *L. (L.) infantum* [= *L. (L.) chagasi*] e *L. (Viannia) brasiliensis* (REY, 2001).

No Brasil, essa enfermidade pode se apresentar como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral Americana (LVA). De acordo com a espécie, podem produzir manifestações cutâneas, muco-cutâneas, cutâneas difusas e viscerais (REY, 2001). Todas as espécies desse parasito, que possuem ciclo de vida heteroxênico, são transmitidas por meio da picada de flebotomos fêmeas infectados, pertencentes à subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* (no Novo Mundo), e *Phlebotomus* (no Velho Mundo) (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Esses mosquitos são conhecidos vulgarmente como mosquito palha, cangalhinha, birigui ou asa dura. A porta de saída de *Leishmania* pode ser a hematogênica e/ou linfática e em cães tem sido encontrada no sangue periférico. As alterações patológicas mais particulares são encontradas no tecido esplênico, hepático, sanguíneo, pulmonar e renal (FREHSE, 2008).

Dentre os demais métodos utilizados para o diagnóstico das leishmanioses caninas, o Ministério da Saúde recomenda a utilização do ensaio imunoenzimático (EIE) para a triagem inicial dos cães suspeitos e o exame de imunofluorescência indireta (IFI) para a confirmação dos casos positivos. O material recomendado para o diagnóstico sorológico é o soro sanguíneo e, em algumas situações, o eluato de sangue embebido em papel de filtro, considerando-se positivos os soros reagentes nas diluições iguais ou superiores a 1:40 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). De acordo com Machado et al. (2007), a alta sensibilidade e especificidade da IFI e do EIE contribuem de forma segura na identificação dos casos positivos, reduzindo a possibilidade de resultados falsos positivos e falsos negativos. De acordo com Souza et al. (1982), a sorologia pode auxiliar no diagnóstico e é frequentemente utilizada em estudos epidemiológicos.

No Brasil, os primeiros relatos de cães naturalmente infectados por *Leishmania* dermatóptica foram descritos no início do século passado (PEDROSO, 1913). A Leishmaniose Tegumentar Canina (LTC) é caracterizada pela presença de lesões cutâneas ulceradas ou vegetantes, frequentemente recobertas por crostas. A evolução é prolongada, e pode apresentar comportamento cíclico, ora com cicatrização ora com exacerbação da lesão, e, ainda, pode cursar de forma subclínica (ARAÚJO FILHO et al., 1978). Entretanto, a LVA surgiu no município do Rio de Janeiro no final dos anos 70 e início da década de 80, na periferia da cidade, e acredita-se que os casos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) tenham surgido também nessa época. Nestes períodos, foi constatada a presença do principal vetor, *L. longipalpis*, nas localidades onde foram notificados os casos humanos e caninos de leishmaniose visceral. Segundo Costa (2005), a situação vem se agravando, pois os dados epidemiológicos entre 1995 e 2005 revelaram a peri-urbanização e urbanização da LVA em

nosso país, tal fato preocupa quanto a dispersão de casos da doença. Pode-se dizer que bem antes da ocorrência dos primeiros surtos de LVA, a *L. longipalpis* foi registrada por Lutz e Neiva (1912) no município de Mangaratiba e no município do Rio de Janeiro (localidade Pau da Fome), Angra dos Reis (Ilha Grande) descrito por Araújo Filho et al. (1978). Ressalta-se, que até a presente data a *L. longipalpis* é apontada como a espécie transmissora de Leishmaniose Visceral no Estado do Rio de Janeiro, exclusivamente por evidências epidemiológicas (SOUZA et al., 2003). Segundo Souza et al. (2009) o Estado do Rio de Janeiro é assinalado como área de transmissão esporádica de LVA, entretanto, esta doença vem se dispersando para diferentes áreas do município do Rio de Janeiro, Angra dos Reis (Caso canino e humano em 2002), Mangaratiba (casos humanos em 1984 e 2001) e Itaguaí (caso humano em 2006) (dados não publicados) (SOUZA et al., 2003).

De acordo com Langoni (2004), a incidência de doenças como a leishmaniose é elevada nos países em desenvolvimento, sendo que aspectos sociais, econômicos e ambientais são praticamente determinantes para sua manutenção e propagação.

De maneira geral, vem sendo observado aumento significativo de casos em seres humanos e caninos em áreas endêmicas. Consideradas doenças de ambiente rural, as leishmanioses vêm passando por mudança em seu perfil epidemiológico, sendo registradas em ambiente urbano, com o cão exercendo um importante papel na manutenção da doença neste ambiente.

Assim, um estudo epidemiológico em cães sorologicamente reativos à *Leishmania* spp. foi realizado na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro. Os exames laboratoriais constaram da utilização das técnicas imunológicas: IFI, EIE e TR DPP<sup>®</sup> (Teste rápido imunocromatográfico). Este estudo foi realizado a fim de avaliar a frequência de possíveis reservatórios caninos em residências nos três municípios que compõem essa microrregião, associando os resultados aos fatores intrínsecos (sexo, definição racial, idade, porte, escore corporal, cor da pelagem, entre outros) e extrínsecos (origem, hábito e comportamento dos animais; e manejo estabelecido pelo proprietário), e aos aspectos clínicos dos animais. A associação de cães sororeagentes com os fatores relacionados aos proprietários dos animais e aos seus respectivos domicílios também foram avaliados. Observações particulares quanto à ocorrência de leishmanioses em humanos durante o período deste estudo foram descritas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Breve histórico sobre as leishmanioses

As primeiras descrições do agente causal da leishmaniose ocorreram ao longo de anos, cruzando momentos de abordagem da forma tegumentar da doença, e outros momentos da forma viscerotrópica.

A Leishmaniose visceral (LV) foi descrita na Grécia em 1835 quando então era denominada "ponos" ou "hapoplinacon". Foi na Índia em 1869 que recebeu o nome "kala-jwar", palavra de origem hindu (REY, 2001) que quer dizer febre negra ou "kala-azar" que significa pele negra em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (MARZOCHI et al., 1981).

As primeiras descrições objetivas de uma espécie de *Leishmania* foram feitas em fins do século XIX. Borovsky (1898) observou-a em Tachkent (Ásia Central), em um paciente com a forma cutânea da doença. Em 1900, William Leishman identificou um protozoário no baço de um soldado que havia vindo a óbito na Índia, em decorrência de uma febre local conhecida como febre "dum dum" ou "kala-azar". Em 1903, Donovan, sem o conhecimento dos trabalhos de Borovsky, redescobriu o parasito de um caso de leishmaniose visceral indiano, conhecido como calazar (REY, 2001). Ross, ainda em 1903, denominou-o *Leishmania donovani*. Wright, em 1903, ao examinar uma criança armênia com leishmaniose cutânea em Boston (EUA), nomeou o parasito isolado de *Leishmania tropica*.

O primeiro caso de LV no Brasil foi descrito por Migone em 1913. O paciente era um imigrante italiano que vivera muitos anos em Santos, São Paulo, e após viajar para Mato Grosso, adoeceu, tendo sido diagnosticada a doença no Paraguai (ALENCAR, 1977). Foi Penna (1934), um patologista do Instituto Oswaldo Cruz, quem iniciou os estudos sobre a distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral nas Américas, quando comprovou parasitologicamente, 41 casos dentre as 40.000 viscerotomias examinadas para febre amarela provenientes de vários estados do Brasil. Em 1953 surgiram numerosos casos da doença, principalmente no Ceará, o que levou à criação da "Campanha contra a Leishmaniose Visceral". Foram Deane e Mangabeira que em 1954 incriminaram *Lutzomyia longipalpis*, espécie de flebotomíneo, como responsável pela transmissão da inicialmente descrita como *L. (Donovani) chagasi* e, a partir de 1957, propuseram o uso do DDT como combate ao inseto vetor, numa tentativa de romper o ciclo da doença. Em agosto de 1977 foi diagnosticado o primeiro caso autóctone de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no bairro de Bangu, subúrbio da cidade do Rio de Janeiro (SABROZA et al., 1978). Posteriormente a doença esteve instalada de forma endêmica em vários bairros cidade do Rio de Janeiro, entre eles Campo Grande, Realengo, Senador Camará (MARZOCHI et al., 1985) e, a partir do início da década de 90, em Barra de Guaratiba.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), caracterizada como a forma cutânea da doença, foi retratada historicamente por ceramistas incas do Peru e Equador, no período pré-hispânico, e referida pelos primeiros colonizadores espanhóis, no século XVII. Em 1855, Cerqueira a relacionou clinicamente com o "Botão de Biskra", uma das muitas denominações da forma cutânea do Velho Mundo, ou seja, a área que envolve os continentes europeu, africano e asiático, e ilhas adjacentes (REY, 2001).

Em 1895, Moreira identificou a existência do botão endêmico dos países quentes, chamado “Botão da Bahia” ou “Botão de Biskra”. No entanto, somente em 1909, Lindenberg conseguiu confirmar as formas de amastigotas em úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias no interior de São Paulo. Splendore em 1911 diagnosticou a forma mucosa da doença e Gaspar Vianna deu-lhe o nome de *Leishmania brazilienses*. Em 1922, Aragão demonstrou pela primeira vez o envolvimento do flebotomíneo na transmissão da leishmaniose tegumentar. Desde as descrições feitas em 1958 por Forattini, que encontrou animais silvestres infectados por *Leishmania* sp. em áreas de floresta no Estado de São Paulo, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios de todas as unidades federadas (UF) brasileiras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

## 2.2 Sistemática e Agentes Etiológicos

As leishmanioses são enfermidades causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (BRANDÃO; MONTANHA, 2011). Gontijo e Carvalho (2003) inclui *Leishmania* na seguinte posição sistemática:

Reino: PROTISTA Haeckel, 1866  
Sub-reino: PROTOZOA Goldfuss, 1817  
Filo: SARCOMASTIGOPHORA Honigberg e Balamuth, 1963  
Subfilo: MASTIGOPHORA Desing, 1866  
Classe: ZOOMASTIGOPHORA Calkins, 1909  
Ordem: KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963, emend. Vickerman 1976  
Subordem: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880  
Família: TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901, emend. Grobben, 1905  
Gênero: *Leishmania* Ross, 1903

Este gênero caracteriza-se por apresentar apenas duas formas durante seu ciclo vital: amastigota e promastigota. A forma evolutiva amastigota apresenta um citossomo levemente achatado e de contorno ovóide, por vezes elíptico ou fusiforme, mostrando poucas estruturas internas, quando fixado e corado pelos métodos derivados do Romanovsky (Giemsa, Leishman, etc.). Por suas dimensões (entre 2 a 6 µm de comprimento por 1,5 a 3 µm de largura), a forma aflagelada encontra-se entre os protozoários de menor tamanho que parasitam o homem. Situado para adiante do núcleo, quase sempre tangente a ele, encontra-se o cinetoplasto, de aspecto baciliforme, reto ou curvo, corando-se em violeta pela técnica de Giemsa. De perfil, sua forma lembra um disco convexo-côncavo. Em geral, o blefaroplasto e o flagelo intracelular não são visíveis nessas preparações. Nesta fase, o parasito caracteriza-se como intracelular de células de defesa dos hospedeiros vertebrados, habitando os vacúolos digestivos (fagolisossomos) de macrófagos (REY, 2001).

A forma evolutiva é descrita promastigota quando o citossomo alonga-se, assumindo aspecto fusiforme ou piriforme, com a extremidade anterior mais arredondada e a posterior mais fina. A forma promastigota alcança dimensões entre 14 e 20 µm de comprimento por 1,5 e 4 µm de largura, e o corpo flexível movimenta-se, tracionado pelo comprido flagelo (aproximadamente 30 µm), que emerge da extremidade anterior. O núcleo fica situado no terço médio da célula, e o cinetoplasto, em posição mais anterior, apresentando-se (de perfil)

o aspecto de bastonete curvo. O agente nesta fase se desenvolve no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados (flebotomíneos), bem como em meios de cultura (LAINSON; SHAW, 1987a).

Por parasitarem células do sistema fagocítico mononuclear do homem e outros mamíferos (FEITOSA et al., 2000), as espécies do gênero *Leishmania* distinguem-se dos membros de gêneros afins (*Leptomastix*, *Phytomonas*, *Crithidia* e *Endotripanum*), que são em geral parasitos de invertebrados e de plantas. Estudos moleculares filogenéticos mostram que há uma distância considerável com o parasito de gênero *Trypanosoma*, mas por diversas características biológicas e morfológicas, assemelham-se ao *Trypanosoma cruzi* (REY, 2001).

Embora seja difícil classificar as espécies de *Leishmania* em bases morfológicas (URQUHART et al., 1996), visto serem muito parecidas, às vezes indistinguíveis, somado ao fato do tipo de reprodução que apresentam, e as taxas de modificação genética serem baixas ou nulas, deve-se considerar as características geográficas, epidemiológicas e clínicas que normalmente são diferentes e tão peculiares que não se pode atribuir sua etiologia a um mesmo agente patogênico. Atualmente considera-se como razoável classificar as espécies de *Leishmania* que acometem o homem em complexos fenotípicos, agrupados em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (BASANO; CAMARGO, 2004).

Ashford (2000) em seus estudos relata que muitas são as espécies causadoras das leishmanioses no Novo Mundo. Dentre as várias espécies de ocorrência, as principais são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) infantum* [= *L. (L.) chagasi*], *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) mexicana*.

### 2.2.1 Questões Taxonômicas

Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral pertencem ao complexo *Leishmania donovani*, sendo a espécie *Leishmania (Leishmania) donovani* o agente etiológico encontrado na África e Ásia. Enquanto isso, *Leishmania (L.) infantum* pode ocorrer na Ásia, Europa e África. E, *Leishmania (L.) chagasi* é a espécie de ocorrência nas Américas (LAINSON; SHAW, 1987b).

Muitos autores consideram a espécie *L. chagasi* como sinônimo de *L. infantum* (CARDOSO et al., 2007; MARCONDES et al., 2011). Em estudo realizado por Marcondes et al. (2011), os resultados demonstraram que *L. infantum* e *L. chagasi* pode partilhar imunogenicidade idênticas. No entanto, alguns pesquisadores são contrários à utilização de *L. infantum* em relação à forma visceral da Leishmaniose nas Américas, ignorando a “Lei da Prioridade” descrita nas regras taxonômicas, defendendo o emprego de *chagasi* como subespécie, dessa forma preservando a identidade da leishmaniose visceral americana.

Segundo Dantas-Torres (2006a) deve-se primeiro restabelecer os critérios para a classificação dos parasitos do gênero *Leishmania* com base nos critérios tradicionais (LAINSON; SHAW, 1987b) e dados moleculares de investigações recentes, dessa forma, sendo mais fácil concordar se um dado parasito merece o status de espécie ou subespécie.

Entre as técnicas atualmente em uso para a classificação de parasitas estão: eletroforese de isoenzimas (WHO, 1990), anticorpos monoclonais espécie-específicos, sonda de DNA e análise polimórfica do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), utilizando diferentes sequências de DNA como alvos (MACEDO et al., 1992; GUIZANI et

al., 1994; MENDONZA-LEON et al., 1995).

Lainson e Shaw (1987b) definiram subespécies considerando o local, as populações geograficamente isoladas, que mostram algumas (geralmente menores) diferenças taxonômicas de outras populações geograficamente separadas da mesma espécie. Dantas-Torres (2006a) infere ainda que se levarmos em consideração essa definição, deveríamos concordar com a classificação do agente etiológico da Leishmaniose visceral americana como *Leishmania infantum chagasi*.

Dantas-Torres (2006a) informa que diferentes nomes estão sendo utilizados em publicações, e considera que isso é realmente inaceitável, devendo-se atribuir um único nome para esse agente etiológico. Em diferentes trabalhos podemos encontrar exemplos da utilização de nomes que estão sendo utilizados, tais como *Leishmania chagasi* (BERMAN, 2006), *Leishmania infantum* (MORAES-SILVA et al., 2006; SHAW, 2011), *Leishmania infantum chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2005), *Leishmania chagasi / infantum* (FELICIANGELI et al., 2005; MARCONDES et al., 2011), *Leishmania infantum (chagasi)* (BERN et al., 2005), e até mesmo *Leishmania (chagasi) infantum* (BARROUIN-MELO et al., 2006).

No entanto, após diversas discussões científicas e realização de testes diversos, foi proposta a simpatricidade entre *L. chagasi* e *L. infantum* (MAURICIO et al., 2001), sendo recomendada a utilização da espécie *L. infantum* ao se referir à leishmaniose visceral nas Américas, e para fins didáticos após a espécie colocar entre parêntese “(= *L. chagasi*)” (DANTAS-TORRES, 2006b).

### 2.3 Ciclo Biológico e Formas de Transmissão

Os protozoários do gênero *Leishmania* habitam o interior dos macrófagos de hospedeiros vertebrados sob a forma de amastigota. As formas promastigota e paramastigota são flageladas e encontradas no trato digestivo dos flebotomíneos. A forma paramastigota, pouco descrita nos estudos, é uma fase de transição da *Leishmania* no inseto vetor (MARSELLA; GOPEGUI, 1998).

A doença é disseminada pela picada do flebotomíneo fêmea, sendo *Phlebotomus* o gênero de importância no Velho Mundo (África e Eurásia) e o gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas). O ciclo de vida do protozoário é heteroxênico, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores (IESBICH, 2008).

De acordo com Bowman (2010), quando um macrófago repleto de amastigotas é ingerido pelo flebotomíneo, que se alimenta de tecidos superficiais e fluidos do seu hospedeiro, as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas, que multiplicam em grande quantidade.

Segundo Gontijo e Carvalho (2003) isso ocorre quando, no estômago do flebotomíneo, os macrófagos repletos de amastigotas, se rompem, liberando-as, às quais se transformam em promastigotas, que se dividem por fissão binária. Ao diferenciarmos as leishmânias quanto aos subgêneros *Viannia*, as promastigotas migram para o intestino posterior, e colonizam as regiões do piloro e íleo. Esses parasitos aderem-se ao epitélio e se reproduzem. As promastigotas migram para o estômago, e em seguida para a faringe do inseto vetor (promastigotas metacíclicas). Para o subgênero *Leishmania*, após a reprodução e colonização das formas promastigotas no intestino anterior e médio do inseto, ocorre migração dessas formas e colonização no estômago, e posteriormente a faringe dos flebotomíneos,

diferenciando-se após, através do processo de metaciclogênese, em promastigotas metacíclicas (infectantes).

De maneira geral, durante seu ciclo biológico, as promastigotas migram para a faringe do flebotomíneo, e alguns dias depois, elas atingem o aparelho bucal, onde estão quase sempre em número suficiente para bloquear a capacidade do inseto se alimentar. O curso da infecção até que o flebotomo tenha condição de infectar um novo hospedeiro leva cerca de uma semana. Na próxima vez em que o flebotomíneo picar, ele vai injetar certa quantidade de promastigotas metacíclicas, mas, devido à dificuldade que tem em se alimentar, o inseto permanece faminto, o que o leva a realizar hematofagia mais vezes do que se não estivesse infectado. As formas promastigotas são, então, fagocitadas por macrófagos e carregadas pelo corpo do hospedeiro vertebrado (BOWMAN, 2010).

Nos macrófagos, as promastigotas transformam-se em amastigotas, e inicia-se o processo de reprodução, especificamente no interior do vacúolo parasitóforo. Ocorre rompimento do macrófago, e liberam-se as amastigotas no interstício, sendo fagocitadas por novos macrófagos. Nessa fase que os macrófagos parasitados podem ser ingeridos pelas fêmeas de flebotomíneos durante repasto sanguíneo (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Quando circulando pelo organismo do hospedeiro, os órgãos que costumam abrigar grande número de parasitos incluem baço, fígado, medula óssea, mucosa intestinal e linfonodos. Cães também podem desenvolver lesões cutâneas, pela proliferação de amastigotas na pele (BOWMAN, 2010).

Entretanto, existem algumas áreas onde a leishmaniose é endêmica ou tem sido esporadicamente relatada, mas poucos casos humanos são notificados, ou mesmo a presença do vetor não é observada (CARVALHO et al., 2007; DANTAS-TORRES et al., 2005). De acordo com Dantas-Torres (2011), isso tem sugerido a participação de outras espécies de flebotomíneos ou até mesmo a existência de formas secundárias de transmissão. Dentre essas formas, estariam inclusas a transmissão por meio de transfusão sanguínea (FREITAS et al., 2006; OWENS et al., 2001), transmissão vertical (SILVA et al., 2009a) transmissão transplacentária (ROSYPAL et al., 2005), transmissão venérea (SILVA et al., 2009b), por mordedura, ingestão de vísceras infectadas (SHERLOCK, 1964) e por pulgas e carrapatos (COUTINHO et al., 2005; COUTINHO; LINARDI, 2007). Recentemente, Dantas-Torres (2009) detectou a presença de DNA de *L. infantum* através de métodos moleculares em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* coletados de cães soropositivos residentes em um município de Pernambuco. Contudo, esse autor destaca que são necessários estudos para verificar se *R. sanguineus* seria capaz de transmitir *L. infantum* durante o repasto sanguíneo.

## 2.4 Hospedeiro Invertebrado

Os vetores das leishmanioses denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gêneros *Lutzomyia* - no novo mundo, e *Phlebotomus* - no Velho Mundo, conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, mulambinho, cangalhinha, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Seu tamanho geralmente não é superior a 0,5 cm de comprimento, apresentando pernas longas e delgadas e corpo densamente piloso. Seu vôo é saltitante, mantém as asas eretas até quando em repouso, o que o caracteriza, diferenciando dos outros dípteros (BASANO; CAMARGO, 2004).



Trata-se de um artrópode pequeno, de 2 a 3 mm, que pode ser encontrado em locais úmidos, escuros, onde tem muitas plantas, às vezes próximo às residências. Áreas de florestas úmidas, com vegetação abundante, locais com elevada umidade e lixo são ideais para a criação do flebotomíneo (IESBICH, 2008). A fêmea pode depositar seus ovos nas tocas de roedores, na casca de árvores, em frestas nas paredes, nos abrigos para animais. O inseto pode voar a distância de até 200 metros do local de origem, e comumente aparece ao cair da noite. Em algumas regiões, apesar de incomum, aparece também pela manhã e à tarde. Como esse inseto (fêmea) é hematófago, pode se alimentar em várias espécies de animais silvestres, animais domésticos, e também o próprio homem (NEVES et al., 1995).

De acordo com o Ministério da Saúde (2007), as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA, no Brasil são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei*.

Quanto às espécies envolvidas na transmissão de LVA, *L. longipalpis* e *L. cruzi* são as incriminadas nesse processo. No entanto, *L. longipalpis* ainda se mantém como a principal envolvida na ocorrência da forma visceral da doença, pois se considera que ela se adapta facilmente ao peridomicílio, alimentando-se de grande variedade de hospedeiros vertebrados, entre aves, animais silvestres, domésticos e o homem (MONTEIRO et al., 2005).

No município de Seropédica, área de ocorrência de LTA, e limítrofe com outras áreas da região Sudeste, entre a década de 20 e 80, o principal vetor da forma tegumentar acometendo humanos foi descrito como a espécie *L. intermedia*, encontrada naturalmente infectada por *Leishmania braziliensis* (FORATTINI; SANTOS, 1952). Entretanto, em seus trabalhos, Cardoso et al. (2009) afirmaram que as espécies *L. whitmani*, *L. migonei* e *L. oswaldoi* também foram encontradas nesse município.

Aguiar et al. (1996) durante seus estudos em Itaguaí, região de ocorrência de muitos casos humanos da doença, encontraram *L. intermedia*, destacando desta forma, o papel desta espécie como o principal vetor potencial do agente da leishmaniose tegumentar, pela sua prevalência, antropofilia e por ser comprovada a veiculação de *L. braziliensis*. Além disso, detectaram a presença de *L. longipalpis*, considerado o vetor de *L. infantum* no Rio de Janeiro, sendo um risco potencial de veiculação do agente etiológico da LVA nessa região, particularmente pela baixa imunidade da população local.

Entretanto, a LVA surgiu no município do Rio de Janeiro no final dos anos 70 e início da década de 80, na periferia da cidade, ou seja, propagação mais recente que a LTA. Nestes períodos, foi constatada a presença do principal vetor, *L. longipalpis*, nas localidades onde foram notificados os casos humanos e caninos de leishmaniose visceral. Segundo Costa (2005), a situação vem se agravando, pois os dados epidemiológicos entre 1995 e 2005 revelaram a peri-urbanização e urbanização da LVA em nosso país, tal fato preocupa quanto a dispersão de casos da doença. Pode-se dizer que bem antes da ocorrência dos primeiros surtos de LVA, *L. longipalpis* foi registrada por Lutz e Neiva (1912) no município de Mangaratiba. Posteriormente, ainda antes da ocorrência de LVA, Araújo Filho et al. (1978), registrou *L. longipalpis* no município do Rio de Janeiro na localidade de Pau da Fome e na Ilha Grande, Angra dos Reis. Após a notificação do primeiro caso humano de LVA no município do Rio de Janeiro, *L. longipalpis* foi capturada nos bairros de Bangu, Campo Grande e Jacarepaguá (RANGEL et al., 1986). Ressalta-se, que até a presente data, *L. longipalpis* é apontada como a espécie transmissora de LVA no estado do Rio de Janeiro, exclusivamente por evidências epidemiológicas, já que, o isolamento e a caracterização do parasita a partir de infecção natural por *L. infantum* no estado, ainda não foi possível (SOUZA et al., 2003).

Assim como os reservatórios, os vetores também mudam de acordo com a espécie de *Leishmania*: *Leishmania* (*L.*) *amazonenses*, seus principais vetores são *L. flaviscutellata*, *L. reducta* e *L. olmeca nociva* (Amazônia e Rondônia), têm seus hábitos noturnos, voo baixo e são poucos antropofílicos; *L. (V.) guyanensis* (seus vetores são *L. anduzei*, *L. whitmani* e *L. umbratilis*, que é o principal vetor tendo hábito de pousar durante o dia em troncos de árvores e atacar o homem em grande quantidade, quando perturbado); *L. (V.) braziliensis* (em área silvestre, o único vetor demonstrando ser o transmissor foi a espécie *Psychodopigus wellcomei*, encontrado na Serra dos Carajás, altamente antropofílico, picando o homem mesmo durante o dia e com grande atividade na estação das chuvas). Em ambientes modificados, rural e peridomiciliar, são mais frequentemente implicadas as espécies *L. whitmani*, *L. intermedia* e *L. migonei* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

## 2.5 Principais Reservatórios

Considera-se “reservatório” a espécie ou o conjunto de espécies que garantem a circulação de um determinado parasito na natureza dentro de um recorte de tempo e espaço, de acordo com os critérios estabelecidos no manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Muitos animais são descritos como possíveis reservatórios dos agentes etiológicos das leishmanioses. Infecções por *Leishmania* foram descritas em várias espécies de animais silvestres (algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres), sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos). Dentre os demais animais existentes no ambiente silvestre, incriminados como possíveis reservatórios podemos citar as espécies: *Rattus* sp., *Didelphis* sp., *Agouti-paca*, *Dasyprocta azarae*, *Cerdocyon thous*, *Lycalopex vetulus*, entre outras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Os marsupiais da espécie *Didelphis marsupialis* são comumente apontados como passíveis de infecção por *L. infantum* (TRAVI et al., 1994). Os marsupiais foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (LAINSON et al., 1990; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). No Brasil, foram detectadas também raposas (*Cerdocyon*) (DEANE; DEANE, 1955) infectadas nas regiões Amazônica, Nordeste e Sudeste. Souza et al. (2010) detectaram e caracterizaram a espécie *L. infantum* em canídeos silvestres (raposas – *Cerdocyon thous*, e cachorro vinagre – *Sphex venaticus*) através da técnica de PCR-RFLP.

Quanto aos animais domésticos, além dos cães, gatos foram incriminados como possíveis reservatórios (HERVÁS et al., 1999), assim como os equinos (KOEHLER et al., 2002; AGUILAR et al., 1986). Yoshida et al. (1988) fez o primeiro relato de um equino albergando parasito de gênero *Leishmania*, onde eles observaram uma única lesão ulcerada no prepúcio, e conseguiram detectar o agente a partir de esfregaço por aposição de tecido, e também por inoculação em hamster, no qual a doença se manifestou e foram isoladas formas amastigotas a partir da lesão gerada.

Müller et al. (2009) relataram a ocorrência de *Leishmania* sp. em lesões cutâneas em equinos na Europa Central e Koehler et al. (2002) encontraram um equino no sul da Alemanha com leishmaniose cutânea, no entanto, através da utilização da técnica de PCR, detectou-se que a espécie envolvida era *L. infantum*. Na Suíça, Lobsiger et al. (2010) realizaram o primeiro relato de leishmaniose cutânea em uma vaca. Inicialmente esse animal foi diagnosticado por aspectos clínicos, sendo submetido a exames imunohistoquímicos e subsequentemente à análise de sequencia comparativa de produtos da PCR, onde confirmou que o agente causador das múltiplas lesões pertencia ao gênero *Leishmania* sp.

Segundo Savani et al. (2003) na epidemiologia das leishmanioses, dentre os animais domésticos, o cão ainda é incriminado como principal reservatório em áreas urbanas.

## 2.6 Situação Epidemiológica

A leishmaniose é uma doença relacionada com a pobreza. Ela afeta os mais pobres, e é associada ao deslocamento, desnutrição, condições precárias de habitação, analfabetismo, discriminação de gênero, a fraqueza do sistema imunológico e a falta de recursos. A leishmaniose também está ligada às mudanças ambientais, como desmatamento, construção de barragens, sistemas de irrigação e nova urbanização, e o acompanhamento da migração de pessoas não-imunes para áreas endêmicas (WHO, 2012).

A LTA constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. É considerada pela Organização Mundial de Saúde, como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

No Brasil, a LTA é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional. Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras. Nas últimas décadas, análises epidemiológicas da LTA têm sugerido mudanças no padrão de transmissão da doença, inicialmente considerada zoonoses de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas. Posteriormente, a doença começou a ocorrer em zonas rurais, já praticamente desmatadas, e em regiões periurbanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Segundo Ministério da Saúde (2007) pode-se dizer que no Brasil, a LTA apresenta três padrões epidemiológicos característicos: o silvestre (a transmissão ocorre em área de vegetação primária e é, fundamentalmente, uma zoonose de animais silvestres, que pode acometer o ser humano quando este entra em contato com o ambiente silvestre, onde esteja ocorrendo enzootia); ocupacional e lazer (a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, usinas hidrelétricas, instalação de povoados, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, de treinamentos militares e ecoturismo); rural e periurbano (relacionado ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais).

A LV é endêmica em 65 países, com registro anual de mais de 90% dos 500 mil casos novos concentrados nos países Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh e Brasil (ALVAR et al., 2004; DESJEUX, 2004). Nas Américas, cerca de 90% dos casos humanos de leishmaniose visceral (LV) têm sido registrados no Brasil e atualmente 20 (74%) das 27 Unidades Federadas, apresentam casos autóctones (ALVES, 2006).

Nas duas últimas décadas, a LV reapareceu no mundo de forma preocupante. No Brasil, epidemias urbanas foram observadas em várias cidades e a doença tem sido verificada como infecção oportunista em pacientes com HIV, à semelhança do que se observa no sul da Europa. Além disso, a expansão da epidemia acometendo grupos de indivíduos jovens ou com co-morbidades tem ocasionado número elevado de óbitos. Observa-se que, nos últimos anos, a letalidade da LVA vem aumentando gradativamente, passando de 3,6% no ano de 1994 para

6,7% em 2003, o que representa um incremento de 85%. A análise parcial dos dados, em novembro de 2004, demonstrou aumento de 26% na letalidade desta doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Epidemias de leishmaniose significativamente atrasaram a implementação de numerosos programas de desenvolvimento, particularmente na bacia amazônica, nas regiões tropicais dos países andinos, Marrocos e Arábia Saudita. A doença tornou-se assim um sério obstáculo ao desenvolvimento socioeconômico (WHO, 2012).

### **2.6.1 Nas Américas**

Como descrito pelo escritório regional da Organização Mundial de Saúde (PAHO, 2007), as leishmanioses compõem um grupo de doenças parasitárias de distribuição global transmitida aos humanos pela picada de cerca de 30 espécies de flebotomíneos infectados por protozoários do gênero *Leishmania*. Estima-se que 2 milhões de novos casos ocorrem a cada ano em todo o mundo, dos quais 1,5 milhões de casos são referentes à leishmaniose cutânea. Estima-se que o número de pessoas infectadas ultrapassa 12 milhões. No entanto, os dados oficiais subestimam a realidade da aflição humana por esses protozoários devido aos seguintes fatos: a maioria dos dados oficiais obtidos são exclusivamente com base na detecção passiva; muitos casos não são diagnosticados; existe um grande número de pessoas assintomáticas; e a leishmaniose exige notificação compulsória em apenas 32 dos 88 países endêmicos no mundo. Nas Américas, casos do norte da Argentina até o extremo sul do Texas foram relatados, com exceção do Chile e Uruguai.

De acordo com os dados sobre a LT relatados pela PAHO através Do Programa Regional em Leishmaniose em 2006, os países mais afetados foram Brasil, Colômbia, Paraguai, Venezuela, Panamá, Equador e Peru. No que diz respeito à LV, mais letal, os países reportaram mais de 5.000 casos, e o país mais afetado é o Brasil. Os principais problemas que podem ser observados sobre o tema são as seguintes: inacessibilidade ao cuidado do paciente; falta de participação social organizada; uso de informações insuficientes para a tomada de decisões; a falta de tratamento; e a interação entre vetor e o homem (DIAS, 1998). Todos esses fatores contribuem para a morbidade da leishmaniose, como observado na Região das Américas. A incidência de LV tem aumentado nos últimos anos. Os sistemas de vigilância são insuficientes. Há uma falta de recursos humanos treinados para as atividades de diagnóstico, tratamento e medidas de controle. Há falta de medicamentos para o tratamento atempado. O Programa Regional, com o apoio do Programa Global, elaborou um plano de ação para 2007, que inclui o seguinte: Determinar o peso da leishmaniose; padronizar as técnicas de diagnóstico; fortalecer os recursos humanos; promover a descentralização do programa de prevenção e controle de atividades de serviços dos países de cuidados primários; fortalecer o sistema de vigilância; capacitar à comunidade e procurar parcerias estratégicas (PAHO, 2007).

De acordo com Dunaiski (2006), no Brasil, a intensa ação de desmatamento em virtude da exploração da madeira, como exemplo, modificando o ambiente natural favorecendo o contato de humanos e cães com os flebotomíneos, aumentam o risco de adquirir leishmaniose.

## 2.6.2 Leishmaniose Canina no Brasil

No Brasil, os primeiros relatos de cães naturalmente infectados por *Leishmania* dermatópica (LTC) foram descritos no início do século passado (PEDROSO, 1913). Desde então, muito estudos feitos com possíveis reservatórios de *Leishmania* spp., conseguiram encontrar cães naturalmente infectados por várias espécies causadoras de leishmaniose tegumentar, como por exemplo: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) peruviana*. Casos de LTC são comumente diagnosticados em áreas onde a leishmaniose tegumentar americana é endêmica (BARRAL; COSTA, 2011).

A leishmaniose visceral canina (LVC) no Rio de Janeiro parece ter surgido quase simultaneamente com a doença humana, dadas as dificuldades iniciais na detecção de animais infectados entre 1977 e 1979 e a frequência relativa de cães infectados a partir de 1980, conforme demonstrado pelos inquéritos caninos, apesar de suas variações metodológicas (MARZOCHI et al., 1985). Em 1980, o Ministério da Saúde do Brasil realizou um inquérito canino em áreas com novos casos humanos (Realengo, Bangu e Serra do Lameirão - Senador Camará). Em Senador Camará, onde a infecção canina existia e apenas um caso humano foi identificado.

Pesquisas foram realizadas após descobertas de casos humanos nas encostas do litoral do mesmo maciço (Campo Grande e Região Administrativa de Jacarepaguá), onde LTA já tinha sido relatada (LIMA et al., 1981). De 1982 a 1983, foi realizado inquérito canino, com um total de 1.342 cães examinados, para investigar a circulação de anticorpos anti-*Leishmania* por meio de imunofluorescência indireta (COUTINHO et al., 1985). Neste referido estudo, os autores observaram 4,3% destes animais sendo positivos no teste de IFI e, constataram que estes vinham de áreas aonde só haviam casos de LV (Realengo, Bangu e Senador Câmara) (COUTINHO et al., 1985).

Um inquérito sorológico canino de 1984 a 1989 utilizando imunofluorescência em 22.828 cães demonstrou que animais de áreas somente com LV (Realengo, Bangu e Senador Camará) mostraram um declínio na soroprevalência de 4,3% para 0,4%. A soroprevalência em cães de uma área com as duas enfermidades, LV e LT (Campo Grande), diminuiu de 12,7% para 0,6%. Enquanto isso, na área conhecida como Pau da Fome na Região Administrativa de Jacarepaguá (inclinação do litoral sudeste do maciço da Pedra Branca), onde apenas os casos humanos e caninos de LT tinham sido relatados, a soroprevalência canina diminuiu de 8,6% para 1,8% (NUNES et al., 1991).

Segundo Marzochi et al. (2009), estas diminuições geralmente surgiram para confirmar que as medidas profiláticas tomadas nestas áreas foram eficazes: retirada de cães infectados, busca ativa e tratamento de casos humanos, e pulverização de casas e anexos com inseticidas, independentemente de LV e LT ocorrerem isoladamente ou em conjunto .

Uma investigação parasitológica recente foi realizada no Rio de Janeiro em 66 cães sororreativos à *Leishmania*, capturados durante as atividades de controle de LV. O parasito foi isolado de 80,3% dos animais: 12 (22,6%) apresentaram *Leishmania (Viannia) braziliensis* exclusivamente das lesões cutâneas, 39 (73,6%) apresentaram *Leishmania (Leishmania) infantum* em diferentes locais no mesmo animal, e dois (3,8 %), mostraram isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) infantum*, ambos de lesões de pele em diferentes locais, respectivamente. Esses achados confirmam que a co-infecção com *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) infantum* pode ocorrer. A existência de infecção por *Leishmania braziliensis* e infecções mistas em cães de uma área com LV humana

indica que a espécie *Leishmania* envolvida precisa ser identificada, a fim de reforçar a vigilância e medidas de controle (MADEIRA et al., 2006).

Segundo Souza et al. (2009) o estado do Rio de Janeiro é assinalado como área de transmissão esporádica de LVA, entretanto, esta doença vem se dispersando para diferentes áreas do município do Rio de Janeiro (SOUZA et al., 2003), Angra dos Reis (Caso canino e Humano 2002), Mangaratiba (1984 e 2001) e Itaguaí (2006).

De maneira geral, cães formam um importante reservatório doméstico para o agente etiológico *Leishmania infantum*. A importância do reservatório canino deriva do contato próximo e frequente entre cães e seres humanos, e o fato de que os animais podem apresentar infecção assintomática, apesar de um alto grau de parasitismo na pele sã e vísceras (MARZOCHI et al., 2009).

## **2.7 Manifestações Clínicas das Leishmanioses**

As diferentes espécies do gênero *Leishmania* produzem diferentes tipos de manifestações clínicas que dependem da interação entre a resposta imune do hospedeiro vertebrado e da invasividade, tropismo e patogenicidade deste parasito.

Durante a picada do flebótomo na pele há lesões na microvasculatura e formação do lago sanguíneo, favorecendo o repasto do inseto. Além do parasito, componentes da saliva são inoculados e ambos irão induzir a resposta imune local (DE MOURA et al., 2010). Observa-se vasculite, principalmente nas biópsias de lesões recentes (MACHADO et al., 2002). Ocorre espessamento dos vasos e endarterite obliterante com infiltrado inflamatório em torno dos vasos, sendo observada uma vasculite leucocitoclástica. As vênulas com espessamento parietal são localizadas em áreas de infiltrado inflamatório intenso. Tanto o espessamento parietal como a presença de trombos pode reduzir a luz dos vasos. Nas biópsias de lesões recentes, observa-se necrose fibrinóide da parede de vasos por vezes associada à necrose dérmica (BARRAL; COSTA, 2011).

### **2.7.1 Humanos**

Em Ministério da Saúde (2007), foi descrita a classificação clínica para leishmaniose tegumentar americana no Brasil: leishmaniose cutânea (forma cutânea única, forma cutânea múltipla, forma cutânea disseminada, forma recidiva cútis, forma cutânea difusa) e leishmaniose mucosa ou mucocutânea (forma mucosa tardia, forma mucosa concomitante, forma mucosa contígua, forma mucosa primária, forma mucosa indeterminada). Em alguns casos, pode ocorrer infecção inaparente, ou seja, sem manifestação clínica, baseando-se em resultados positivos de testes sorológicos e intradermo reação de Montenegro em indivíduos aparentemente saudáveis.

A típica LT é indolor e costuma localizar-se em áreas expostas da pele; com formato arredondado ou ovalado; mede de alguns milímetros até alguns centímetros; base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; bordas bem-delimitadas e elevadas; fundo avermelhado e com granulações grosseiras. Quando há infecção bacteriana associada, pode haver dor local e produção de exsudato seropurulento que, ao formar crostas, recobre total ou de forma parcial o fundo da úlcera. Muitas vezes, o uso de produtos tópicos, ou infecção secundária, podem causar eczema na pele ao redor da úlcera, modificando seu aspecto (forma ectimóide). Outros tipos de lesões cutâneas menos frequentes podem ser encontrados. Podemos observar lesões

iniciais nodulares (com pequenas pápulas, semelhantes à picada de inseto, que evoluem aumentando em tamanho e profundidade e ulcerando posteriormente), vegetantes (aspecto pailomatoso, úmido e de consistência mole), e verrucosas (superfície seca, áspera, com presença de pequenas crostas e descamação) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Ao redor da lesão principal, poderão surgir endureção subcutânea e pápulas satélites que podem coalescer formando placas. Caso não tratadas, as lesões tendem à cura espontânea em período de alguns meses a poucos anos, podendo também permanecer ativas por vários anos e coexistir com lesões mucosas de surgimento posterior. Nos casos de evolução para a cura, podem formar cicatrizes atróficas, deprimidas, com superfície lisa, áreas de hipopigmentação e traves fibrosas. Algumas vezes podem tornar-se hipertróficas, ou podem passar despercebidas, por sua coloração, tamanho, forma ou localização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Outra manifestação comum associada a leishmaniose é a linfadenopatia, a qual ocorre em cerca de dois terços dos pacientes com lesão, podendo-se aumentar essa frequência quando incluídos aqueles que apresentem pápula cutânea, precedente ao desenvolvimento da úlcera, nos casos de leishmaniose tegumentar. Muitas das vezes, o paciente pode ser acometido por linfadenopatia localizada, mesmo na ausência de lesão tegumentar (MACHADO et al., 2002; CARVALHO, 1995).

A partir de um estudo realizado em áreas endêmicas da Bahia, Badaro et al. (1986) e Marzochi e Marzochi (1994b) afirmaram que existem cinco tipos de apresentações da Leishmaniose Visceral em humanos: assintomática; subclínica (observaram pacientes com febre, hepatomegalia, aumento das globulinas e da velocidade de sedimentação globular na ausência de esplenomegalia); oligossintomática ou forma leve (não apresenta sintomas ou ocorrem ocasionalmente; no exame clínico podem apresentar hepato e/ou esplenomegalia leves); moderada (paciente apresenta uma história clínica de semanas a poucos meses de febre variável com sudorese noturna, diarreia e astenia durante episódios febris, mas, com atividade normal nos períodos sem febre; ao exame clínico apresentam hepatomegalia leve a moderada); grave (progressão insidiosa, o que leva a um diagnóstico tardio, às vezes, meses ou anos com a doença, o que leva a quadros com febre variável, astenia, anorexia, perda de peso, aumento de volume abdominal, episódios de diarreia, mais frequente em crianças, e sangramentos). As formas mais graves apresentam fenômenos hemorrágicos em pele e mucosas, ascite icterícia, hipertensão arterial e infecções secundárias. A morte ocorre por complicações hemorrágicas ou por infecções concomitantes que levam ao choque séptico no paciente.

De acordo com o Manual de Leishmaniose Visceral Grave, a classificação descrita é similar ao descrito anteriormente, dividindo em infecções inaparentes ou assintomáticas, doença em período inicial, doença em período de estado, doença em período final, e forma grave. É considerado um caso suspeito de leishmaniose visceral todo indivíduo com febre e esplenomegalia, proveniente de área com ocorrência de transmissão de LV ou de áreas sem ocorrência, mas desde que descartados os diagnósticos diferenciais mais frequentes na região. É considerado grave todo paciente de LV com desnutrição grave, co-morbidades ou uma das seguintes manifestações clínicas: icterícia, fenômenos hemorrágicos (exceto epistaxe), edema generalizado, sinais de toxemia (letargia, má perfusão, cianose, taquicardia ou bradicardia, hipoventilação ou hiperventilação e instabilidade hemodinâmica) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

## 2.7.2 Cães e outros reservatórios

A Leishmaniose Tegumentar Canina (LTC) é caracterizada pela presença de lesões cutâneas ulceradas ou vegetantes, frequentemente recobertas por crostas; únicas, múltiplas ou confluentes, predominando nas extremidades, em áreas desprovidas de pelos e no focinho, envolvendo a mucosa respiratória. A evolução é prolongada, e pode apresentar comportamento cíclico, ora com cicatrização ora com exacerbação da lesão, e, ainda, pode cursar de forma subclínica (ARAÚJO FILHO et al., 1978).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) pode apresentar um espectro de manifestação clínicas bem variadas, condicionadas à imunocompetência individual do animal, cujos sinais clínicos mais comuns são as lesões cutâneas, alopecia, descamação furfurácea, hiperqueratose, apatia, emagrecimento, onicogribose, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (SILVA et al., 2011).

De acordo com Benites et al. (2011), inicialmente, os sinais clínicos são linfadenomegalia superficial generalizada, edema de membros e dermatite esfoliativa, inicialmente periorbital e nasal, e posteriormente disseminada, caracterizada por alopecia, descamação e onicogribose.

Outros sinais como febre, apatia, diarreia, emagrecimento progressivo, e ceratoconjuntivite são frequentes, apesar de não estarem presentes em todos os casos (GENARO et al., 1988; DIAS et al., 1999).

Entretanto, segundo Marzochi e Marzochi (1994a) e Deane e Deane (1955), os cães infectados, podem se apresentar assintomáticos por um longo período de tempo.

Quanto aos manuais de leishmaniose, alguns autores relatam a ocorrência de leishmaniose em outros animais domésticos, como em gatos e equinos. A Leishmaniose Cutânea tem sido descrita em felinos em vários países (HERVÁS et al., 1999). Os sinais típicos incluem úlceras crostosas nos lábios, focinho, pálpebras e borda do pavilhão auricular, alopecias simétricas e descamação, e o aparecimento de nódulos no ouvido externo (BERGEON 1927; GIORDANO 1993; BARNES et al., 1993; COSTA DURAO et al., 1994; MERCHANT; TABOADA 1995). Entretanto, Leishmaniose visceral em gatos não é muito comum, apesar de alguns poucos casos terem sido relatados na Ásia, América e na área do Mediterrâneo, onde o parasito foi detectado, com ou sem sinais da doença (BERGEON, 1927; GIORDANO, 1933; GIMENO, 1933; FERREIRA et al., 1938).

Aguilar e Rangel (1986) em trabalho realizado na localidade de Mesquita, município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, detectaram parasitos do gênero *Leishmania* em úlceras de pele de uma mula (*Equus caballus* x *Equus asinus*), onde casos cutâneos humanos e caninos ocorreram. Após esse achado, levou-os a procurar sistematicamente infecções por *Leishmania* em equinos, resultando no encontro de 30,8% de animais parasitados, incluindo cavalos e mula, onde alguns apresentaram como manifestação clínica somente algumas lesões cutâneas, de onde foram isoladas formas amastigotas (AGUILAR et al., 1986).

## 2.8 Diagnóstico laboratorial

Tanto para o diagnóstico da leishmaniose humana quanto a leishmaniose canina, os métodos utilizados são semelhantes. Algumas adaptações são realizadas para utilizar determinadas técnicas de maneira precisa e adequada naqueles acometidos pela leishmaniose.

No entanto, o diagnóstico laboratorial canino por vezes baseia-se no diagnóstico



parasitológico (exames de observação em lâmina, histopatológico ou cultura) ou sorológico (imunofluorescência indireta – IFI e ensaio imunoenzimático – EIE). Dentre esses, o mais utilizados nos inqueritos são os métodos sorológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O diagnóstico laboratorial das leishmanioses se constitui fundamentalmente por três grupos de exames: parasitológicos, imunológicos e moleculares.

### **2.8.1 Parasitológico**

É o procedimento de primeira linha 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 um ano. A infecção secundária contribui para diminuir a sensibilidade do método, dessa forma, deve ser tratada previamente. Como procedimentos são adotados: escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa. A sensibilidade desta técnica poderá ser aumentada pela repetição do exame (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Outra técnica que pode ser utilizada é o isolamento em cultivo *in vitro* (meios de cultivo). Este método é considerado um meio de confirmação do agente etiológico que permite a posterior identificação da espécie de *Leishmania* envolvida. Os fragmentos de pele obtidos por biópsia da borda da úlcera ou de pele íntegra são inoculados em meios de cultivo NNN – Neal, Novy e Nicolle (Agar sangue modificado) e LIT (Live Infusion Trptose), entre 24°C e 26°C, nos quais o parasito cresce satisfatoriamente bem. Após cinco dias, pode-se encontrar formas promastigotas do parasito, entretanto a cultura deve ser mantida por até um mês em observação antes de liberar o laudo oficial. Eventualmente, pode-se utilizar material proveniente das úlceras ou de linfonodos por punção com tubo selado a vácuo contendo meio de cultura (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Uma alternativa que é pouco utilizada para diagnóstico parasitológico pela complexidade e alto custo é o isolamento *in vivo* (inoculações em animais). O material obtido por biópsia ou raspado de pele é triturado em solução salina estéril e inoculado via intradérmica, no focinho e/ou patas de hamster (*Mesocricetus auratus*); as lesões no animal, em geral, desenvolvem-se tardiamente, a partir de um mês. Esses animais devem ser acompanhados por três a seis meses. Apesar das desvantagens som relação ao custo e realização dos procedimentos, trata-se de uma técnica com elevada sensibilidade entre os demais métodos parasitológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

### **2.8.2 Imunológico**

De acordo com Teva et al. (2009), o diagnóstico sorológico das doenças infecciosas consiste na investigação da infecção no indivíduo ou na população, mediante a detecção, quantificação e caracterização de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no plasma/soro sanguíneo, no caso das leishmanioses. Os testes sorológicos, que podem ser qualitativo ou quantitativo, vêm sendo constantemente empregados para auxiliar na confirmação diagnóstica das suspeitas clínicas de infecções, permitindo a obtenção de resultados em curto espaço de tempo, em função de algumas características que incluem a simplicidade de execução, baixo custo operacional e a possibilidade de automação.

A técnica de imunofluorescência indireta (IFI) permite realizar a pesquisa de anticorpos contra os mais variáveis antígenos. O conjugado é uma imonoglobulina que

reconhece a outra imunoglobulina como antígeno, ou seja, é uma anti-imunoglobulina ou anticorpo secundário. A vantagem deste método é que o anticorpo pode estar ancorado à superfície de qualquer antígeno e ainda assim será reconhecido pelo conjugado. Uma vez que o reconhecimento de uma imunoglobulina por outras se dá pela região estável do fragmento cristalizável (porção Fc), a ligação é espécie-específica, conferindo ao método grande especificidade. O método indireto se torna mais sensível do que o direto, pois existem normalmente mais epítomos na imunoglobulina para o conjugado se ligar. Quanto maior a quantidade de conjugado maior será a emissão de fluorescência. De maneira geral, a técnica de imunofluorescência apresenta níveis de sensibilidade que variam entre 70% e 90%, e especificidade que varia de 85% a 99%. Por ser um método com perfil mais específico, este é mais utilizado em confirmações sorológicas. Deve-se utilizar o método de imunofluorescência sempre aliado a outro método mais sensível para a realização da triagem e fornecer os dois resultados em combinação (TEVA et al., 2009).

A sua utilização pesquisando IgM e IgG séricas pode aumentar a sensibilidade, uma vez que a primeira aparece mais precocemente (TEVA et al., 2009). No caso da forma tegumentar da doença, as lesões múltiplas (cutânea ou mucosas) estão associadas a títulos mais altos. Entretanto, as lesões mucosas apresentam títulos mais altos e persistentes que as lesões cutâneas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O ensaio imunoenzimático (EIE), quando efetuado em ótimas condições (enzimas altamente ativas, antígenos puros, substratos de alta qualidade, anticorpo e conjugado), apresenta sensibilidade semelhante ao radioimunoensaio, com a vantagem de não ser necessário utilizar material radioativo. A reação é desenvolvida frequentemente em placas plásticas de microdiluição (suporte), contendo séries de orifícios, onde são depositados os imunorreagentes, antígenos ou anticorpos, dependendo do objetivo do método. O processo de revestimento da placa com o imunorreagente adequado denomina-se sensibilização. O EIE é empregado para a pesquisa de anticorpos, onde amostras de soro são colocadas para reagir com antígenos imobilizados em uma fase sólida (placas já sensibilizadas de EIE). Posteriormente, são revelados com auxílio de conjugado enzimático específico levando a formação de um produto corado ao agir sobre substrato cromogênicos (TEVA et al., 2009).

O teste imunocromatográfico também vem sendo desenvolvido para o diagnóstico da leishmaniose. O dispositivo de imunocromatografia é composto de uma membrana porosa de celulose modificada e membranas absorventes acessórias de fibra de vidro, contendo os elementos de reação, ajustadas em um invólucro de plástico apropriado com uma janela para se acrescentar a amostra de teste e outra para a leitura do resultado da reação. O princípio deste teste baseia-se na reação específica antígeno-anticorpo e se constitui por uma fase sólida (membrana porosa), onde estão imobilizados os elementos de captura, e por uma fase móvel, onde estão suspensos o conjugado (que pode ser a proteína A, ligada ao ouro coloidal ou outros conjugados disponíveis) e a molécula alvo da amostra. A fase móvel migra sobre a fase sólida por efeito de capilaridade conduzindo o complexo formado entre a molécula alvo e o conjugado, que, por sua vez, será retido na linha de captura da fase sólida, formando um complexo macromolecular colorido visível ao olho humano. Caso a amostra não contenha a molécula alvo, esta linha de reação não se formará. Uma segunda linha de reação, denominada linha controle, se forma pela captura do conjugado livre, que permite a confirmação da migração da fase móvel (TEVA et al., 2009).

O teste intradérmico, conhecido mais comumente como Intradermoreação de Montenegro (IDRM), fundamenta-se na visualização da resposta de hipersensibilidade celular

tardia. Geralmente persiste positiva após o tratamento, ou cicatrização da lesão cutânea tratada ou curada espontaneamente, podendo vir a dar um resultado negativo nos indivíduos fraco-reatores e nos precocemente tratados. Em áreas endêmicas, a IDRМ positiva pode ser interpretada como leishmaniose anterior ou mesmo aplicação anterior de antígeno de IDRМ, exposição ao parasito sem infecção, alergia ao diluente do teste ou reação cruzada com outras soenças (doença de Chagas, esporotricose, hanseníase, virchowiana, tuberculose, cromomicose, entre outras). Segundo MINISTÉRIO DA SAÚDE (2007), nas populações de área endêmica, na ausência de lesão ativa ou cicatriz, a positividade varia entre 20% e 30%. A IDRМ pode ser negativa nas primeiras quatro a seis semanas após o surgimento da lesão cutânea e testes repetidos com poucas semanas de intervalo, com finalidade de diagnóstico ou inquéritos epidemiológicos, podem induzir um “efeito reforço”.

Assim, em ambas as situações, os resultados devem ser interpretados com cuidado. Após a cura clínica, a IDRМ pode permanecer positiva durante vários anos sendo, portanto, de limitado valor para o diagnóstico de reativação. Pacientes com leishmaniose mucosa costumam apresentar IDRМ exacerbada, com vários centímetros de endureção e presença da vesícula no centro da reação, podendo ocorrer ulceração e necrose local. Na forma cutânea difusa a IDRМ costuma ser negativa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Em relação aos cães, apesar da utilização do teste sorológico (COUTINHO et al., 1985), o diagnóstico também era concretizado por intradermoreação (TÁVORA et al., 2007). Posteriormente, com a realização de um inquérito sorológico por Távora (2004), a partir deste estudo, a imunofluorescência indireta passou a ser considerada diagnóstico padrão para leishmaniose tegumentar americana em humanos, sendo também utilizada como técnica de diagnóstico sorológico em cães.

Outros exames imunológicos podem ser utilizados no diagnóstico das leishmanioses como o *Western Blotting*, Imunohistoquímica, entre outros. As técnicas de imunohistoquímica ou imunocitoquímica são métodos altamente sensíveis e específicos para a detecção de *Leishmania* sp. em tecidos. Para tanto, pode-se utilizar qualquer tecido fixado e processado pelas técnicas usuais de microscopia, sendo que a pele, o fígado e os órgãos linfóides são os mais utilizados (LAURENTI, 2009).

### 2.8.3 Molecular

Os métodos moleculares são pouco utilizados na rotina de diagnóstico, e mais utilizados para fins de pesquisa. Contudo, acrescenta em sensibilidade quando utilizado com os métodos parasitológicos tradicionais. São diversas as técnicas utilizadas, e dentre elas foram empregadas: PCR (*Polymerase Chain Reaction*) por hibridização (minicírculos), PCR-RFLP, PCR (G6PhD), PCR Real Time, entre outras. A última apresenta vantagens de utilizar dados computadorizados, identificar e quantificar a espécie do parasito. Tem como desvantagem o alto custo por necessitar de reagentes e equipamentos especiais, como termociclador, e, além disso, realiza uma pequena quantidade de reações, sendo pouco utilizado em inquéritos caninos que geralmente avaliam um grande número de amostras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Entretanto, as técnicas bio-moleculares vêm sendo utilizadas amplamente em estudos e projetos de pesquisas, como pode ser visto nos trabalhos de avaliação da técnica (NUNES et al., 2007), ou mesmo de investigação canina (VELASQUES et al., 2006; COURA-VITAL et al., 2011).

Quanto a natureza das amostras coletadas para o diagnóstico das leishmanioses, muitas têm sido as alternativas descritas na literatura, desde utilização de sangue total (NUNES et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2009), à capa leucocitária (ODORIZZI et al., 2006), material proveniente de “swab” conjuntival (GRAMICCIA et al., 2010; LEITE et al., 2010), aspirado de linfonodo (VELASQUES et al., 2006), punção de medula óssea (THOMAZ-SOCCOL et al., 2009), biópsias de lesões (BACHA et al., 2011; QUEIROZ et al., 2010) ou fragmentos de necrópsia como de fígado e baço (GOMES et al., 2007).

## 2.9 Tratamento

As drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses em humanos são os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose deste antimonial seja calculada em mg  $Sb^{+5}$ /kg/dia, havendo dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados, o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio, sendo este último não comercializado no Brasil. Os antimoniais pentavalentes são drogas consideradas leishmanicidas, pois interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise quanto a oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares, são inibidos, sendo que esta inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O tratamento deve ser realizado de acordo com o tipo de leishmaniose e a manifestação clínica encontrada. Além disso, de acordo com a portaria interministerial n.º 1426 de 2008 do Ministério da Saúde, é determinada a proibição da utilização de medicamentos de uso humano em animais. Sendo assim, pela ausência de produtos conhecidamente eficazes no mercado de medicamentos de uso veterinário, reconhecido pelo Ministério da Pecuária e Abastecimento, não é recomendado realizar o tratamento de animais com leishmaniose. Apenas, nos casos de LTC, pode-se realizar tratamento de suporte, a fim de evitar infecções secundárias e promover higienização das lesões, melhorando e fomentando o bem-estar do animal.

Contudo, o tratamento de animais doentes, de acordo com os Manuais de Vigilância de Leishmanioses, não é uma medida aceita para o controle da leishmaniose, pois poderá conduzir ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento de casos humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

## 2.10 Prevenção e Métodos de Controle

Após os primeiros surtos de LTA (1915, 1922 e década de 50), esta protozoose manteve-se em baixíssima proporção, devido ao Programa de Controle de Malária, onde as aspersões de inseticidas organoclorados (DDT) eram contínuas nos domicílios de áreas rurais (NERY-GUIMARÃES, 1955). A interrupção desse programa contribuiu com o recrudescimento da LTA e com a introdução da LVA no Rio de Janeiro em 1978 (MARZOCHI et al., 1994).

De acordo com o Manual de Vigilância, para evitar os riscos de transmissão, algumas medidas preventivas de ambientes individuais ou coletivos devem ser estimuladas, tais como: o uso de repelentes, evitar a exposição nos horários de atividades do vetor (crepúsculo e noite), uso de mosquiteiros de malha fina, bem como a telagem de portas e janelas, manejo

ambiental por meio de limpeza de quintais e terrenos (a fim de alterar as condições do meio que propiciem o estabelecimento de criadouros para formas imaturas do vetor), poda de árvores (para aumentar a insolação, a fim de diminuir o sombreamento do solo e evitar as condições favoráveis, como temperatura e umidade, ao desenvolvimento de larvas de flebotomíneos), destino adequado do lixo orgânico, limpeza periódica dos abrigos de animais domésticos, manutenção de animais domésticos distantes do intradomicílio durante a noite (reduzindo a atração de flebotomíneos para este ambiente), manter faixa de segurança de 400 a 500 metros entre as residências e a mata (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Quanto às orientações dirigidas para o controle de vetores, para a indicação do controle químico por meio da utilização de inseticidas de ação residual deverá ser determinado através de análises em conjunto dos dados epidemiológicos e entomológicos. Esta medida de controle vetorial é recomendada no âmbito da proteção coletiva, dirigida apenas para o inseto adulto e tem como objetivo evitar ou reduzir o contato entre o inseto transmissor e a população humana no domicílio, conseqüentemente, diminuindo o risco de transmissão da doença. Os produtos mais empregados são os inseticidas do grupo dos piretróides (deltametrina, lambdacialotrina, alfacipermetrina, cipermetrina, ciflutrina e betaciflutrina) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Com relação aos hospedeiros, no caso da Leishmaniose Tegumentar, não são recomendadas ações objetivando o controle de animais silvestres ou de animais domésticos. Sobre os cães, a eutanásia será indicada somente quando os animais doentes evoluírem para o agravamento das lesões cutâneas, com surgimento de lesões mucosas e infecções secundárias que poderão conduzir o animal ao sofrimento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Com relação aos cães infectados por *Leishmania infantum*, recomenda-se a retirada dos mesmos e posteriormente a realização da eutanásia. Tal determinação ocorre pela forma grave que a leishmaniose pode alcançar nos indivíduos infectados, e pelo fato do cão ser considerado um reservatório potencial no ciclo desta zoonose. Este método de controle reflete muitas polêmicas no meio veterinário por alguns pesquisadores através de trabalhos avaliando a funcionalidade da retirada do animal no recrudescimento da doença, e muitas vezes sugerem que esta ação é ineficaz (DIETZE et al., 1997; COURTENAY et al., 2002). Muitos destes estudos demonstram que proceder a eutanásia destes animais não contribui para a diminuição da enfermidade em áreas endêmicas, e que a utilização de inseticidas no controle de vetores funciona de maneira mais atuante (DYE, 1996).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Descrição das áreas estudadas

O presente estudo foi realizado na microrregião de Itaguaí, à qual pertence à mesorregião metropolitana do estado do Rio de Janeiro. Esta microrregião possui uma área de 907,007 km<sup>2</sup> e, é composta por três municípios: Itaguaí, Seropédica e Mangaratiba.

A microrregião de Itaguaí possui um clima caracterizado como tropical com estação seca e chuvas no verão (Aw) e estação de inverno bem definida segundo classificação de Köppen-Geiger (PIEEL et al., 2007). Este clima apresenta temperatura média do mês mais frio do ano >18°C e temperatura média máxima acima de 25°C.

Seguem abaixo as respectivas coordenadas geográficas dos municípios:

- Itaguaí: 22° 51'08" latitude Sul; 43° 46'31" longitude Oeste; Altitude: 13 metros.
- Seropédica: 22° 44' 38" latitude Sul; 43° 42' 27" longitude Oeste; Altitude: 26 metros.
- Mangaratiba: 22°57'35" latitude Sul; 44°02'26" longitude Oeste; Altitude: 18 metros.

Segundo informações divulgadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) após o Censo 2010, as populações de Itaguaí (100.362), Seropédica (76.045), e Mangaratiba (34.966) somadas, totalizam 211.373 habitantes (IBGE, 2010).

Essa microrregião é cortada por diferentes rodovias, o que facilita o deslocamento de pessoas entre os municípios, assim como o desenvolvimento de atividades econômicas ou de turismo na região. Além disso, faz divisa com diversos municípios (Rio de Janeiro, Nova Iguaçu, Queimados, Japeri, Paracambi, Pirai, Rio Claro e Angra dos Reis) (Figura 1).



**Figura 1.** Localização geográfica da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, evidenciando os municípios de Seropédica, Itaguaí e Mangaratiba. Baseado no mapa multimodal desenvolvido pelo DNIT (Departamento Nacional de Infraestrutura de Transportes) em 2009.

## 3.2 Inquérito Canino

### 3.2.1 Tamanho da amostra e amostragem

Adotou-se a prevalência esperada para a microrregião de Itaguaí de 19,6% baseando-se nas médias entre as prevalências encontradas nos trabalhos realizados em diferentes áreas do Rio de Janeiro por Coutinho et al. (1985), Cabrera et al. (2003) e de Santos et al. (2005), visto não haverem dados referentes à prevalência nos municípios da microrregião estudada. Admitiu-se um intervalo de confiança de 95%, e margem de erro de 4%.

Desta forma, para estabelecer o número mínimo de amostras para coleta na microrregião de Itaguaí, seguiu-se a equação descrita por Sampaio (2002):

$$n = \frac{1,96^2 \times P_{esp} \times (1 - P_{esp})}{d^2}$$

Onde: n = tamanho da amostra;  $P_{esp}$  = prevalência esperada;  $d^2$  = precisão absoluta desejada.

Após a aplicação desta fórmula, foi estabelecida a coleta de 378 amostras na microrregião estudada.

A coleta das amostras foi realizada por conveniência não probabilística, onde as residências foram visitadas e, após consentimento do proprietário ou responsável, os animais foram submetidos aos exames clínicos e as amostras de sangue foram coletadas. O número total de amostras coletadas na microrregião de Itaguaí foi de 524, distribuídas da seguinte forma: Itaguaí (n=166) e Seropédica (n=220) e Mangaratiba (n=138), no período de abril de 2010 à abril de 2011.

Segundo informações do setor de vigilância da Secretaria de Saúde do Estado, a população canina dos municípios é baseada na população humana (critério adotado pelo estado do Rio de Janeiro: 2,5% da população humana de cada município). No entanto, apesar de Seropédica ser o segundo município da microrregião em maior densidade demográfica, foi coletado maior número de amostras, pois é uma área de alta concentração de animais domésticos provenientes de outras localidades pela característica de cidade universitária, principalmente cães, por abrigar a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, assim como, a existência do curso de Medicina Veterinária nesse campus, que atrai maior número de animais junto aos estudantes ao município.

### **3.2.2 Visita às residências e aplicação de questionário epidemiológico**

Em cada residência visitada, foi explicado ao proprietário a razão do estudo, juntamente à conscientização da necessidade deste tipo de trabalho, elucidando-o sobre as doenças que possivelmente podem acometer seus animais. Após o seu consentimento, foi aplicado um questionário semi-estruturado (Anexo 1) na forma de entrevista, como instrumento de investigação, visando recolher informações inerentes aos proprietários (dados pessoais, endereço, escolaridade, condição financeira, entre outros), às condições ambientais do local (característica do ambiente, se métodos profiláticos contra vetores foram utilizados etc.) e ao animal (sexo, idade, raça, porte, pelagem, pêlo, hábitos do animal, contato com outras espécies, alterações clínicas, entre outras). Todas as informações adquiridas a partir de questões pré-estabelecidas foram tabuladas a fim de avaliar possíveis fatores associados à sororreatividade de cães à *Leishmania* spp.

### **3.2.3 Coleta de amostras de sangue**

Uma amostra de 5 mL de sangue periférico foi coletada de cada animal através de punção da veia cefálica, e colocadas em tubo seco (sem anticoagulante), sendo devidamente identificado e acondicionado em recipiente térmico e encaminhada ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz (E.E.P.P. W.O. Neitz), na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para ser submetida à centrifugação.

Após centrifugação dos tubos a 2500xg por 5 minutos, o soro foi separado, e aliquotado em microtubos de polipropileno de 1,5 mL, identificados e acondicionados a -20°C até o momento da realização dos ensaios sorológicos.



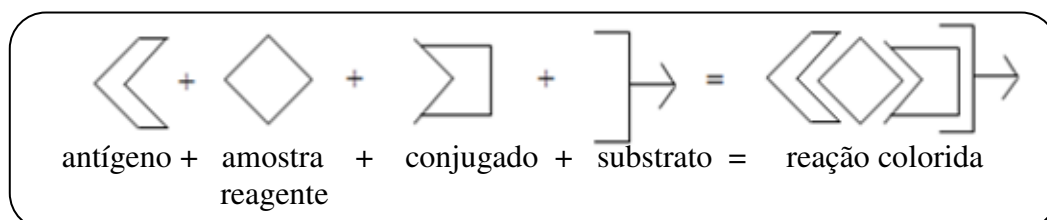
### 3.2.4 Inquérito Sorológico

Para pesquisa de anticorpos específicos anti-*Leishmania* foram empregados os seguintes métodos: imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (EIE), ambos fornecidos por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ-RJ, para se detectar animais sororreagentes à *Leishmania* spp. Além disso, foi realizado o teste imunocromatográfico para leishmaniose visceral canina. Os ensaios sorológicos foram realizados no Laboratório de Imunodiagnóstico da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro. Foram considerados reagentes para leishmaniose (*Leishmania* spp.) os animais que tiveram resultados positivos no EIE e IFI na titulação de  $\geq 1:40$ . Além disso, realizou-se a avaliação da concordância entre os testes EIE e IFI, através da descrição de Laurentino-Silva (1999), onde os resultados dos testes sorológicos foram confrontados para a verificação da co-positividade, co-negatividade e concordância bruta.

#### a) Ensaio Imunoenzimático (EIE)

As amostras de soro após descongeladas, foram diluídas em solução contendo caseína, seguindo as titulações desejadas (1:40; 1:80; 1:160). Como já descrito, foi utilizado o “kit” fornecido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ-RJ, conjunto acompanhado por uma microplaca contendo cavidades, previamente sensibilizadas com antígeno *Leishmania major*-like. Foi adicionado 100  $\mu$ L dessa solução em cada cavidade, conforme padronização do teste. Seguiu-se à colocação da placa em câmara úmida incubada em estufa (sob 37°, durante 45 minutos). Após esse procedimento, a placa foi submetida à lavagem (seis repetições, com intervalo de 60 segundos entre elas), onde 200  $\mu$ L de uma solução contendo tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,2, 10x diluído) com um emulsificante (Tween®) foram adicionados em cada poço. Posteriormente, 100  $\mu$ L do conjugado (anti-IgG de cão marcada com a enzima peroxidase) devidamente diluído, foram distribuídos em cada poço. A placa foi novamente colocada em câmara úmida e incubada em estufa nas mesmas condições já descritas. A placa foi submetida à nova lavagem. Com o objetivo de evidenciar a reação, utilizou-se uma substância cromógena TMB (tetrametilbenzidina) que pela ação da peroxidase com o peróxido de hidrogênio forma um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) que interrompe a reação, passa a apresentar uma coloração amarela, em caso da amostra ser reagente (Figura 2). Nas cavidades que não havia anticorpos específicos, não houve desenvolvimento de cor.

A leitura foi realizada em leitora de microplacas a 450nm. Foram considerados reagentes os animais que apresentaram valores acima do *cutt-off*, determinado utilizando os resultados dos controles soronegativos confirmados, considerando a diluição  $\geq 1:40$ .



**Figura 2.** Esquema do ensaio imunoenzimático, baseado no manual do conjunto diagnóstico EIE – Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos.

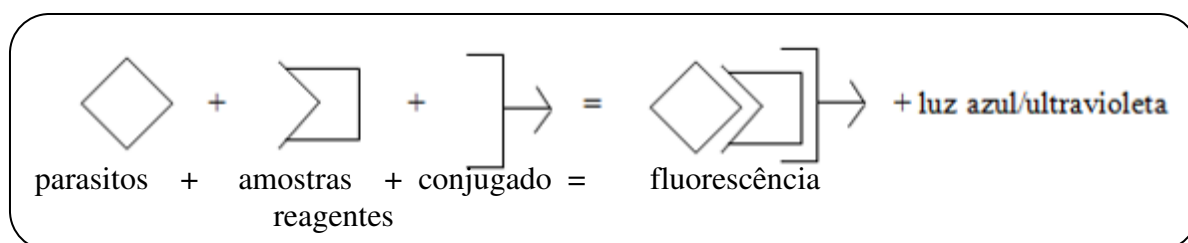
b) Imunofluorescência Indireta (IFI):

O teste de imunofluorescência indireta consiste no diagnóstico sorológico da leishmaniose canina através da reação de soros de cães naturalmente infectados, com parasitos do gênero *Leishmania* fixados em lâminas de microscopia.

Foram considerados reagentes os soros que apresentaram fluorescência (Figura 3), tomando-se como referência os soros controle positivo e negativo que foram incluídos em cada lâmina. O antígeno utilizado foi obtido a partir de promastigotas na fase logarítmica provenientes de meios de cultura de *Leishmania (L.) infantum*.

Foram utilizadas para a sensibilização das lâminas, 10 µL da suspensão contendo  $1,2 \times 10^6$  promastigotas/mL em cada poço. As lâminas foram colocadas em estufa (sob 37°C, por 30 minutos) para fixação do parasito. A seguir, os soros controle (positivo e negativo) do teste e as amostras coletadas neste estudo foram devidamente diluídos (1:40; 1:80; 1:160) e homogeneizados. Foram adicionados em cada poço 10 µL das respectivas amostras diluídas, com o objetivo de que anticorpos específicos se fixassem aos antígenos. As lâminas foram acondicionadas em câmara úmida e colocadas em estufa (sob 37°C, durante 45 minutos). Posteriormente, foram submetidas à lavagem com PBS (pH 7,2). As lâminas foram colocadas em estufa (sob 37°C, por 30 minutos) para secagem. Em seguida, foi realizada a incubação utilizando-se anticorpo anti-IgG de cão conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FICT) diluídos em PBS com o corante Azul de Evans. Novamente colocou-se as lâminas em câmara úmida e em estufa (sob 37°C, durante 45 minutos). Submetê-las à nova lavagem com PBS. Após a secagem das lâminas, acrescentou-se gotas de glicerina e sobrepoie-se com lamínula para leitura no microscópio de imunofluorescência.

Foram consideradas reagentes as amostras que expressaram fluorescência com refringência na diluição  $\geq 1:40$ , na análise por microscopia específica.



**Figura 3.** Esquema do teste de imunofluorescência indireta (reação positiva), baseado no manual do conjunto diagnóstico IFI – Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos.

c) Teste Rápido Imunocromatográfico de Duplo Percurso (TR DPP® - Leishmaniose Visceral Canina)

Segundo a descrição feita por Schubach (2011), o teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso (TR DPP®) emprega uma combinação de proteína A conjugada com partículas de ouro coloidal e antígenos recombinantes para *Leishmania* K28 (fragmentos K26 e K39). Entre esses antígenos, a proteína recombinante K39 (rK39) está incluída, que consta de uma sequência de 39 aminoácidos clonada da região quinase de *Leishmania infantum*, complexo donovani-específico (ASSIS et al., 2008). São ligados à fase sólida de uma

membrana de nitrocelulose, para detectar anticorpos específicos para *Leishmania infantum* em sangue total, soro ou plasma. O conjunto diagnóstico é composto por uma plataforma de base plástica (Figura 4) com dois poços que dão acesso a uma tira cada. A primeira é a condutora da amostra, sendo composta por leito de aplicação da amostra e membrana e cartão laminado (S1). A segunda tira detecta anticorpos da amostra, sendo composta por leito com conjugado, membrana de absorção residual e cartão laminado (S2). Além disso, o conjunto diagnóstico vem acompanhado por um frasco de solução tampão, uma alça para coleta da amostra e uma lanceta. A tira S1 serve para conduzir a amostra à tira S2, onde a reação imunocromatográfica acontece. A tira S2 possui uma linha transversal com antígeno. Se houver anticorpo, forma-se um complexo que liga ao conjugado e aos anticorpos da amostra, produzindo uma coloração rosada, classificando a amostra como reagente. Na ausência desta, não se observa a coloração. O conjugado que não se ligou continua o percurso ao longo da membrana e passam por uma área contendo anticorpos inespecíficos, corando a região de controle. Este controle serve para demonstrar que a amostra e os reagentes foram devidamente aplicados e que migraram através do dispositivo. O tampão facilita o fluxo lateral e promove a ligação dos anticorpos aos antígenos.



**Figura 4.** Plataforma plástica com dois poços por onde são conduzidas amostra e solução tampão, ocorrendo a reação do TR DPP®.

Neste estudo, preferiu-se realizar o teste rápido após centrifugação das amostras no laboratório, adotando a utilização do soro, ao invés de sangue total ou plasma. Com uma pipeta apropriada coletou-se 5µL de soro previamente descongelado e aplicou-se no poço de nº 1, adicionando em seguida duas gotas de tampão. Após cinco minutos, foram aplicadas quatro gotas do mesmo tampão no poço de nº 2 e aguardou-se 10 minutos. A leitura foi realizada visualmente, observando as linhas do teste e do controle macroscopicamente evidentes, diretamente na plataforma plástica. A reação foi considerada positiva, ao ser formado um complexo macromolecular colorido (linha visível), banda referente à amostra testada, e uma segunda linha de reação, determinada linha controle, para validação do teste. O teste foi considerado negativo, quando apenas a banda referente ao controle apareceu. Quando nenhuma banda foi visualizada, o teste foi considerado inválido e repetido, utilizando um novo kit.

O resultado do teste imunocromatográfico foi realizado no intuito de detectar especificamente cães com anticorpos contra *L. infantum*. E foram considerados reagentes para

leishmaniose visceral, aqueles que tiveram resultados positivos na IFI, EIE e TR DPP<sup>®</sup>. Os testes rápidos reagentes foram repetidos com a mesma amostra (duplicata), e nos casos em que o resultado persistiu, os animais foram submetidos à nova coleta de amostra de sangue para realizar novo teste rápido.

O critério utilizado para a leitura do teste (Anexo II) seguiu as recomendações do manual descrito por Bio-Manguinhos, FIOCRUZ/RJ.

### **3.3 Princípios éticos**

Os procedimentos realizados nos animais desse estudo foram aprovados pela COMEP/UFRRJ (Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ) sob o protocolo N.º 124/2011, informando que este projeto de pesquisa que está sob o processo 23083.005908/2011-01, atende aos princípios básicos e éticos para pesquisa envolvendo o uso de animais (Anexo III). Todos os procedimentos foram realizados por uma equipe de médicos veterinários capacitados.

### **3.4 Avaliação dos resultados e análise estatística**

Os resultados dos exames sorológicos (positivos na IFI e EIE, sob a titulação de 1:40) foram comparados e associados às variáveis obtidas através do questionário aplicado aos proprietários dos animais através da análise não paramétrica pelo Teste de Qui quadrado ( $X^2$ ) e/ou Exato de Fisher, em nível de 5% de significância. Os resultados obtidos (sob a titulação 1:40) foram submetidos ao teste de McNemar em nível de 5% de significância, a fim de avaliar a discordância entre os exames utilizados no diagnóstico. Todas as análises utilizaram o programa Bioestat 4.0 (AYRES, 2000).

## 4 RESULTADOS

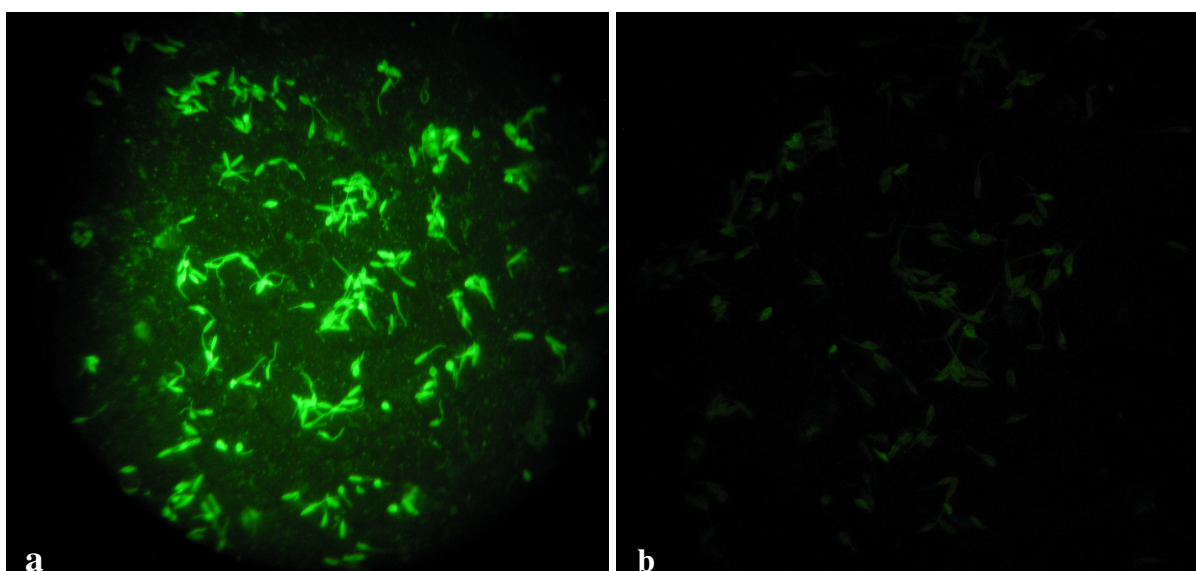
### 4.1 Inquérito Sorológico

#### 4.1.1 Imunofluorescência indireta (IFI) e Ensaio Imunoenzimático (EIE)

A partir das 524 amostras submetidas aos testes sorológicos, foram detectados 148 (28,24%) animais sororreagentes para *Leishmania* spp. em ambas as técnicas (IFI e EIE na titulação  $\geq 1:40$ ), durante inquérito compreendido no período de abril de 2010 a abril de 2011.

Do total de amostras de soro analisadas através da reação de imunofluorescência indireta (IFI) (Figura 5), em 148 (28,24%) foram detectados anticorpos para *Leishmania* spp.

Ao realizar o ensaio imunoenzimático (EIE) das 524 amostras, 270 (51,53%) foram reagentes (Tabela 1).



**Figura 5.** a) Observação de amostra positiva (titulação de 1:160), através de microscopia de imunofluorescência. b) Demonstração de amostra negativa (titulação 1:160).

**Tabela 1.** Relações de concordância entre os testes de IFI e EIE sob a titulação  $\geq 1:40$ .

		IFI		Total
		Positivo	Negativo	
EIE	Positivo	148 (28,24%)	122 (23,29%)	270 (51,53%)
	Negativo	0 (0%)	254 (48,47%)	254 (48,47%)
	Total	148 (28,24%)	376 (71,76%)	524 (100%)

A relação de co-positividade EIE/IFI foi de 54,82%, e a de co-negatividade EIE/IFI foi de 100%; a co-positividade IFI/EIE foi de 100% e a co-negatividade IFI/EIE foi de 67,55%. A concordância bruta obtida foi de 76,51%.

Os testes IFI e EIE foram considerados discordantes ( $p < 0,0001$ ) na titulação de 1:40.

Em relação ao título de anticorpos, as amostras que foram reagentes a titulação de 1:40, foram tituladas até 1:160. Na IFI, das 148 amostras que foram reagentes à 1:40, apenas 44 (29,73%) continuaram a reagir na titulação de 1:80, e somente 11 (7,43%) titularam à 1:160. No EIE, do total de 270 amostras reativas na titulação de 1:40, observamos que 208 (77,04%) foram sororreagentes quando tituladas a 1:80, e que somente 119 (44,07%) reagiram na titulação a 1:160.

#### **4.1.2 Teste Rápido DPP<sup>®</sup> para leishmaniose visceral canina**

Dos animais avaliados pelo TR DPP<sup>®</sup>, somente 20 foram reagentes ao primeiro exame. Foi realizada busca ativa a esses animais para serem submetidos à nova coleta de sangue. No entanto, dos 20 animais inicialmente considerados positivos ao exame realizado após primeira coleta de sangue, somente dois animais foram encontrados durante a segunda visita. Dos 18 animais restantes, cinco faleceram, e os outros não foram encontrados. Dos animais que os proprietários informaram falecimento, um deles foi relativo a adoecimento e os outros por atropelamento.

As duas novas amostras coletadas na segunda visita, após serem submetidas à repetição do TR DPP<sup>®</sup>, apresentaram resultado negativo.

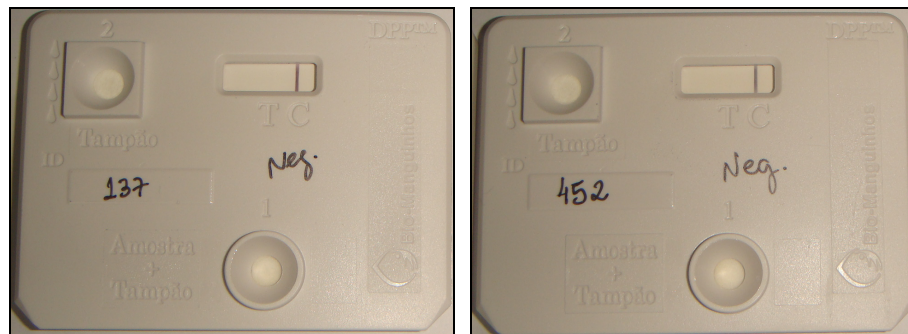
Sendo assim, ao final foram considerados positivos 18 (0,03%,  $n=18/524$ ) animais no TR DPP<sup>®</sup>. Entretanto, somente oito desses animais, foram também reagentes na IFI e no EIE, considerando-os como reagentes para leishmaniose visceral.

Com exceção de dois dos exames, em que as bandas formadas apresentaram-se bem definidas e com intensidade de cor satisfatória, pode-se observar que os outros 16 testes formaram bandas tênues, com pouca intensidade de cor (Figura 6), diferenciando-se dos resultados negativos (Figura 7). Por se tratar de um teste qualitativo, a leitura seguiu as recomendações do manual para realização dos testes como descritas e exemplificadas no Anexo II.

Somente um dos animais testados positivamente, amostra número 73 (Figura 6) apresentava-se com clínica de leishmaniose visceral, como emagrecimento observado pelo proprietário em pouco tempo, apatia, inapetência e sinal de onicofribose. Além disso, como histórico deste animal, o proprietário relatou que o mesmo tinha origem no município de Governador Valadares-MG, e foi trazido com poucos meses de idade para Seropédica-RJ. A fêmea, mãe deste animal, teve leishmaniose visceral diagnosticada em Governador Valadares, e faleceu poucos meses após a parição em que nasceu este cão. Ainda nesse histórico, foi relatado que os outros filhotes provenientes desta mesma parição faleceram com sinais de leishmaniose visceral poucos meses depois.



**Figura 6.** Leitura positiva dos testes rápidos TR DPP®. Observar a intensidade de cor e definição das linhas formadas no momento da reação de diferentes amostras (73, 52, 165).



**Figura 7.** Imagem demonstrativa de resultados negativos encontrados durante a realização da leitura dos testes rápidos TR DPP®.

#### **4.2 Fatores associados às características inerentes aos cães sororreagentes à *Leishmania* spp.**

Foram selecionadas as amostras positivas no EIE (titulação de 1:40) para realização da IFI (titulação de 1:40), funcionando o EIE como teste de triagem das amostras. Os animais sororreagentes em ambos os testes foram incluídos no estudo epidemiológico.

No presente estudo, foi verificada associação ( $p < 0,05$ ) entre as variáveis: definição racial, faixa etária, cor da pelagem e presença de ectoparasitos (Tabela 2).

As variáveis relacionadas com o hospedeiro que não apresentaram associação ( $p > 0,05$ ) com a reatividade nos exames sorológicos foi sexo, tamanho do pêlo, porte do animal, escore corporal e comportamento do animal. Entretanto, observou-se que fêmeas (RF=1,09,  $p=0,3076$ ), assim como animais com pêlo curto (RF=1,46,  $p=0,0552$ ), e magro (RF=2,08,  $p=0,1284$ ) apresentaram maior frequência de soropositividade para leishmaniose.



**Tabela 2.** Frequência de cães sorreagentes à *Leishmania* spp., em função do sexo, faixa etária, raça, cor da pelagem, tamanho do pêlo, porte do animal, escore corporal, comportamento do animal e presença de ectoparasitos na Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro no período de abril de 2010 a abril de 2011.

<b>Fatores</b>	<b>N</b>	<b>Sorreagentes a <i>Leishmania</i> spp. n %</b>		<b>RF</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p-valor</b>
<b>Sexo do cão</b>						
Macho	280	76 <sup>a</sup>	27,14	1	-	-
Fêmea	244	72 <sup>a</sup>	29,51	1,09	0,83 a 1,43	0,3076
<b>Faixa etária</b>						
< 6 meses a < 2 anos	171	41 <sup>b</sup>	23,98	1	-	-
≥ 2 anos a < 5 anos	153	54 <sup>a</sup>	35,29	1,47	1,05 a 2,07	0,0174
≥ 5 anos	200	53 <sup>ab</sup>	26,50	1,11	0,78 a 1,57	0,3309
<b>Definição racial</b>						
Sem raça definida	366	118 <sup>a</sup>	32,24	1,70	1,19 a 2,42	0,014
Raça definida	158	30 <sup>b</sup>	18,99	1	-	-
<b>Cor da pelagem</b>						
Clara	217	48 <sup>b</sup>	22,12	1	-	-
Escura	168	49 <sup>ab</sup>	29,17	1,32	0,94 a 1,86	0,0720
Duas ou três cores	139	51 <sup>a</sup>	36,69	1,66	1,19 a 2,31	0,0020
<b>Tamanho do pêlo</b>						
Curto	265	82 <sup>a</sup>	30,94	1,46	0,93 a 2,29	0,0552
Médio	174	48 <sup>a</sup>	27,59	1,03	0,65 a 1,63	0,4805
Longo	85	18 <sup>a</sup>	21,18	1	-	-
<b>Porte do animal</b>						
Pequeno	164	37 <sup>a</sup>	22,56	1	-	-
Médio	281	87 <sup>a</sup>	30,96	1,37	0,98 a 1,91	0,0362
Grande	79	24 <sup>a</sup>	30,38	1,35	0,87 a 2,09	0,1233
<b>Escore corporal</b>						
Magro	52	18 <sup>a</sup>	34,62	2,08	0,69 a 6,23	0,1284
Normal	454	127 <sup>a</sup>	27,97	1,68	0,59 a 4,77	0,2165
Obeso	18	3 <sup>a</sup>	16,67	1	-	-
<b>Comportamento</b>						
Triste	30	8 <sup>a</sup>	26,67	1	-	-
Ativo	494	140 <sup>a</sup>	28,34	1,06	0,58 a 1,96	0,4955
<b>Presença de ectoparasitos</b>						
Sim	341	116 <sup>a</sup>	34,02	1,95	1,37 a 2,75	<0,0001
Não	183	32 <sup>b</sup>	17,49	1	-	-

<sup>a</sup>Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher (p>0,05).

N: Número de animais examinados nos testes sorológicos; n: número de animais soropositivos; RF: Razão de Frequência; IC: Intervalo de Confiança.



### 4.3 Fatores associados aos caracteres extrínsecos aos cães (origem, hábitos, comportamento e manejo) sororreagentes à *Leishmania* spp.

Ao analisar os fatores associados aos caracteres extrínsecos aos cães, pode-se observar que muitas das variáveis observadas apresentaram associação (Tabelas 3 e 4).

As variáveis relacionadas à origem do animal que apresentaram associação significativa ( $p < 0,05$ ) com a sororreatividade dos animais à *Leishmania* spp. foram: município de domicílio do cão; se o domicílio localiza-se na zona rural ou urbana; se o animal nasceu na propriedade ou não; origem do animal. A variável referente há quanto tempo o animal reside na propriedade, não apresentou associação significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3).

Dentre os municípios avaliados, Seropédica (RF=3,25,  $p < 0,0001$ ), seguido de Itaguaí (RF=2,10,  $p = 0,0024$ ) apresentaram as maiores frequências de animais soropositivos à *Leishmania* spp. Animais errantes (RF=3,12,  $p < 0,0001$ ), e de área rural (RF=1,67,  $p = 0,0002$ ) apresentaram-se mais propensos a serem sororreagentes à leishmaniose.

**Tabela 3.** Frequência de cães sororreagentes à *Leishmania* spp., em função dos caracteres extrínsecos que envolvem a origem dos animais amostrados na Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, no período de abril de 2010 à abril de 2011.

Fatores	N	Sororreagentes a <i>Leishmania</i> spp. n	%	FR	95% IC	p-valor
<b>Município da microrregião</b>						
Seropédica	220	88 <sup>a</sup>	40,00	3,25	2,02 a 5,21	<0,0001
Itaguaí	166	43 <sup>b</sup>	25,90	2,10	1,26 a 3,52	0,0024
Mangaratiba	138	17 <sup>c</sup>	12,32	1	-	-
<b>Área em que reside</b>						
Rural	249	89 <sup>a</sup>	35,74	1,67	1,26 a 2,21	0,0002
Urbana	275	59 <sup>b</sup>	21,45	1	-	-
<b>Animal é nascido na propriedade?</b>						
Sim	161	44 <sup>b</sup>	27,33	1,07	0,78 a 1,45	0,3860
Não	343	88 <sup>b</sup>	25,66	1	-	-
Animais errantes	20	16 <sup>a</sup>	80,00	3,12	2,35 a 4,14	<0,0001
<b>Se não nasceu na propriedade, de onde veio?</b>						
Do município de Seropédica	106	39 <sup>a</sup>	36,79	3,15	1,51 a 6,61	<0,0001
Do município de Itaguaí	71	15 <sup>b</sup>	21,13	1,81	0,79 a 4,15	0,1134
Do município de Mangaratiba	60	7 <sup>b</sup>	11,67	1	-	-
De fora da microrregião de Itaguaí	55	10 <sup>b</sup>	18,18	1,56	0,64 a 3,81	0,2357
Não sabe	51	17 <sup>a</sup>	33,33	2,86	1,29 a 6,34	0,0057
<b>Há quanto tempo o animal reside na propriedade?</b>						
< 6 meses a < 2 anos	182	47 <sup>a</sup>	25,82	1	-	-
≥ 2 anos a < 5 anos	158	50 <sup>a</sup>	31,65	1,23	0,88 a 1,72	0,1434
≥ 5 anos	184	51 <sup>a</sup>	27,72	1,07	0,76 a 1,51	0,3856

<sup>a</sup>Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher ( $p > 0,05$ ).

N: Número de animais examinados nos testes sorológicos; n: número de animais soropositivos; RF: Razão de Frequência; IC: Intervalo de Confiança.

Quanto aos hábitos do animal (Tabela 4), foi observada associação significativa ( $p < 0,05$ ) em todas as variáveis analisadas: se vive dentro da residência; locais de acesso do animal; se tem contato direto com outras espécies; quais as espécies que tem contato; hábito do animal; se apresenta abrigo; e tipo de ambiente em que o animal passa a maior parte do tempo. Animais que vivem fora da residência (RF=1,42,  $p=0,0197$ ) apresentaram maior chance de soropositividade à *Leishmania* spp. A categoria com relação ao acesso aos locais de matas, córregos ou pastagem (RF=2,81,  $p=0,0007$ ) apresentou mais animais sororreagentes, assim como as categorias sobre os animais que vivem soltos (RF=1,66,  $p=0,0073$ ), ou presos durante o dia e soltos a noite (RF=1,47,  $p=0,1738$ ). Cães que mantiveram contato com outras espécies de animais (RF=1,76,  $p < 0,0001$ ), principalmente animais de produção e de companhia (RF=2,66,  $p=0,0020$ ) mostraram as maiores frequências de soropositividade.

**Tabela 4.** Frequência de cães sororreagentes à *Leishmania* spp., em função dos caracteres extrínsecos que envolvem os hábitos dos animais amostrados na Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, no período de abril de 2010 à abril de 2011.

Fatores	N	Sororreagentes a <i>Leishmania</i> spp.		FR	95% IC	p-valor
		n	%			
<b>Animal vive dentro da residência</b>						
Não	363	113 <sup>a</sup>	31,13	1,42	1,02 a 1,98	0,0197
Sim	160	35 <sup>b</sup>	21,88	1	-	-
<b>Locais de acesso do animal</b>						
Ambiente Urbano	193	40 <sup>b</sup>	20,73	1,60	0,76 a 3,37	0,1382
Matas, córregos e pastagens	277	101 <sup>a</sup>	36,46	2,81	1,39 a 5,71	0,0007
Quintal/mantido preso	54	7 <sup>b</sup>	12,96	1	-	-
<b>Contato com outras espécies</b>						
Sim	224	84 <sup>a</sup>	37,50	1,76	1,33 a 2,31	<0,0001
Não	300	64 <sup>b</sup>	21,33	1	-	-
<b>Quais as espécies que tem contato?</b>						
Animais de produção e de companhia	55	26 <sup>a</sup>	47,27	2,66	1,34 a 5,29	0,0020
Animais de produção	78	36 <sup>a</sup>	46,15	2,60	1,33 a 5,09	0,0015
Animais de companhia	46	14 <sup>ab</sup>	30,43	1,71	0,80 a 3,68	0,1220
Aves/ animais silvestres	45	8 <sup>b</sup>	17,78	1	-	-
<b>Hábito do animal</b>						
Solto	372	116 <sup>a</sup>	31,18	1,66	1,10 a 2,52	0,0073
Sempre preso	112	21 <sup>b</sup>	18,75	1	-	-
Preso de dia/solto a noite	40	11 <sup>ab</sup>	27,50	1,47	0,78 a 2,76	0,1738
<b>Apresenta abrigo?</b>						
Sim	358	74 <sup>b</sup>	20,67	1	-	-
Não	166	74 <sup>a</sup>	44,58	2,16	1,66 a 2,81	<0,0001
<b>Ambiente em que o animal passa a maior parte do tempo</b>						
Predominantemente de terra	338	110 <sup>a</sup>	32,54	1,87	1,30 a 2,70	0,0002
Cimentado e/ou ladrilhado	167	29 <sup>b</sup>	17,37	1	-	-
Gramma e/ou pasto	19	9 <sup>a</sup>	47,37	2,73	1,53 a 4,86	0,0028

<sup>a</sup>Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher ( $p > 0,05$ ).

N: Número de animais examinados nos testes sorológicos; n: número de animais soropositivos; RF: Razão de Frequência; IC: Intervalo de Confiança.

Com relação ao manejo estabelecido pelo proprietário aos animais (Tabela 5), as variáveis relacionadas (qual o tipo de alimentação; se recebe tratamento contra ectoparasitos; quais as condições de limpeza do ambiente; se faz o recolhimento das fezes; se o animal tem assistência veterinária; e frequência do banho) apresentaram associação significativa ( $p < 0,05$ ).

Em relação às condições de limpeza do ambiente, observou-se que 33,85% ( $n=87/257$ ) dos animais amostrados que foram submetidos a viverem em ambiente onde o manejo de limpeza foi classificado como moderado ou ruim ( $RF=1,48$ ,  $p=0,0035$ ) foram soropositivos à *Leishmania* spp.

**Tabela 5.** Frequência de cães sorreagentes à *Leishmania* spp., em função dos caracteres extrínsecos que envolvam o manejo estabelecido pelo proprietário aos animais amostrados na Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, no período de abril de 2010 à abril de 2011.

Fatores	N	Sororreagentes a <i>Leishmania</i> spp.		FR	95% IC	p-valor
		n	%			
<b>Tipo de alimentação</b>						
Ração	234	53 <sup>b</sup>	22,65	1	-	-
Comida caseira	290	95 <sup>a</sup>	32,76	1,45	1,08 a 1,93	0,0070
<b>Recebe tratamento ectoparasiticida</b>						
Sim	389	90 <sup>b</sup>	23,14	1	-	-
Não	135	58 <sup>a</sup>	42,96	1,86	1,42 to 2,42	<0,0001
<b>Condições de limpeza do ambiente</b>						
Satisfatória	267	61 <sup>b</sup>	22,85	1	-	-
Moderada ou Ruim	257	87 <sup>a</sup>	33,85	1,48	1,12 a 1,96	0,0035
<b>Recolhimento de fezes</b>						
Sim	374	82 <sup>b</sup>	21,93	1	-	-
Não	150	66 <sup>a</sup>	44,00	2,01	1,54 a 2,61	<0,0001
<b>O cão tem assistência veterinária?</b>						
Sim	242	42 <sup>b</sup>	17,36	1	-	-
Não	282	106 <sup>a</sup>	37,59	2,17	1,58 a 2,96	<0,0001
<b>Frequência de banho</b>						
Semanal	113	26 <sup>ab</sup>	23,01	1,15	0,65 a 2,02	0,3787
Quinzenal	63	17 <sup>ab</sup>	26,98	1,35	0,73 a 2,48	0,2219
Mensal	75	15 <sup>b</sup>	20,00	1	-	-
Outros	273	90 <sup>a</sup>	32,97	1,65	1,02 a 2,67	0,0214

<sup>a</sup>Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher ( $p > 0,05$ ).

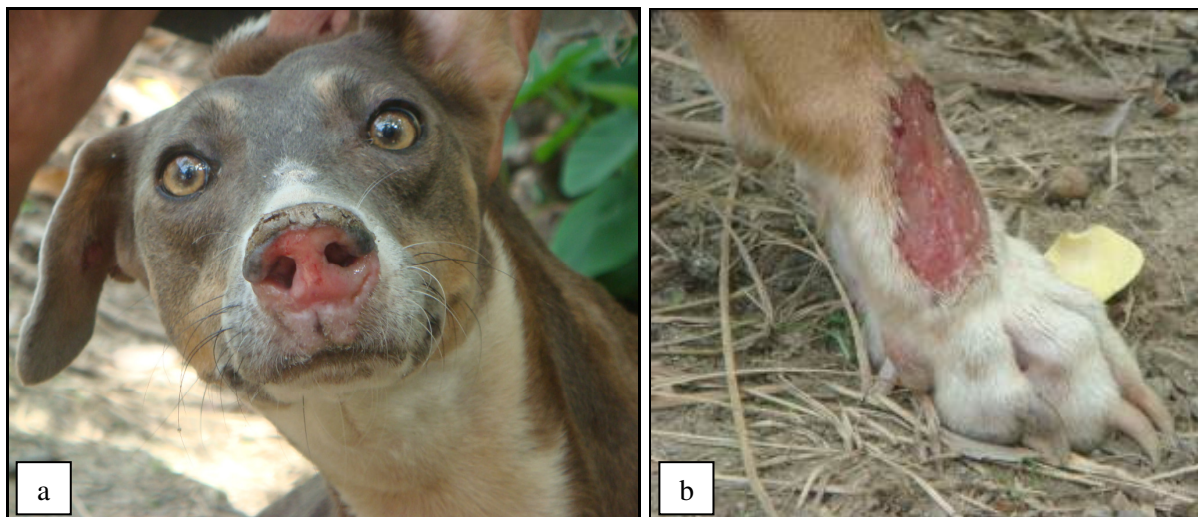
N: Número de animais examinados nos testes sorológicos; n: número de animais soropositivos; RF: Razão de Frequência; IC: Intervalo de Confiança.

#### 4.4 Fatores associados aos aspectos clínicos observados nos cães sororreagentes à *Leishmania* spp.

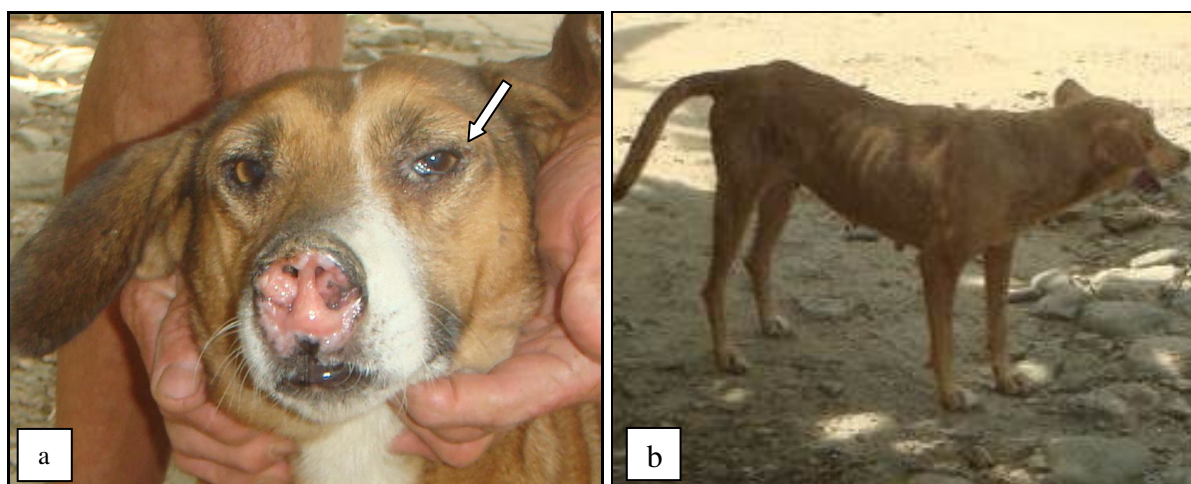
Ao analisar os achados clínicos observados nos animais durante o inquérito, podemos obter as variáveis: turgor, coloração de mucosas oral e ocular, linfadenopatias, onicogribose (Figura 8b), dermatopatias em geral, secreção e/ou corrimento ocular, e histórico de epistaxe, rinorragia e gengivorragia. Todas as variáveis não tiveram associação significativa ( $p > 0,05$ ), com exceção das dermatopatias em geral ( $p < 0,05$ ) encontradas (Tabela 6).

Em relação às dermatopatias ( $RF=1,41$ ,  $p=0,0186$ ), encontramos animais com

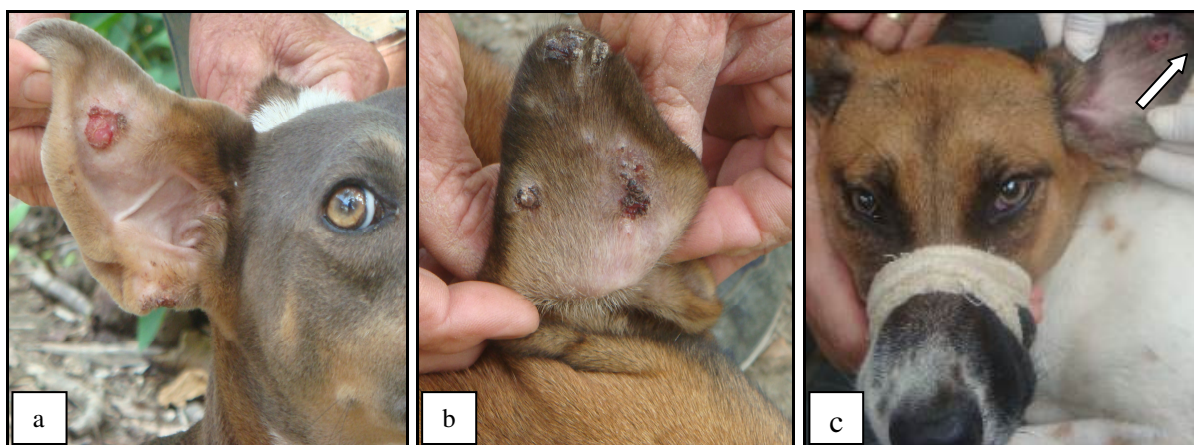
diferenças tipos de alterações, desde descamações secas, hiperqueratoses (Figura 8a), eczemas, seborréias oleosas, alopecias, até ulcerações de mucosa (Figura 8a e 9b) e lesões no pavilhão auricular (Figura 10a, 10b e 10c) (chamadas vulgarmente de lesão em ponta de orelha).



**Figura 8.** a) Cadela sororreagente à *Leishmania* spp. encontrada na localidade de Mazomba no município de Itaguaí, Rio de Janeiro, apresentando lesão ulcerativa e hiperqueratose no focinho. b) Extermidade distal do membro anterior direito apresentando lesão com aspecto ulcerativo úmido, e sinal de onicogribose.



**Figura 9.** a) Animal sororreagente à *Leishmania* spp. encontrado na localidade de Mazomba no município de Itaguaí, Rio de Janeiro, apresentando lesão na mucosa nasal e início de ulceração na pálpebra esquerda (seta). b) Fêmea apresentando-se com escore corporal magro.



**Figura 10.** a,b) Lesões no pavilhão auricular de dois animais pertencentes ao município de Itaguaí, RJ. c) Animal do município de Mangaratiba, RJ, com lesão ulcerativa no pavilhão auricular esquerdo (seta).

Os achados clínicos como as linfadenopatias, onicogrifose, e secreções oculares foram encontrados em poucos animais durante o inquérito. Em relação às linfadenopatias (RF=1,58,  $p=0,1319$ ), podemos observar que dos animais que apresentaram essa alteração clínica, 43,75% ( $n=7/16$ ) foram sororreagentes à *Leishmania* spp. Quanto aos animais que apresentaram onicogrifose (RF=1,40,  $p=0,3159$ ), pode-se observar que 40% ( $n=4/10$ ) foram reagentes nos exames sorológicos. Com relação àqueles animais encontrados com secreção e/ou corrimento ocular (RF=1,80,  $p=0,1173$ ) foram mais sororreativos em ambos os testes IFI e EIE sob a titulação  $\geq 1:40$ .

**Tabela 6.** Frequência de cães sororreagentes à *Leishmania* spp., em função dos aspectos clínicos observados nos animais na Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, no período de abril de 2010 à abril de 2011, durante a realização do estudo.

Fatores	N	Sororreagentes a <i>Leishmania</i> spp. n	%	FR	95% IC	p-valor
<b>Turgor</b>						
Normal	499	141 <sup>a</sup>	28,26	1,01	0,53 a 1,92	0,4208
Diminuído	25	7 <sup>a</sup>	28,00	1	-	-
<b>Mucosa oral</b>						
Hipocorada	108	25 <sup>a</sup>	23,15	1	-	-
Normocorada	413	122 <sup>a</sup>	29,54	1,28	0,88 a 1,86	0,1162
Congesta	3	1 <sup>a</sup>	33,33	1,44	0,28 a 7,40	0,3897
<b>Mucosa ocular</b>						
Hipocorada	132	36 <sup>a</sup>	27,27	1,64	0,27 a 10,01	0,4592
Normocorada	386	111 <sup>a</sup>	28,76	1,73	0,29 a 10,40	0,4226
Congesta	6	1 <sup>a</sup>	16,67	1	-	-
<b>Linfadenopatias</b>						
Sim	16	7 <sup>a</sup>	43,75	1,58	0,89 a 2,80	0,1319
Não	508	141 <sup>a</sup>	27,76	1	-	-

<b>Onicogrifose</b>							
Sim	10	4 <sup>a</sup>	40,00	1,43	0,66 a 3,09	0,3159	
Não	514	144 <sup>a</sup>	28,02	1	-	-	
<b>Dermatopatias e outras alterações dermatológicas</b>							
Sim	109	40 <sup>a</sup>	36,70	1,41	1,05 a 1,89	0,0186	
Não	415	108 <sup>b</sup>	26,02	1	-	-	
<b>Secreção ocular ou corrimento</b>							
Sim	10	5 <sup>a</sup>	50,00	1,80	0,95 a 3,39	0,1173	
Não	514	143 <sup>a</sup>	27,82	1	-	-	
<b>Histórico de epistaxe, rinorragia, gengivorragia</b>							
Sim	23	8 <sup>a</sup>	34,78	1,24	0,70 a 2,22	0,3172	
Não	501	140 <sup>a</sup>	27,94	1	-	-	

<sup>a</sup>Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher ( $p > 0,05$ ).

N: Número de animais examinados nos testes sorológicos; n: número de animais soropositivos; RF: Razão de Frequência; IC: Intervalo de Confiança.

#### 4.5 Características inerentes aos proprietários e às residências localizadas na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, associados aos cães residentes com resultado sororreagente à *Leishmania* spp.

Durante o inquérito foram visitadas 217 residências na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, das quais 110 (50,69%) pertenciam ao município de Seropédica, 71 (32,72%) ao município de Itaguaí, e 36 (16,59%) ao município de Mangaratiba. Das 217 residências visitadas, 101 (46,54%) pertenciam à zona rural e 116 (53,46%) à zona urbana. Quanto às outras variáveis avaliadas como o tipo de vegetação predominante no entorno da residência, presença de animais silvestres, se utiliza produtos inseticidas no ambiente, nível sócio-econômico e de escolaridade dos proprietários não apresentaram associação ( $p > 0,05$ ) com a sororegatividade dos cães à *Leishmania* spp. (Tabela 7).

**Tabela 7.** Características inerentes aos proprietários e às residências localizadas na Microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, associados aos resultados sororreagentes à *Leishmania* spp. de cães residentes no período de abril de 2010 à abril de 2011, durante a realização do estudo.

Características	N	<i>Leishmania</i> spp.		FR	95% IC	p-valor
		n	%			
<b>Residências pertencem à zona</b>						
Rural	101	49 <sup>a</sup>	48,51	1,22	0,91 a 1,65	0,1200
Urbana	116	46 <sup>a</sup>	39,66	1	-	-
<b>Tipo de vegetação predominante no entorno da residência</b>						
Quintal (Jardim e/ou gramado)	87	35 <sup>a</sup>	40,23	1,48	0,71 a 3,06	0,1909
Mata e/ou pastagem	108	54 <sup>a</sup>	50,00	1,83	0,90 a 3,72	0,0513
Não tem	22	6 <sup>a</sup>	27,27	1	-	-

<b>Presença de animais silvestres</b>						
Sim	154	70 <sup>a</sup>	45,45	1,15	0,81 a 1,63	0,2653
Não	63	25 <sup>a</sup>	39,68	1	-	-
<b>Utiliza produtos inseticidas no ambiente</b>						
Sim	61	22 <sup>a</sup>	36,07	1	-	-
Não	156	73 <sup>a</sup>	46,79	1,30	0,89 a 1,89	0,1003
<b>Nível sócio-econômico</b>						
Baixo	96	48 <sup>a</sup>	50,00	1,29	0,95 a 1,76	0,0684
Médio	111	43 <sup>a</sup>	38,74	1	-	-
Alto	10	4 <sup>a</sup>	40,00	1,03	0,47 a 2,29	0,3973
<b>Nível de escolaridade dos proprietários</b>						
Nunca frequentou a escola	4	2 <sup>a</sup>	50,00	1,60	0,55 a 4,65	0,4155
Ensino fundamental	108	50 <sup>a</sup>	46,30	1,48	0,93 a 2,36	0,0567
Ensino médio	57	28 <sup>a</sup>	49,12	1,57	0,96 a 2,58	0,0510
Ensino superior	48	15 <sup>a</sup>	31,25	1	-	-

<sup>a</sup>Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher ( $p > 0,05$ ).

N: Número de animais examinados nos testes sorológicos; n: número de animais soropositivos; RF: Razão de Frequência; IC: Intervalo de Confiança.

Durante a realização deste estudo, podemos fazer algumas observações particulares a respeito da ocorrência das leishmanioses na microrregião de Itaguaí, RJ. Ao se realizar a abordagem aos proprietários e informá-los a respeito das leishmanioses, alguns informaram conhecerem ou terem visto os flebotomíneos, os quais em algumas localidades chamaram-no popularmente de “asa branca” ou “asa de palha”.

Além disso, alguns relataram já ter visto a doença em humanos nas proximidades, ou mesmo já terem sido acometidos pela forma tegumentar da doença (Figura 11). Tais informações não foram analisadas estatisticamente, pois poucos moradores compartilharam esses dados, o que poderia subestimar ou superestimar os resultados no momento da avaliação estatística.

Alguns proprietários relataram também a presença de hospedeiros paratênicos em suas residências, principalmente ratos. Entretanto, como essas questões não foram direcionadas à totalidade das casas assistidas, não foram acrescentadas ao questionário aplicado, e a associação desse achado à sorologia positiva em cães.





**Figura 11.** À esquerda, lesão em processo de cicatrização, após submissão a tratamento, na face posterior da perna de um senhor. À direita, lesão também em processo de cicatrização na região costal de um senhor. Em ambos os casos, observaram-se animais sororreagentes nas residências.



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Inquérito Sorológico

#### 5.1.1 Imunofluorescência indireta (IFI) e Ensaio Imunoenzimático (EIE)

Os resultados obtidos no presente inquérito confirmam a hipótese de que os animais que são domiciliados em áreas onde já foram notificados casos de leishmanioses em humanos podem realmente ser incriminados como reservatórios no ambiente doméstico, corroborando com outros estudos epidemiológicos já realizados (SILVEIRA et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2009).

Comparado a outros estudos realizados no Estado do Rio de Janeiro, a frequência de cães sororreagentes (28,24%) para *Leishmania* spp. na microrregião de Itaguaí foi considerada elevada. Estudos realizados por Marzochi et al. (2009) demonstraram que a soroprevalência das leishmanioses caninas em áreas endêmicas no Rio de Janeiro decresceram consideravelmente com o passar do tempo em função de medidas profiláticas, tais como: retirada de cães infectados, busca ativa e tratamento de casos humanos, e pulverização de casas e anexos com inseticidas. Porém, tal observação não foi constatada no presente estudo. Estudos sorológicos sobre a leishmaniose canina foram realizados em diversos locais no Estado do Rio de Janeiro. Cardoso (2007) observou no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro que havia animais sorologicamente positivos para LTA, e detectou anticorpos contra *Leishmania* sp. em 14,2% dos cães amostrados. Coutinho et al. (1985) realizaram uma investigação sobre a leishmaniose em cães provenientes de áreas do Rio de Janeiro onde a doença ocorria em humanos, e a maior prevalência foi observada entre os cães da área onde ambas as doenças ocorreram (12,7%). Esses mesmos autores observaram que a soroprevalência de *Leishmania* sp. entre os cães provenientes de área de leishmaniose tegumentar foi significativamente maior que a observada nas áreas de leishmaniose visceral (8,6% vs. 4,3%;  $p < 0,02$ ). Na microrregião de Itaguaí existem áreas em que foram notificados casos de leishmaniose tegumentar e visceral em humanos, e dentre os animais soropositivos encontrados durante este inquérito, 40% pertenciam à Seropédica, 25,9% à Itaguaí e 12,3% à Mangaratiba.

Cabrera et al. (2003) ao estudarem em Barra de Guaratiba, localidade litorânea do Rio de Janeiro, os fatores envolvidos na manutenção e circulação de *L. infantum*, detectaram uma soroprevalência de 29% sob a titulação de 1:40 e de 25% na titulação de 1:80. Segundo os autores deste trabalho, nesta área, mesmo com as triagens sorológicas realizadas constantemente e eliminação sistemática de cães, novos casos continuavam ocorrendo, em contraste com a baixa incidência de casos humanos. Uma provável explicação para a alta prevalência da infecção canina é a presença de reservatórios silvestres e sinantrópicos, que ajudam o parasita a se manter na natureza, favorecendo a infecção de animais suscetíveis, tais como o cão e o próprio homem (CABRERA et al., 2003). No presente estudo, detectou-se uma frequência relativamente elevada comparada ao estudo no município de Santa Rita de Cássia, Barra Mansa, RJ, realizado por Figueiredo et al. (2009), onde foi encontrada uma frequência de 10% de soropositividade na IFI, e 10,7% no EIE.

Laurentino-Silva (1999) utilizou o seguinte critério para conceituar os resultados em relação à concordância de exames sorológicos: valores  $\leq 40\%$  são considerados pobres, de 40,1 até 79,9% regulares, de 80 a 89,9% são considerados bons e  $\geq 90\%$  consideram-se como excelentes. No presente estudo, encontramos uma concordância bruta de 76,51%, considerada regular, segundo Laurentino-Silva (1999). A concordância entre a co-positividade IFI/EIE e a co-negatividade EIE/IFI foram de 100%, valores considerados como excelentes.

Ao aferirmos separadamente cada resultado obtido de cada exame utilizado (IFI e EIE), e determinarmos através de teste estatístico como discordantes, observamos que em estudo feito por Assis et al. (2010) foi relatado o mesmo episódio em grupo de animais oligossintomáticos, e tal fato pode ser explicado pela elevada sensibilidade exibida pelo EIE e a especificidade da IFI.

### 5.1.2 Teste Rápido DPP<sup>®</sup> para leishmaniose visceral canina

Das 524 amostras testadas para o TR DPP<sup>®</sup>, e após as buscas pelos animais para repetição dos exames, 18 amostras foram consideradas positivas de acordo com o manual para leitura visual do teste. Entre os 18 animais positivos ao teste um apresentou a doença clínica que cursou com inapetência, fraqueza, apatia, seguida de morte. Para este animal, o teste rápido foi positivo, e concordante com os outros exames IFI e EIE, alcançando as titulações  $\geq 1:160$ . Ao associarmos a clínica ao diagnóstico sorológico pelo TR DPP positivo, poderíamos suspeitar da ocorrência de leishmaniose visceral canina, no entanto, estudos mais aprofundados seriam necessários para comprovarmos o agente etiológico. Ao retornarmos à residência, o cão já havia falecido e não foi possível realizar isolamento do parasito. O diagnóstico de Leishmaniose em animais provenientes de áreas endêmicas para não endêmicas já foi relatado na literatura (SAVANI et al., 2003). Savani e seus colaboradores encontraram 12 animais sororreativos a IFI (1:40), e em apenas 3 animais foi realizado o exame parasitológico direto, e somente em um foi encontrado o parasito. Esse animal foi positivo em ambos os testes e era proveniente de Belo Horizonte, Minas Gerais, área endêmica para leishmaniose visceral.

De Oliveira et al. (2010) relataram em seu estudo que o TR-DPP<sup>®</sup> demonstrou ser uma boa alternativa como triagem em campo, mas não deve ser considerado definitivo, sendo desejável confirmação em EIE ou IFI, essa mesma observação foi confirmada no presente estudo. No corrente estudo, não foi observada analogia entre os resultados do teste rápido e dos sorológicos (IFI e EIE), pois somente 8 animais foram reagentes nos outros testes, enquanto 10 não apresentaram reatividade nos testes de IFI e EIE na titulação de 1:40.

Schubach (2011) ao realizar a validação do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso (TR DPP<sup>®</sup>) para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro, descreveu coeficiente Kappa de 0,88, com um nível de concordância entre a leitura visual e a eletrônica classificada como quase perfeita. Segundo esse mesmo autor, o bom desempenho do teste rápido com leitura visual sugere que o mesmo possa ser indicado como exame de triagem para uso na rotina de campo e que ferramentas para leitura eletrônica devem ser utilizadas em associação e não para confirmação do resultado.

No Brasil, quando o TRALd<sup>®</sup> (Teste Rápido Antígeno para *L. donovani*) foi aplicado em cães de área endêmica, a sensibilidade foi de 92% e a especificidade de 99,5%. Entretanto, o teste não foi capaz de detectar infecção nos animais com títulos de RIFI baixos de 1:40 até 1:320 (GENARO et al., 1997).

Ao utilizarmos o teste rápido (TR DPP®) no presente trabalho observou-se que dentre os resultados obtidos, apenas dois formaram linhas na plataforma de leitura com intensidades de cor relativamente fortes, enquanto as outras amostras avaliadas apresentaram coloração mais clara. Sabe-se que nesse local há uma linha transversal com antígeno, e se houver anticorpo, forma-se um complexo que se liga ao conjugado formado pelas partículas de ouro coloidal e anticorpos da amostra, produzindo uma coloração rosada, classificando a amostra como reagente. A coloração é formada pela reação entre antígeno e o anticorpo da amostra e, a baixa intensidade de cor na leitura pode ser em decorrência de possíveis reações cruzadas com outros patógenos, como observado por Gontijo e Melo (2004) com relação ao TRALd® que possui a proteína rk39 como o TR DPP®. Gontijo e Melo (2004) descreveram que quando utilizado pode haver reação cruzada com malária, febre tifóide ou tuberculose. Outra possibilidade é que em relação ao teste imunocromatográfico, as poucas reações obtidas contra a proteína recombinante rK39 podem estar associadas ao fato do teste apresentar maior sensibilidade em cães sintomáticos (LEMOS et al., 2008; METTLER et al., 2005), no entanto, no presente estudo 94,44% dos cães reagentes foram assintomáticos.

Trabalhos da literatura descrevem o rK39, através da técnica de EIE, como um antígeno que não apresenta reatividade cruzada com outras doenças (BADARO et al., 1993). No entanto, no trabalho realizado por Cunha (2001), foi encontrada reatividade cruzada para as doenças de Chagas, malária e leishmaniose mucosa. Segundo este autor, a desvantagem do Kit com k39 que foi utilizado, encontra-se na alta reatividade cruzada com soros de pacientes portadores de doença de Chagas e de leishmaniose cutânea.

No corrente estudo, os cães positivos no teste rápido, e negativos na IFI e/ou EIE, nos remete pensar que possa estar ocorrendo reações cruzadas com outros patógenos, como foi observado em outros estudos que utilizaram como antígenos proteínas que seriam específicas de *L. infantum*, como observado por Lemos et al. (2008) que relataram reatividade com parasitos dos gêneros *Ehrlichia* e *Trypanosoma*, assim como descrito por Madeira et al. (2009). O teste imunocromatográfico obtém melhores resultados em animais sintomáticos e para confirmar essa suspeita, seria necessário realizar testes mais específicos, como o método parasitológico, imuno-histoquímico ou molecular.

## **5.2 Fatores associados às características inerentes aos cães sororreagentes à *Leishmania* spp.**

Barbosa et al. (2010) em estudo realizado no Maranhão não observaram associação significativa entre sexo e soropositividade canina, assim como Oliveira et al. (2010), Almeida et al. (2009) e Cabrera et al. (2003). Resultado semelhante também foi observado na presente pesquisa. Outros estudos envolvendo soroprevalência canina para leishmanioses confirmam que a variável sexo não apresenta associação significativa (ZAFFARONI et al., 1999; CRINGOLI et al., 2002; LEONTIDES et al., 2002; FRANÇA-SILVA et al., 2003; MOREIRA JR et al. 2003; CARDOSO et al., 2004; MATOS et al., 2006; AZEVEDO et al., 2008; SANTOS et al., 2010; ALMEIDA et al., 2010). Com relação ao tamanho do pêlo, muitos estudos tem demonstrado que não existe associação com a soropositividade canina (FISA et al., 1999; LEONTIDES et al., 2002; MOREIRA JR et al., 2003; BARBOSA et al., 2006). Oliveira et al. (2010) também não ressaltou significância estatística, embora os animais com pêlo curto foram mais sororreagentes. Em estudo conduzido por Rondon (2007), a maioria dos cães positivos era de raças de pêlo curto, e segundo esse autor, provavelmente a

infecção por *Leishmania* está associada ao pêlo curto e não a raça, pois a tosa pode descaracterizar o padrão do animal, o que poderia facilitar o ataque do vetor. Barboza et al. (2006) também fez essa observação, considerando que os animais com pelo curto estariam mais expostos à infecção, uma vez que o vetor teria menos dificuldade de efetuar o repasto sanguíneo. Este fato também foi observado em Montes Claros, Minas Gerais onde os animais de pêlo curto foram os mais prevalentes (11,9%) (FRANÇA-SILVA et al., 2003).

Quanto ao porte dos animais, apesar de não haver associação com a reatividade para *Leishmania* spp., observou-se que os animais de porte médio foram mais reagentes (58,78%, n=87/148), tal fato deve ser em razão do grande número de cães de porte médio amostrados na região estudada. Contudo, tal observação é contrária a observação de Almeida et al. (2010), que não observaram associação significativa em seus estudos. Nesse estudo houve associação daqueles animais sem raça definida (79,73%, n=118/148) a sororreatividade à *Leishmania* spp. No entanto, apesar de não encontrar associação significativa a leishmaniose canina com relação variável raça em seu estudo, Oliveira et al. (2010), Almeida et al. (2010) e Rondon (2007) observaram que a maior parte dos animais reagentes constituíam o grupo daqueles sem raça definida. Ao analisar a faixa etária dos animais reagentes, observou-se que aqueles com idade entre 2 e 5 anos (36,49%, n=54/148) apresentaram diferença estatística entre animais com idade < 6 meses a < 2 anos (27,70%, n=41/148), mas não diferiram daqueles com idade superior a 5 anos (35,81%, n=53/148). Matos et al. (2006) avaliaram a ocorrência de leishmaniose canina em Mossoró, no Rio Grande do Norte, e notaram que os animais mais acometidos foram os animais adultos jovens. Isso pode ser explicado pelo fato de que nesta idade os cães geralmente são colocados na parte externa dos domicílios o que aumenta o contato com o vetor. Essa informação confirma a observação realizada nesse estudo, pois os cães com idade maior ou igual a 5 anos passaram mais tempo no exterior do domicílio. Moreira Jr. et al. (2003) sugeriram que após o primeiro ano de vida do cão, aumentaria o risco de se infectarem com parasitas do gênero *Leishmania*, porém não identificaram a faixa etária com maior incidência, aspecto também observado no presente estudo. Os resultados obtidos nesse estudo conferem com os achados por Zivincjak et al. (2005) que relataram maior prevalência entre os animais da faixa etária de 3-4 anos (34,5%) e 6-7 anos (35%). De acordo com Gállego (2004) a maior frequência de animais adultos jovem positivos para *Leishmania* sp. ocorre devido ao longo período de incubação do parasito, que em média é de dois meses, além do maior tempo de exposição ao vetor. Entretanto, FRANÇA-SILVA et al. (2003) observaram que os cães, independente da idade, têm a mesma probabilidade de contrair leishmaniose, não excluindo a importância das outras faixas etárias na epidemiologia da doença.

Quanto aos ectoparasitos presentes nos animais, encontraram-se pulgas, carrapatos e sarnas. Foi significativa ( $p < 0,0001$ ) a associação entre a presença de ectoparasitos e a detecção de anticorpos específicos para *Leishmania* spp. nos cães (78,38%, n=116/148). Apesar da literatura descrever que os flebotomíneos são reconhecidamente os principais transmissores das leishmanias, alguns estudos discutem a participação de ectoparasitos no ciclo da doença em cães. Linardi e Nagem (1973) referiram que perante a ausência de transmissão da doença por vetores da família Psychodidae, a transmissão pode ocorrer através de outros ectoparasitas como a pulga *Ctenocephalides felis felis* e o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, dada a elevada frequência e quantidade com que estas aparecem nos cães (COUTINHO et al., 2005). Estudo realizado por Paz et al. (2010), com 5.556 animais domiciliados em Belo Horizonte, área endêmica de leishmaniose, corroboraram com os

autores citados anteriormente ao associar a ocorrência de infestação por *C. felis felis* e *R. sanguineus* a presença de anticorpos para *Leishmania* sp. Coutinho et al. (2005) demonstraram que *Rhipicephalus sanguineus*, no Brasil, é susceptível à infecção com a espécie *Leishmania infantum*, e que é capaz de transmitir a doença aos hospedeiros em níveis experimentais.

### **5.3 Fatores associados aos caracteres extrínsecos aos cães (origem, hábitos, comportamento e manejo) sororreagentes à *Leishmania* spp.**

#### **5.3.1 Origem dos animais**

De acordo com Cardoso et al. (2009), com a municipalização dos programas de leishmanioses, o município de Seropédica notificou no ano de 2003, quinze casos humanos autóctones de LTA, sendo que, nove casos foram procedentes da localidade de Valão da Louça. Embora, existam registros de ocorrências de casos autóctones de LTA na localidade supracitada, pode-se constatar uma escassez de estudos sistemáticos envolvendo vetores das leishmanioses. No presente estudo, observou-se que muitos animais foram reagentes nos testes sorológicos no município de Seropédica. Foram coletadas amostras de animais de diferentes localidades dentro do município, incluindo: Boa Esperança, Km49 (Centro), Fazenda Caxias, Fonte Limpa, Mutirão, El Dourado, Peixoto, Sá Freire, Santa Sofia, Vila Sônia, Km 47 (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ), Areal, São Miguel e Valão da Louça, sendo uma coleta representativa.

Por ser considerada uma cidade universitária, Seropédica, abriga muitos estudantes provenientes de diferentes Estados, e muitas vezes países. Ao escolherem esse município para se instalar no período das aulas, os estudantes trazem seus animais, que passam a residir na cidade. Por essa razão, ao realizarmos o inquérito canino, foi decidido coletar um número de animais superior ao calculado (baseado na proporção da população humana entre os municípios da microrregião), visto o aumento da população canina no município estar relacionado à moradia estudantil, assim como a existência do curso de Medicina Veterinária com seu hospital veterinário no campus da UFRRJ, que atrai muitas pessoas que abandonam seus animais no campus, com intuito de que os estudantes os adotem.

As detecções de cães sororreagentes nos domicílios em Itaguaí descritas nesse estudo corroboram com as informações de que o ciclo biológico do protozoário consegue ser mantido no peridomicílio (ALEXANDER et al., 2002). Pelo fato do município de Itaguaí estar em expansão constante pelo desenvolvimento econômico e industrial na região, muitas são as localidades que vem surgindo com a ocupação humana. Neste inquérito foram visitadas as seguintes localidades: Caçador, Piranema, Centro, Jardim Uêda, Engenho, Mazomba, Brisamar, Coroa Grande e Vila Geni, e em todas elas foram detectados animais reativos a *Leishmania* spp. Sabendo-se que os vetores estão presentes, a existência de possíveis reservatórios e a ocorrência de casos de leishmaniose em humanos, torna a situação desta zoonose nessa região um caso que motiva a atenção dos órgãos responsáveis pela vigilância das leishmanioses.

O Estado do Rio de Janeiro está classificado como área de transmissão esporádica para LV com casos caninos diagnosticados na capital (MARZOCHI et al., 1985; CABRERA et al., 2003; MADEIRA et al., 2006), e vem aparecendo em áreas na vertente litorânea, como Maricá (PAULA et al., 2009). Entretanto, já foram relatados casos de leishmaniose visceral

canina (LVC) nos municípios de Angra dos Reis e Mangaratiba (MADEIRA et al., 2006), demonstrando a expansão da doença para outras regiões do estado.

Os resultados encontrados no município de Mangaratiba neste inquérito, onde foram detectados animais reagentes para *Leishmania* spp., mostraram que a doença pode ter continuado a se manifestar nesta localidade. As localidades visitadas neste município foram: Itacuruçá, Ilha de Itacuruçá, Mangaratiba e Conceição de Jacareí. Em todos esses locais, foram encontrados cães reagentes aos testes imunoserológicos. Segundo Barcelos (2009), do ano de 1998 a 2000, casos de leishmaniose visceral americana foram notificados em Conceição de Jacareí, 2º distrito de Mangaratiba, área que limita o município com Angra dos Reis, RJ. Barcelos (2009) relata ainda que em 1970, Conceição de Jacareí contava com aproximadamente 30 casas, habitadas principalmente por pescadores da região. A facilidade de acesso contribuiu para inúmeros investimentos e ações especuladoras que, com diversas atividades ligadas ao turismo, induziu ao processo de ocupação desordenada da área, contribuindo em muitos casos para a degradação e fragmentação do meio-ambiente. Apesar dos esforços empreendidos, há ainda nessa área uma soroprevalência alta de cães infectados e notificação de casos humanos.

Durante este estudo, observou-se associação íntima entre animais de áreas rurais e a reatividade à IFI e ao EIE (60,14%, n=89/148). Quando avaliamos a área em que o animal residia, observou-se que foi caracteristicamente rural. Santos et al. (2005) ao realizarem estudos visando o conhecimento da prevalência canina em Paracambi, RJ, observaram que dentre os animais de área semi-urbanizada e de área rural, houve maior prevalência da infecção nos animais de origem rural. Oliveira et al. (2010) ao avaliarem os possíveis fatores de risco associados a LVC em uma localidade na Bahia, observaram que houve soroprevalência estatisticamente significativa ( $p=0,0001$ ) entre animais de zona rural (29,9%) e zona urbana (4,9%), corroborando os achados deste estudo. Resultados semelhantes foram observados quando se analisou a prevalência em dois grupos de animais em áreas rurais e urbanas (COURTENAY et al., 1994). De acordo com Oliveira et al. (2010) a variação na soroprevalência entre essas duas áreas estão intrinsecamente ligadas às condições ambientais doméstica e peridoméstica para o desenvolvimento de infecção. Estas condições podem incluir o vetor, a população canina, alterações causadas pela presença do homem, o acúmulo de matéria orgânica e lixo e más condições de saneamento (CAMARGO-NEVES; BRASIL, 2003; GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

No presente estudo avaliou-se a origem do animal, se o mesmo nasceu na propriedade ou veio de fora. Essa variável apresentou associação com a reatividade dos animais à *Leishmania* spp. Pelo fato da microrregião de Itaguaí, ser caracterizada principalmente por áreas rurais, muitos dos proprietários visitados adotavam os animais apenas no sentido de oferecer alimentação e alguns cuidados, mas os mantinham soltos. Outra situação quanto aos animais errantes, foi à coleta de cães que circulam dentro do campus da UFRRJ em Seropédica. Do total de animais errantes coletados, 80% (n=16/20) apresentaram reatividade nos exames sorológicos. Esse resultado deve ser justificado pela alta circulação desses animais em áreas com presença de mata, ambiente natural para a ocorrência de flebotomíneos infectados, assim como manter o maior contato com reservatórios silvestres, e ao retornarem para proximidade das residências, serve de amplificadores da infecção para outros cães e para os humanos (ALBUQUERQUE et al., 2007). Gálvez et al. (2010) ao realizarem avaliação da soroprevalência em Madri, Espanha, também observaram que os animais errantes foram mais reagentes. A explicação para diferença entre as taxas de infecção entre cães errantes e os

outros animais poderia ser o resultado da vida ao ar livre aumentando a exposição aos flebotomíneos (DYE et al., 1992; AMUSATEGUI et al., 2004) e a falta de prevenção ou medidas de controle.

### 5.3.2 Hábitos dos animais

Os hábitos dos animais são importantes em estudos epidemiológicos de zoonoses como a leishmaniose. Ao analisar a soropositividade dos cães em relação à permanência dos animais dentro da residência, observou-se que aqueles que permaneciam maior parte do tempo no intradomicílio foram menos reativos ( $p=0,0271$ ) quando comparados com as outras categorias. Isso demonstra que os animais que ficam ao ar livre, possivelmente estão mais expostos aos insetos vetores infectados (DYE et al., 1992).

Quanto aos locais de acesso dos animais, foi observada associação com a sororreatividade dos animais. As categorias matas/córregos (36,02,  $n=85/236$ ) e pastagem (39,02%,  $n=16/41$ ) não diferiram estatisticamente entre si, mas se diferenciaram ( $p=0,0001$ ) daqueles animais que frequentavam predominantemente ambiente urbano (20,71%,  $n=40/193$ ) ou ficavam no quintal, sendo mantidos presos (12,96%,  $n=7/54$ ). Seguntos Santos et al. (2005), a presença de vegetação abundante, grande umidade, fornecida por um pequeno curso de água, e a diversidade de animais domésticos e sinantrópicos estariam propiciando excelentes condições bióticas à presença da fauna flebotomínica que, por sua vez, estaria se encarregando de disseminar os agentes etiológicos desta doença. Normalmente nas localidades de pastagem, há vegetação remanescente próxima, o que pode explicar a frequência da soropositividade observada. Em estudo realizado por Almeida et al. (2010), apesar de não ter obtido associação significativa sobre essa variável, foi observado que boa parte dos animais sororreagentes tinham acesso à mata remanescente e a córregos, rios ou represas. Ao avaliar condições de confinamento, Oliveira et al. (2010) observaram que animais com livre acesso a diversos locais, diferente dos limitados ao quintal, apresentaram uma maior soroprevalência ( $p=0,005$ ). A importância de áreas com vegetação remanescente na periferia das cidades é um aspecto relatado em várias pesquisas como determinante para ocorrência da infecção, e em virtude de ambiente rico em matéria orgânica, propício para manutenção do vetor (MISSAWA; LIMA, 2006). Entretanto, Barboza et al. (2006), inferiram que o livre acesso dos animais não demonstrou significância estatística em relação ao risco de infecção quando comparado a animais que viviam limitados ao quintal da casa.

No presente estudo, observou-se uma associação significativa ( $p<0,0001$ ) entre soropositividade para *Leishmania* spp. e o contato com outras espécies animais. Cabrera et al. (2003) observaram que a proximidade dos cães com animais silvestres, como os marsupiais, foi considerado um fator de risco para infecção por *Leishmania* sp. A partir de análises de fatores de risco, Oliveira et al. (2010) detectaram que a presença de criação de aves (galinhas) foi estatisticamente significativa ( $p=0,003$ ), enquanto a presença de suínos e outros animais não demonstraram associação, resultado esse contrário ao encontrado por Moreira Jr. et al. (2003), que observaram que a presença de suínos foi considerada fator de risco. Para Julião et al. (2007), a presença de galinhas no peridomicílio não apresentou associação significativa, embora alguns autores tenham relatado seu envolvimento na epidemiologia da LV (DYE et al., 1991; ARIAS et al., 1996; MOREIRA JR et al., 2003). Provavelmente, as galinhas representam uma fonte de alimentação, não só para o vetor, como para alguns animais silvestres, que são potenciais reservatórios de *L. infantum*, atraindo-os e mantendo-os no

peridomicílio (ALEXANDER et al., 2002). No corrente estudo, o contato com aves e animais silvestres em geral, não foi representativo, contrariando os resultados encontrados por Cabrera et al. (2003). Contudo, as categorias animais de companhia e aves/animais silvestres, não apresentaram a associação com a soropositividade dos cães para *Leishmania* spp. Em relação ao hábito do animal, aqueles mantidos soltos (31,83%, n=116/372) apresentaram maior frequência nos exames sorológicos positivos. Da mesma forma, foi relevante o resultado encontrado na categoria dos animais presos de dia e soltos a noite (27,50%, n=11/40). Ambos diferiram estatisticamente (p=0,0373) da categoria que abriga os animais mantidos sempre presos. Todavia, Barbosa et al. (2010) demonstraram resultados que estavam de acordo quanto à ausência de predisposição para a infecção relacionada a forma de criação do animal (solto ou preso). Diante deste fato, é prudente considerar que a leishmaniose canina seja uma doença de natureza local e que os fatores de risco possam variar de uma região para outra. No entanto, parece bastante evidente que o estilo de vida de cada cão em particular possa favorecer a sua exposição aos vetores (SANTOS et al., 2010).

### 5.3.3 Manejo estabelecido pelo proprietário aos animais

Dentre os animais em que foram detectados anticorpos específicos para *Leishmania* spp., aqueles que eram alimentados com comida caseira diferiram consideravelmente (p=0,0070) daqueles que recebiam somente ração. Porto (2010) observou que a alimentação com comida caseira pode atrair outros reservatórios para próximo do domicílio que sirvam de fonte de alimentação para o vetor de *Leishmania* spp.

Outra medida adotada pelos proprietários é o tratamento ectoparasitário, onde grande parte das propriedades avaliadas nesse estudo adotaram o uso de inseticidas a base piretróides, que são utilizados para desinsetizações através de borrifação em alguns locais para o controle de flebotomíneos em áreas endêmicas (TEODORO et al., 1999). Neste estudo, dentre aqueles animais que não recebem tratamento contra ectoparasitos, 42,96% (n=58/135) foram reagentes nos exames sorológicos. Quanto àqueles que recebem tratamento, somente 23,14% (n=90/389) foram reativos. Esse resultado demonstra que a utilização de inseticidas nos animais com objetivo de controlar ectoparasitas, pode repelir flebotomíneos nas áreas estudadas da microrregião de Itaguaí.

Ambientes com condições de limpeza moderada à ruim estiveram mais associados à ocorrência de animais soropositivos à leishmaniose (p=0,0035). Em relação ao recolhimento das fezes dos animais, pode-se dizer que houve associação entre o não recolhimento e a sororreatividade dos animais à *Leishmania* spp. (p<0,0001), pois 44% dos animais em que seus donos não fazem o recolhimento das fezes foram reagentes. Os proprietários que decidem não fazer a limpeza adequada do ambiente, de maneira indireta permitem uma maior susceptibilidade desses animais às picadas por flebotomíneos que se aproximam por atração à matéria orgânica presente. Segundo Reis et al. (2011) variáveis como a presença de resíduo, destino do esgoto e o destino do lixo foram estatisticamente significativas, apresentando influência na epidemiologia de *Leishmania* sp., uma vez que os flebotomíneos se desenvolvem em matéria orgânica e ambientes úmidos e sombreados, particularmente em resíduos de folhas e pedaços de madeira.

Quanto à assistência veterinária, observamos que aqueles animais que não a possuem estavam associados à detecção de anticorpos para *Leishmania* spp. A presença de um profissional veterinário é fundamental para uma correta orientação aos donos dos animais



sobre as medidas preventivas das principais enfermidades que possam acometer os cães, principalmente aquelas zoonoses cuja forma de transmissão seja através de vetores. Guimarães et al. (2009) e Almeida et al. (2010) relacionaram a assistência veterinária a redução da exposição de animais à doenças infecciosas.

#### **5.4 Fatores associados aos aspectos clínicos observados nos cães sororreagentes à *Leishmania* spp.**

Muitos estudos avaliariam sinais clínicos dos animais acometidos por *Leishmania* spp. (MATTOS JR. et al., 2004; MATOS et al., 2006; AZEVEDO et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2010;). No presente estudo, durante a visita a residência e abordagem do animal, realizou-se o exame clínico, onde observou-se a coloração das mucosas, turgor, e possíveis alterações observadas no momento do exame físico, como alterações dermatológicas, linfadenopatias, secreções ou corrimentos oculares, onicogribose, e de acordo com informações fornecidas pelos proprietários, se havia histórico de epistaxe, rinorragia ou gengivorragia. Dentre todos esses itens observados, apenas as dermatopatias em geral foram associadas à soropositividade canina nesse inquérito ( $p=0,0276$ ). Santos et al. (2005) relataram que a presença de lesões cutâneas estiveram sempre associadas aos resultados positivos evidenciados nas reações imunológicas, assim como no presente trabalho. Azevedo et al. (2008) também descreveram os sinais clínicos observados em cães soropositivos para *Leishmania* spp., e dentre eles, a maior frequência foi observada naqueles que apresentavam lesão cutânea e onicogribose. No presente trabalho, apesar de não ter sido demonstrada associação com onicogribose, dos 10 animais encontrados 40% ( $n=4/10$ ), foram reagentes à *Leishmania* spp.

Segundo Almeida et al. (2009), os sinais clínicos observados nos cães sororreagentes foram os dermatológicos, principalmente alopecia, úlcera de ponta de orelha e descamação, seguidos de linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogribose e distúrbios oftálmicos como conjuntivite. Dentre as dermatopatias encontradas no presente estudo, observaram-se principalmente alopecias, descamações e úlceras no pavilhão auditivo dos animais. Foram encontrados animais soropositivos com linfadenomegalia (4,73%,  $n=7/148$ ), mas não teve associação significativa com os resultados imunológicos. Poucos animais foram encontrados com corrimentos ou secreções oculares, mas desses, 50% ( $n=5/10$ ) apresentaram reatividade. Quanto ao histórico de epistaxe, rinorragia e gengivorragia (5,41%,  $n=8/148$ ) não foi observada associação significativa à sororeatividade. Coloração de mucosas e turgor não foram parâmetros relevantes na avaliação da soropositividade canina a leishmaniose. Os resultados do corrente estudo corroboram a outros estudos (FEITOSA et al., 2000; GÁLLEGO et al., 2004), em que as alterações cutâneas são os sinais clínicos mais comumente observados na leishmaniose canina.

#### **5.5 Características inerentes aos proprietários e às residências localizadas na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, associados aos cães residentes com resultado sororreagente à *Leishmania* spp.**

Dentre as variáveis analisadas sobre os proprietários (nível sócio-econômico, nível de escolaridade) e as residências visitadas (pertencia a zona rural ou urbana, tipo de vegetação predominante, presença de animais silvestres nas proximidades, utilização de produtos

inseticidas no ambiente), não observamos associação significativas em relação a soropositividade dos animais. Pode-se observar através deste estudo que de todas as residências abordadas, 95 (43,78%) possuíam pelo menos um animal sororreagente à *Leishmania* spp., sendo 49 (51,58%) domicílios de área rural, e 46 (48,42%) de área urbana, não havendo associação ( $p>0,05$ ) entre a área a que pertence a residência (rural ou urbana) e a presença de cães sororreativos à *Leishmania* spp. Contudo, em relação ao tipo de vegetação predominante no entorno da residência, 24,85% ( $n=54/217$ ) dos domicílios em que havia a presença de animais reagentes tinham mata e/ou pastagem nos arredores, enquanto 16,13% ( $n=35/217$ ) possuíam apenas jardim e/ou gramado no quintal, e somente 2,77% ( $n=6/217$ ) não tinham nenhum tipo de vegetação nas proximidades. Estudos elucidam a proximidade da moradia dos cães da mata e vegetação abundante como fatores de risco para infecção por *Leishmania* spp. (RONDON et al., 2008; SILVA et al., 2005; VANZELI et al., 2005; CABRERA et al., 2003), evento evidenciado por Almeida et al. (2009).

Quanto à presença de animais silvestres próximo à residência, não foi observada associação significativa ( $p>0,05$ ), onde 45,46% ( $n=70/154$ ) dos domicílios em que os proprietários relataram que animais silvestres se aproximam ou visitam o local, encontraram-se cães positivos frente aos testes IFI e EIE na titulação 1:40. Cabrera et al. (2003) refere-se a importância da proximidade de animais silvestres à residência como fator de risco à infecção por *Leishmania* sp.

Em se tratando da utilização de produtos inseticidas no ambiente 29,58% ( $n=21/71$ ) daquelas residências em que são usados esses tratamentos no ambiente e adjacências apresentaram cães sororreagentes à *Leishmania* sp., enquanto, 46,80% ( $n=73/156$ ) que não usam produtos inseticidas apresentaram animais sorologicamente positivos.

Com relação ao nível sócio-econômico dos proprietários entrevistados em função da existência de animais positivos na residência, observou-se que as categorias analisadas não apresentaram associação significativa ( $p>0,05$ ). Dentre aqueles relativos ao nível sócio-econômico baixo 50% ( $n=48/96$ ) detectou-se animais sorologicamente positivos à leishmaniose em sua residência. Das residências prenotadas em nível sócio-econômico médio, 38,74% ( $n=43/111$ ) apresentaram animais sororreagentes, e dentre as de nível sócio-econômico alto, 40% ( $n=4/10$ ) apresentaram animais soropositivos *Leishmania* spp. Como foram poucas as residências consideradas de alto nível sócio-econômico, o percentual foi superestimado com relação à positividade dos animais à leishmaniose. Azevedo et al. (2008) ao avaliarem fatores associados a leishmaniose visceral canina, também não observaram associação significativa entre a renda dos proprietários e soropositividade dos animais, mas revelaram que houve maior frequência de cães positivos nas residências como nível sócio-econômico baixo, sugerindo que essas pessoas poderiam estar vivendo em condições que favoreçam a manutenção desta zoonose. Almeida et al. (2010) inferiram que na análise da distribuição de cães infectados de acordo com o abairramento por renda per capita, se observou diferença estatística entre os bairros com a renda baixa dos demais. Além disso, esses mesmos autores relataram que na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, áreas com precária infraestrutura higiênico-sanitária decorrente da ocupação de áreas por população de baixa renda e criação de loteamentos, provocaram a destruição de ecótopos silvestres, contribuindo para a instalação da leishmaniose. No presente estudo, apesar de não ter sido observada associação significativa ( $p>0,05$ ) nos níveis de escolaridade dos proprietários, observou-se que 50% ( $n=2/4$ ) dos que nunca frequentaram a escola tiveram em suas residências animais soropositivos, 46,30% ( $n=50/108$ ) que tiveram acesso somente ao ensino fundamental

(completo ou não) apresentaram cães sororreagentes. Nas residências de 49,12% (n=28/57) daqueles que estudaram o ensino médio (completo ou não) foram encontrados animais reagentes. E, por fim, daqueles proprietários que tiveram acesso ao ensino superior (completo ou incompleto), 31,25% (n=15/48) tiveram em sua residência animais soropositivos para *Leishmania* spp.

Durante o estudo, foram encontrados casos de LTA em humanos, e todos eles em áreas predominantemente rurais. Conseguimos detectar anticorpos específicos para *Leishmania* spp. nos animais que convivem na residência dessas pessoas, assim como observado por Santos et al. (2005) em seu estudo de soroprevalência canina para leishmaniose. Apesar da controvérsia entre os pesquisadores sobre a importância do cão na LTA, a constatação de animais sororreagentes a leishmaniose em locais onde ocorreram casos humanos, sugere que o cão pode representar papel na cadeia de transmissão da LTA (SANTOS et al., 2005).

## 6 CONCLUSÕES

A leishmaniose canina é uma doença com elevada frequência na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, ocorrendo nas áreas rurais, afetando principalmente cães sem raça definida, com idade entre dois e cinco anos e que tem hábito livre, com acesso às matas, córregos e pastagens. O controle de ectoparasitos, a presença de abrigo e condições de limpeza no ambiente em que o cão passa mais tempo são aspectos identificados nesse estudo como medidas preventivas que podem ser usadas para reduzir a probabilidade de infecção por parasitos do gênero *Leishmania* em cães.

A presença de alterações dermatológicas está intimamente associada à soropositividade à *Leishmania* spp.

A associação entre as técnicas de Imunofluorescência indireta e Ensaio Imunoenzimático são opções corretas para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em cães. O teste rápido imunocromatográfico com antígenos recombinantes para *Leishmania* (fragmentos rk26 e rk39) é uma boa alternativa como triagem à campo para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina.

Fortes evidências de um primeiro relato de caso de leishmaniose visceral canina no município de Seropédica foram encontradas. Entretanto, para confirmação é necessário realizar testes específicos a fim de detectar a espécie *Leishmania infantum*.

A detecção de animais sororreagentes em residências onde ocorreram casos de leishmaniose tegumentar americana demonstra que os cães são considerados potenciais reservatórios e amplificadores no ambiente doméstico, constituindo assim um fator de importância em saúde pública.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M.; MARCO, T. S.; SANTOS, S. C.; GAMBARDELLA, S. Ecologia dos flebotomíneos da Serra do Mar, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. I – A fauna flebotomínica e prevalência pelo local e tipo de captura (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v.12, n.2, p.195-206, 1996.
- AGUILAR, C. M.; RANGEL, E. F. Leishmaniose tegumentar em uma mula (*Equus caballus* x *Equus asinus*) em área endêmica no Estado do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, p.239-240, 1986.
- AGUILAR, C. M.; RANGEL, E. F.; DEANE, L. M. Cutaneous leishmaniasis is frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.81, n.4, p.471-472, 1986.
- ALBUQUERQUE, A. R., ARAGÃO, F. R., FAUSTINO, M. A. G., GOMES, Y. M., LIRA, R. A., NAKASAWA, M. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, ano XII, n.71, 2007.
- ALENCAR, J. E. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará**, v.17, p.129-148, 1977.
- ALEXANDER, B.; CARVALHO, R. L.; McCALLUM, H.; PEREIRA, M. H. Role of domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.12, p.1480-1485, 2002.
- ALMEIDA, A. B. P. F.; FARIA, R. P.; PIMENTEL, M. F. A.; DAHROUG, M. A. A.; TURBINO, N. C. M. R.; SOUZA, V. R. F. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.156-159, 2009.
- ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; SOUZA, V. R. F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p.1610-1615, 2010.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-87, 2004.
- ALVES, W. Controle da leishmaniose visceral baseado no reservatório canino. In: Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis visceral en las Américas, 2005, Brasília. Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de Salud, 2006. p. 94-98.
- AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; AGUIRRE, E.; TESOURO, M. A. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1026, p.154-157, 2004.
- ARAÚJO FILHO, N. A.; COURA, J. R.; RESIS, V. L. Z. Leishmaniose tegumentar americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro. IV. Reservatórios domésticos. **Revista da**

**Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.15, p.82-103, 1978.

ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.2, n.2, p.145-146, 1996.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, v.30, p.1269-1281, 2000.

ASSIS, T. S. M.; BRAGA, A. S. C.; PEDRAS, M. J.; BARRAL, A. M. P.; SIQUEIRA, I. C.; COSTA, C. H. N.; COSTA, D. L.; HOLANDA, T. A.; SOARES, V. Y. R.; BITA, M.; CALDAS, A.J. M.; ROMERO, G. A. S.; RABELLO, A. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH<sup>®</sup> para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.17, n.2, p.107-116, 2008.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N.M.G.P; SILVEIRA, R.C.V; NUNES, C.M; OLIVEIRA, T.M.F.S; JUNIOR, C.F.N; NEVES, M.F; MACHADO, R.Z; BUZETTI, W.A.S. Estudo comparativo dos métodos diagnóstico para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.1, p.17-25, 2010.

AYRES, M. **BioEstat 2.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, 2000. 272 p.

AZEVEDO, M. A. A.; DIAS, A. K. K.; DE PAULA, H. B.; PERRI, S. H. V.; NUNES, C. M. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoreó, estado do Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n.3, p.123-127, 2008.

BADARO, R. J.; LORENCO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 4, p.639-649, 1986.

BADARO, R.; EULALIO, M. C.; BENSON, D.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BURNS, J. M.; DAVID JR, J. R.; JOHNSON, W. D.; REED, S. G. Sensitivity and specificity of a recombinant *Leishmania chagasi* antigen in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Archives de l'Institut Pasteur de Tunis**. v.70, p. 331-332. 1993.

BARBOSA, D. S.; ROCHA, A. L.; SANTANA, A. A.; SOUZA, C. S. F.; DIAS, R. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; ABREU-SILVA, A. L. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município do Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p.653-659, 2010.

BARBOZA, D. C. P. M.; GOMES NETO, C. M. B.; LEAL, D. C.; BITTENCOURT, D. V. V.; CARNEIRO, A. J. B.; SOUZA, B. M. P.; OLIVEIRA, L. S.; JULIÃO, F. S.; SOUZA, V. M. M.; FRANKE, C. R. Estudo de coorte em áreas de risco para leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, n.2, p.152-163, 2006.

BACHA, H. A.; TUON, F. F.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M.; OLIVEIRA, J.; NICODEMO, A. C.; QUIROGA, M. M.; MASCHERETTI, M.; BOULOS, M.; AMATO, V. S. *Leishmania (Viannia) braziliensis* identification by PCR in the state of Pará, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.105, n.3, p.173-178, 2011.

BARCELOS, D. S. Aspectos clínicos e parasitários de cães infectados naturalmente por *Leishmania* spp. em duas áreas de transmissão intensa com diferentes características ambientais e sociais. 2009. 74 f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BARNES, J. C.; STANLEY, O.; CRAIG, T. M. Diffuse cutaneous leishmaniosis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, p.416-418, 1993.

BARRAL, A.; COSTA, J. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas. 1 ed. Salvador. 2011, 236 p.

BARROUIN-MELO SM, LARANGEIRA DF, DE ANDRADE FILHO FA, TRIGO J, JULIAO FS, FRANKE CR, PALIS AGUIAR PH, CONRADO-DOS-SANTOS WL, PONTES-DE-CARVALHO L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary Journal**, v.171, p.331-339, 2006.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, 2004.

BENITES, A.P; FERNANDES, C.E; BRUM, F.K; ABDO, M.A.G.S. Presença de formas amastigostas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.1, p.72-77, 2011.

BERGEON, P. Un cas de leishmaniose chez le chat. **Bulletin de la Societe des Sciences Veterinaires de Lyon**, v.30, p.92-93, 1927.

BERMAN J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. **Indian Journal of Medical Research** v.123, p.289-294, 2006.

BERN, C.; HIGHTOWER, A. W.; CHOWDHURY, R.; ALI, M.; AMANN, J.; WAGATSUMA, Y.; HAQUE, R.; KURKJIAN K, VAZ LE, BEGUM M, AKTER T, CETRE-SOSSAH CB, AHLUWALIA IB, DOTSON E, SECOR WE, BREIMAN RF, MAGUIRE JH. Risk factors for kalaazar in Bangladesh. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, p.655-662, 2005.

BOWMAN, D. D. **Georgis – Parasitologia Veterinária**. 2010. Elsevier, 432 p.

BRANDÃO, T. G. E.; MONTANHA, F. P.; Leishmaniose visceral – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.9, n.16, 2011.

CABRERA, M.A.; PAULA, A.A.; CAMACHO, L.A.; MARZOCHI, M.C.; XAVIER, S.C.; SILVA, A.V.; JANSEN, A.M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.25, n.2, p.79-83, 2003.

CAMARGO-NEVES VL, BRASIL MT. American leishmaniasis in the state of São Paulo: epidemiological status in 2001-2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.30-35, 2003.

CARDOSO, L.; RODRIGUES, M.; SANTOS, H.; SCHOONE, G. J.; CARRETA, P.; VAREJÃO, E.; BENTHEM, B. V.; AFONSO, M. O.; ALVES-PIRES, C.; SEMIÃO-SANTOS, S. J.; RODRIGUES, J.; SCHALLIG, H. D. F. H. Sero-epidemiological study of

canine *Leishmania* spp. Infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). **Veterinary Parasitology**, v.121, p.21-32, 2004.

CARDOSO, P. G. Levantamento da fauna flebotomínica e ocorrência de cães sororreagentes para Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro. 2007. 53 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

CARDOSO, L.; SCHALLIG, H. D. F. H.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; CABRAL, M.; ALUNDA, J. M.; RODRIGUES, M. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.117, n. 35-41, 2007.

CARDOSO, P. G.; SOUZA, M. B.; SANAVRIA, A.; MEIRA, A. M.; MERODIO, J. C. Flebotomos de áreas com ocorrências de casos humanos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, 2009.

CARVALHO, E. M. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, n.3, p.256-259, 1995.

CARVALHO, M. R.; LIMA, B. S.; MARINHO-JÚNIOR, J. F.; SILVA, F. J.; VALENÇA, H. F.; ALMEIDA, F. A.; SILVA, A. L.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p. 1227-1232, 2007.

CAVALCANTI, M. P.; BRITO, M. E. F.; SOUZA, W. V.; GOMES, Y. M.; ABATH, F. G. C. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **The Veterinary Journal**, v.182, p.356-358, 2009.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.75, n.1, p.3-17, 2005.

COSTA DURAO, J. F.; REBELO, E.; PELETEIRO, M. C.; CORREIA, J. J.; SIMOES, G. First case of leishmaniosis in domestic cat (*Felis catus domesticus*) detected in Portugal (Sesimbra), Preliminary record. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.511, p.140-144, 1994.

COUTINHO, S. G.; NUNES, M. P.; MARZOCHI, M. C. A.; TRAMONTANO, N. A survey for american cutaneous and visceral leishmaniasis among 1.342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, n.1, 1985.

COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.128, n.1/2, p.149-155, 2005.

COUTINHO, M. T.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 3/4, p. 320-325, Jul. 2007.



- COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; REIS, L. E. S.; BRAGA, S. L.; MORAIS, M. H. F.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.8, p.1-10, 2011.
- COURTENAY O, MACDONALD DW, LAINSON R, SHAW JJ, DYE C. Epidemiology of canine leishmaniasis: a comparative serological study of dogs and foxes in Amazon Brazil. **Parasitology**, v.109, p.273-279, 1994.
- COURTENAY, O., QUINNELL, R.J., GARCEZ, L.M., SHAW, J.J., DYE, C., 2002. Infectiousness of a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J. Infect. Dis.* 186, 1314–1320.
- CRINGOLI G., RINALDI L., CAPUANO F., BALDI L., VENEZIANO V.; CAPELLI G. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.307-313, 2002.
- CUNHA, D. E. S. Análise do uso de frações antigênicas de *Leishmania sp* no diagnóstico imunológico da Leishmaniose Visceral e Diagnóstico imunológico da leishmaniose visceral utilizando antígeno recombinante K39 através das técnicas de ELISA e *Particle gel immunoassay- PaGIA* (DiaMed). Monografia. FIOCRUZ (PROVOC- FIOCRUZ). Centro de Pesquisas René Rachou. Laboratório de Pesquisas Clínicas. Belo Horizonte. 2001, 44 p.
- DANTAS-TORRES, F. *Rhipicephalus sanguineus* e a epidemiologia da leishmaniose visceral canina no Estado de Pernambuco. Tese apresentada ao curso de doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. 2009. 95 p.
- DANTAS-TORRES, F.; FAUSTINO, M. A. G.; LIMA, O. C. C.; ACIOLI, R. V. Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.38, n.5, p.444-445, 2005.
- DANTAS-TORRES, F. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.8, p.929-930, 2006a.
- DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.1, p.117-118, 2006b.
- DANTAS-TORRES, F. Ticks as vector of *Leishmania* parasites. **Trends in Parasitology**, v.xx, p.1-5, 2011.
- DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatório da *L. donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. **O Hospital**. v.48, p.61-70, 1955.
- DE MOURA, T. R.; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, G. C.; CARNEIRO, M. W.; FUKUTANI, K. F.; NOVAIS, F. O. Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.6, p.712, 2010.

- DE OLIVEIRA, A.; FREIRE, M. P.; HIRAMOTO, R. M.; TOLEZANO, J. E.; CASTELLÃO, K. G.; TANIGUCHI, H. H.; PRATTI, A. N. Análise comparativa de três diferentes testes sorológicos empregados na detecção da leishmaniose visceral em cães. **Revista Saúde**, v. 4, n.1, p. 34, 2010.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v.27, n.5, p.305-318, 2004.
- DIAS, J. C. P. Problemas e possibilidades de participação comunitária no controle das grandes endemias no Brasil **Cad. Saúde Pública**, v.14, n.2, p.19-37, 1998.
- DIETZE, R., BARROS, G.B., TEIXEIRA, L., HARRIS, J., MICHELSON, K., FALQUETO, A., COREY, R.. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v.25, p.1240–1242, 1997.
- DUNAISKI, M.; Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Região do Vale do Ribeira –Paraná: Cães reservatórios ou hospedeiros acidentais? Dissertação. Pós graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, 2006, 57 p.
- DYE, C.; DAVIES, C. R.; LAINSON, R. Communication among phlebotomine sandflies: A field study of domesticated *Lutzomyia longipalpis* populations in Amazonian Brazil. **Animal Behaviour**, v.42, p.183-192, 1991.
- DYE, C.; KILLICK-KENDRICK, R.; VITUTIA, M. M.; WALTON, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; HARITH, A. E.; GUY, M. W.; CAÑAVATE, M. C.; HASIBEDER, G. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. **Parasitology**, v.105, p.35–41, 1992.
- DYE, C. The logic visceral leishmaniasis control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, n.2, p.125-130, 1996.
- FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v.28, p.36-44, 2000.
- FELICIANGELI, M. D.; DELGADO, O.; SUAREZ, B.; CHIURILLO, M. A. The burden of the *Leishmania chagasilinfantum* infection in a closed rural focus of visceral leishmaniasis in Lara state, west-central Venezuela. **Tropical Medicine & Internation Health**, v.10, p.444-449, 2005.
- FERREIRA, L. C.; MANGABEIRA, O.; DEANE, L.; CHAGAS, A. W. Notas sobre a transmissão de leishmaniose visceral americana. **Hospital**, v.14, p.1077-1087, 1938.
- FIGUEIREDO, F. B.; BONNA, I. C. F.; NASCIMENTO, L. D.; COSTA, T.; BAPTISTA, C.; PACHECO, T. M. V.; AMENDOEIRA, M. R. R.; MADEIRA, M. F. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**. v.42, n.2, p.141-145, 2009.
- FISA, R.; GÁLLEGO, M.; CASTILLEJO, S.; AISA, M. J.; SERRA, T.; RIERA, C.; CARRIÓ, J.; GÁLLEGO, J.; PORTÚS, M. Epidemiology of canine leishmaniosis in

Catalonia (Spain): the example of the Priorat focus. **Veterinary Parasitology**, v. 83, n. 2, p.87-97, 1999.

FORATTINI, O. P.; SANTOS, M. R. Nota sobre a infecção natural de *Phlebotomus intermedius* (Lutz; Neiva, 1912) por formas em leptomonas, em um foco de leishmaniose tegumentar americana. **Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP**, v.17, p.171-174, 1952.

FRANÇA-SILVA, J.C. COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.S.; GENNARO, O., NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.111, p.161-173, 2003.

FREHSE, M. S. Vigilância ativa da leishmaniose visceral canina no município de São José dos Pinhais – PR. 2008. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR.

FREITAS, E.; MELO, M. N.; COSTA-VAL, A. P.; MICHALICK, M. S. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1/2, p. 159-167, 2006.

GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: las leishmaniosis. **Revue Scientifique et Technique the Office International des Epizooties**, v.23, n.2, p.661-676, 2004.

GÁLVEZ, R.; MIRÓ, G.; DESCALZO, M. A.; NIETO, J.; DADO, D.; MARTIN, O.; CUBERO, E.; MOLINA, R. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). **Veterinary Parasitology**, v.169, p.327-334, 2010.

GENARO, O.; MAYRINK, W.; MICHALICK, M. S. M.; DIAS, M.; DA COSTA, C. A.; MELO, M. N. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.83, p.43, 1988.

GENARO, O.; COSTA, R. T.; FRANÇA SILVA, J. C.; REIS, A. B.; VIEIRA, E. P.; ARIAS JR. Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis for dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi* in Brazil. **Acta Parasitol Turcica**, v.21, n:1, p.93, 1997.

GIMENO, O. Contribución a la epidemiología del kal-azar. **Abstracts of Tropical Diseases Bulletin**, v.30, p.752, 1933.

GIORDANO, A. Le chat dans la transmission de la leishmaniose viscerale de le mediterranee. **Bulletin de la Sezione Italiana de la Societe Internazionale de Microbiologie**. v.5, p.330-332, 1933.

GOMES, A. H. S.; FERREIRA, I. M. R.; LIMA, M. L. S. R.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F. L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.234-241, 2007.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n.2, p.338-349, 2004.

GRAMICCIA, M.; DI MUCCIO, T.; FIORENTINO, E.; SCALONE, A.; BONGIORNO, G.; CAPPIELO, S.; PAPPARONE, R.; MANZILLO, V. F.; MAROLI, M.; GRADONI, L.; OLIVA, C. Longitudinal study on the detection of canine *Leishmania* infections by conjunctival swab analysis and correlation with entomological parameters. **Veterinary Parasitology**, v.171, p.223-228, 2010.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1169-1180, 2005.

GUIMARÃES, A. M.; ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; ROSADO, I. R.; MORAIS, L. G.; SANTOS, R. R. D. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n.1, p.49-53, 2009.

GUIZANI I, VAN EYS GJJM, ISMAIL RB, DELLAGI K. Use of recombinant DNA probes for species identification of Old World *Leishmania* isolates. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.50, p. 632- 640, 1994.

HERVÁS, J.; CHACÓN-M DE LARA, F.; SÁNCHEZ-ISARRIA, M. A.; PELLICER, S.; CARRASCO, L.; CASTILLO, J. A.; GÓMES-VILLAMANDOS, J. C. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.1, p.101-105, 1999.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Resultados preliminares do Censo 2010. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/resultados\\_dou/RJ2010.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/resultados_dou/RJ2010.pdf)>. Acessado em: 02/01/2012.

IESBICH, M. M. P. Avaliação de amostras de soro canino para leishmaniose tegumentar americana (LTA) em áreas de baixa endemicidade/Porto Alegre/RS através de métodos diagnósticos laboratoriais imunológicos e biomoleculares. 2008. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), UFRGS, Rio Grande do Sul - RS.

JULIÃO, F. S.; SOUZA, B. M. P. S.; FREITAS, D. S.; OLIVEIRA, L. S.; LARANJEIRA, D. F.; DIAS-LIMA, A.; SOUZA, V. M. M.; BARROUIN-MELO, S. M.; MOREIRA JR, E. D.; PAULE, B. J. A.; FRANKE, C. R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n.8, p. 319-324, 2007.

KOEHLER, K., STECHELE, M., HETZEL, U., DOMINGO, M., SCHONIAN, G., ZAHER, H., BURKHARDT, E. Cutaneous leishmaniasis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.9-17, 2002.

LAISON, R., SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v.273: 595-99, 1978a.

- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In R Killick-Kendric, WPeters (eds), **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, Academic Press, p. 1-120, 1987b.
- LAISON, R.; DYE, C.; SHAW, J. J.; MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O.; SOUZA, A. A.; SILVEIRA, F. T. Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.85, n.1, p.135-137, 1990.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p.811-827, 2005.
- LANGONI, H. Zoonoses and human beings. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.10, n.2, p.111, 2004.
- LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Bepa**, v. 6, n.67, p.13-23, 2009.
- LAURENTINO-SILVA, V. Imunologia aviária e aplicação da imunoglobulina Y (IgY) na soroprevalência das leishmanioses caninas. Seropédica, RJ. 1999. 130 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- LEITE, R. S.; FERREIRA, S. A.; ITUASSU, L. T.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. R. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, v.170, p.201-206, 2010.
- LEONTIDES L.S., SARIDOMICHELAKIS M.N., BILLINIS C., KONTOS V., KOUTINAS A.F., GALATOS A.D.; MYLONAKIS M.E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.19-27, 2002.
- LEMOES, E. M.; LAURENTI, M. D.; MOREIRA, M. A.; REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; RAYCHAUDHURI, S. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. **Acta Tropica**, v.107, n.2, p.205-7, 2008.
- LIMA, L. C. R.; MARZOCHI, M. C. A.; SABROZA, P. C. Flebotomíneos em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar no bairro de Campo Grande, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v.33, p.64-74, 1981.
- LINARDI, P. M.; NAGEM, R. L. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães em Belo Horizonte e municípios vizinhos. **Rev. brasil. Biol**, v.33, n.4, p.529-538, 1973.
- LOBSIGER, L.; MÜLLER, N.; SCHWEIZER, T.; FREY, C. F.; WIEDERKEHR, D.; ZUMKEHR, B.; GOTTSSTEIN, B. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 408-411, 2010.
- LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.4, p.84-95, 1912.

- MACEDO, A. M.; MELO, M. N.; GOMES, R. F.; PENA, S. D. J. DNA fingerprints: a tool for identification and determination of the relationship between species and strains of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.53, p.63-70, 1992.
- MACHADO, P.; ARAÚJO, C.; DA SILVA, A. T.; ALMEIDA, R. P.; D'OLIVEIRA Jr, A.; BITTENCOURT, A. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. **Clinical Infectious Diseases**, v.34, n.12, p. 69-73, 2002.
- MACHADO, J. G.; MORAES, J. R. C.; COSTA, R. T.; NASCIMENTO, E.; MOREIRA, E. C. Comparação dos resultados dos métodos de imunofluorescência indireta e ELISA indireto no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina realizado pelos laboratórios de Belo Horizonte, MG, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**. v.14, n.1, jun., p. 47-51, 2007.
- MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C.; LEAL, C. A.; MELO, C. X.; CONFORT, E. M.; MARZOCHI, M. C. A. *Post mortem* evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.138, p.366-370, 2006.
- MADEIRA, M. F.; SOUSA, M. A.; BARROS, J. H. S.; FIGUEIREDO, F. B.; FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A.; DE PAULA, C. C.; FAISSAL, B. N. S.; FONSECA, T. S.; THOMA, H. K.; MARZOCHI, M. C. A. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology**, v.136, p 411-423, 2009.
- MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; GOMES, A. A. D.; SILVA, A.R.S.; VIEIRA, R.F.C.; CAMACHO, A.A.; QUINN, J.; CHANDRASHEKAR, R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v.175, p.15–19, 2011.
- MARSELLA, R.; GOPEGUI, R. R. Leishmaniasis: A re-emerging zoonosis. **International Journal of Dermatology**. v.37, n.11, p. 801-814, 1998.
- MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; AMENDOEIRA, M. R. R. Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina** 42:69-84, 1981.
- MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; SOUZA, P. P. M.; TOLEDO, L. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.1, p.432-446, 1985.
- MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, v. 10, p. 37-40, 1994.
- MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v.10, supl. 2, p. 359-375, 1994b.
- MARZOCHI, M. C. A.; FAGUNDES, A.; ANDRADE, M. V.; SOUZA, M. B.; MADEIRA, M. F.; COUTA-CONFORT, E.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n.5, p.570-580, 2009.

- MATOS, M. M.; FILGUEIRA, K. D.; AMORA, S. S. A.; SUASSUNA, A. C. D.; AHID, S. M. M.; ALVES, N. D. Ocorrência da leishmaniose visceral em cães em Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal**, v.16, n.1, p.51-54, 2006.
- MATTOS JR., D. G.; PINHEIRO, J. M.; MENEZES, R. C.; COSTA D. A. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.119-122, 2004.
- MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The stranger case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v.16:188-89, 2001.
- MENDOZA-LEON, A.; HAVERCROFT, J. C.; BARKER, D. C. The RFLP analysis of the b-tubulin gene region in New World *Leishmania*. **Parasitology**, v.111, p.1-9, 1995.
- MERCHANT, S. R.; TABOADA, J. Enfermedades sistémicas con manifestaciones cutáneas. In: **Clínicas Veterinarias de Norteamérica**. Interamericana. p.999-1016, 1995.
- METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Epidemiologia. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2003. 120p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6 ed.; v.1, p.444-466, Brasília, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Visceral Grave. Série A. Normas e Manuais Técnicos**, 2006, 59p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007, 179p.
- MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.4, p.337-340, 2006.
- MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; DE PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.2, p.147-152, 2005.
- MORAES-SILVA, E.; ANTUNES F. R.; RODRIGUES, M. S.; DA SILVA JULIÃO F.; DIAS-LIMA, A. G.; LEMOS-DE-SOUSA, V.; DE ALCANTARA, A. C.; REIS, E. A.; NAKATANI, M.; BADARO, R.; REIS, M. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; FRANKE, C. R. Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. infantum* infection. **Acta Tropica**, v.98, p.176-182, 2006.

- MOREIRA JR., E. D.; SOUZA, V. M. M.; SREENIVASAN, M.; LOPES, N. L.; BARRETO, R. B.; CARVALHO, L. P. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.69, n.4, p.393-397, 2003.
- MÜLLER, N.; WELLE, M.; LOBSIGER, L.; STOFFEL, M. H.; BOGHENBOR, K. K.; GOTTSTEIN, B.; FREY, C. F.; GEYER, C.; BOMHARD, W. Occurrence of *Leishmania* sp. In cutaneous lesions of horses in Central Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 346-351, 2009.
- NERY-GUIMARÃES, F. Estudo de um foco de Leishmaniose Muco-cutânea na baixada Fluminense (Estado do Rio de Janeiro). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.53, p.1-11, 1955.
- NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 9 ed. Rio de Janeiro; Atheneu; 1995, 494 p.
- NUNES, R. R. M. Alterações genitais em animais reservatórios de tripanossomatídeos de importância para o produtor rural. 2008. 58 f. Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal Tropical). Universidade Federal do Tocantins, Tocantins, TO.
- NUNES, M. P.; JACKSON, J. M.; CARVALHO, R. W.; FURTADO, N. J.; COUTINHO, S. G. Serological survey for canine cutaneous and visceral leishmaniasis in areas at risk for transmission in Rio de Janeiro where prophylactic measures had been adopted. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, p.411-417, 1991.
- NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDI, F. P.; DE PAULA, H. B.; AZEVEDO, M. A. A.; LIMA, V. M. F.; GARCIA, J. F. Avaliação da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n.1, p.5-9, 2007.
- ODORIZZI, R. M. F. N. Estudo da leishmaniose visceral canina e dos vetores de leishmanioses no município de Miranópolis, região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. 2006. 61 f. Dissertação, USP.
- OLIVEIRA, L. C. P; ARAÚJO, R. R; ALVES, C. R; MOUTA-CONFORT, E.; LÓPEZ, J. A; LIMA, F. W. M. Seroprevalence and risk factory for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, Estado da Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.4, p.400-404, 2010.
- OWENS, S. D. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1076-1083, 2001.
- PAHO. Pan American Health Organization. Leishmaniasis: 2007 Update. Disponível em: <[www.paho.org/english/ad/dpc/cd/leish-2007.pdf](http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/leish-2007.pdf)>. Acessado em: 06 jan. 2012.
- PAULA, C. C.; FIGUEIREDO, F. B., MENEZES, R. C., MOUTA-CONFORT, E.; BOGIO, A.; MADEIRA, M. F. Leishmaniose visceral canina em Maricá, Estado do Rio de Janeiro: relato do primeiro caso autóctone **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 42, 77-78, 2009.



- PAZ, G. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MAGALHÃES, D. F.; SATHLER, K. P. B.; MORAIS, M. H. F.; FIÚZA, V. O. P.; BRANDÃO, S. T.; WERNECK, G. L.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 97, p. 131-133, 2010.
- PEDROSO, A. A leishmaniose local do cão. **Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia**, v.1, p.1-33, 1913.
- PENNA, H. A. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Brasil Médico**, v.18, p.940-950, 1934.
- PIEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. "Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification". **Hydrology and Earth System Sciences**, v.11, n. 5, p.1633-1644, 2007.
- PORTO, M. L. Soroprevalência e fatores de risco para leishmaniose visceral canina em Patos, Paraíba, Brasil. 2010. 34 f. Monografia. (Trabalho de conclusão do Curso de Graduação em Medicina Veterinária). UFCG. CSTR – Campus Patos, PARAÍBA, PB.
- QUEIROZ, N. M. G. P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; NUNES, C. M.; STARKE-BUZETTI, W. A. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.1, p.34-40, 2010.
- RANGEL, E. F.; SOUZA N. A.; WERMELINGER, E. D.; AZEVEDO, A. C.; BARBOSA, A. F.; ANDRADE, C. A. *Phlebotomus* of Vargem Grande, a focus of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, p.347-349, 1986.
- REIS, H. R.; LOPES-MORI, F. M. R.; REIS, C. R.; FREIRE, R. L.; MARANA, E. R.; CHRYSAFIDIS, A. L.; TEDIM, A. V.; RUFFOLO, B. B.; BUGNI, F. M.; CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; NABUT, L. B.; NAVARRO, I. T. Soroprevalência da leishmaniose tegumentar americana (LTA) canina e fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Bela Vista do Paraíso, Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.3, p.1083-1094, 2011.
- REY, L. *Leishmania* e leishmaníases: Os parasitos. In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 214 – 226.
- RONDON, F. C. M. Estudo transversal da leishmaniose visceral canina na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. 2007. 61 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.
- RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; FRANKE, C. R.; BARROS, R. S.; OLIVEIRA, F. R.; ALCÂNTARA, A. C.; DINIZ, A. T. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.155, p.24-31, 2008.
- ROSYPAL, A. C.; TROY, G. C.; ZAJAC, A. M.; FRANK, G.; LINDSAY, D. S. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970-972, 2005.

SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; MARZOCHI, M. C. A. In XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e II Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, João Pessoa -PB. 1978.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.

SANTOS, G. P. L.; SANAVRIA, A.; MAROOCH, M. C. A.; SANTOS, E. G. B.; PACHECO, V. L. S. R. S.; CONFORT, E. M.; ESPINDOLA, C. B.; SOUZA, M. B.; PONTE, C. S.; CONCEIÇÃO, N. F.; ANDRADE, M. V. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.2, p.181-166, 2005.

SANTOS, J. M. L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M. R. F.; LINO, F. R. L.; ANDRADE, L. S. S.; SOUZA, R. C. A.; BRITO, F. L. C.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; SIMÕES-MATTOS, L. Prevalência de anticorpos antileishmania spp em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n.1, p.41-45, 2010.

SAVANI, E. S. M. M.; SCHIMONSKY, B. V.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N. Vigilância de leishmaniose visceral Americana em caso de área não endêmica, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v.37, n.2, p.260-262, 2003.

SCHUBACH, E. Y. P. Validação de um teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro. 2011. 68f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia e Controle das Doenças Infecciosas e Parasitárias). Universidade de Brasília, Brasília, DF.

SHAW, J. Leishmanial taxonomy: a never ending academic challenge. In: BARRAL, A.; COSTA, J. M. L. **Leishmanias e leishmaniose tegumentar nas Américas**. 1 ed. Salvador: Fiocruz-BA, 2011, p. 6-10.

SILVA, A. V. M.; PAULA, A. A.; CABRERA, M. A. A.; CARREIRA, J. C. A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21,;324-328, 2005.

SILVA, S. M.; RIBEIRO, V. M.; RIBEIRO, R. R.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.166, p.159-162, 2009.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.160, n.1/2, p. 55-59, 2009b.

SILVA, D. A.; PERIÉ, C. S. F. S.; MENDES JÚNIOR, A. A. V.; MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B. Leishmaniose visceral canina em Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro – relato de caso. **Clínica Veterinária**, v.18, n.95, p.64-68, 2011.

SILVEIRA, T. G. V.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; TOLEDO, M. J. O.; BERTOLINI, D. A.; ARRAES, S. M. A. A.; FILHO, D. V; Investigação sorológica em cães de

área endêmica de leishmaniose tegumentar no estado do Paraná. **Cadernos de Saúde Pública**, v.12, n.1, p.89-93, 1996.

SHERLOCK, I. Notas sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 16, n. 1, p. 19-26, 1964.

SOUZA, W. J. S.; COUTINHO, S. G.; MARZOCHI, M. C. A.; TOLEDO, L. M.; GOTTLIEB, M. V. Utilização da reação de imunofluorescência indireta no acompanhamento da terapêutica da leishmaniose tegumentar americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.77, p.247-253, 1982.

SOUZA, M. B.; M. C. A. MARZOCHI; R. W. CARVALHO; P. C. RIBEIRO; C. S. PONTE; CAETANO, J. M.; MEIRA, A. M. Ausência da *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no Município do Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, p.1881-1885, 2003.

SOUZA, M. B.; CARVALHO, R. W.; MACHADO, R. N. M.; WERMELINGER, E. D. Flebotômíneos de áreas com notificações de casos autóctones de leishmaniose visceral canina e leishmaniose tegumentar americana em Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.53, n.1, p.147-150, 2009.

SOUZA, N. P.; ALMEIDA, A. B. P. F.; FIRETAS, T. P. T.; PAZ, R. C. R.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V. R. F. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em cães silvestres mantidos em cativeiro, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.3, p.333-335, 2010.

TÁVORA, M. P. F. Inquérito sorológico para *Leishmania* sp em cães de rua apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro. 2004. 60 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, RJ.

TÁVORA, M. P. F.; PEREIRA, M. A. V. C.; SILVA, V. L.; VITA, G. F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas ELISA e RIFI para diagnosticar *Leishmania* sp em cães errantes apreendidos no Município de Campo dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.40, n.4, p.482-483, 2007.

TEODORO, U.; KÜHL, J.B.; SANTOS, D.R.; SANTOS, E.S. Impacto de alterações ambientais na ecologia de flebotômíneos no sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.15, n.4, p.901-906, 1999.

TEVA, A.; FERNANDES, J. C. C.; LAURENTINO-SILVA, V. Imunologia. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio: Rio de Janeiro. 2009. 496 p.

THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E. A.; NAVARRO, I. T.; FARIAS, M. R.; SOUZA, L. M.; CARVALHO, Y.; BISPO, S.; MEMBRIVE, N. A.; MINOZZO, J. C.; TRUPPEL, J.; BUENO, W.; LUZ, E. Casos autóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n.3, p.46-51, 2009.

- TRAVI, B.L.; JARAMILLO, C.D.; MONTOYA, J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONÇALVES, A.; VELLEZ, I.D. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.50, n.5, p.557-565, 1994.
- URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia veterinária**, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, 273p.
- VANZELI, A. C.; KANAMURA, H. Y. Estudo dos fatores socioambientais associados à ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no município de Ubatuba, SP, Brasil. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.9, p.20-25, 2005.
- VELASQUEZ, L. G.; MEMBRIVE, N.; MEMBRIVE, U.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; LONARDONI, M. V. C.; TEODOR, U.; TESSMANN, I. P. B.; SILVEIRA, T. G. V. PCR in the investigation of canine American tegumentar leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.22, n.3, p.571-578, 2006.
- WHO - World Health Organization. **Control of the Leishmaniasis**, WHO Tech Rep Ser p.793, 1990.
- WHO - World Health Organization. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/disease\\_epidemiology/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html)>, Acessado em: 02 de janeiro de 2012.
- YOSHIDA, E. L. A.; MARQUES, S. A.; STOLF, H. O.; BARSOTTI, L. A.; BUÉNO, M. M. F.; SOGAYAR, R. Infecção Natural de *Equus caballus* por *Leishmania* sp. - São Paulo, Brasil (Breve comunicação científica). **Revista do Instituto de Medicina Tropical De São Paulo**. v.30, n.2, p.79-80, 1988.
- ZAFFARONI, E.; RUBAUDO, L.; LANFRANCHI, P.; MIGNONE, W. Epidemiological gápatterns of canine leishmaniosis in western Liguria (Italy). **Veterinary Parasitology**, v.81, p.11-19, 1999.
- ZIVINCJAK, T.; MARTINKOVIC, F.; MARINCULIC, A.; MRLJAK, V.; KUCER, N.; MATIJATKO, V.; MIHALJEVIC, Z.; BARIC-RAFAJ, R. A seroepidemiologic survey of canine leishmaniosis among apparently healthy dogs of Croatia. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 35-43, 2005.

## **ANEXOS**

Anexo I – Questionário epidemiológico estruturado e aplicado aos moradores visitados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

Anexo II – Critério utilizado para a leitura do teste rápido, de acordo com as recomendações descritas no manual de treinamento TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina, por Bio-Manguinhos, Fiocruz/RJ.

Anexo III – Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP.

Anexo I – Questionário epidemiológico estruturado e aplicado aos moradores visitados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

### Ficha de Propriedade e Proprietário

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Propriedade Nº \_\_\_\_\_ Zona: ( ) Rural ( ) Urbana

Localidade: \_\_\_\_\_ Coord. Geográf.: \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Pt de referência: \_\_\_\_\_ Temperatura ambiente: \_\_\_\_\_

Tel: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

Tipo de residência: ( ) pau a pique ( ) alvenaria ( ) outros:

Tipo de vegetação predominante: \_\_\_\_\_

Quantos cães em casa: \_\_\_\_

Pratica alguma ação para controle de ectoparasitos?

( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

Leva o cão ao veterinário?

( ) sim ( ) não Qual a Periodicidade? \_\_\_\_\_

Presença de outras espécies domésticas:

( ) gatos ( ) bovinos ( ) equinos ( ) outros: Quais? \_\_\_\_\_

Presença de animais silvestres:

( ) capivara ( ) gambá ( ) outros: \_\_\_\_\_

Condição econômica (observacional):

( ) baixa ( ) média ( ) alta

Escolaridade:

Nunca frequentou a escola ( )

Ensino fundamental incompleto ( )

Ensino fundamental completo ( )

Ensino médio incompleto ( )

Ensino médio completo ( )

Ensino superior completo/incompleto ( )

Que produtos de limpeza utiliza no ambiente? \_\_\_\_\_

Utiliza prod. inseticidas no ambiente?

( ) sim ( ) não Quais? \_\_\_\_\_ Intervalos? \_\_\_\_\_

Utiliza mét. Físicos de limpeza no ambiente (Ex: Vassoura de fogo)?

( ) sim ( ) não Quais? \_\_\_\_\_ Intervalos? \_\_\_\_\_

**Outras observações relevantes:**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**FICHA INDIVIDUAL ANIMAL Nº \_\_\_\_\_**

Data: \_\_/\_\_/\_\_ Propriedade Nº \_\_\_\_ Zona: ( ) Rural ( ) Urbana Localidade: \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_

Nome do animal: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) Macho ( ) Fêmea Raça: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_

Animal nascido na propriedade? ( ) sim ( ) não

Se não, de onde veio o animal? \_\_\_\_\_

Há quanto tempo está com o animal? \_\_\_\_\_

Pêlo: ( ) curto ( ) médio ( ) longo

Porte: ( ) peq ( ) méd ( ) grande

Escore: ( ) caquético ( ) magro ( ) normal ( ) obeso

Comportamento: ( ) triste ( ) ativo/normal ( ) agitado

Idade: ( ) <6 meses ( ) 6 meses a 2 anos ( ) 2 a 5 anos ( ) 5 a 10 anos ( ) > 10 anos

Temperatura: \_\_\_\_ Pulso: \_\_\_\_ FR: \_\_\_\_ FC: \_\_\_\_ TPC: \_\_\_\_ Turgor: \_\_\_\_\_

Linfonodos: \_\_\_\_\_

Mucosa ocular: ( ) hipocorada ( ) normocorada ( ) ictérica ( ) congesta

Mucosa oral: ( ) hipocorada ( ) normocorada ( ) ictérica ( ) congesta

Outras alterações sanitárias atuais: \_\_\_\_\_

Distúrbios atuais de coagulação na pele: ( ) petéquias ( ) equimoses ( ) outros: \_\_\_\_\_

Histórico de epistaxe, rinorragia, gengivorragia: ( ) sim ( ) não

Animal vive dentro da residência: ( ) sim ( ) não ( ) às vezes

Locais de acesso do animal: ( ) pastagens ( ) córregos ( ) matas ( ) ambiente urbano

Contato direto com outras espécies de animais: ( ) sim ( ) não Quais? \_\_\_\_\_

Histórico de patologias: \_\_\_\_\_

Tipo de alimentação: ( ) comida ( ) ração

Possui água e comida à disposição o tempo todo? ( ) sim ( ) não

Vermifugação: ( ) sim ( ) não Há qto tempo? \_\_\_\_\_ Qual produto? \_\_\_\_\_

Critério para escolha: ( ) indicação ( ) balconista ( ) veterinário ( ) propaganda

Possui ectoparasitos? ( ) sim ( ) não

Quais e quantidade?

( ) pulgas \_\_\_\_\_ ( ) piolhos \_\_\_\_\_ ( ) sarnas \_\_\_\_\_

( ) carrapatos \_\_\_\_\_ Fases: \_\_\_\_\_ espécies: \_\_\_\_\_

Faz tratamento? ( ) sim ( ) não Qual produto? \_\_\_\_\_

Se não trata, qual motivo? \_\_\_\_\_

Critério para escolha do produto: ( ) indicação ( ) balconista ( ) veterinário ( ) propaganda

Dermatopatias? ( ) sim ( ) não

Outros tipos de lesões: \_\_\_\_\_

Sinais de otite? ( ) sim ( ) não

Hábito do animal?

( ) sempre preso ( ) preso de dia e solto à noite ( ) solto ( ) outros \_\_\_\_\_

Apresenta abrigo? ( ) sim ( ) não Tipo: \_\_\_\_\_

Tipo de ambiente do animal:

( ) ladrilhado ( ) cimentado ( ) de terra ( ) outros

Condição de limpeza do ambiente do animal: ( ) ruim ( ) moderada ( ) satisfatória

Frequência de recolhimento e limpeza das fezes:

( ) diariamente ( ) 2 a 3 vezes por semana ( ) 1 vez por semana ( ) não faz

Tem assistência Veterinária? ( ) sim ( ) não

Frequência? ( ) a cada 6 meses ( ) 1 x por ano ( ) só qd fica doente

Animal é vacinado? ( ) sim ( ) não Quais vacinas? \_\_\_\_\_

Banho: ( ) semanal ( ) quinzenal ( ) mensal ( ) outros

Usa produtos parasiticidas? ( ) sim ( ) não Quais? \_\_\_\_\_

**Outras obs relevantes:**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_





### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Eu, \_\_\_\_\_ CPF/RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ telefone: \_\_\_\_\_, recebi explicações sobre o projeto do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, visando estudos epidemiomoleculares de hemoparasitos em cães, autorizo a coleta de material biológico em meus cães, estando ciente que minha identidade será preservada, que não haverá danos nos animais decorrentes da coleta do material e ausência de custos na realização dos exames.

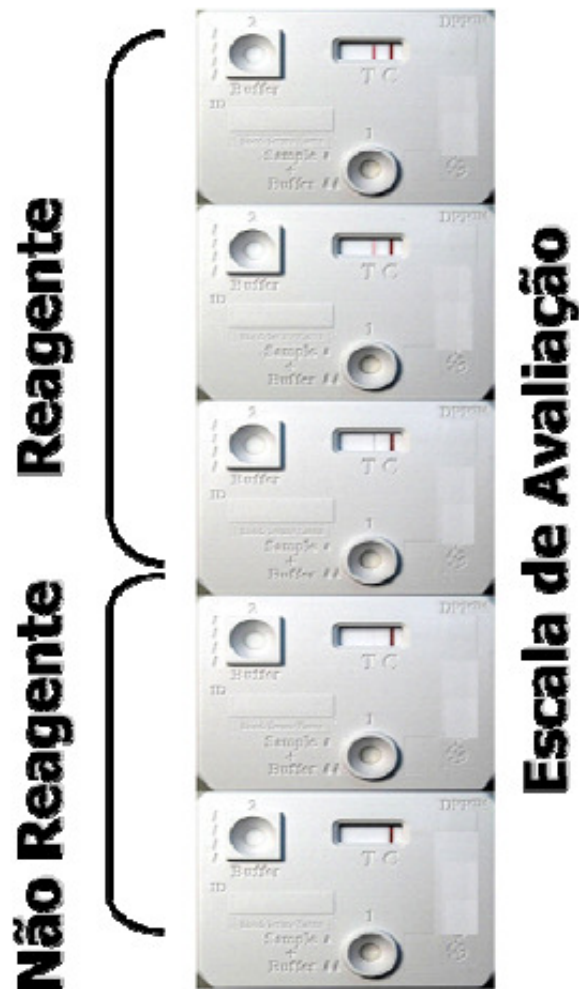
Em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Anexo II – Critério utilizado para a leitura do teste rápido, de acordo com as recomendações descritas no manual de treinamento TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina, por Bio-Manguinhos, Fiocruz/RJ.

## ESCALA DE AVALIAÇÃO DE INTENSIDADE TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

---



Anexo III – Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP.



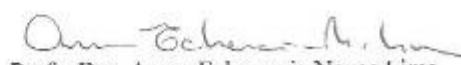
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo N° 124/2011

**PARECER**

O Projeto de Pesquisa intitulado “*Inquérito soropidemiológico canino em áreas endêmicas de Leishmanioses na microrregião de Itaguaí – Rio de Janeiro*” sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Luiz Massard do Departamento de Parasitologia Veterinária do Instituto de Veterinária, processo 23083.005908/2011-01, atende aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e práticos do uso de animais em experimentação.

UFRRJ, 11/08 /2011.

  
Profª. Dra. Aurea Echevarria Neves Lima  
Pró-reitora de Pesquisa e Pós-graduação