

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



“Monitoramento sorológico de novos casos de leishmaniose visceral canina e avaliação da fauna flebotomínica na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, RJ”

por

Livia Aparecida Lopes do Carmo

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública.

Orientador principal: Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo

Segundo orientador: Prof. Dr. Marcos Barbosa de Souza

Rio de Janeiro, fevereiro de 2013.



Esta dissertação, intitulada

“Monitoramento sorológico de novos casos de leishmaniose visceral canina e avaliação da fauna flebotomínica na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, RJ”

apresentada por

Livia Aparecida Lopes do Carmo

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Sandro Antonio Pereira

Prof. Dr. Valmir Laurentino Silva

Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo – Orientador principal

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus que me deu saúde e coragem para seguir em frente apesar de todos os obstáculos, que me guiou no momento que tive de escolher o caminho a seguir.

Aos meus pais, Vladimir e Lourdes por terem me dado o suporte para que eu pudesse realizar este sonho. Eles que entenderam minhas viagens, minhas faltas nas reuniões de família. Muito obrigada por tudo que me deram, graças a vocês conquistei mais esta vitória. Amo vocês.

Ao meu orientador, Dr. Fabiano Borges Figueiredo que me recebeu de braços abertos e acreditou que mesmo com pouco tempo eu conseguiria. Agradeço a tranquilidade que me transmitiu, o suporte e a grande contribuição na minha formação acadêmica.

Ao Dr. Marcos Barbosa de Souza, a quem considero como um segundo pai. A ele dedico meu mestrado, pois sem seu apoio eu não teria seguido em frente, aceitado o desafio e chegado lá. Obrigada, você foi especial.

Ao Adilson Benedito, meu agradecimento mais que especial, ele que me aturou esses dois anos pacientemente, carregou minhas poucas “tralhas”, trabalhou duro sem nunca reclamar, apesar de todo o cansaço, sempre deu força nas minhas decisões, e foi meu psicólogo durante as longas caminhadas. Meu amigo “Didi”, gosto muito de você, sou muito grata por tudo.

À Dra. Joseli Nogueira, que se tornou uma amiga. Ela que entendeu meu sofrimento no mestrado, me deu suporte, ensinou e torceu por mim. Você é muito especial, amiga.

À equipe da Dermatozoonoses, Artur Augusto, Tuanne Rotti, Livia Cardoso e Carlos José, que me acompanharam e ajudaram nas coletas. Muito obrigada.

À Dra. Fernanda Nunes Santos, do Laboratório de Imunodiagnóstico da ENSP/FIOCRUZ, que teve a paciência de me ensinar e auxiliar nas sorologias. Que passou horas no laboratório, ficando até tarde mesmo estando cansada. Muito obrigada.

Ao pessoal do Laboratório de Vetores, Miguel Alves Souza, Antônio de Medeiros Meira, Elir Dias, Flávio Alcelino, Jairo Caetano Meródio, Wallace Osório, Ciro Benigno Villanova e em especial os técnicos Sidney da Silva Alves e César dos Santos Ponte, por terem me auxiliado na identificação dos flebotômíneos.

Ao meu noivo, Roberto, que durante todo o mestrado me apoiou, vibrou e compreendeu. Ele que fez o grande sacrifício de acordar cedo para me levar às minhas coletas a campo, cuidou dos nossos filhos peludos, teve paciência, e põe paciência... Obrigada pelos conselhos e por tudo que fez para que eu concretizasse meu sonho, você foi um Companheirão. Te amo!

Às minhas grandes amigas Danielle Berniz e Ludimila Amaral, que acreditaram na minha capacidade e me incentivaram a prestar a prova. Vocês que estiveram do meu lado nos momentos difíceis e não me deixaram desistir, e muitas vezes, foram meu muro das lamentações. Vocês são muito importantes para mim, amo muito vocês.

À Thais Leal, uma parceira e amiga que aguentou minhas bagunças e teve disposição de me acompanhar nas coletas a campo. Que nas minhas noites de insônia fez um baita esforço para manter-se acordada, e que sempre deu opiniões construtivas. Muito obrigada “Tatá”, sua amizade foi um presente.

Aos queridos companheiros de laboratório, Roberto Nei, Silvio Montenegro e Denise Alves que me apoiaram. Nossas longas conversas me fizeram refletir muito.

Ao Alessandro Coelho La Porta, que foi um ótimo parceiro de coletas e de fotografias, um amigo que me acompanhou nas longas caminhadas. Muito obrigada. Na sua vez pode contar comigo.

Não sou muito boa com as palavras, mas saibam que serei eternamente grata a todos, cada pedacinho desta conquista devo a vocês.

Bem, finalizo este agradecimento pedindo desculpas a quem eu possa ter esquecido, obrigada de coração.

Resumo

A leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi*. O principal vetor do parasito é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, e o reservatório nos ambientes domiciliar e peridomiciliar é o cão, e ambos contribuem para a manutenção do ciclo da doença. Para o diagnóstico da leishmaniose deve ser considerada a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. A leishmaniose visceral canina (LVC) apresenta-se clinicamente de maneiras variadas. O diagnóstico laboratorial inclui métodos parasitológicos com identificação microscópica direta e isolamento do parasita, métodos moleculares, e testes sorológicos como a imunofluorescência indireta (IFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste imunocromatográfico rápido (DPP). Para o diagnóstico laboratorial da LVC, o Ministério da Saúde preconiza a técnica de ELISA para triagem e a IFI para a confirmação dos casos. O presente estudo teve como objetivo reavaliar a prevalência da LVC em 2012 e identificar a fauna flebotomínica, na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Para a avaliação sorológica foram empregadas as técnicas IFI, ELISA e DPP. Para levantamento da fauna flebotomínica foram realizadas capturas por armadilhas tipo HP. O censo canino totalizou 116 cães, sendo identificados 17 cães positivos, uma prevalência de 14,65%. Um total de 2.524 espécimes foram capturados no período de abril a novembro de 2012. Foram encontradas nove espécies de flebotomíneos: *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia intermédia*, *Migoneimyia migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Evandromyia edwardsi*, *Micropygomyia capixaba*, *Pintomyia bianchigalatae*, *Micropygomyia schreiberi* e *Bruptomyia* sp.. A confirmação de 17 (14,65%) cães soropositivos para LVC na Ilha da Marambaia no ano 2012, ao compararmos com a prevalência encontrada em 2009 que foi de 15%, demonstra a manutenção da prevalência da infecção na região, mesmo com a remoção de grande parte dos cães sororretores diagnosticados em 2009. Na avaliação da fauna flebotomínica foi encontrada uma baixa densidade de *L. longipalpis* na região, o que pode explicar o não encontro de casos humanos de LV. Os resultados nos mostraram que a prevalência da LVC não foi alterada.

Palavras-chaves: monitoramento, leishmaniose visceral canina, *Lutzomyia longipalpis*, *Leishmania chagasi*, sorologia

Abstract

American visceral leishmaniasis (AVL) in Brazil is caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. The main vector of the parasite is the sandfly *Lutzomyia longipalpis*, and the reservoir in the domiciliary area is the dog, and both contribute to the maintenance of the disease cycle. For the diagnosis of leishmaniasis should be considered the association between clinical, laboratory and epidemiological studies. Canine visceral leishmaniasis (CVL) presents clinically in various ways. Laboratory diagnosis includes parasitological methods with direct microscopic identification and isolation of the parasite, molecular methods, such as serological tests and indirect immunofluorescence (IFI), the immunoenzymatic assay (ELISA) and immunochromatographic test (DPP). For laboratory diagnosis of CVL, the Ministry of Health recommends the ELISA technique for screening and confirmation for IFI cases. The present study aimed to assess the prevalence of LVC in 2012 and identify sand flies in Marambaia Island, the city of Mangaratiba, State of Rio de Janeiro, Brazil. To evaluate serological techniques were employed IFA, ELISA and DPP. For survey of sand flies were captured by HP light traps. The canine census totaled 116 dogs, 17 dogs being identified positive, a prevalence of 14.65%. A total of 2.524 specimens were collected from April to November 2012. Foram found nine species of sandfly: *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia intermediate*, *Migoneimyia migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Evandromyia edwardsi*, *Micropygomyia capixaba*, *Pintomyia bianchigalatae*, *Micropygomyia schreiberi* and *Bruptomyia* sp.. The confirmation of 17 (14,65%) seropositive dogs for LVC in Marambaia Island in the year 2012, when compared with the prevalence found in 2009 that was 15%, demonstrating the maintenance of the prevalence of infection in the region, even with the removal of most dogs seropositive diagnosed in 2009. In the evaluation of sand flies found a low density of *L. longipalpis* in the region, which may explain the finding of no human cases of VL. The results showed that the prevalence of CVL has not changed.

Lista de Abreviaturas

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DCB	Departamento de Ciências Biológicas
DDI	Departamento de Doenças Infecciosas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPP	Teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
FAPERJ	Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IFI	Imunofluorescência Indireta
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínicas Evandro Chagas
LAPCLIN- DERMZOO	Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LTC	Leishmaniose Tegumentar Canina
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
NNN	Novy, Macneal e Nicole
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PCV	Protocolo de Campo Veterinário
RAPD	Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TAD	Teste de Aglutinação Direta
WHO	Organização Mundial de Saúde

Lista de Figuras

Figura 1: Localização da Ilha da Marambaia, em destaque os pontos de coleta12

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. AGENTE ETIOLÓGICO	2
1.2. O VETOR	3
1.3. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	4
1.4. LEISHMANIOSE NA ILHA DA MARAMBAIA	7
2. JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	9
3.1. OBJETIVO GERAL	9
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
4. METODOLOGIA	10
4.1. DESENHOS DO ESTUDO E POPULAÇÃO ALVO	10
4.1.1. Critérios de inclusão	10
4.1.2. Critérios de exclusão	10
4.2. ÁREA DE ESTUDO	11
4.3. MATERIAIS, PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS	12
4.3.1. Manejo dos animais	12
4.3.1.1. Avaliação clínica	12
4.3.1.2. Coleta de sangue	13
4.3.2. Provas sorológicas	13
4.3.2.1. Imunofluorescência indireta (IFI)	13
4.3.2.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	14
4.3.2.3. Teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma (Dual Path Platform - DPP)	15
4.4. AVALIAÇÃO DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA	16
4.4.1 Captura	16
4.4.2 Fixação e caracterização dos flebótomos	16
4.5. PROCEDIMENTO ÉTICO	17
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
5. RESULTADOS	17
5.1 ARTIGO	18
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	32
ANEXO (PROTOCOLO DE CAMPO VETERINÁRIO)	37

1. Introdução

As leishmanioses compreendem um conjunto de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, que acometem o ser humano e diferentes espécies de animais, em regiões tropicais e subtropicais do Velho e do Novo Mundo. No Novo Mundo, as leishmanioses são classificadas clinicamente como leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA) (Brasil, 2010; W.H.O., 2010).

As leishmanioses são zoonoses de grande importância em saúde pública, endêmicas em 88 países, infectando cerca de 350 milhões de pessoas em todo mundo. Atualmente acredita-se que a população de infectados seja de 12 milhões, com uma incidência anual de 1 a 2 milhões de casos, sendo cerca de 500 mil os casos de leishmaniose visceral humana (W.H.O., 2010).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, no período de 2007 a 2012 foram registrados 20.359 casos de LVA, com 1.210 óbitos pela doença, com uma letalidade de 5,94%. Está distribuída nas cinco regiões brasileiras, tendo maior ocorrência na região nordeste. A região sudeste apresenta aproximadamente 20,43% dos casos registrados entre 2007 e 2012 (SINAN, 2013).

No Estado do Rio de Janeiro a LVA é classificada epidemiologicamente como de baixíssima incidência (Brasil, 2010). Entre o período de 2007 a 2012 foram registrados no Estado 17 casos de LVA, com 3 óbitos confirmados. O município de Mangaratiba não apresenta áreas com notificações de casos humanos autóctones de LVA, mas há a ocorrência da doença humana nos municípios vizinhos como Angra dos Reis e Rio de Janeiro (SINAN, 2013). A Ilha da Marambaia localizada no município de Mangaratiba- RJ, é uma área com notificação de casos autóctones de leishmaniose visceral canina (LVC) em levantamento sorológico realizado no ano de 2009.

1.1. Agente etiológico

No Brasil, a LVA é causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*. O seu principal vetor é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, e o principal reservatório no ambiente doméstico e peridoméstico é o cão (*Canis familiaris*), e ambos contribuem para o ciclo de manutenção da doença (Franca-Silva et al., 2005).

O agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) é um protozoário da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania* e existem três espécies responsáveis pela doença, *Leishmania infantum* nos países da Europa, África e Ásia, *L. (L.) chagasi* no Brasil e *Leishmania donovani* na Índia, estas compõem o *Complexo donovani* (Lainson ; Shaw, 1987).

A *L.(L) chagasi* foi descrita pela primeira vez no Brasil em 1937 por Cunha e Chagas. Décadas após, por meio de análise molecular utilizando a técnica de amplificação aleatória do DNA (RAPD) foi concluído que as espécies *L.(L.) chagasi* e a *L.(L.) infantum* são genotipicamente idênticos (Mauricio et al., 1999). Porém, Lainson e Shaw (2005) afirmaram a consideração do nível subespecífico *Leishmania (L.) infantum chagasi* baseando-se nas características eco-epidemiológicas, como o habitat silvestre do *L. longipalpis* e o reservatório silvestre natural. Recentemente, através de um estudo populacional dos parasitos *Leishmania* do Novo Mundo utilizando microsatélites marcadores com variáveis amplas, afirmou-se uma baixa heterogeneidade entre as populações de *L. infantum*, considerando a *L. chagasi* sinônimo da *L. infantum* (Cunha & Chagas, 1937; Lainson & Shaw, 2005; Kuhls et al, 2011).

L.(L.) chagasi são parasitos intracelulares obrigatórios que apresentam duas formas distintas em seu ciclo de vida, a forma amastigota e a promastigota (Pimenta et al., 2003).

As formas amastigotas possuem o formato ovóide, estão presentes nos macrófagos de hospedeiros vertebrados. Esses protozoários são ingeridos no momento do repasto sanguíneo do vetor *L. longipalpis* e no trato digestivo do flebótomo as amastigotas se modificam e se

multiplicam para promastigotas, a forma flagelada dos protozoários. As promastigotas seguem para o esôfago e a faringe do inseto onde se transformam em promastigotas metacíclicas, forma infectante dos parasitas. O vetor no momento em que se alimenta no hospedeiro vertebrado inocula os protozoários (Pimenta et al., 2003).

1.2. O vetor

No Brasil, o principal vetor incriminado pela transmissão da LVA é um díptero, da família Psychodidae, da subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*, espécie *Lutzomyia longipalpis* (Rangel & Lainson, 2003). Nos Estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso a espécie *Lutzomyia cruzi* é o principal vetor da LVA (Santos et al., 1998; Missawa et al., 2011). O vetor *L. longipalpis* está distribuído nas cinco regiões do país. No Estado do Rio de Janeiro, o inseto está distribuído nos municípios do Rio de Janeiro, Angra dos Reis, Mangaratiba, Rio Bonito, Petrópolis, Mesquita, Itaguaí, Saquarema e Casimiro de Abreu (Souza et al., 2009). Na Ilha da Marambaia a ocorrência do *L. longipalpis* foi relatada após levantamento entomológico (Novo et al., 2012).

Os flebotomíneos apresentam quatro fases em seu ciclo vital: ovo, larva, pupa e adulto, sendo considerado um inseto holometabólico. O período de cada fase é definido conforme as condições climáticas e o tipo de alimento (Sherlock, 2003).

Quando adulto o *L. longipalpis* apresenta hábito crepuscular e noturno. Durante o dia o flebotomíneo apresenta atividade, mas em baixa densidade (Deane & Deane, 1962). A maior densidade da espécie ocorre no período de elevada precipitação onde o solo e o ar atmosférico, tornam-se mais úmidos e a temperatura está ideal para o desenvolvimento das formas imaturas e a dispersão dos adultos (Forattini, 1973).

Apenas as fêmeas de *L. longipalpis* são hematófagas e alimentam-se em ambientes silvestres, principalmente do sangue de marsupiais do gênero *Didelphis* e de raposas dos gêneros *Lycalopex* e *Cerdocyon*.

Porém, impactos ambientais causados pela expansão territorial com destruição de seu habitat, tem favorecido a dispersão dos flebótomos para áreas peridomiciliares e domiciliares urbanas, e em consequência disso, ocorreu a adaptação do hábito alimentar dos flebótomos à animais domésticos, especialmente o cão (*Canis familiaris*) e ao ser humano contribuindo assim para a manutenção do ciclo da doença (Marzochi, 1994; Franca-Silva et al., 2005).

1.3. Leishmaniose visceral canina

Classicamente, a doença visceral canina pode apresentar um espectro de manifestações clínicas bem variadas, condicionadas à imunocompetência individual do animal e a cepa do parasito inoculada (Michalick & Genaro, 2005). Entre os sinais clínicos mais comuns na LVC estão as alterações cutâneas, principalmente descamação e eczema, em particular no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras rasas, localizadas mais frequentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações. Nas fases mais adiantadas da doença, observa-se, com grande frequência, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além da hiperqueratose nasal, digital e auricular. Na fase final da infecção, ocorre em geral paresia dos membros posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo (Deane ; Deane, 1955a; b; Marzochi ; Marzochi, 1994; Almeida et al., 2005), sendo a forma assintomática relatada em proporções que podem representar cerca de 40 a 60% da população soropositiva (Marzochi ; Marzochi, 1997).

O diagnóstico das leishmanioses deve considerar a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Os testes laboratoriais contam com ferramentas de diferentes complexidades, cuja aplicabilidade pode variar de acordo com a forma da doença (LTA ou LVA) ou da infraestrutura local. Os métodos parasitológicos incluem:

identificação microscópica direta e isolamento do parasita em meio de cultura a partir de diferentes espécimes clínicos. Em áreas endêmicas de LVA, os testes sorológicos são usados como ferramenta nos inquéritos epidemiológicos para diagnóstico e posterior recolhimento dos cães considerados positivos (Ministério da Saúde, 2006).

Os espécimes clínicos coletados para o diagnóstico parasitológico podem ser obtidos a partir de aspirado de medula óssea, baço, fígado, linfonodos e em alguns casos de biópsias de pele íntegra, lesão cutânea ou vísceras. No exame parasitológico direto é realizada a pesquisa de formas amastigotas em lâminas de impressão por aposição do material coletado corado pela técnica de Giemsa ou Leishman. O exame parasitológico indireto visa o isolamento do agente infeccioso em meios de cultivo apropriados, sendo comumente utilizado o meio NNN acrescido do meio Schneider, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Ministério da Saúde, 2006).

Na LVC, a distribuição do parasito pode ser extensiva, alcançando órgãos como baço, fígado, linfonodos, pele, medula óssea etc. (Alvar et al., 2004), oposto do que ocorre no ser humano onde o parasita é normalmente limitado à medula óssea, baço e fígado (Swenson et al., 1988). A presença do parasita em diferentes tecidos e órgãos podem ocasionar a ativação policlonal de linfócitos B, produzindo elevados níveis séricos de imunoglobulinas, que, se por um lado não possui significado de proteção, por outro, facilita o diagnóstico laboratorial por meio de testes sorológicos (Gontijo & Melo, 2004). A imunofluorescência indireta (IFI), um dos métodos mais empregados na rotina do diagnóstico do calazar canino. A IFI apresenta uma elevada especificidade e relativa sensibilidade, no entanto, algumas desvantagens, tais como, não automatização e avaliação subjetiva, têm sido apontadas como fatores limitadores para utilização em larga escala. Por outro lado, os ensaios imunoenzimáticos tais como *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), que são automatizados, possuem vantagens nesse aspecto. (Ribeiro et al, 2011)

Nos últimos anos importantes avanços têm acontecido na elaboração de exames sorológicos para o diagnóstico das leishmanioses, incluindo o teste imunocromatográfico rápido (DPP), os testes de aglutinação direta (TAD) e *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) construídos a partir de antígenos puros ou recombinantes (Grimaldi Jr et al., 2012; El Harith et al., 1996; Ministério da Saúde, 2006).

O teste imunocromatográfico rápido (DPP) é considerado uma alternativa para o sorodiagnóstico da LVC por apresentar uma alta especificidade (Silva et al., 2012).

De acordo com o manual de controle da LVA (Ministério da Saúde, 2006), devem ser realizados inquéritos sorológicos (amostrais ou censitários) na população canina para avaliação da soroprevalência, empregando para isto a técnica de ELISA para triagem e a imunofluorescência indireta (IFI) para confirmação dos casos. Embora seja recomendada a utilização de soro sanguíneo para ambas as técnicas, por questões operacionais, em várias regiões do país, ainda emprega-se o eluato (sangue dessecado em papel de filtro).

De um modo geral, os testes sorológicos são considerados muito sensíveis e específicos, entretanto, possuem limitações para detecção de baixos níveis de anticorpos e apresentam reatividade cruzada com a leishmaniose tegumentar canina (LTC), observada em áreas endêmicas de sobreposição (Ferrer et al., 1995). A sensibilidade e a especificidade dos testes sorológicos estão condicionadas a inúmeros aspectos e podem variar consideravelmente, acreditando-se que dessa forma, subestimem a verdadeira prevalência da doença (Massunari et al., 2009).

No Estado do Rio de Janeiro, desde dezembro de 2011, após notificação de aumento da ocorrência de casos autóctones de LV humana e canina, o teste DPP tem sido utilizado para a triagem e o ELISA para a confirmação do diagnóstico da infecção (SESRJ, 2012).

Com o crescimento geográfico e a urbanização da LVA é necessário estabelecer medidas de controle mais efetivas. Acredita-se que esta expansão para diversas regiões do Brasil pode ser atribuída a diversos fatores tais como: dificuldades na eliminação do reservatório,

diversidade epidemiológica das regiões afetadas, capacidade adaptativa do vetor, medidas insuficientes no controle do vetor pelo alto custo financeiro e social, além de outros fatores desconhecidos (Oliveira et al., 2008).

Devido à complexidade do cenário epidemiológico da LVA, as ações de controle devem ser adequadas ao contexto epidemiológico da área em questão para que possam ser efetivas. Na LVA, o cão doméstico é a principal fonte de infecção para os insetos vetores, fato que tem direcionado grandes esforços na identificação e eliminação de animais considerados positivos, visando à interrupção do ciclo de transmissão (Ministério da Saúde, 2006).

1.4. Leishmaniose na Ilha da Marambaia

A Ilha da Marambaia é considerada reserva biológica e apresenta relevo e vegetação bastante variados. Áreas de praias, matas de encosta, restinga e mangues podem ser encontrados ao longo da ilha. Conecta-se com o continente através de uma faixa estreita de areia com cerca de 40 km de extensão, a leste, com a região de Guaratiba (Conde et al., 2005). É uma localidade que recebe constantemente militares de diversas regiões endêmicas de leishmanioses. Além disso, também conta com uma pequena comunidade descendente de quilombolas. Há histórico de caso autóctone de LVC com caracterização de *L. chagasi* (Comunicação Pessoal, Maria de Fátima Madeira).

Recente estudo nessa região aponta para uma variada fauna de flebotomíneos, incluindo espécies importantes na transmissão da LTA e LVA. Segundo Novo et al (2012) durante o ano de 2009 foi possível identificar treze espécies diferentes desses dípteros, quatro delas com importância epidemiológica na transmissão das Leishmanioses: *L. longipalpis*, *L. migonei*, *L. intermedia* e *L. fischeri*. Com um total de 32.006 espécimes coletados, *L. intermedia* foi a espécie mais abundante,

seguida de *L. migonei*, enquanto que *L. longipalpis* apresentou densidade relativamente baixa em comparação com *L. intermedia*.

2. Justificativa

A LVA encontra-se em processo de expansão em várias regiões brasileiras, sendo registrados casos humanos e caninos, tanto em áreas rurais, como em áreas urbanizadas (Bevilacqua et al., 2001; Gontijo ; Melo, 2004; Ministério da Saúde, 2006).

No Estado do Rio de Janeiro, embora os casos humanos de LVA não sejam descritos com frequência, casos caninos são diagnosticados frequentemente, sendo observado nos últimos anos um aumento nos índices de soroprevalência canina nas regiões endêmicas, além da descrição novos casos em outras cidades do Estado onde não existiam casos autóctones (de Paula et al., 2009). Recentemente, foram identificados nos municípios de Barra Mansa e Volta Redonda, casos humanos de LVA, com a ocorrência de óbito pela doença em Barra Mansa, segundo nota técnica emitida pelo Governo do Estado do Rio de Janeiro, em maio de 2012 (SES RJ, 2012).

O presente estudo pretende realizar um segundo inquérito canino na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro, no qual foram identificados 20 casos autóctones de LVC no ano de 2009. A notificação desses casos nesta região, onde anteriormente não havia registro de LVC, expõe à fragilidade do controle da doença e o risco de sua expansão no Estado do Rio de Janeiro, o que pode se agravar devido ao fato de pouco se conhece sobre a dinâmica de transmissão nessa área.

Um importante passo para a vigilância da LVA no Rio de Janeiro, além de estudos relacionados à fauna flebotomínica local, será o monitoramento da LVC dessa região, para que o diagnóstico precoce possa ser instituído e as medidas preventivas tomadas em tempo hábil.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a situação da leishmaniose visceral em cães e a fauna flebotomínica na Ilha da Marambaia, no município de Mangaratiba, Rio de Janeiro através de inquérito realizado no período de fevereiro a novembro de 2012.

3.2. Objetivos Específicos

- a. Avaliação da soroprevalência da LVC em cães submetidos ao inquérito sorológico de 2009, negativos e positivos ainda não retirados, que permaneceram na área de estudo;
- b. Avaliação da soroprevalência da LVC em cães nascidos ou inseridos após 2009 na Ilha da Marambaia;
- c. Avaliação a fauna flebotomínica na área de estudo, comparando esses achados com os resultados da captura realizada em 2009;

4. Metodologia

4.1. Desenhos do estudo e população alvo

Trata-se de um estudo seccional, onde foi realizado o censo canino, com uma amostra 116 animais, que consistiu na investigação diagnóstica de cães domiciliados na região da Ilha da Marambaia, localizada no município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro. Também foi realizada a captura de flebotomíneos para avaliação das espécies presentes nessa região.

4.1.1. Critérios de inclusão

- Cães de proprietários que residirem na região do estudo há mais de seis meses;
- Cães com idade igual ou superior a oito meses;
- Cães que apresentarem condições clínicas de serem submetidos à coleta de sangue.

4.1.2. Critérios de exclusão

- Cães agressivos que representem perigo para a equipe de campo;

4. 2. Área de estudo

A Ilha da Marambaia (figura 1) está situada no litoral da Costa Verde, ao Sul do Estado do Rio de Janeiro ($23^{\circ}04'S$ e $43^{\circ}53' W$), no município de Mangaratiba, na entrada da Baía de Sepetiba, defrontando-se com a Ilha Grande, é administrada pelas Forças Armadas Brasileiras onde são realizados treinamentos militares e testes de armamentos. A ilha possui 79 km², e liga-se ao continente por uma faixa de areia de cerca de 40 km de extensão, a Restinga da Marambaia não é, de fato, uma ilha cercada de água por todos os lados, mas recebe esta denominação, tendo em vista o porte das elevações que se erguem no extremo Oeste, ao final da longa restinga. O seu ponto culminante é o Pico da Marambaia com 647 metros de altura. A ilha possui um clima tropical úmido, sua vegetação reúne uma das últimas reservas de Mata Atlântica do sudeste brasileiro, grandes áreas de restingas (incluindo praias e dunas) e manguezais, com ecossistemas associados (Conde et al., 2005; Mattos, 2005).

Esta localidade também é ocupada por uma comunidade quilombola (remanescente dos quilombos - descendentes de escravos). Segundo dados fornecidos pela Marinha do Brasil, que realiza censo populacional anualmente existem 103 famílias, um total de 352 habitantes distribuídas em 1,6 hectares da região. Anualmente esta área recebe centenas de militares oriundos de diferentes regiões endêmicas de LVA no Brasil para a realização de treinamentos.

A população da Ilha está distribuída em dez pontos. Nas praias da Pescaria Velha, Praia da Caetana, Praia do Cutuca, Praia do José, Praia Grande, Praia Suja, Praia do João Manoel, Praia do Caju, Praia do Sítio. E em uma área de mata, conhecida como Buraco Quente.

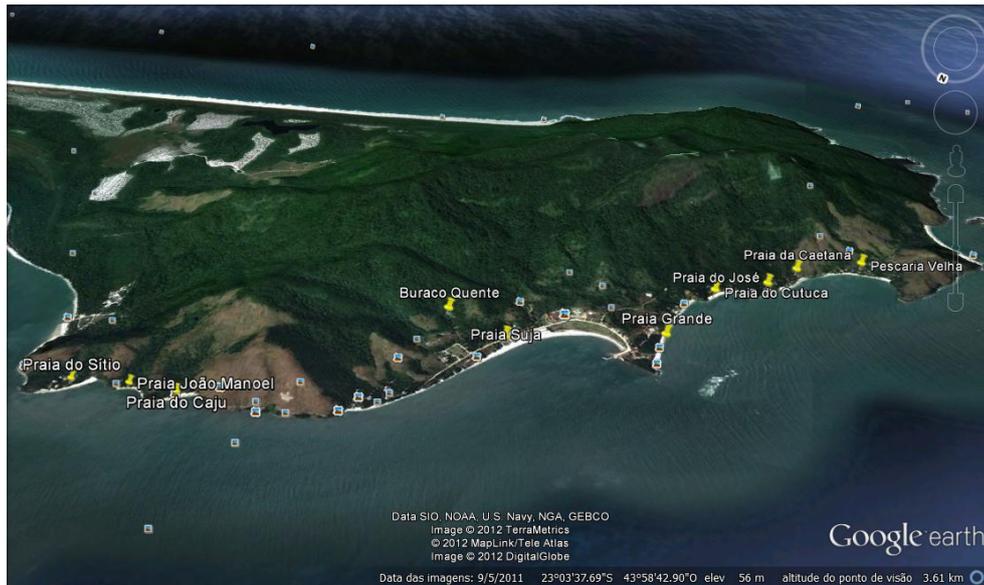


Figura 1. Mapa da Ilha da Marambaia, em destaque os pontos onde foram realizadas as coletas.

4.3. Materiais, Procedimentos e Técnicas

4.3.1. Manejo dos animais

4.3.1.1. Avaliação clínica

Os cães foram amordaçados, contidos fisicamente e examinados detalhadamente, de forma a serem agrupados clinicamente segundo Paltrinieri et al (2010) como:

1. Cães expostos: cães clinicamente saudáveis, mas que vivem ou viveram em região que possua o vetor da *Leishmania*;
2. Cães infectados: cães clinicamente saudáveis, ou com sinais clínicos associados a outras doenças, mas que vivem ou viveram em região endêmica;
3. Cães doentes: cães com evidências clínicas de leishmaniose, um ou mais sinais clínicos;
4. Cães gravemente doentes: cães com sinais clínicos severos de leishmaniose, com caquexia, paresia de posteriores.

E as informações foram anotadas em uma ficha contendo identificação e sinais clínicos (Anexo I) apresentados no momento da visita às residências.

4.3.1.2. Coleta de sangue

Para a realização dos testes sorológicos, foram coletados cerca de 5 mL de sangue, e colocados em tubo sem anticoagulante, por punção da veia cefálica ou veia jugular externa. As amostras sanguíneas foram transportadas até o laboratório (LAPCLIN- DERMZOO), acondicionadas em caixa térmica contendo placas de gelo em gel mantendo os soros refrigerados. O soro foi separado por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, e através de uma pipeta estéril descartável o soro separado foi transferido para microtubos tipo *ependorf* e conservado a - 20°C até o momento da realização dos testes sorológicos.

4.3.2. Provas sorológicas

Foram empregados os testes de IFI, ELISA e o DPP utilizando os “kits” comerciais produzidos por Bio-Manguinhos[®] (FIOCRUZ; Rio de Janeiro) e distribuídos à rede pública.

4.3.2.1. Imunofluorescência indireta (IFI)

Para a IFI, o antígeno utilizado foi obtido a partir de promastigotas de *Leishmania major*-like na fase logarítmica fixadas em formalina a 2%. As lâminas de imunofluorescência foram impregnadas com 10 µL de antígeno contendo $2,0 \times 10^6$ promastigotas/mL na área demarcada do teste. Após, foram submetidas secagem em estufa a 37°C

por duas horas. Os soros a serem analisados, foram diluídos em diferentes concentrações de 1:40 até a diluição 1:640, e adicionados em um volume de 10 µL/área, seguido de incubação por 40 minutos à 37°C em câmara úmida. Foram realizadas três lavagens de 5 minutos com PBS (0,018M-pH 7,2). O conjugado, foi diluído em uma solução de PBS-Azul de Evans a 0,004% num volume final de 10 µL, seguido de incubação. A leitura foi realizada por microscopia de fluorescência no aumento de 40X. (Camargo, 1969)

4.3.2.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Para o ELISA, foram utilizadas placas de poliestireno de alta absorção cobertas com 100 µL/poço de extrato bruto de *L. (L.) chagasi*, que são antígenos espécie-específicos o que aumenta a especificidade do teste, em tampão carbonato bicarbonato (20% de Na₂CO₃ 0,06M e 80% de NaHCO₃ 0,06M pH 9,6). Estas placas foram incubadas por 16 horas em câmara úmida em uma temperatura de 4 a 8°C. Após este período as placas foram lavadas por duas vezes com solução de lavagem (PBS 0,05% de Tween 20). Após a secagem das placas foi adicionado, em duplicata, um volume de 100 µL/poço de amostras de soro canino, diluídas na proporção de 1: 100 em solução de diluição *Phosphate Buffered Saline Tween* (PBST) com leite Mólico em placas de diluição. As amostras diluídas foram colocadas nas microplacas sensibilizadas, em duplicatas, e levadas à estufa à 37°C por 40 minutos. Após este período, as placas foram retiradas da estufa e lavadas por três vezes com PBST. Após três lavagens, o conjugado foi adicionado em volume de 100 µL/poço diluído em solução de diluição, seguido de incubação por 40 minutos a 37°C em câmara úmida. Após quatro lavagens, a revelação foi realizada, protegida da luz, com solução reveladora (TMB). Após 30 minutos, a reação foi paralisada com ácido sulfúrico 1M em volume de 50µL/poço. A análise foi realizada por espectrofotometria com filtro de referência de 450nm e diferencial de

620nm (Voller, 1976; Hommel et al , 1978; Coutinho et al, 1985). A positividade foi determinada pela padronização do teste. A linha de corte entre amostras consideradas positivas (reagentes) e negativas (não reagentes) foi calculada tendo-se como base a média de leitura dos soros negativos mais dois desvio padrão.

4.3.2.3. Teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma (Dual Path Platform - DPP)

Os soros obtidos, foram avaliados pelo teste imunocromatográfico rápido (DPP). Este teste possui tecnologia já utilizada em testes de diagnóstico rápido para outras doenças, sendo produzido por Biomanguinhos/Fiocruz. O “kit” contém um dispositivo impregnado com antígeno recombinante rK28 (Pattabhi et al., 2010) (quimera combinando K9, K26 e K39) de *L.(L.)chagasi* (= *Leishmania infantum*), o qual pode utilizar amostras de sangue e de soro, fornecendo uma avaliação qualitativa do diagnóstico. Neste estudo foram utilizadas amostras de soro, e segundo as recomendações contidas no “kit”, brevemente descritas a seguir.

Com um dispositivo fornecido pelo “kit”, coletar uma gota do soro (cerca 5µL) previamente descongelado e aplicar no poço de nº 1 do suporte do teste, adicionando em seguida 2 gotas de tampão. Após 5 minutos, aplicar 4 gotas do mesmo tampão no poço de nº 2 e aguardar vinte minutos. O teste será considerado positivo quando duas bandas, uma referente ao controle do teste e outra referente à amostra testada, aparecer dentro de 15 minutos. O teste será considerado negativo, quando apenas a banda referente ao controle aparecer. Caso nenhuma banda seja visualizada, o teste será considerado inválido e deverá ser repetido, utilizando outro “kit”.

4.4. Avaliação da fauna flebotomínica

4.4.1 Captura

Foram utilizadas armadilhas luminosas de sucção (modelo HP) para a captura dos flebótomos, estas foram introduzidas em ambiente domiciliar, peridomiciliar, como galinheiros e canis, e ambiente silvestre (Pugedo H. et al, 2005; Aguiar et al., 1996). As armadilhas foram postas às 18h e retiradas às 7h da manhã seguinte, um total de 13h de coletas por armadilha. Os espécimes coletados foram acondicionadas em microtubulos tipo *eppendorf* contendo álcool 70% devidamente identificados, indicando a data, a localidade e o tipo de armadilha utilizada, foram encaminhados ao Laboratório de Vetores Miguel Alves de Souza – ENSP/FIOCRUZ, para clarificação, montagens e identificação das espécies.

4.4.2 Fixação e caracterização dos flebótomos

Os espécimes de flebótomos capturados foram separados manualmente com o auxílio de uma lupa. Após, foram colocados em pequenas placas de Petri com solução de hidróxido de potassa (KOH a 10%) para o início do processo de clarificação, onde permaneceram por 2-3 horas, para o amolecimento da quitina. Após esse período, foram transferidos para outras placas de Petri com ácido acético, por um período de 15-20 minutos para retirar o excesso de hidróxido de potassa. Em seguida, os espécimes foram imersos em água destilada por 20 minutos, para a lavagem. Após a lavagem, os flebótomos permaneceram em lactofenol por 24 horas, para diafanizar, e completada a etapa de clarificação os espécimes foram montados entre lâmina e lamínula, em líquido de Berlese, e assim, identificados de acordo com a nomenclatura proposta por Galati (2003).

4.5. Procedimento Ético

O projeto contemplando os procedimentos realizados nos animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ), sob o protocolo LW- 82/2010-1

4.6. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada de forma descritiva avaliando a frequência dos achados.

5. Resultados

Os resultados dessa dissertação serão apresentados no formato de artigo científico submetido para publicação na Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

5.1 Artigo

Monitoramento sorológico de novos casos de leishmaniose visceral canina e avaliação da fauna flebotomínica na Ilha da Marambaia, Município de Mangaratiba, RJ

Livia Aparecida Lopes do Carmo ^{a*}, Marcos Barbosa de Souza ^b, Valmir Laurentino da Silva ^c, Fernanda Nunes Santos ^c, Adilson Benedito de Almeida ^b, Carlos Jose de Lima Barbosa Filho ^d, César dos Santos Pontes ^b, Fabiano Borges Figueiredo ^d,

^a Pós-graduação Stricto-sensu (Mestrado), Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil

^b Laboratório de Vetores Miguel Alves de Souza, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil

^c Laboratório de Imunodiagnóstico, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil

^d Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, (IPEC-FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil

Resumo:

No Brasil a leishmaniose visceral americana (LVA) é causada pela *Leishmania chagasi* e o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, o principal vetor. O reservatório doméstico é o cão (*Canis familiaris*). O presente estudo teve como objetivo reavaliar a prevalência da LVC em 2012 e identificar a fauna flebotomínica, na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Foi realizado inquérito sorológico canino, através das técnicas IFI, ELISA e DPP, e a captura dos flebotomíneos foi realizada com o auxílio de armadilhas luminosas, tipo HP. O censo totalizou 116 cães, sendo identificados 17 cães positivos, uma prevalência de 14,6%. Foram capturados 2.524 espécimes, no período de abril a novembro de 2012, sendo encontradas nove espécies de flebotomos. Foi observada a manutenção da prevalência da LVC na região comparando com dados anteriores.

Palavras chaves: monitoramento, leishmaniose visceral canina, *Lutzomyia longipalpis*, sorologia, *Leishmania*

1 **Abstract:**

2 In Brazil the American visceral leishmaniasis (AVL) is caused by
3 *Leishmania chagasi* and the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, the main
4 vector. The reservoir is the domestic dog (*Canis familiaris*). The present
5 study aimed to reassess the prevalence of LVC in 2012 and identify
6 fauna of phlebotomine sandflies in Marambaia Island, the city of
7 Mangaratiba, Rio de Janeiro State, Brazil. Serological survey was
8 conducted canine, through techniques IFI, ELISA and DPP, and the
9 capture of sandflies was carried out with the aid of HP light traps. The
10 census totaled 116 dogs, 17 dogs being identified positive, a prevalence
11 of 14.6%. 2.524 specimens were captured in the period April-November
12 2012, which found nine species of sandflies. Were observed to maintain
13 the prevalence of CVL in the area comparing with previous data.

14 **Introdução**

15 A leishmaniose visceral é uma doença disseminada pelo Mundo
16 com cerca de 350 milhões de pessoas infectadas. No Brasil é uma
17 zoonose de grande importância em saúde pública. Segundo dados do
18 Ministério da Saúde, entre 2007 e 2012 foram registrados 20.353 casos
19 de leishmaniose visceral americana (LVA), com 1.210 óbitos causados
20 pela doença (SINAN, 2013)

21 O agente etiológico da LVA no Brasil é a *Leishmania*
22 (*Leishmania*) *chagasi* (= *Leishmania infantum*), um protozoário
23 transmitido principalmente pelo vetor *Lutzomyia longipalpis*, um díptero
24 da subfamília Phlebotominae, no momento do repasto sanguíneo em
25 animais vertebrados (Miles et al., 1999).

26 Os marsupiais do gênero *Didelphis* e as raposas dos gêneros
27 *Lycalopex* e *Cerdocyon*, são os reservatórios da *L. (L.) chagasi* no
28 ambiente silvestre e rural. Em áreas urbanas, no peridomicílio e
29 domicílio, o principal hospedeiro é o cão doméstico (*Canis familiaris*)
30 contribuindo assim para a manutenção do ciclo da doença.
31 (Marzochi, 1994; Franca-Silva et al., 2005).

1 A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença que
2 apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas variando do cão
3 aparentemente saudável ao cão severamente doente. Esta variação está
4 condicionada à imunocompetência individual do animal e a cepa do
5 parasito inoculada (Michalick & Genaro, 2005).

6 Segundo o manual de controle de LVA (Ministério da Saúde,
7 2006), uma das medidas de controle da doença é a vigilância
8 epidemiológica com a realização inquéritos sorológicos na população
9 canina, retirada dos cães sororretores e o levantamento entomológico.

10 No Estado do Rio de Janeiro a LVA é classificada
11 epidemiologicamente como de baixa incidência, entretanto nos últimos
12 anos as áreas endêmicas tem se expandido de forma acentuada. Em 2009
13 foi relatado um caso autóctone de LVC em Maricá (de Paula C. C. et al ,
14 2009) e em 2010, no bairro de Laranjeiras, no município do Rio de
15 Janeiro (Figueiredo F. B. et al, 2010). Na Ilha da Marambaia localizada
16 no município de Mangaratiba-RJ, onde anteriormente não havia registro
17 de casos, foram diagnosticados 20 casos de leishmaniose visceral canina
18 em 2009, as amostras isoladas nesses animais foram caracterizadas como
19 *L. (L.) chagasi*. Mesmo sem a notificação de casos humanos nessa área
20 torna-se importante uma nova avaliação, para que possa ser confirmada a
21 circulação da doença, além de reavaliar a prevalência canina e
22 continuidade da presença do vetor. Por esse, motivo o presente estudo
23 teve como objetivo avaliar a soroprevalência dos cães e a presença de
24 flebotomíneos na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, estado
25 do Rio de Janeiro.

26 **Material e Métodos**

27 **Área de estudo.** A Ilha da Marambaia está situada no município
28 de Mangaratiba ao Sul do Estado do Rio de Janeiro, é administrada pelas
29 Forças Armadas Brasileiras, recebendo militares de diversas regiões
30 brasileiras e é habitada por 103 famílias, 352 habitantes, distribuídas em
31 uma área de 1,6 hectares. A ilha possui um clima tropical úmido, sua
32 vegetação reúne uma das últimas reservas de Mata Atlântica do sudeste

1 brasileiro, grandes áreas de restingas (incluindo praias e dunas) e
2 manguezais, com ecossistemas associados (Conde et al 2005; Mattos,
3 2005).

4 A população da Ilha está distribuída em nove praias são elas:
5 Pescaria Velha, Caetana, Cutuca, do José, Grande, Suja, João Manoel,
6 Caju e Sítio. E em uma área de mata conhecida como Buraco Quente.

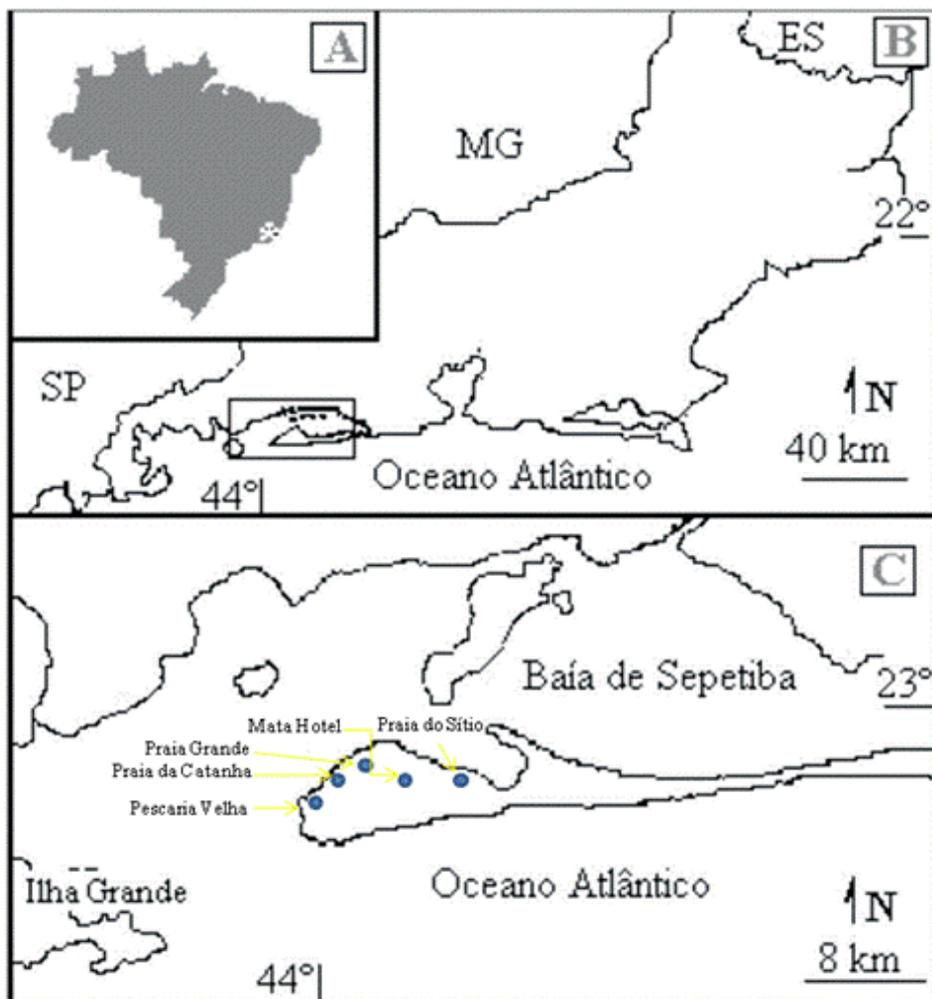


Figura 1: Mapa do Estado do Rio de Janeiro, em destaque a Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba

7

8

9

1 **População alvo.** No ano de 2012 foi realizado um censo canino
2 na área de estudo, totalizando 116 animais (incluindo os cães errantes),
3 distribuídos nos dez pontos da ilha. Os animais foram submetidos a um
4 exame físico detalhado e em seguida, submetidos à coleta de amostras
5 sanguíneas, por punção das veias cefálicas ou jugular externa, para a
6 realização dos testes sorológicos. Após a coleta das amostras foi
7 realizada a identificação eletrônica dos cães através da colocação de
8 microchip Animall TAG, inoculado na região da cernelha, evitando
9 assim viés de informação, devido ao grande deslocamento dos cães desta
10 região.

11 Foram coletados cerca de 5ml de sangue de cada cão, que foi
12 centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos para a separação do soro, e
13 através de uma pipeta estéril descartável o soro separado foi transferido
14 para microtubos tipo *ependorf* e conservado a - 20°C até o momento da
15 realização dos testes sorológicos.

16 **Provas sorológicas.** Para o levantamento sorológico foram
17 realizados o teste o imunocromatográfico rápido (DPP), técnica de
18 imunofluorescência indireta (IFI), e o ensaio imunoenzimático (ELISA).

19 Para a avaliação qualitativa do diagnóstico foi realizado o DPP,
20 utilizando o “kit” que possui um dispositivo impregnado com o antígeno
21 rK28 de *L. (L.) chagasi*, os testes foram realizados no Laboratório de
22 Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos –
23 IPEC/FIOCRUZ, de acordo com as normas do fabricante (Pattabhi et al.,
24 2010).

25 Para o ELISA utilizou-se uma placa de microtitulação
26 sensibilizada com antígenos solúveis de *L. (L.) chagasi*. As amostras
27 foram diluídas 1:100, em duplicatas, cuja positividade foi determinada
28 pela padronização do teste. (Voller, 1976; Hommel et al , 1978; Coutinho
29 et al, 1985).

30 Para o IFI foram utilizadas lâminas de imunofluorescência
31 impregnadas contendo formas promastigotas de *Leishmania major*-like

1 como antígeno para a pesquisa de anticorpos específicos anti-
2 *Leishmania* IgG. As amostras foram diluídas a partir de 1:40 em
3 microplacas e avaliadas até a diluição que não apresentasse reatividade
4 (Camargo, 1969).

5 No presente estudo, para a confirmação do diagnóstico foi
6 utilizada a técnica de imunofluorescência (IFI), seguindo o manual do
7 Ministério da Saúde (Brasil, 2006). Este critério foi adotado, para que
8 fosse possível a comparação com inquérito sorológico anterior.

9 **Avaliação da fauna flebotômica.** Foram colocadas armadilhas
10 luminosas de sucção, tipo HP, em ambiente domiciliar, peridomiciliar,
11 como canis e galinheiros, e ambiente silvestre. As armadilhas foram
12 postas às 18h e retiradas às 7h da manhã seguinte (Pugedo H. et al,
13 2005). Foram realizadas coletas mensais, três dias consecutivos no
14 período de abril a novembro de 2012.

15 As coletas foram realizadas em onze pontos: nas praias Pescaria
16 Velha, Caetana, Suja, do José, Grande, Cutuca, Sítio, Caju e nas
17 localidades Buraco Quente, Vacaria e no Hotel dos Sargentos.

18 Os espécimes coletados foram acondicionados em microtubos
19 tipo *eppendorf* contendo álcool 70% devidamente identificados, e
20 encaminhados ao Laboratório de Vetores Miguel Alves de Souza –
21 ENSP/FIOCRUZ, para clarificação, montagens e identificação das
22 espécies de acordo com a nomenclatura proposta por Galati (2003).

23 A análise estatística foi realizada de forma descritiva avaliando a
24 frequência dos achados.

25

26

27

28

29

1 **Resultados**

2 **Sorologia.** Foram analisados 116 soros caninos, sendo 13 (11,2
3 %) amostras positivas no DPP, 45 (38,79%) no ELISA e 17 (14,65%) na
4 IFI.

5 Destes, 12 (10,34%) apresentaram concordância em todos os
6 testes sorológicos realizados. Dos animais inseridos após o ano de 2009,
7 apenas dois cães apresentaram soropositividade, ocorreu a soroconversão
8 em sete cães participantes do inquérito realizado em 2009. E três cães
9 soropositivos no ano de 2009, que não foram retirados.

10 Os cães soropositivos estão distribuídos nas praias: Suja, Caetana,
11 Grande, Pescaria Velha, José e Caju (Quadro 1).

PONTOS DE COLETA	DISTRIBUIÇÃO DE SOROPOSITIVOS
Praia Suja	5
Praia da Caetana	4
Praia da Pescaria Velha	3
Praia Grande	3
Praia do Caju	1
Praia do José	1
Praia do Cutuca	0
Praia do Sítio	0
Buraco Quente	0
TOTAL	17

12 Quadro 1: Distribuição dos cães soropositivos por ponto de coleta.

13 **Fauna flebotomínica.** Foram encontradas nove espécies de
14 flebotomíneos na região o *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia intermedia*,
15 *Migoneimyia migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Evandromyia edwardsi*,
16 *Micropygomyia capixaba*, *Pintomyia bianchigalatiae*, *Micropygomyia*
17 *schreiberi* e *Bruptomyia* sp. (Quadro 2).

18

ESPÉCIE	MACHO	FEMEA	TOTAL
<i>L. intermedia</i>	1029	1016	2045
<i>L. migonei</i>	263	141	404
<i>L. longipalpis</i>	34	6	40
<i>L. fischeri</i>	4	16	20
<i>L. schreiberi</i>	4	6	10
<i>L. capixaba</i>	0	2	2
<i>L. bianchigalatae</i>	0	1	1
<i>L. edwardsi</i>	1	1	2
TOTAL	1335	1189	2524

1 Quadro 2: Fauna flebotomínica da Ilha da Marambaia de abril a
2 novembro de 2012.

3 O *L. longipalpis* foi encontrado em apenas três praias a
4 Pescaria Velha, a do Cutuca e a da Caetana. O *N. intermedia* apresentou
5 ampla distribuição sendo encontrado principalmente nas praias Suja e
6 Pescaria Velha, e na Vacaria. A espécie *M. migonei* foi capturada em três
7 praias a do José, Pescaria Velha e Suja e na região da Vacaria.

Pontos de coleta	Distribuição das espécies		
	<i>L. longipalpis</i>	<i>N. intermedia</i>	<i>M. migonei</i>
Praia Suja	Ausente	Presente	Presente
Praia da Caetana	Presente	Presente	Presente
Praia da Pescaria Velha	Presente	Presente	Presente
Praia Grande	Ausente	Presente	Presente
Praia do Caju	Ausente	Presente	Ausente
Praia do José	Ausente	Presente	Presente
Praia do Cutuca	Presente	Presente	Presente
Praia do Sítio	Ausente	Presente	Presente
Buraco Quente	Ausente	Ausente	Ausente
Vacaria	Ausente	Presente	Presente

1 **Discussão**

2 A leishmaniose visceral canina é um grave problema de saúde
3 pública, em processo de expansão no território brasileiro, principalmente
4 no meio urbano de cidades, antes consideradas indenes.

5 A confirmação de 17 (14,65%) cães soropositivos para LVC na
6 Ilha da Marambaia no ano 2012, onde em 2009 foram notificados 20
7 casos caninos, revela a manutenção da prevalência da doença que
8 anteriormente era de 15%, mesmo com a remoção de grande parte dos
9 cães sororretores diagnosticados naquela ocasião. Esse achado
10 corrobora com o estudo de Costa (2011) que realizou uma revisão
11 sistemática sobre a ineficácia da remoção de cães no controle da LVA.
12 Courtenay et al (2002) relataram que a retirada de cães soropositivos, não
13 é suficientemente eficaz para o controle da LVC, devido a demora no
14 recolhimento dos animais sororreagentes que permanecem como uma
15 fonte de infecção na região.

16 Os cães em sua maioria circulam livremente pela ilha durante o
17 dia e no crepuscular voltam para a casa de seus proprietários, horário em
18 que o risco de contato com o vetor da LVA é elevado.

19 A Ilha da Marambaia teve a descrição dos primeiros casos de
20 LVC no ano de 2009. Esta área é composta por uma reserva de Mata
21 Atlântica, sua população está distribuída em residências instaladas
22 próximas ao ambiente silvestre ou até mesmo dentro da mata. As
23 modificações realizadas pelos moradores no ambiente natural, o
24 saneamento precário, a falta de rede de esgoto e coleta de lixo regular,
25 assim como a presença de galinheiro nos quintais, ocasiona o acúmulo de
26 matéria orgânica ao redor das habitações promovendo a constituição de
27 um ambiente favorável para a criação de flebotomíneos. Cerbino et al
28 (2009), em estudo realizado em Teresina, Piauí entre o período de 1991
29 até 2000 verificaram que a vegetação vasta e o incremento populacional
30 está relacionada com o aumento do índice da doença. Monteiro et al
31 (2005) descreveram que no município de Montes Claros, as condições de
32 habitações precárias, o nível sócio-econômico baixo e a falta de

1 saneamento básico, juntamente com o convívio muito próximo com os
2 animais domésticos, eleva o risco de transmissão da LVA.

3 A não redução da prevalência de LVC na área de estudo, mesmo
4 após a retirada de cães soropositivos, pode estar relacionada a utilização
5 dessa medida de forma isolada, sem as campanhas educacionais ou
6 controle das populações de flebotomos. Outro ponto importante que pode
7 estar corroborando para ineficiência do controle é o ambiente da região,
8 no qual as casas estão inseridas na mata, onde a presença do vetor e de
9 reservatórios silvestres é abundante.

10 A fauna flebotomínica da Ilha da Marambaia foi estudada no ano
11 de 2009, por Novo et al. (2013) que descreveram um total de treze
12 espécies coletadas em três diferentes ecótopos: intradomicílio,
13 peridomicílio e mata, sendo a *N. intermedia* encontrada em maior
14 densidade e distribuída por toda a região. A presença de *L. longipalpis*
15 foi constatada, mas em baixa densidade.

16 Em nosso estudo, a espécie de flebotomo com maior densidade
17 continuou sendo a *N. intermédia*, seguida por *M. migonei*, *L. longipalpis*
18 e *P. fischeri*. Tais espécies são de grande importância vetorial para as
19 leishmanioses. O *L. longipalpis* foi encontrado em densidade reduzida,
20 em apenas três praias a Pescaria Velha, Praia do Cutuca e na Praia da
21 Caetana. Brandão-Filho et al (2002) realizaram estudo na Zona da Mata
22 de Pernambuco, e descreveram a presença de casos de LVA, sem o
23 registro de *L. longipalpis* na região, sugerindo o envolvimento de outra
24 espécie vetor da doença, como a *M. migonei*.

25 A baixa de densidade ou mesmo a ausência de *L. longipalpis*
26 talvez possa explicar a ausência de casos humanos na área estudada.
27 Segundo de Souza et al (2003), na zona oeste do município do Rio de
28 Janeiro a LVC é encontrada por anos sem o registro de casos humanos, o
29 que também pode estar relacionado a participação de outro flebotomo no
30 ciclo de transmissão com hábitos alimentares direcionados para os cães e
31 outros animais domésticos.

1 Neste estudo foi possível observar a manutenção da prevalência
2 da LVC na Ilha da Marambaia e que a fauna flebotômica manteve-se
3 nos mesmos padrões contribuindo assim para maior conhecimento sobre
4 a dinâmica da doença na região.

5

6 **Referências**

7 Braga MD, Coelho IC, Pompeu MM, Evans TG, MacAullife IT, Teixeira
8 MJ, et al. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results
9 from a rapid elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution
10 indirect immunofluorescence. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998; 31(5):419-
11 24.

12 Brandão-Filho SP, Silva OA, Almeida EL, Valença HF, Almeida FA.
13 Incidência da leishmaniose visceral sem a presença de *Lutzomyia*
14 *longipalpis*, na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. *Rev Soc Bras Med*
15 *Trop.*2002; 35(Supl 1):333

16 Camargo, M.E., Rebonato, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for
17 *Trypanosoma* and leishmania antibodies. A simple inhibition procedure to
18 ensure specific results. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1969; 18: 500-505.

19 Cerbino Neto, J.; Werneck, G. L.; Costa, C. H. N.. Factors associated
20 with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in
21 Teresina, Piauí State, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 25,
22 n. 7, July 2009.

23 Conde MMS, Lima HRP, Peixoto AL. Aspectos florísticos e
24 vegetacionais da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil. In: *História Natural*
25 *da Marambaia*. Seropédica: Editora da Universidade Federal Rural do
26 Rio de Janeiro; 2005. p. 133-168.

27

28 Costa C. H. N.. How effective is dog culling in controlling zoonotic
29 visceral leishmaniasis? a critical evaluation of the science, politics and

- 1 ethics behind this public health policy. *Rev. Soc. Bras. Med.*
2 *Trop.* [online]. 2011, vol.44, n.2
3
- 4 Courtenay O, Quinnell, RJ, Garcez, LM, Shaw, JJ, Dye, C..
5 Infectiousness in
6 a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis.* 2002 Nov 1; 186 (9):1314-
7 20
8
9
- 10 Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano NA. Survey for
11 American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from
12 areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur.
13 *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1985; 80: 17-22.
14
- 15 França Silva, JC et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the
16 dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic
17 area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. **Vet Parasitol**, v.
18 131, n. 3-4, p. 213-20, Aug 10 2005.
19
- 20 de Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Bogio A,
21 Madeira Mde F. Canine visceral leishmaniasis in Maricá, State of Rio de
22 Janeiro: first report of an autochthonous case. *Rev Soc Bras Med Trop.*
23 2009; 42 (1): 77-8.
24
- 25 Figueiredo FB, Barbosa Filho CJ, Schubach EY, Pereira SA, Nascimento
26 LD, Madeira M F. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010 Jan-Feb; 43(1):98-9.
27
- 28 Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel, E.F, Lainson,
29 R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz; 2003. p. 23-
30 51.
- 31 Hommel M, Pekis W, Ranque J, Quilici M, Lanotte G. The micro-ELISA
32 technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med*
33 *Parasitol.* 1978; 72: 213-218.

- 1 Mattos CCLV, 2005. Caracterização climática da restinga da Marambaia,
2 RJ. In Menezes LFT, Peixoto AL and Araújo DSD. (Eds.). *História*
3 *Natural da Marambaia*. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do
4 Rio de Janeiro. p. 55-66.
- 5 Michalick M. S. M; Genaro O.. Leishmaniose Visceral Americana. In:
6 Neves, D.P.; Melo, A.L.; Linardi, P.M.; Vitor, R.W.A. (Ed) *Parasitologia*
7 *humana*. 11º ed., Ed. Atheneu, São Paulo, 2005. p. 56-72.
- 8 Miles, M. A.; Vexenat, J. A.; Furtado Campos, J. H.; Fonseca de Castro,
9 J. A. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for
10 visceral leishmaniasis. In: International Canine Leishmaniasis Forum,
11 1999. Barcelona. Proceedings...Barcelona: Killick-Kendrick, 1999. p.
12 46-53.
- 13 Monteiro, E. M.; Silva, J. C.; Costa, R. T.; Costa, D. C.; Barata, R. A.;
14 Paula, E. V.; Machado-Coelho, G. L.; Rocha, M. F.; Fortes-Dias, C. L.;
15 Dias, E. S. Visceral leishmaniasis: a study on phlebotomine sand flies
16 and canine infection in Montes Claros, State of Minas Gerais. *Rev. Soc.*
17 *Bras. Med. Trop* 2005; 38 (2): 147-52.
- 18 Novo SPC, Souza MB, Villanova CB, Caetano JM, Meira AM. Survey of
19 sandfly vectors of leishmaniasis in Marambaia Island, municipality of
20 Mangaratiba, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*
21 2013; 46 (2)
- 22 Pattabhi S, Whittle J, Mohamath R, El-Safi S, Moulton GG, Guderian
23 JA, et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-
24 care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS*
25 *Negl Trop Dis*. 2010; 4(9).
- 26
- 27 Pugedo H, Barata R A, França-Silva J C, Silva J C, Dias E S. HP: um
28 modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de
29 pequenos insetos. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 70-72.

1 Souza, M. B.; Marzochi, M. C.; de Carvalho, R. W.; Ribeiro, P. C.;
2 Pontes, C. S; Caetano, J. M.;Meira A. M. Ausência da *Lutzomyia*
3 longipalpis em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no
4 Município do Rio de Janeiro. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 19,
5 n. 6, Dec. 2003 .

6 Voller A; Bidwell DE, Bartlett ANN. Enzyme immunoassays in
7 diagnostic medicine. Theory and practice. Bull World Health
8 Organ.1976; 53: 55-65.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

6. Referencias Bibliográficas:

Aguiar, G. M.; Medeiros, W. M.; De Marco, T. S.; Santos, S. C. & Gambardella, S., 1996. 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*, 12:195-206.

Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*. 2005;127(3-4):227-32.

Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2004;57:1-88.

Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2001;53(1).

Brasil. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Brasília. 2010:62.

Camargo, M.E., Rebonato, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for Trypanosoma and leishmania antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1969; 18: 500-505.

Conde MMS, Lima HRP, Peixoto AL. Aspectos florísticos e vegetacionais da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil. In: História Natural da Marambaia. Seropédica: Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2005. p. 133-168.

Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano NA. Survey for american cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. MemInstOswaldo Cruz. 1985; 80: 17-22.

Cunha AM, Chagas E. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* n. sp previous note. Hospital (Rio de Janeiro) : . 1937;11:3-9.

da Silva DA, Madeira M de F, Abrantes TR, Filho CJ, Figueiredo FB. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. The Veterinary Journal. 2012.

de Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Bogio A, Madeira Mde F. Canine visceral leishmaniasis in Marica, State of Rio de Janeiro: first report of an autochthonous case. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(1):77-8.

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sôbre a importância comprovativa do homem, do cão e da rapôsa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. O Hospital. 1955a(1).

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

El Harith A, Chowdhury S, Al Masum, Semião SS, Das PK, Akhter S. Reactivity of various leishmanial antigens in a direct agglutination test and their value in differentiating post-kala azar dermal leishmaniasis from leprosy and other skin conditions. J Med Microbiol 1996;44:142-146.

Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Portus M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec.* 1995;136(20):514-6.

Franca-Silva JC, Barata RA, Costa RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GL, Vieira EP, et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.* 2005;131(3-4):213-20.

Google earth - mapas. <http://mapas.google.com>. Consulta realizada em 12/01/2013.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia.* 2004;7(3).

Grimaldi GJ, Teva A, Ferreira AL, Dos Santos CB, Pinto IS, de-Azevedo CT,

Falqueto A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP((R)) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2012; 106, 54–59.

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

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution: *Biology and Epidemiology*, Academic Press, London; 1987.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in the new world. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 10th ed. London: E Arnold ed; 2005.

Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(4):566-7.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Caderno de Saúde Pública.* 1994;10(2):359-75.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Leishmanioses em áreas urbanas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 1997;30:162-167.

Massunari GK, Voltarelli EM, Santos DR, Santos AR, Poiani LP, de Oliveira O, et al. A serological and molecular investigation of American cutaneous leishmaniasis in dogs, three years after an outbreak in the Northwest of Parana State, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2009;25(1):97-104.

Mattos, CCLV, 2005. Caracterização climática da restinga da Marambaia, RJ. In Menezes, LFT, Peixoto, AL and Araújo DSD. (Eds.). *História Natural da Marambaia.* Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. p. 55-66.

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

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília-DF. Ministério da Saúde - MS (ed), Brasília. 2006.

Novo SPC, Souza MB, Villanova CB, Caetano JM, Meira A M. Survey of sandfly vectors of leishmaniasis in Marambaia Island, municipality of Mangaratiba, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013; 46 (2).

Oliveira CD, Morais MH, Machado-Coelho GL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. *Cadernos de Saúde Pública*. 2008; 24(12):2953-8.

Pattabhi S, Whittle J, Mohamath R, El-Safi S, Moulton GG, Guderian JA, et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(9).

Pimenta PFP, Secundino NFC, Blanco EEN. Interação leishmania-hospedeiro invertebrado In: Rangel, E. F.; Lainson, R. (Org.). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2003.

Ribeiro F C, Schubach A D O, Mouta-Confort E, Pacheco T, Madeira M D F, Abboud L C D S, ... & Marzochi M C. Use of elisa employing homologous and heterologous antigens for the detection of IgG and subclasses (IgG1 and IgG2) in the diagnosis of Canine visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2011; 53(5), 283-289.

Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Subsecretaria de Vigilância em Saúde Superintendência de Vigilância Epidemiológica e Ambiental. Nota Técnica N° 5/2012 - GDTVZ/DTI/CVE/SVEA/SVS-SES RJ.

SINAN. Portal da Saúde - www.saude.gov.br - Vigilância - <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>. 2013.

Swenson CL, Silverman J, Stromberg PC, Johnson SE, Wilkie DA, Eaton KA, et al. Visceral leishmaniasis in an English foxhound from an Ohio research colony. *J Am Vet Med Assoc*. 1988;193(9):1089-92.

Voller A; Bidwell DE, Bartlett ANN. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. Bull World Health Organ.1976; 53: 55-65.

W.H.O. World Health Organization Control of Leishmaniases. Technical Report Series 2010:793.

Anexo (Protocolo de Campo Veterinário)

4850541827		PROTOCOLO DE CAMPO VETERINÁRIO	
1-Nº	2-Data de Coleta		
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
3-Nome do Animal:			
<input type="text"/>			
4-Proprietário:			
<input type="text"/>			
5-Endereço:			
<input type="text"/>			
6-Bairro:			7-Estado:
<input type="text"/>			<input type="text"/>
8-Cidade:		9-Telefone:	
<input type="text"/>		<input type="text"/> - <input type="text"/>	
10-Raça: ANIMAL			
<input type="checkbox"/> SRD <input type="checkbox"/> Outros <input type="text"/>			
11-Sexo		12-Idade:	
<input type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Fêmea		<input type="checkbox"/> Até 12 Meses <input type="checkbox"/> Acima de 1 ano até 7 anos <input type="checkbox"/> Acima de 7 anos	
13-Tipo de Pelagem		14-Peso:	
<input type="checkbox"/> Curto <input type="checkbox"/> Longo		<input type="text"/> , <input type="text"/>	
15-Vacinação:		16-Outras:	
<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> V8		<input type="text"/>	
<input type="checkbox"/> V10 <input type="checkbox"/> Anti-rábica			
<input type="checkbox"/> Contra Leishmaniose			
17-Castrado:			
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
EXAME CLÍNICO			
18-Estado Geral		19-Condição Corporal:	
<input type="checkbox"/> Bom <input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> Ruim		<input type="checkbox"/> Muito Magro <input type="checkbox"/> Magro <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Obeso	
20-Mucosas:			21-Temperatura:
<input type="checkbox"/> Hipocoradas <input type="checkbox"/> Normocoradas <input type="checkbox"/> Hiperemicas <input type="checkbox"/> Ictéricas			<input type="text"/> , <input type="text"/>
22-Desidratação:		23-Prenhez:	
<input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Lave <input type="checkbox"/> Severa		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
24-Presença de Ectoparasitos:		25-Lesões Cutâneas:	
<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Piolhos		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
<input type="checkbox"/> Pulgas <input type="checkbox"/> Carrapatos		26-Início das Lesões:	
<input type="checkbox"/> Outros <input type="text"/>		<input type="text"/>	
27-Nº de Lesões:			
<input type="text"/>			
28-Localizações das Lesões:			
<input type="checkbox"/> Orelha <input type="checkbox"/> Nariz <input type="checkbox"/> Escroto <input type="checkbox"/> Não se aplica			
<input type="checkbox"/> Outras <input type="text"/>			

