

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

DENISE AMARO DA SILVA

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE CÃES
SORORREACTORES PARA *LEISHMANIA*
PROVENIENTES DE INQUÉRITO SOROLÓGICO
REALIZADO NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2010

DISSERTAÇÃO MPCDI – IPEC

D. A. DA SILVA 2010

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S586

Silva, Denise Amaro da.

Avaliação clínica e laboratorial de cães sororretores para *Leishmania* provenientes de inquérito sorológico realizado no município do Rio de Janeiro / Denise Amaro da Silva. – Rio de Janeiro, 2010.

xiv, 90 f. : il.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas, 2010.

Bibliografia: f. 44-50

1. *Leishmania*. 2. Leishmanioses. 3. Zoonoses. 4. Controle. 5. *Trypanosoma caninum*. I. Título.

CDD 616.93648153

Avaliação Clínica e Laboratorial de Cães Sororretores para
Leishmania Provenientes de Inquérito Sorológico Realizado
no Município do Rio de Janeiro

DENISE AMARO DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dra. Maria de Fátima Madeira
Dr. Fabiano Borges Figueiredo

Rio de Janeiro

2010

DENISE AMARO DA SILVA

Avaliação Clínica e Laboratorial de Cães Sororretores para
Leishmania Provenientes de Inquérito Sorológico Realizado
no Município do Rio de Janeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores. Dra. Maria de Fátima Madeira

Dr. Fabiano Borges Figueiredo

Aprovado em 22/10/2010

BANCA EXAMINADORA

Dr. Armando de Oliveira Schubach (IPEC/FIOCRUZ)
Presidente da banca

Dr. Sandro Antonio Pereira (IPEC/FIOCRUZ)
Componente da banca

Dr. Valmir Laurentino da Silva (ENSP/FIOCRUZ)
Componente da banca

Dra. Aline Fagundes da Silva (IPEC/FIOCRUZ)
Suplente

Ao meu marido por todo apoio.

Aos meus pais por todo carinho.

A Deus, pela inspiração.

Aos amigos pela colaboração.

*"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal,
ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."*

Albert Schweitzer

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que tem realizado em minha vida.

Agradeço aos meus pais, José Amaro da Silva e Maria Lucia Silva, que fizeram o possível e impossível para toda a minha formação pessoal e profissional.

Ao meu marido, Alexsandro de Farias Costa, por todo apoio e incentivo.

À minha irmã, Denilda Amaro da Silva, pelo apoio e carinho dado em todos os momentos.

Aos amigos do Lapclin-Dermzoo que nestes anos de convivência se tornaram a família que a gente escolhe para todos os momentos.

Aos amigos do Vigileish que me acolheram com enorme carinho.

À Dra. Isabella Dib que desde o primeiro dia em que a conheci foi como fossemos amigas de muitos anos. E quando retornei de Fortaleza me incentivou a voltar para o Lapclin-Dermzoo e fazer a prova para o ingresso no mestrado.

Aos meus orientadores Dra. Maria de Fátima Madeira e Dr. Fabiano Borges Figueiredo pela confiança, apoio e dedicação, além dos ensinamentos pessoais e profissionais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

A CAPES, pela concessão da bolsa de apoio à pesquisa.

À agência de fomento FAPERJ pelo financiamento do projeto pelo Programa APQ1.

Ao Adenauer Cruz Teixeira e Cristiane Marques de Souza pela realização dos exames sorológicos.

Ao Serviço de Epidemiologia da Secretaria Municipal de Saúde e ao Centro de Controle de Zoonoses do Rio de Janeiro pela realização do diagnóstico sorológico inicial e recolhimento dos animais.

Aos colegas mestrandos e doutorandos que compartilharam expectativas e ansiedades.

À minha cadela Nina, pela sua companhia enquanto escrevia e preparava a dissertação ela dormia ao meu lado, às vezes até roncava.

A todos aqueles que ajudaram direta e indiretamente na realização deste trabalho.

Silva, D. A. **Avaliação clínica e laboratorial de cães sororretores para *Leishmania* provenientes de inquérito sorológico realizado no município do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2010. 90 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

As leishmanioses, na sua forma tegumentar (LT) e visceral (LV), são doenças complexas em diferentes aspectos, cujas ações de controle devem ser adequadas ao contexto epidemiológico para que possam ser efetivas. Em áreas de LV, o cão doméstico constitui a principal fonte de infecção para os insetos vetores, fato que tem direcionado esforços na identificação e eliminação dos animais soropositivos. No município do Rio de Janeiro, embora casos humanos de LV sejam raros, tem-se observado, nos últimos anos, um aumento gradual dos índices de soroprevalência canina. No ano de 2008, o programa de controle de leishmaniose identificou, nesse município, 168 cães com títulos ≥ 40 pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) em sangue dessecado em papel filtro. Com o objetivo de confirmar a infecção por *Leishmania*, este estudo avaliou esse grupo de cães, os quais foram submetidos à eutanásia e coleta de espécimes clínicos. Coletaram-se sangue e fragmentos teciduais (pele íntegra, lesões cutâneas e de baço). O sangue foi processado e submetido às técnicas de IFI, ensaio imunoenzimático (EIE) e o teste imunocromatográfico *dual pack platform* (DPP). Os fragmentos teciduais foram processados para isolamento parasitário em meio de cultura e identificação por isoenzimas e fragmentos de pele íntegra para pesquisa de DNA de *Leishmania* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Dos 168 animais identificados no inquérito, 155 foram estudados. Dos animais, 48% eram machos e 52% fêmeas oriundos de diferentes localidades. Desse grupo, 6% eram sintomáticos, 54% oligossintomáticos e 40% eram assintomáticos para LV. Na reavaliação sorológica com amostras de soro de 144 animais, no momento da eutanásia, 28% e 10% foram positivos com sensibilidade de 73% e 60%, à IFI quando antígenos de *Leishmania major*-like e *Leishmania Leishmania chagasi* foram, respectivamente, utilizados nos ensaios. No teste imunoenzimático EIE com antígeno de *L. major*-like e *L.(L.) chagasi*, 22% e 17% foram positivos com sensibilidade de 93% e 100%, respectivamente. O teste DPP demonstrou que 17% dos animais foram positivos, com sensibilidade de 93%, com amostras de soro. Trinta e nove por cento (56/144) dos animais foram positivos a sorologia independente das técnicas ou antígenos empregados. O isolamento parasitário foi obtido em 29 animais, dos quais *L.(L.) chagasi* foi isolada de 14 e *Leishmania (Viannia) braziliensis* de 5 cães, este último exclusivamente em fragmentos de lesões cutâneas. Um animal apresentou infecção mista, com isolamento simultâneo de *L. (V.) braziliensis* e *L.(L.) chagasi* e de sete animais isolou-se *Trypanosoma caninum* exclusivamente de pele íntegra. Em dois animais, promastigotas isoladas em fragmentos de baço, foram perdidas e não puderam ser identificadas. Pela PCR, 17 animais foram positivos. Os resultados considerando todas as técnicas empregadas (cultura, IFI, EIE, DPP e PCR), demonstraram que 59% (91/155) dos animais avaliados foram negativos. Dessa forma, esse estudo alerta para as particularidades do município do Rio de Janeiro que devem ser consideradas junto ao programa de controle da leishmaniose visceral.

Palavras-chave: 1. *Leishmania* 2. Leishmanioses 3. Zoonoses 4. Controle 5. *Trypanosoma caninum*

Silva, D. A. **Clinical and laboratory evaluation of seroreactive dogs for *Leishmania* from sero-epidemiological survey from Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2010. 90 f. Master [Science Dissertation in Clinic Research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clinica Evandro Chagas.

ABSTRACT

Tegumentary (TL) and visceral leishmaniasis (VL) are complex diseases in different aspects, whose control actions should be appropriate to the epidemiological context in order to be effective. In areas of VL, the domestic dog is the main source of infection for insect vectors, a fact that has directed many efforts in the identifying and elimination of the seroreactive animals. In the municipality of Rio de Janeiro, although human cases of VL are rare, in recent years, has been observed a gradual increase in seroprevalence rates in dogs. In 2008, the leishmaniasis control program identified 168 dogs with titers ≥ 40 by indirect immunofluorescence (IIF) on blood samples collected on filter paper. With aim to confirm infection by *Leishmania*, this study evaluated this group of dogs which were euthanized and collected clinical specimens. Blood and tissue samples (intact skin, spleen and cutaneous lesion) were collected. Blood was processed for serological tests as IIF, enzyme immunoassays (EIE) and immunochromatographic test pack dual platform (DPP). The tissue samples were processed for parasite isolation in culture and identification by isoenzymes electrophoresis and fragments of intact skin for detection of *Leishmania* DNA by the polymerase chain reaction (PCR). Of the 168 animals identified in the survey, 155 were studied. The animals originating from different localities, of which 48% were males and 52% female. Of that group, 6% were symptomatic, 54% oligosymptomatic and 40% were asymptomatic for VL. In serological reevaluated with serum samples from 144 animals, at the time of euthanasia, 28% and 10% were positive, with sensitivity of 73% and 60% with IIF when antigens of *Leishmania major*-like and *Leishmania (Leishmania) chagasi* were used respectively in assays. In enzyme immunoassays with antigen from *L. major* and *L. (L.) chagasi*, 22% and 17% were positive, with 93% sensitivity and 100%, respectively. The DPP test showed that 17% of animals were positive, with 93% sensitivity with serum samples. Thirty-nine percent (56/144) animals were positive in the serological tests regardless of the techniques or antigens employed in the assay. The isolation of parasite in culture was achieved in 29 animals, including *L. (L.) chagasi* that isolated from 14 dogs and *Leishmania Viannia braziliensis* from 5 dogs only in cutaneous lesions. One animal showed mixed infection with isolation of *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) chagasi* and 7 animals *Trypanosoma caninum* was isolated exclusively from intact skin. In two animals, promastigotes isolated from spleen fragments were lost and could not be identified. By PCR, 17 animals were positive. The results considering all the techniques (culture, IIF, EIE, DPP and PCR) demonstrated that 59% (91/155) animals evaluated were negative. Thus, this study alert for the peculiarities of the municipality of Rio de Janeiro that should be considered by the visceral leishmaniasis control program.

Keywords: 1. *Leishmania* 2. Leishmaniasis 3. Zoonoses 4. Control 5. *Trypanosoma caninum*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Distribuição dos 155 cães, por bairro de origem, avaliados no município do Rio de Janeiro (2008).....	24
Figura 2.	Percentual da variável raça dos 155 cães avaliados no município do Rio de Janeiro (2008).....	24
Figura 3.	Localização e número de lesões cutâneas observadas em 28 de 155 cães avaliados no município do Rio de Janeiro (2008).....	25
Figura 4.	Distribuição dos principais sinais clínicos característicos de leishmaniose visceral canina encontrados nos 155 cães avaliados no município do Rio de Janeiro (2008).....	25
Figura 5.	Perfil eletroforético apresentado pela enzima málica (ME) em amostras isoladas de lesão cutânea obtida de oito animais. (1) amostra referência de <i>L. (L.) chagasi</i> , (2) amostra referência de <i>L. (V.) braziliensis</i> , (3) amostra SE075, (4) amostra SE053, (5) amostra SE097, (6) amostra SE135, (7) amostra SE085, (8) amostra SE115, (9) amostra SE166, (10) amostra SE014 no município do Rio de Janeiro no ano de 2008.....	30
Figura 6.	Perfil eletroforético apresentado pela enzima 6-phosphoglucomutase (6PGDH) em amostras isoladas de pele íntegra de seis animais. (1) amostra SE006, (2) amostra SE054, (3) amostra SE070, (4) amostra SE097, (5) amostra SE104, (6) amostra SE135, (7) amostra referência de <i>L. (L.) chagasi</i> , (8) amostra referência de <i>L. (L.) amazonensis</i> , (9) amostra referência de <i>L. (V.) braziliensis</i> no município do Rio de Janeiro no ano de 2008.....	30

- Figura 7** Mapa do município do Rio de Janeiro representando os 29 isolados obtidos no estudo de 155 cães no ano de 2008..... 31
- Figura 8.** Eletroforese de gel de agarose 2% mostrando os produtos amplificados obtidos com oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 120 pares de base (bp) que corresponde a uma região conservada no minicírculo do kDNA de espécies do gênero *Leishmania*. (1) marcador tamanho de DNA de 100bp, (2) amostra SE006, (3) amostra SE014, (4) amostra SE041, (5) amostra SE042, (6) amostra SE054, (7) amostra SE070, (8) amostra SE100 (9) amostra SE060, (10) controle negativo, (11) controle positivo de *L. (L.) chagasi* no município do Rio de Janeiro no ano de 2008..... 33
- Figura 9.** Eletroforese de gel de agarose 2% mostrando os produtos amplificados obtidos com oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 120 pares de base (bp) que corresponde a uma região conservada no minicírculo do kDNA de espécies do gênero *Leishmania*. (1) marcador tamanho de DNA de 100bp, (2) amostra SE100, (3) amostra SE086, (4) amostra SE087, (5) controle negativo (6 e 7) controle positivo de *L. (L.) chagasi* no município do Rio de Janeiro no ano de 2008..... 33
- Figura 10.** Distribuição dos 64 cães que apresentaram resultado positivo para algum protozoário em pelo menos uma das técnicas (IFI, EIE, DPP, PCR e cultura parasitológica) realizadas no estudo de acordo com o bairro de origem no município do Rio de Janeiro no ano de 2008..... 34

Figura 11. Distribuição dos 155 cães avaliados no município do Rio de Janeiro no ano de 2008 de acordo com as diferentes técnicas realizadas.....	35
--	----

LISTA DE TABELAS E QUADROS

- Quadro 1.** Soluções tampão utilizadas na preparação dos géis e nas corridas eletroforéticas. Utilizado nos seguintes sistemas enzimáticos: 6PGDH, GPI, NH. Utilizado nos seguintes sistemas enzimáticos: G6PDH, ME..... 21
- Quadro 2.** Valores do índice Kappa (k) e sua classificação segundo ShROUT (1988)..... 22
- Quadro 3.** Interpretação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia da reavaliação sorológica realizada em amostras de soro de 144 cães através das técnicas Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (EIE) e o *Dual Pack Platform* (DPPTM), utilizando como padrão de referência a cultura parasitológica no município do Rio de Janeiro (2008)..... 27
- Tabela 1.** Resultado da reavaliação sorológica realizada em amostras de soro de 144 cães através das técnicas Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (EIE) e o *Dual Pack Platform* (DPPTM) no município do Rio de Janeiro (2008)..... 27

Tabela 2.	Resultado da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia da reavaliação sorológica realizada em amostras de soro de 144 cães através das técnicas Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (EIE) e o <i>Dual Pack Platform</i> (DPP TM), utilizando como padrão de referência a cultura parasitológica no município do Rio de Janeiro (2008).....	27
Tabela 3.	Concordância das técnicas realizadas no estudo através do cálculo do índice kappa e sua classificação segundo Shrout et al. (1998) utilizando como padrão de referência a cultura parasitológica no município do Rio de Janeiro (2008).....	28
Tabela 4.	Resultados laboratoriais dos 155 cães avaliados neste estudo no município do Rio de Janeiro no ano de 2008.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
NNN	Novy, MacNeal e Nicolle
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IFI	Imunofluorescência Indireta
EIE	Ensaio Imunoenzimático
DPP	Dual Pack Platform
Bio-manguinhos	Instituto de Biotecnológicos da Fiocruz/RJ
LF	Lateral Flow
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
LTC	Leishmaniose Tegumentar Canina
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
SES/RJ	Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro
SMS/RJ	Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro
MS	Ministério da Saúde
CCZ/RJ	Centro de Controle de Zoonoses do Rio de Janeiro
Lapclin-Dermzoo	Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos
PBS	Tampão fosfato-salino
DO	Densidade Óptica
SFB	Soro Fetal Bovino
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
N ₂	Nitrogênio Líquido
dNTPS	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
MLEE	Eletroforese de isoenzimas
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
pH	Potencial Hidrogeniônico
6PGDH	6-fosfogluconato desidrogenase
ME	Enzima málica
NH	Nucleotidase
G6PDH	Glicose-6-fosfoisomerase
q.s.p	Quantidade suficiente para
SPSS	Statistical Package for the Social Science
k	Índice kappa
SRD	Sem Raça Definida

SUMÁRIO

RESUMO.....	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	VII
LISTA DE TABELAS E QUADROS	X
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 LEISHMANIOSES: CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)	2
1.3 AGENTE ETIOLÓGICO, RESERVATÓRIOS E VETORES.....	3
1.4 DIAGNÓSTICO	5
1.5 CONTROLE	8
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 OBJETIVO GERAL	11
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	12
4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO	12
4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	12
4.4 MANEJO DOS ANIMAIS	13
4.4.1 Exame clínico	13
4.4.2 Coleta de sangue.....	13
4.4.3 Eutanásia e coleta de espécimes clínicos.....	14
4.5 TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO.....	14
4.5.1 Técnicas sorológicas.....	14
4.5.1.1 Imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (EIE)	14
4.5.1.2 Teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma (<i>Dual Path Platform</i> - DPP™).....	15
4.5.2 Técnica molecular: reação em cadeia pela polimerase (PCR)	16
4.5.2.1 Extração de DNA	16
4.5.2.2 Avaliação do DNA extraído por espectrofotometria	17
4.5.2.3 Amplificação de DNA.....	17
4.5.3 Técnica parasitológica: cultura para <i>Leishmania</i>	18
4.6 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS ISOLADAS EM CULTURA PELA ELETROFORESE DE ISOENZIMAS	19
4.6.1 Recuperação das amostras criopreservadas.....	19
4.6.2 Expansão das culturas	19
4.6.3 Eletroforese de isoenzimas (MLEE).....	20
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
5. RESULTADOS	23
5.1 ANIMAIS ESTUDADOS.....	23
5.2 SOROLOGIA.....	26
5.3 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO: CULTURA E IDENTIFICAÇÃO ETIOLÓGICA.....	29

5.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE	31
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	51
ANEXO 1. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/FIOCRUZ).....	52
ANEXO 2. FICHA CLÍNICA.....	53
ANEXO 3. ARTIGO CONFECCIONADO COM OS RESULTADOS DESSE ESTUDO E SUBMETIDO À VETERINARY PARASITOLOGY	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES: CONSIDERAÇÕES GERAIS

As leishmanioses, na sua forma tegumentar (LT) e visceral (LV), constituem um grupo de doenças infecto-parasitárias de grande importância em saúde pública no mundo (GRIMALDI e TESH, 1993). São endêmicas em 88 países, infectando cerca de 12 milhões de pessoas em todo mundo, e 350 milhões estão sob risco de adquirir a doença, com incidência anual de 1 a 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea e 500.000 novos casos da forma visceral. Nas Américas, o Brasil é o país com mais registros de casos, tanto da forma tegumentar quanto visceral (WHO, 2008).

As leishmanioses são zoonoses importantes, que acometem o ser humano e outras espécies de mamíferos silvestres e domésticos, sob a forma de doenças infecciosas crônicas com diversas manifestações clínicas. São causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e a sua principal forma de transmissão ocorre através da picada de insetos vetores da subfamília Phlebotominae. São relacionadas entre as seis principais endemias do mundo (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; WHO, 2008).

As diferentes formas da doença (LT ou LV) estão relacionadas à espécie do parasita e diferem em distribuição geográfica, hospedeiros e vetores envolvidos, taxas de incidência e de mortalidade com perfil epidemiológico distinto (MARZOCHI, 1992). No Brasil, a LT é determinada por sete espécies, seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) naiffi*, *L.(V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L.(L.) amazonensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A LV está associada a uma única espécie, do subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A identidade do agente etiológico da LV nas Américas tem sido causa de inúmeras discussões (MOMEN et al., 1993; SHAW, 2002). Por muito tempo considerou-se como agente autóctone no Novo Mundo, entretanto atualmente, admite-se que *L. (L.) chagasi* tenha sido introduzida neste continente durante a colonização européia, através de cães infectados

por *L. infantum*, espécie predominante em países costeiros do Mediterrâneo, e aqui tenha se adaptado a novos vetores e hospedeiros (KILLICK-KENDRICK R, 1985; RIOUX et al., 1990). Com base nos perfis moleculares, alguns autores relatam que não foram capazes de distinguir *L. (L.) chagasi* de *L. infantum* (MAURICIO et al., 1999).

No Brasil, a LV é uma doença infecciosa de evolução crônica, cujo principal vetor é o díptero *Lutzomyia longipalpis*, o reservatório no ambiente doméstico e peridoméstico é o cão doméstico (*Canis familiaris*). Ambos contribuem para o ciclo de manutenção da doença (FRANÇA-SILVA et al., 2005). Outros animais como canídeos silvestres, marsupiais e roedores já foram encontrados naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, entretanto, os cães são considerados os principais reservatórios domésticos, constituindo um importante elo na cadeia de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Com relação à distribuição geográfica, em meados da década de 1980, constatou-se uma transformação nos padrões epidemiológicos da LV no Brasil, antes restrita às áreas rurais do Nordeste brasileiro, a doença avançou para outras regiões indenes alcançando a periferia de grandes centros urbanos. A partir dos anos 1990, os Estados do Pará e Tocantins (região norte), Mato Grosso do Sul (região centro-oeste), Minas Gerais e São Paulo (região sudeste) passaram a fazer parte de maneira significativa nas estatísticas da LV, com focos relatados em áreas rurais e periurbanas (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)

Classicamente, a LVC pode apresentar um espectro de manifestações clínicas bem variadas, condicionadas principalmente a imunocompetência individual do animal. Entre os sinais clínicos mais comuns estão o emagrecimento e as alterações cutâneas como descamação e eczema, em particular no espelho nasal e orelha; e pequenas úlceras rasas, localizadas mais freqüentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações.

Nas fases mais adiantadas da doença, observam-se, com freqüência, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômitos, além da hiperqueratose.

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 e DEANE, 1955a; b; MARZOCHI et al., 1985; ALMEIDA et al., 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), sendo a forma assintomática relatada em proporções que podem representar cerca de 40 a 60% da população soropositiva (MARZOCHI e MARZOCHI, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A alopecia pode ser explicada pela ação direta do parasito sobre o folículo piloso ou devido a um distúrbio do metabolismo do ácido pantotênico, decorrente de lesão hepática, ou ainda, deposição dos imunocomplexos existentes na membrana basal da pele, induzindo um processo autoimune desencadeador da alopecia.

Segundo Donatien & Lestoquard (1938) citado por Marzochi et al. (1985) o crescimento exagerado das unhas pode ser explicado pelo estímulo do parasita na matriz ungueal. Entretanto, Marzochi et al. (1985) relata que o estado de apatia em que o animal permanece durante a doença dificulta o desgaste natural das unhas.

A hepatoesplenomegalia e a adenopatia generalizada são conseqüentes do acometimento do sistema fagocítico mononuclear (SFM). O emagrecimento ocorre devido ao desequilíbrio protéico que levaria a uma intensa albuminúria ou pelo comprometimento da mucosa digestiva, mas a explicação para os outros sinais clínicos são menos conclusivas (HOMMEL M, 1978; MARZOCHI et al., 1985; FEITOSA et al., 2000).

1.3 AGENTE ETIOLÓGICO, RESERVATÓRIOS E VETORES

Os agentes etiológicos da LV são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório das células do SFM, e se apresenta com uma forma flagelada (promastigota), encontrada no tubo digestório do inseto vetor e outra sem flagelo livre (amastigota) nos tecidos dos vertebrados (REY, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*), é considerado o principal reservatório e fonte de infecção. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*).

No Brasil, as raposas foram encontradas infectadas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica. Os marsupiais foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (LAINSON

et al., 1990; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Os marsupiais da espécie *Didelphis marsupialis* são frequentemente apontados como passíveis de infecção por *L. (L.) chagasi* (TRAVI et al., 1994).

Os vetores da LV são pequenos insetos alados da Ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phebotominae, cor de palha, grandes asas pilosas dirigidas para trás e para cima, cabeça fletida para baixo, aspecto giboso do corpo e longos palpos maxilares e somente as fêmeas são hematófagas, denominados flebotomíneos, e conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (REY, 1991; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença *L. longipalpis* e *L. cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora de *L. (L.) chagasi* no Brasil e *L. cruzi* também tem sido incriminada como vetor no Estado de Mato Grosso do Sul (GALATI et al., 1997; SANTOS et al., 1998).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de hospedeiros infectados ingerem macrófagos parasitados com as formas amastigotas. No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas, que se diferenciam rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária (GONTIJO e MELO, 2004).

As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas (GILLESPIE e PEARSON, 2001).

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor, onde as formas promastigotas metacíclicas, presentes no tubo digestivo, juntamente com a saliva do inseto são inoculadas na pele. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do SFM. No interior dos macrófagos diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então, a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do SFM, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

1.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LV deve considerar a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos, uma vez que a doença produz um amplo espectro de manifestações clínicas, o que torna o diagnóstico difícil (GONTIJO e MELO, 2004). Por essa razão, o diagnóstico laboratorial é requerido para confirmar a suspeita clínica.

Os testes laboratoriais contam com ferramentas de diferentes complexidades, cuja aplicabilidade pode variar de acordo com a forma da doença (LT ou LV) ou da infra-estrutura local. Os métodos parasitológicos incluem: identificação microscópica direta e isolamento do parasita em meio de cultura a partir de diferentes espécimes clínicos (GONTIJO e MELO, 2004).

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 ou vísceras.

No exame parasitológico direto, é realizada a pesquisa de formas amastigotas em lâminas de impressão por aposição do material coletado na punção, 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 Novy, MacNeal e Nicolle (NNN) acrescido do meio Schneider e suplementado com 10% de soro fetal bovino. Devido a especificidade de 100% o exame parasitológico pela cultura é considerado uma ferramenta padrão de referência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Na LVC, a distribuição do parasita 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 nos mais diferentes tecidos e órgãos provocam reações características da LVC, entre as quais a ativação policlonal de células B, produzindo elevados níveis séricos de imunoglobulinas, que, se por um lado não significa proteção, por outro, facilita o diagnóstico laboratorial através de testes sorológicos, sendo a imunofluorescência indireta (IFI), um dos métodos mais empregados na rotina do diagnóstico da LVC (ALVES e BEVILACQUA, 2004; GONTIJO e MELO, 2004).

Em áreas endêmicas de LV, os testes sorológicos são usados como ferramenta nos inquéritos epidemiológicos para diagnóstico e posterior recolhimento dos cães considerados

positivos. A IFI é oficialmente recomendada pelo Ministério da Saúde para confirmação diagnóstica da LVC, apresentando 90 a 100% de sensibilidade e 80% de especificidade para amostras de soro (ALVES e BEVILACQUA, 2004). Segundo Ikeda-Garcia e Feitosa (2006), esta técnica é de execução possível, rápida e barata.

A principal limitação dos estudos sorológicos é a baixa especificidade e a possibilidade de reações cruzadas com outros tripanosomatídeos como *L. (V.) braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* (TRONCARELLI et al., 2009), os quais apresentam uma relação filogenética muito estreita com *L. (L.) chagasi*, podendo refletir resultados falsos positivos nos testes sorológicos (VEXENAT et al., 1996). Por outro lado, os achados falsos negativos podem ocorrer, ou por atraso no período pré-patente ou por alguns cães nunca soroconverterem (PARANHOS-SILVA et al., 1996).

Apesar da técnica de IFI apresentar elevada sensibilidade e relativa especificidade, algumas desvantagens, tais como, não automatização e avaliação subjetiva, tem sido apontado como fatores limitadores para sua utilização em larga escala. Por outro lado, os ensaios imunoenzimáticos tais como “*enzyme linked immunosorbent assay*” (ELISA) são automatizados e apresentam vantagens nesse aspecto (ROSATI et al., 2003).

De um modo geral, os testes sorológicos apresentam limitações para detecção de baixos níveis de anticorpos e observa-se reatividade cruzada em áreas endêmicas de sobreposição. A sensibilidade e a especificidade dos testes sorológicos estão condicionadas a diferentes aspectos e podem variar, acreditando-se que dessa forma, subestimem a verdadeira prevalência da doença.

A tecnologia recombinante em conjunto com a caracterização de antígenos específicos imunodominantes têm permitido o desenvolvimento de uma segunda geração de diagnóstico imunoenzimático, sendo proposto para diagnóstico da LVC.

Diversos antígenos recombinantes de *L. (L.) chagasi* (K9, K26 e k39) têm sido testados e avaliados quanto ao desempenho no diagnóstico da leishmaniose visceral humana (ROMERO et al., 2009; MOHAPATRA et al., 2010) e canina (ROSATI et al., 2003; PORROZZI et al., 2007). A sensibilidade e especificidade destes testes têm-se mostrado elevadas quando comparadas aos testes sorológicos convencionais.

O desempenho dessas moléculas em ensaios sorológicos clássicos tem influenciado a sua utilização na construção de testes diagnósticos de última geração, empregando diferentes antígenos recombinantes associados num único ensaio, o que poderá aumentar a sensibilidade do diagnóstico da LV humana e canina. Baseado nesse conceito, o Instituto de

Biotecnológicos da Fiocruz/Rio de Janeiro (Bio-manguinhos) tem investido nesse campo e desenvolvido testes imunocromatográficos voltados para o diagnóstico da LVC.

Atualmente, está sendo avaliado em diversos estudos, o teste *Dual Path Platform* (DPPTM), cuja tecnologia emprega os princípios dos testes imunocromatográficos qualitativos rápidos, utilizando os antígenos rK26 e rK39 de *L. (L.) chagasi*. É um sistema baseado nos testes rápidos para detecção do vírus da imunodeficiência humana (HIV), também desenvolvidos pela Fiocruz e que abrem uma alternativa para o diagnóstico da LVC (GALVÃO, 2010).

Embora em fase de validação, os resultados preliminares têm demonstrado excelente desempenho, apresentando vantagens em relação aos métodos utilizados atualmente: maior rapidez e precisão, interpretação dos dados simplificada, uso de volumes mínimos de amostra e sensibilidade cerca de 10 a 50 vezes maior que o “lateral flow” (LF), teste inicialmente desenvolvido com a mesma tecnologia, além da compatibilidade com diferentes tipos de fluidos corporais como sangue, soro, saliva, plasma, urina etc (GALVÃO, 2010).

As provas moleculares de detecção e identificação da *Leishmania* vêm sendo empregadas no diagnóstico da doença e em estudos taxonômicos (CUPOLILLO et al., 1994; DEGRAVE et al., 1994). Recentemente, tem sido demonstrado que métodos moleculares baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) são importantes ferramentas para o diagnóstico de diferentes doenças infecciosas, entre elas as leishmanioses (HARRIS et al., 1998) e é um método sensível e específico para a detecção do DNA de *Leishmania* em uma variedade de amostras clínicas (ASHFORD et al., 1995; BERRAHAL et al., 1996; REALE et al., 1999; ROURA et al., 1999; REITHINGER et al., 2000).

A PCR tem sido utilizada na detecção e discriminação, de espécies de *Leishmania* infectando uma ampla série de vertebrados (BRANDAO-FILHO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005a; DE ANDRADE et al., 2006) e hospedeiros invertebrados como flebotomíneos e carrapatos (COUTINHO et al., 2005; PARVIZI et al., 2005).

Embora de grande aplicabilidade, a PCR não é, ainda, utilizada na rotina diagnóstica devido principalmente ao elevado custo da técnica que limita a sua utilização em larga escala. Entretanto, observando outro aspecto, o diagnóstico através da PCR pode ser muito útil, uma vez que a condição imunológica do animal não interfere no teste, podendo ser utilizado em casos de resultados inconclusivos por outras técnicas ou nos casos de anergia ou de reação cruzada em testes sorológicos, além de apresentar uma sensibilidade e especificidade próxima de 100% (ASHFORD et al., 1995; LACHAUD et al., 2002; MOREIRA et al., 2007).

Entretanto, outros autores, afirmam que, este teste não garante 100% de sensibilidade e especificidade devido a possível contaminação com outras amostras ou ainda com “amplicons” (produtos amplificados pós PCR). Resultados falsos negativos também podem ser encontrados, sendo estes decorrentes da possível presença de substâncias na amostras, as quais podem inibir total ou parcialmente a reação de amplificação do DNA (BARKER, 1989; DEGRAVE et al., 1994).

1.5 CONTROLE

As medidas de controle da LV preconizadas pela Organização Mundial de Saúde englobam: i) busca ativa de doentes e encaminhamento para diagnóstico e tratamento; ii) inquérito sorológico canino; iii) apreensão e eliminação dos cães soropositivos; iv) borrifação sistemática de inseticida residual nos domicílios e peridomicílios e v) programas de educação comunitária (WHO, 2008).

Devido à complexidade do cenário epidemiológico desse grupo de doenças, as ações de controle devem ser adequadas ao contexto da área em questão para que possam ser efetivas. Uma vez que em área urbana, o cão doméstico constitui a principal fonte de infecção para os insetos vetores, esforços são concentrados na identificação e eliminação de animais considerados positivos, visando à interrupção do ciclo de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

De acordo com o manual de controle da LV, 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 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) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Em áreas onde ocorrem simultaneamente LT e LV, a utilização de ferramentas sorológicas possui valor limitado no diagnóstico canino, uma vez que não discriminam a leishmaniose tegumentar canina (LTC) da LVC, para as quais as indicações de controle são diferentes (MADEIRA et al., 2006b). Essa mesma observação deve levar em conta áreas aonde ocorrem outros tripanosomatídeos como *T. cruzi*, *T. evansi* e *T. caninum* (SAVANI et al., 2005; MADEIRA et al., 2009; TRONCARELLI et al., 2009; DE S. PINTO et al., 2010).

Com a expansão geográfica e a urbanização da LV é necessário estabelecer medidas de controle mais efetivas. Acredita-se que esta expansão para diversas regiões do Brasil pode ser atribuída a inúmeros fatores tais como: dificuldades na eliminação do reservatório, diversidade epidemiológica das regiões afetadas, capacidade adaptativa do vetor, medidas insuficientes no controle do vetor e alto custo financeiro e social, além de outros fatores desconhecidos (OLIVEIRA et al., 2008).

Na LV, o potencial de cães domésticos como reservatório de *L. (L.) chagasi* direcionou medidas na detecção e eliminação de cães sororretores nas áreas endêmicas, diferente do que ocorre nas áreas de LT, na qual não se conhece o verdadeiro papel do cão doméstico infectado. No entanto, a retirada e eliminação de cães sororretores das áreas endêmicas, ainda é um assunto polêmico e tem sido a causa de vários debates.

Para alguns autores o controle dos reservatórios, particularmente os cães, causa um baixo impacto na incidência das leishmanioses humanas (DIETZE et al., 1997; MOREIRA et al., 2004). Ao contrário, outro estudo mostra que medidas de controle eficientes reduzem consideravelmente o número de reservatórios e, conseqüentemente, a taxa de infecção em humanos (ASHFORD et al., 1998).

2. JUSTIFICATIVA

A eutanásia de cães sororretores, como medida de controle da LV ainda é um assunto polêmico, principalmente em áreas onde ocorre, simultaneamente, a forma tegumentar e visceral, tendo em vista que as ferramentas aplicadas para o diagnóstico (sorologia) apresentam valor limitado na discriminação dos casos. No município do Rio de Janeiro, embora não sejam descritos, atualmente, casos humanos de LV, casos caninos são freqüentemente diagnosticados sendo que nos últimos anos, tem-se observado um aumento gradual nos índices de soroprevalência canina. O controle do calazar canino, nesse município, sempre foi feito por meio de inquéritos, através da técnica de IFI em eluato, cujo resultado positivo era posteriormente confirmado, em amostras de soro, em três laboratórios, sendo somente recolhidos para eutanásia os animais que apresentavam dois testes concordantes com títulos ≥ 80 . No entanto, esse procedimento não corresponde à determinação preconizada no manual do Ministério da Saúde (2006) que recomenda a diluição $\geq 1:40$ como ponto de corte para eutanásia dos cães. A partir da observação do aumento da soroprevalência canina, nesse município, diferentes setores responsáveis pelas ações de controle foram mobilizados, na tentativa de conhecer elementos que possam ter contribuído para elevação desses índices, uma vez que os animais com diluição $< 1:80$ permaneciam nas áreas sem qualquer monitoramento quanto à possível evolução da LVC. Nesse sentido, ficou estabelecido que todos os animais sororretores pela IFI identificados no inquérito realizado ano de 2008 seriam eutanasiados, considerando como ponto de corte a titulação $\geq 1:40$, e avaliados por diferentes abordagens. Dessa forma, este projeto foi constituído, com o objetivo de avaliar clínica e laboratorialmente todos os cães sororretores para *Leishmania*, com indicação de eutanásia, para confirmar a infecção por *Leishmania*, por diferentes técnicas diagnósticas. O Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (Lapclin-Dermzoo) e o Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (Vigileish), ambos do IPEC/FIOCRUZ, atuam em parceria em projetos que envolvem o diagnóstico clínico e laboratorial de cães, possibilitando o desenvolvimento deste projeto. Os resultados obtidos poderão ser importantes para nortear discussões e contribuir para o controle da doença no município do Rio de Janeiro.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar clínica e laboratorialmente, para confirmação da infecção por *Leishmania*, cães sororretores para *Leishmania*, encaminhados a eutanásia, oriundos do inquérito sorológico realizado no município do Rio de Janeiro no ano de 2008.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Descrever clinicamente os animais sororretores para *Leishmania* eutanasiados;
- ✓ Comparar os resultados da técnica de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (EIE) e teste imunocromatográfico (DPP), empregando soro sanguíneo coletado no momento da eutanásia;
- ✓ Verificar a concordância entre os resultados dos testes sorológicos (IFI, EIE e DPP) e molecular (PCR) com o padrão de referência (cultura parasitológica);
- ✓ Investigar a presença de *Leishmania* em fragmentos de pele íntegra, lesões cutâneas e baço através do isolamento em cultura axênica;
- ✓ Descrever as espécies de *Leishmania* isoladas em cultura, empregando a técnica de eletroforese de enzimas;
- ✓ Investigar a presença de DNA de *Leishmania*, através da PCR, em fragmentos de pele íntegra no grupo de animais estudados;
- ✓ Identificar no município do Rio de Janeiro as localidades com sobreposição de *L. braziliensis*, *L. chagasi* ou de outros tripanosomatídeos;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo de procedimentos realizado nos animais foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- FIOCRUZ) e aprovado sob licença N° L-023/06 (Anexo 1).

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo e seccional com amostra de todos os cães sororretores para *Leishmania*, identificados no inquérito realizado no município do Rio de Janeiro no ano de 2008 e que foram encaminhados para eutanásia.

Este projeto foi desenvolvido em parceria com a Secretaria Estadual de Saúde (SES/RJ), Secretaria Municipal Saúde (SMS/RJ) e Ministério da Saúde (MS).

4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

O inquérito e os exames para identificação dos animais sororretores foi realizado pelo Serviço de Epidemiologia da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro. Os animais foram diagnosticados através da IFI, em sangue dessecado em papel filtro (eluato), usando o “kit” IFI-leishmaniose-Bio-Manguinhos (IFI-LC) que usa como antígeno formas promastigotas de *Leishmania major*-like (MHOM/BR/76/JOF).

Todos os animais que apresentaram anticorpos específicos para *Leishmania*, com titulação ≥ 40 , foram recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ/RJ) para eutanásia, no prazo máximo de 30 dias, cumprindo as recomendações do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Todos os animais sororretores foram encaminhados para o Lapclin-Dermzoo para eutanásia e coleta de espécimes clínicos. Todas as informações obtidas no decorrer deste estudo foram armazenadas em banco de dados informatizado.

4.4 MANEJO DOS ANIMAIS

4.4.1 Exame clínico

Todos os animais que fizeram parte deste estudo cumpriram os mesmos protocolos para avaliação clínica, coleta de amostras e eutanásia. Durante a avaliação, foi preenchida uma ficha com os dados clínicos obtidos no momento da eutanásia e informações gerais do animal (Anexo 2), extraídas da ficha de encaminhamento do cão fornecida pelo CCZ/RJ.

Os cães foram contidos mecanicamente e sedados, por via intramuscular com cloridrato de quetamina (10 mg/Kg) associado à acepromazina (0,2 mg/Kg) para coleta de sangue periférico, exame clínico e dermatológico, observando a presença de lesões cutâneas e mucosas, especificando o número, localização e características.

Cada cão recebeu uma numeração única em ordem seqüencial de SE001 até SE167. A identificação dos frascos contendo as amostras biológicas foi realizada com caneta permanente, mantendo a mesma numeração da ficha de avaliação preenchida.

Os animais foram classificados como assintomáticos (sem nenhum sinal clínico), oligossintomáticos (1 a 3 sinais clínicos) e sintomáticos (mais de 3 sinais clínicos) baseados nos critérios estabelecidos por Mancianti et al. (1988).

4.4.2 Coleta de sangue

De cada animal, antes da eutanásia, foi coletado cerca de 10 mL de sangue sem anticoagulante por punção da veia jugular ou cefálica. Após retração completa do coágulo, o sangue foi centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos, separando-se o soro que foi estocado à -20° C para posterior realização dos testes sorológicos.

4.4.3 Eutanásia e coleta de espécimes clínicos

Após o exame clínico e coleta de sangue, os animais foram eutanasiados com a administração intravenosa (IV) na veia cefálica de tiopental sódico 5% (dose-efeito) utilizando seringa de 10 mL e dispositivo para infusão intravenosa até parada cardiorrespiratória confirmada através de palpação de pulso femoral e ausculta cardíaca.

Foram coletados fragmentos de pele íntegra, baço e lesões cutâneas e mucosas, quando presentes para realização da cultura parasitológica e PCR. A biópsia de pele íntegra foi obtida da região escapular após tricotomia, higienização com água e sabão, anti-sepsia com álcool a 70%, com auxílio de *punch* de 3 mm. Quando havia lesão cutânea e/ou mucosa, a biópsia era realizada como descrita para pele íntegra.

Para cultura, a amostra tecidual (pele, lesão e baço) foi acondicionada em solução salina estéril, contendo 100µg de 5-fluorocitosina; 1000UI de penicilina G potássica e 200µg de estreptomicina por mL. Para a técnica de PCR, somente foram processadas amostras de pele íntegra, as quais foram colocadas em tubo tipo “eppendorf” estéril e estocadas à -20° C até a realização da técnica.

Após necropsia, as carcaças dos animais foram devidamente embaladas e congeladas até serem enviadas para cremação.

4.5 TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO

4.5.1 Técnicas sorológicas

4.5.1.1 Imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (EIE)

Para pesquisa de anticorpos específicos anti-*Leishmania* utilizou-se o “kit” IFI-leishmaniose-Biomanguinhos (IFI-LC) que usa como antígeno formas promastigotas de *Leishmania major*-like (MHOM/BR/76/JOF) e o “kit” EIE-leishmaniose-visceral-canina-Biomanguinhos (EIE-LVC) com antígenos solúveis de formas promastigotas de *Leishmania major*-like (MHOM/BR/76/JOF), ambos produzidos por Bio-manguinhos/Fiocruz. Os testes foram realizados pelo Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (Bio-manguinhos/Fiocruz), de

acordo com as recomendações do fabricante. Em ambos os testes foram empregadas amostras de soro obtidas no momento da eutanásia.

Seguindo o mesmo protocolo dos “kits” comerciais de IFI e EIE, as técnicas foram realizadas com antígenos de formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*. Utilizou-se uma amostra de referência de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) que foram expandidas em meio de cultura Schneider, enriquecido com 10% de soro fetal bovino.

Para a reação de IFI foi utilizado cerca de 100 mL de cultura. As amostras foram transferidas para tubos cônicos estéreis e submetidas a centrifugações (7000 rpm) a 4° C durante 10 minutos. Esta operação foi repetida por duas vezes, utilizando salina acrescida de fosfatos (PBS pH 7,2). Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspensão em formalina tamponada (10%) e estocada em geladeira até o uso, não ultrapassando o período de 60 dias. No momento do uso, a amostra foi diluída até obter cerca de 40 parasitas por campo, observada em aumento de 400 vezes.

Para o EIE, o antígeno foi lavado como mencionado acima, sendo que após a última lavagem, o sedimento foi ressuspensão em tampão de lise contendo inibidores de proteases e submetidos a ciclos de congelamento (gelo seco + etanol) e descongelamento (banho-maria a 60° C) e posteriormente submetido durante duas horas no ultra-som (Transsonic 310-Elma, Durhan, NC, EUA) para o rompimento total dos parasitas. A seguir, o material foi centrifugado (10000g/5minutos/4° C) e o sobrenadante coletado para dosagem do teor protéico pelo método de Folin-Lowry (LOWRY et al., 1951). O antígeno foi conservado a -20° C até o momento do uso.

Para a técnica de IFI, foram consideradas positivas as amostras que apresentaram fluorescência nas diluições iguais a 1:40. Para o EIE, os soros foram diluídos a 1:40 em duplicata e o ponto de corte foi estabelecido pela média das leituras dos controles negativos mais duas vezes o desvio padrão dos mesmos. Dessa forma, a reatividade era calculada pela densidade óptica (DO) dividido pelo ponto de corte.

4.5.1.2 Teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma (*Dual Path Platform* - DPPTM)

Os soros, obtidos no momento da eutanásia, foram também avaliados pelo teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma (DPP), utilizando os antígenos

recombinantes (rK26 e rK39) de *L. (L.) chagasi*, que se encontra em fase de validação para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

Com uma alça fornecida pelo “kit” coletou-se uma gota do soro (cerca 5 μ L) previamente descongelado e aplicou-se no poço de n° 1 do suporte do teste adicionando em seguida duas gotas de tampão, também fornecido pelo “kit”. Após cinco minutos, aplicaram-se quatro gotas do mesmo tampão no poço de n° 2 e aguardou-se quinze minutos. Foram feitas leituras visuais (dois observadores) e computadorizada. O teste foi considerado positivo quando duas bandas, uma referente ao controle do teste e outra referente à amostra testada, apareceram após 15 minutos. 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 outro “kit”. A leitura computadorizada foi realizada utilizando um equipamento de leitura (Chembio Diagnostic System, INC) fornecido pelo fabricante. O aparelho lê a placa do teste e grava o resultado com o número da amostra em um arquivo que é transferido para o computador em forma de planilha.

4.5.2 Técnica molecular: reação em cadeia pela polimerase (PCR)

4.5.2.1 Extração de DNA

Para a PCR utilizou-se somente amostras de pele íntegra. A extração de DNA foi feita utilizando o Illustra™ Tissue & Cells Genomicprep Mini spin kit (GE Healthcare, Nova Iorque, EUA), seguindo as recomendações contidas no manual de instruções do fabricante. Cerca de 10 mg de tecido foi transferido para um tubo tipo “eppendorf” contendo 1 mL de PBS e submetido a centrifugação (16.000 x g por 2 minutos). Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e adicionado cerca de 50 μ L de PBS, sendo o tecido macerado manualmente com auxílio de um pistilo.

Após a maceração, 50 μ L de solução de lise e 10 μ L de solução proteinase k foram adicionados e homogeneizados durante 15 segundos, sendo em seguida, incubada em banho-seco (56° C) durante 1 hora. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 2000 x g por 10s, adicionado 5 μ L de RNase A (20mg/mL) e incubada a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida foi adicionado 500 μ L de solução lise, homogeneizando durante 15 segundos, permanecendo em repouso, em temperatura ambiente, por 10 minutos. Ao final, a amostra foi

transferida, através de uma mini coluna, para outro tubo fornecido pelo “kit” e submetida à centrifugação (11.000 x g por 1 min). Em seguida, o sobrenadante foi descartado, adicionado 500 µL de solução lise e novamente centrifugado (11.000 x g por 1 minuto). Nesta etapa, o sobrenadante foi descartado e adicionado ao “pellet” 500 µL de tampão “wash buffer”, homogeneizado e repetido a centrifugação, adicionando 50 µL de “elution buffer” e, após 1 minuto, centrifugado (11.000 x g por 1 min). As eluições foram identificadas com data e código da extração e estocadas abaixo de -10° C.

4.5.2.2 Avaliação do DNA extraído por espectrofotometria

Para quantificação do DNA extraído foram utilizados 3 µL do mesmo acrescentando 57µL de solução de hidratação e realizando forte agitação em aparelho vortex durante 10 segundos. O espectrofotômetro foi calibrado utilizando um controle (branco) sendo concentração e a pureza da extração de DNA verificadas em absorbância de 260-280nm (A260-280), respectivamente. A concentração de DNA na amostras foi expressa em nanogramas/microlitros (ng/µL). Valores de 1,80 a 2,00 foram aceitos como referência para a medida de absorbância.

4.5.2.3 Amplificação de DNA

Todas as amostras foram submetidas a protocolos já padronizados e utilizados no Vigileish.

A amplificação foi realizada utilizando o par de oligonucleotídeos: 5' - (G/C)(G/C) (C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC - 3' e 5'- GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA - 3' que amplificam um fragmento de 120 pares de base (bp) que corresponde a uma região conservada no minicírculo do kDNA de espécies do gênero *Leishmania* (DEGRAVE et al., 1994).

A reação foi realizada em volume final de 25,0 µL, contendo tampão Tris-HCL (10mM), MgCl₂ (1,5mM), dNTPs (0,2mM), Taq DNA Polimerase (2,5U), DNA da amostra (5µL) e água ultra pura para PCR. Os ciclos de amplificação iniciaram-se a 94° C por 15 min,

seguido por 30 ciclos a 94° C por 30s, 55° C por 30s, 72° C por 30s e uma extensão final de 72° C por 10 min, realizado em termociclador automático (PTC-100 Pelthier Thermal Cycler MJ Research, GMI Inc., Minesota, EUA). Como controle positivo para cada reação foi utilizado 5 ng/μL da cepa referência de *Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75), e como controles negativos (todos os componentes da reação, exceto o DNA, e uma amostra de DNA negativo para *Leishmania*).

Foram realizadas duas amplificações para cada amostra e os resultados discordantes foram submetidos a uma nova amplificação. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 2%, impregnado por brometo de etídio, submetido a uma corrida de 80 V por aproximadamente 2h. Foi utilizado o marcador de tamanho de DNA - 100 bp Ladder DNA Marker (Real Biotech Corporation, Taiwan, China) na concentração de 1 μg/μL, aplicado em um “slot” do gel de agarose. O gel foi visualizado e fotografado em aparelho de sistema digital L-PIX HE (Loccus Biotecnologia®, São Paulo, Brasil).

4.5.3 Técnica parasitológica: cultura para *Leishmania*

As amostras de pele íntegra, lesões cutâneas e de baço foram coletadas e encaminhadas para o Vigileish para processamento da cultura e isolamento parasitário. Inicialmente, as amostras foram lavadas em solução salina acrescida de antibiótico e antifúngico como descrito no item 4.4.3 e mantidos à temperatura de 4°C durante 24 horas. Após este período, os fragmentos foram transferidos, de forma asséptica, para tubos contendo meio bifásico NNN acrescido de meio Schneider Insect Medium (Sigma) suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB-Cultilab) contendo antibióticos associados (penicilina G potássica: 200 unidades/mL e estreptomicina: 100 unidades/mL). Os tubos foram mantidos em estufa incubadora B.O.D. com temperatura de 26-28° C durante 30 dias e a partir do 5° dia, em intervalos semanais, exames a fresco foram realizados para verificar a presença de formas promastigotas de *Leishmania*. Nos casos positivos, a amostra foi criopreservada em nitrogênio líquido (N₂).

4.6 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS ISOLADAS EM CULTURA PELA ELETROFORESE DE ISOENZIMAS

4.6.1 Recuperação das amostras criopreservadas

Os isolados criopreservados provenientes dos cães foram retirados para realização da expansão parasitária. Inicialmente, após descongelamento em temperatura ambiente, realizou-se exame a fresco para observação da motilidade das formas promastigotas, sendo o conteúdo (cerca de 1 mL) semeado em dois tubos contendo meio NNN acrescido de meio Schneider suplementados com 10% de SFB contendo antibióticos associados (Penicilina G potássica: 200 unidades/mL e estreptomicina 200 µg/mL). Os tubos foram examinados semanalmente por meio de exames a fresco em microscópio óptico e quando observado crescimento satisfatório as amostras foram repicadas para obtenção da massa parasitária.

4.6.2 Expansão das culturas

Para obtenção da massa parasitária, empregada na técnica de isoenzimas, é necessário um número de parasitas na ordem de 10^9 . Para tal, as amostras crescidas em tubos, foram transferidas, com inóculo aproximado de 10%, para garrafas de cultivo celular (TPP – 75cm²) contendo meio bifásico (NNN/Schneider) acrescido de 10% de SFB e antibióticos na mesma proporção citado para o isolamento. O crescimento foi acompanhado em microscópio invertido, adicionando-se meio Schneider completo em volumes e intervalos de acordo com o crescimento da amostra, até obtenção de um volume de cultura com cerca de 60-80 mL. Em fase exponencial, a cultura foi transferida para tubos tipo FALCON de 50 mL e centrifugada a 7000 rpm por 10 minutos a 4° C. Após desprezar o sobrenadante as culturas foram submetidas a duas lavagens utilizando solução tampão de lavagem (NaCl 0,85% adicionada de 0,01M de EDTA, pH 8,0).

4.6.3 Eletroforese de isoenzimas (MLEE)

O estudo isoenzimático das amostras foi realizado por eletroforese em gel de agarose, seguindo protocolos descritos por Cupolillo et al.(1994).

A preparação do gel de agarose foi realizada na concentração de 1% em diluição de 1:2 de água destilada e solução tampão de reação. O tipo de tampão utilizado foi escolhido segundo a enzima a ser testada, sendo o mesmo tampão utilizado nas corridas eletroforéticas (Quadro 1).

Foi utilizada agarose do Tipo V (Sigma) acrescido do tampão (maleico ou fosfato) e dissolvida em água. Após a solução de agarose (cerca de 50 mL) foi derramada uniformemente sobre um suporte de poliestireno (Filme Gelbond®, GE Healthcare, Nova Iorque, EUA).

Para aplicação das amostras a serem testadas, foi colocada sobre o gel uma fita plástica contendo 24 retângulos vazados e equidistantes que foram numeradas de acordo com a ordem da aplicação das amostras, as quais foram identificadas em formulário próprio. Inicialmente, aplicou-se cerca de 5 µL da solução corante (34 mg de azul de bromofenol e 28 mg xilencianol dissolvidos em 10 mL de água destilada e estocado a 4° C) nas ranhuras das extremidades do gel, objetivando gerar um marcador, facilitando a visualização da corrida eletroforética.

Empregando um pipetador automático, cerca de 10µL de cada amostra foi aplicado em cada um dos quadrículos da fita. Essas amostras foram absorvidas pelo gel e quando completamente secas a fita plástica foi retirada. O gel, então, foi transferido para uma cuba de eletroforese horizontal (Pharmacia Biotech modelo Multiphor II) acoplada a um banho-maria com circulação constante de água, a refrigeração em torno de 4° C. O tampão (maleico ou fosfato, dependendo do sistema enzimático), foi colocado nas laterais da cuba e feito uma ponte para condução de energia entre os eletrodos (pólo positivo e pólo negativo) e o gel.

Aplicou-se uma corrente elétrica de 40 volts para as corridas realizadas em tampão fosfato e de 60 volts para as corridas em tampão maleico. O término da corrida foi determinado quando os corantes alcançavam a extremidade do gel com o primeiro ou segundo marcador dependendo do sistema enzimático a ser revelado. A revelação da atividade enzimática foi feita acondicionando os géis em recipientes plásticos e colocando-se

diretamente sobre ele uma mistura contendo os substratos, transportadores e receptores de elétrons, cofatores e tampões próprios para cada sistema enzimático estudado. Visando facilitar a revelação, os géis foram colocados no escuro em estufa a 37° C e assim que as bandas foram visualizadas no gel, a reação foi interrompida, colocando-se sobre o gel uma solução de ácido acético a 5%, sendo tal solução trocada até que o excesso de corante do sistema revelador fosse completamente eliminado do gel, deixando-os apenas com as bandas eletroforéticas marcadas.

Foram estudados cinco sistemas enzimáticos: glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH; E.C.1.1.1.49); fosfoglucoase isomerase (GPI; E.C.5.3.1.9); nucleosídeo hidrolase (NH; E.C.3.2.2.1); enzima málica (ME, E.C.1.1.1.40); 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH; E.C.1.1.1.43). A posição das bandas, reveladas no gel, foram analisadas por comparação com os perfis de amostras de referência, que foram empregadas em todas as corridas eletroforéticas: *L. (V.) braziliensis* - MHOM/BR/75/M2903, *L. (L.) chagasi* - MHOM/BR/74/PP75 e *L. (L.) amazonensis* - IFLA/BR/67/PH8.

Quadro 1. Soluções tampão utilizadas na preparação dos géis e nas corridas eletroforéticas
Utilizado nos seguintes sistemas enzimáticos: 6PGDH, GPI, NH
Utilizado nos seguintes sistemas enzimáticos: G6PDH, ME

Solução Tampão	Reagentes e preparo
1. Tampão Tris Maleico, pH 7,4	Tris base (24,22g), ácido maleico (10,0g), MgCl ₂ (0,19g), EDTA (0,74g). Água q.s.p 2 litros. Dissolver todos os reagentes e acertar o pH para 7,4. Estocar a 4° C
2. Tampão Fosfato, pH 8,0	Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O (solução A - estoque 1M), NaH ₂ PO ₄ (solução B - estoque 1M). Mistura 13,6 mL da solução A e 186,4 mL da solução B e completa para 1litro com água destilada. Estocar a temperatura ambiente

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com auxílio do programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 16.0 foi realizada uma análise descritiva quanto à região de moradia, ao estado clínico, sexo,

raça, número de lesões e os resultados dos exames realizados por descrição de frequências. Para avaliar a concordância das técnicas realizadas foi empregada a medida Kappa (k), conforme a classificação de Shrout (1998) demonstrada no quadro 2. A cultura parasitológica positiva para *L. (L.) chagasi* foi utilizada como padrão de referência para o cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia das técnicas de IFI, EIE, DPP e PCR.

Quadro 2. Valores do índice Kappa (k) e sua classificação segundo Shrout (1998)

k	Interpretação
0,00 a 0,10	Virtualmente ausente
0,11 a 0,40	Fraca
0,41 a 0,60	Discreta
0,61 a 0,80	Moderada
0,81 a 1,00	Substancial

5. RESULTADOS

5.1 ANIMAIS ESTUDADOS

Cento e sessenta e oito animais sororretores para *Leishmania* foram identificados durante o inquérito, realizado no período compreendido entre março e setembro de 2008. Desse grupo, 13 animais não foram encaminhados para o Lapclin-Dermzoo por motivos de morte do animal ou recusa na entrega pelo proprietário, sendo estudados 155 animais provenientes de diferentes bairros (Figura 1).

Dos 155 cães avaliados, 52% eram fêmeas e 48% machos, sendo que, 74% eram sem raça definida (SRD) (Figura 2). Vinte e oito cães apresentavam lesões cutâneas localizadas em diferentes sítios anatômicos (Figura 3). Quanto ao estado geral, em 72% dos animais foi considerado bom, 22% regular e 6% ruim.

Com relação à condição corporal, 5% animais foram considerados muito magros, 23% magros, 63% normais, 5% obesos e em 4% não foram preenchidos no formulário. Clinicamente, 40% foram considerados assintomáticos, 54% oligossintomáticos e 6% sintomáticos para LVC (Figura 4).

Quanto à presença de ectoparasitas, 49 animais tinham infestação de pulgas, 32 possuíam infestação de carrapatos, em 30 animais havia infestação de pulgas e carrapatos e um animal apresentava miíase.

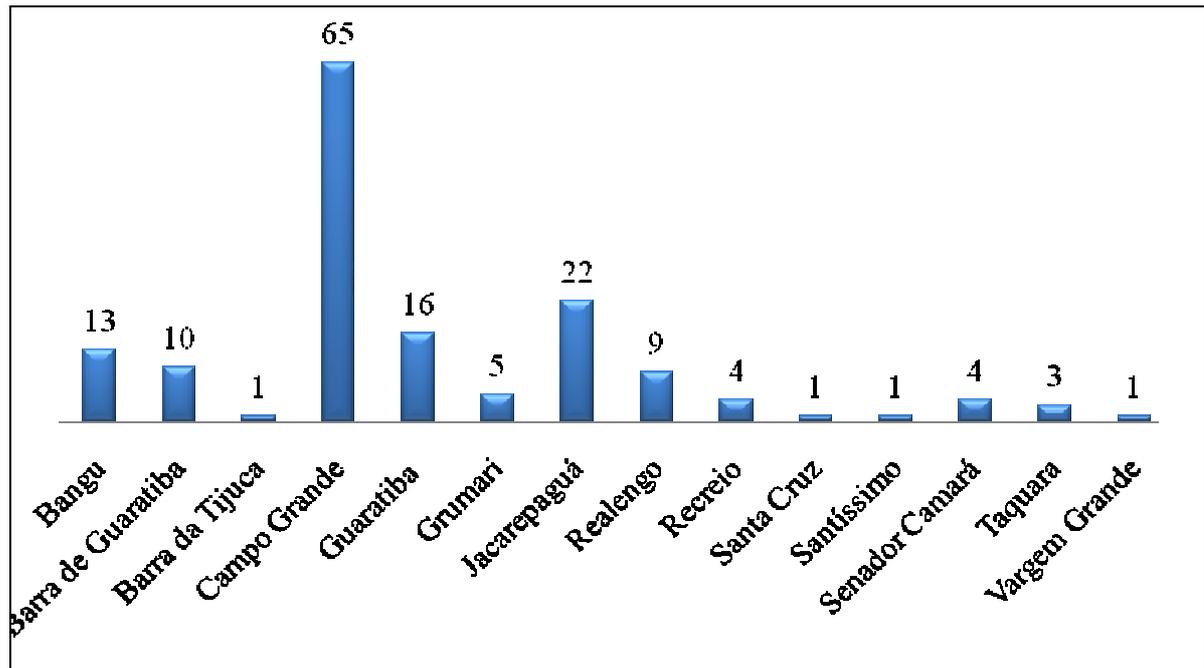


Figura 1. Distribuição dos 155 cães, por bairro de origem, avaliados no município do Rio de Janeiro (2008).

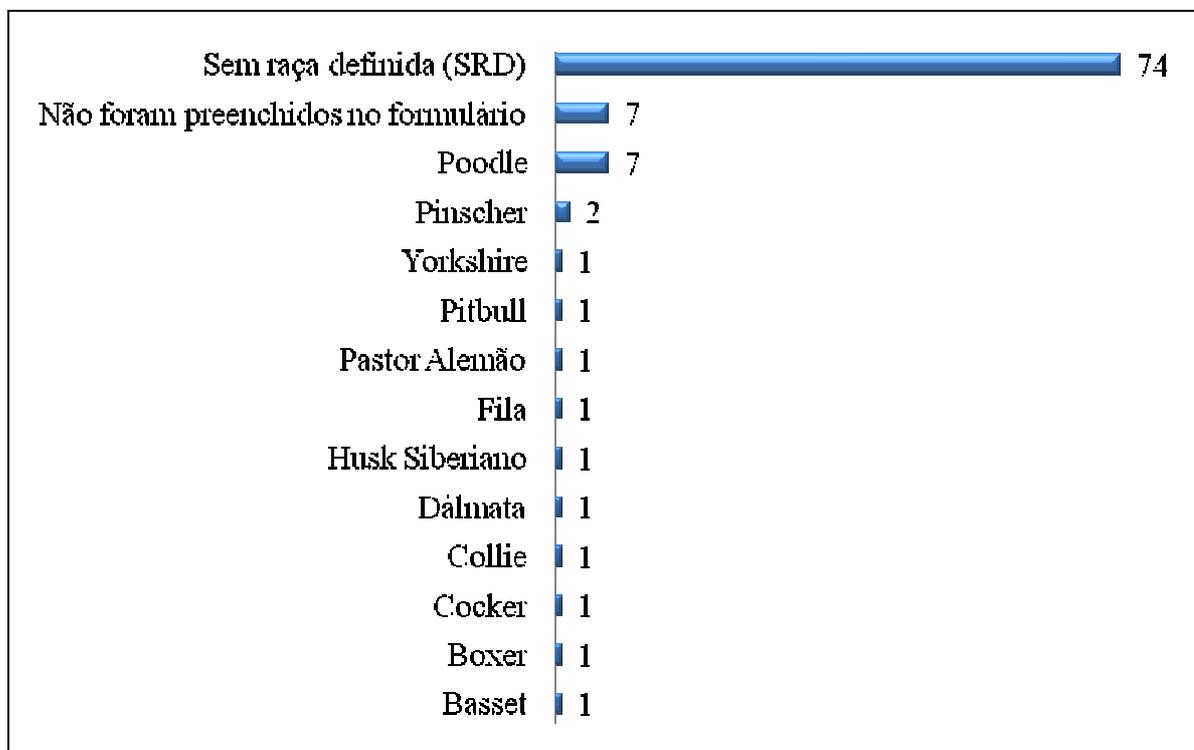


Figura 2. Percentual da variável raça dos 155 cães avaliados no município do Rio de Janeiro (2008).

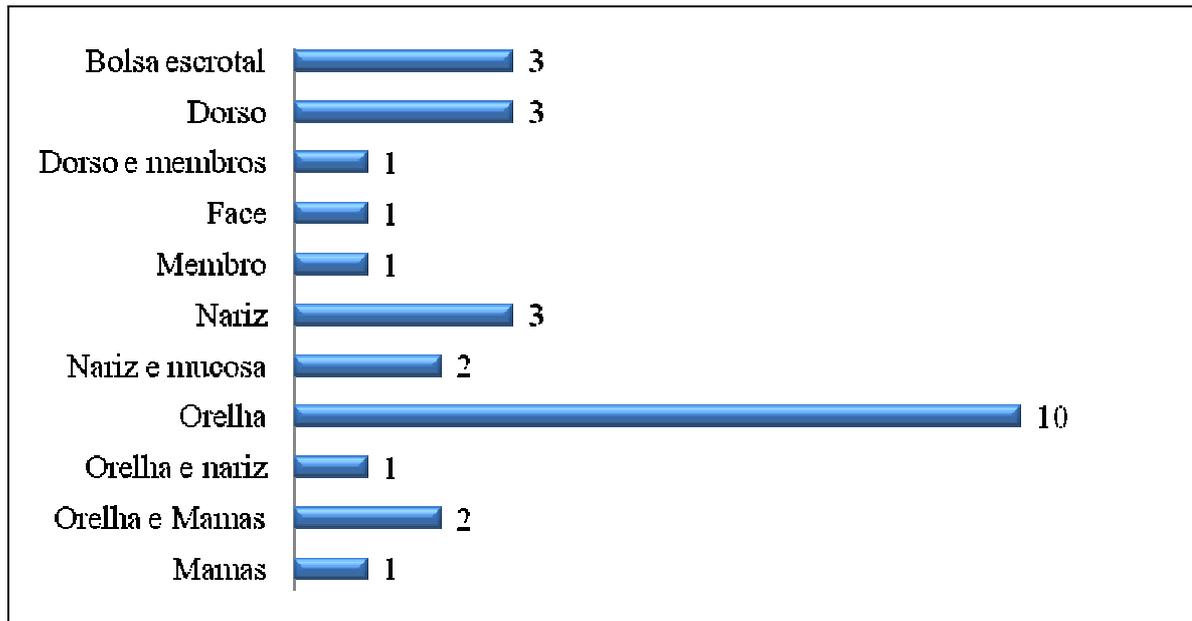


Figura 3. Localização e número de lesões cutâneas observadas em 28 de 155 cães avaliados no município do Rio de Janeiro (2008).

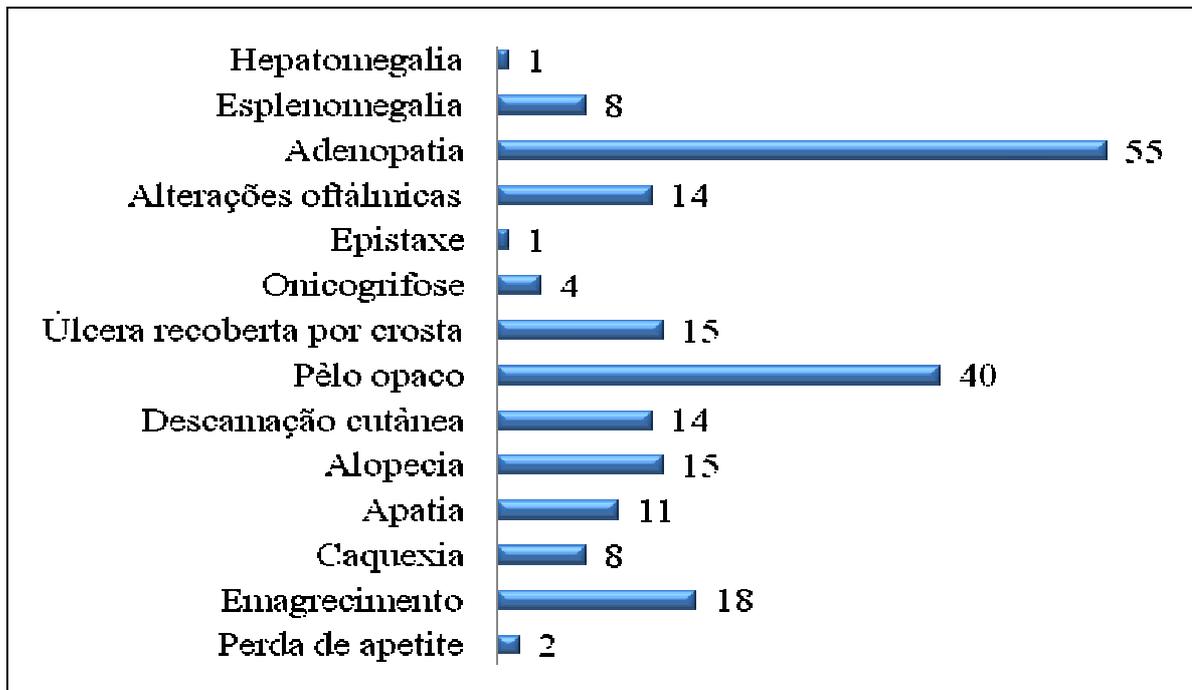


Figura 4. Distribuição dos principais sinais clínicos característicos de leishmaniose visceral canina encontrados nos 155 cães avaliados no município do Rio de Janeiro (2008).

5.2 SOROLOGIA

Anticorpos específicos para *Leishmania* foram pesquisados em 144 amostras, pelas técnicas de IFI e EIE utilizando antígeno heterólogo (*L. major*-like) e homólogo (*L. chagasi*) em ambos os testes. Ocorreu a perda de 11 amostras devido ao extravasamento do soro ou perda da identificação dos tubos. Os resultados e a interpretação dos testes sorológicos realizados estão descritos na tabela 1 e quadro 3, respectivamente. A sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia foram calculadas, utilizando como padrão de referência, a cultura parasitológica positiva para *L. (L.) chagasi* (tabela 2). Em 39% dos animais (56/144) a reatividade sorológica para *Leishmania* foi confirmada nas amostras de soro, independente das técnicas ou antígenos empregados.

Os resultados obtidos do cálculo do índice kappa para verificação da concordância das técnicas realizadas estão na tabela 3.

Quando os resultados obtidos nos testes de IFI com os antígenos de *L. major*-like e *L. chagasi* foram comparados com o DPP, a concordância entre os testes foi considerada fraca e moderada, com valores de kappa (k) = 0,39 e 0,70, respectivamente. Nos testes de EIE com o antígeno de *L. major*-like e *L. chagasi* comparados com o DPP, a concordância foi moderada com valores de k = 0,61 e 0,72, respectivamente.

Quando os resultados obtidos nos testes de EIE com o antígeno de *L. major*-like e *L. chagasi* foram comparados com IFI com antígeno de *L. chagasi* a concordância foi discreta (k = 0,51) e moderada (k = 0,67), respectivamente.

A concordância entre os testes foi moderada (k = 0,77) quando os resultados obtidos no EIE com antígenos de *L. chagasi* e *L. major*-like foram comparados. Quando os resultados encontrados no EIE com antígenos de *L. major*-like e *L. chagasi* foram comparados com IFI *L. major*-like a concordância entre os testes foi discreta com valores de k = 0,41 e 0,42, respectivamente.

Quando o resultado obtido no teste de IFI com antígeno de *L. major*-like foi comparado com IFI *L. chagasi* a concordância foi fraca (k = 0,38).

Tabela 1. Resultado da reavaliação sorológica realizada em amostras de soro de 144 cães através das técnicas Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (EIE) e o *Dual Pack Platform* (DPPTM) no município do Rio de Janeiro (2008).

Resultado n (%)	Testes Sorológicos/Antígenos Empregados				
	IFI		EIE		DPP TM
	<i>L. major-like</i>	<i>L. chagasi</i>	<i>L. major-like</i>	<i>L. chagasi</i>	
Positivo	41 (28%)	14 (10%)	31 (22%)	25 (17%)	24 (17%)
Negativo	103 (72%)	130 (90%)	113(78%)	119 (83%)	120 (83%)
Total	144 (100%)	144 (100%)	144 (100%)	144 (100%)	144 (100%)

Quadro 3. Interpretação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia da reavaliação sorológica realizada em amostras de soro de 144 cães através das técnicas Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (EIE) e o *Dual Pack Platform* (DPPTM), utilizando como padrão de referência a cultura parasitológica no município do Rio de Janeiro (2008).

	Interpretação
Sensibilidade	EIE <i>L. chagasi</i> > (EIE <i>L. major-like</i> = DPP) > IFI <i>L. major-like</i> > IFI <i>L. chagasi</i>
Especificidade	IFI <i>L. chagasi</i> > (EIE <i>L. chagasi</i> = DPP) > EIE <i>L. major-like</i> > IFI <i>L. major-like</i>
VPP	IFI <i>L. chagasi</i> > EIE <i>L. chagasi</i> > DPP > EIE <i>L. major-like</i> > IFI <i>L. major-like</i>
VPN	EIE <i>L. chagasi</i> > (EIE <i>L. major-like</i> = DPP) > IFI <i>L. major-like</i> > IFI <i>L. chagasi</i>
Acurácia	EIE <i>L. chagasi</i> > (IFI <i>L. chagasi</i> = DPP) > EIE <i>L. major-like</i> > IFI <i>L. major-like</i>

Tabela 2. Resultado da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia da reavaliação sorológica realizada em amostras de soro de 144 cães através das técnicas Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (EIE) e o *Dual Pack Platform* (DPPTM), utilizando como padrão de referência a cultura parasitológica no município do Rio de Janeiro (2008).

Resultado (%)	Testes Sorológicos/Antígenos Empregados				
	IFI		EIE		DPP TM
	<i>L. major-like</i>	<i>L. chagasi</i>	<i>L. major-like</i>	<i>L. chagasi</i>	
Sensibilidade	73%	60%	93%	100%	93%
Especificidade	77%	96%	87%	92%	92%
VPP	27%	64%	45%	60%	58%
VPN	96%	95%	99%	100%	99%
Acurácia	76%	92%	88%	93%	92%

Tabela 3. Concordância das técnicas realizadas no estudo através do cálculo do índice kappa e sua classificação segundo Shrout et al. (1998) utilizando como padrão de referência a cultura parasitológica no município do Rio de Janeiro (2008).

Índice kappa (concordância)	Técnicas Realizadas				DPP TM	PCR
	IFI		EIE			
	<i>L. major-like</i>	<i>L.chagasi</i>	<i>L. major-like</i>	<i>L. chagasi</i>		
Cultura parasitológica	0,28 fraca	0,57 discreta	0,54 discreta	0,71 moderada	0,67 moderada	0,65 Moderada

5.3 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO: CULTURA E IDENTIFICAÇÃO ETIOLÓGICA

Dos 155 cães estudados, foi possível o isolamento parasitário em 29 (19%) animais. Formas promastigotas foram isoladas do sítio de pele íntegra de quatro animais; de lesão cutânea em cinco; de baço em quatro; lesão, pele e baço em um; lesão e pele em dois; pele e baço em cinco; lesão e baço em um animal. Formas epimastigotas foram isoladas de amostras de pele íntegra em sete animais.

Após a caracterização por isoenzimas, utilizando os isolados dos diferentes sítios observamos que:

a) Quatorze (48%) animais estavam parasitados por *L. (L.) chagasi*. Essa espécie foi isolada de fragmentos de pele íntegra, lesão e baço. Três animais foram considerados sintomáticos para LVC, nove oligossintomáticos e dois animais eram assintomáticos.

b) Cinco (17%) animais estavam parasitados por *L. (V.) braziliensis*. Essa espécie foi isolada exclusivamente de fragmentos de lesões cutâneas de três animais assintomáticos e dois oligossintomáticos para LVC.

c) Um (4%) animal apresentou infecção mista por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*. *L. (V.) braziliensis* foi isolada de lesão no nariz e *L. (L.) chagasi* de fragmento de baço. O animal encontrava-se oligossintomático para LVC.

d) Sete (24%) cães estavam parasitados por *Trypanosoma caninum*. Desses animais, formas epimastigotas foram isoladas exclusivamente de fragmentos de pele íntegra, sendo três assintomáticos, três oligossintomáticos e um sintomático para LVC. Estas amostras foram identificadas, em outro estudo, por PCR e sequenciamento molecular (dados em fase de publicação).

Formas promastigotas, isoladas de fragmentos de baço de dois (7%) animais oligossintomáticos, foram perdidas e não puderam ser identificadas. Nas figuras 5 e 6 apresentamos o resultado de dois sistemas enzimáticos analisados. Na figura 7, apresentamos o mapa com a representação dos 29 isolados e suas localidades de origem.

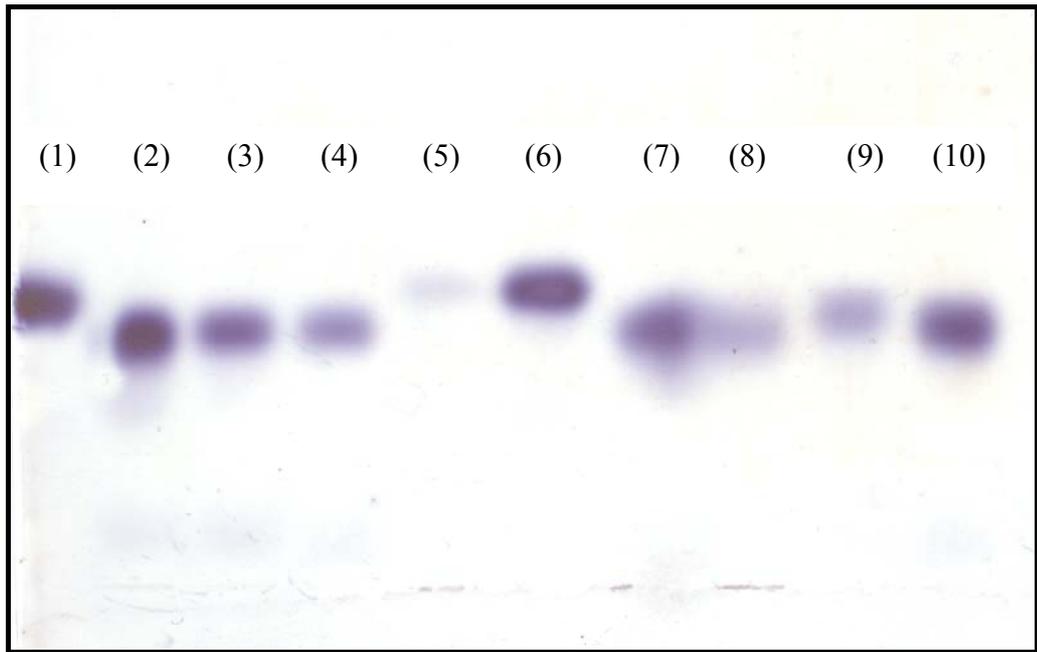


Figura 5. Perfil eletroforético apresentado pela enzima málica (ME) em amostras isoladas de lesão cutânea obtida de oito animais. (1) amostra referência de *L. (L.) chagasi*, (2) amostra referência de *L. (V.) braziliensis*, (3) amostra SE075, (4) amostra SE053, (5) amostra SE097, (6) amostra SE135, (7) amostra SE085, (8) amostra SE115, (9) amostra SE166, (10) amostra SE014 no município do Rio de Janeiro no ano de 2008.

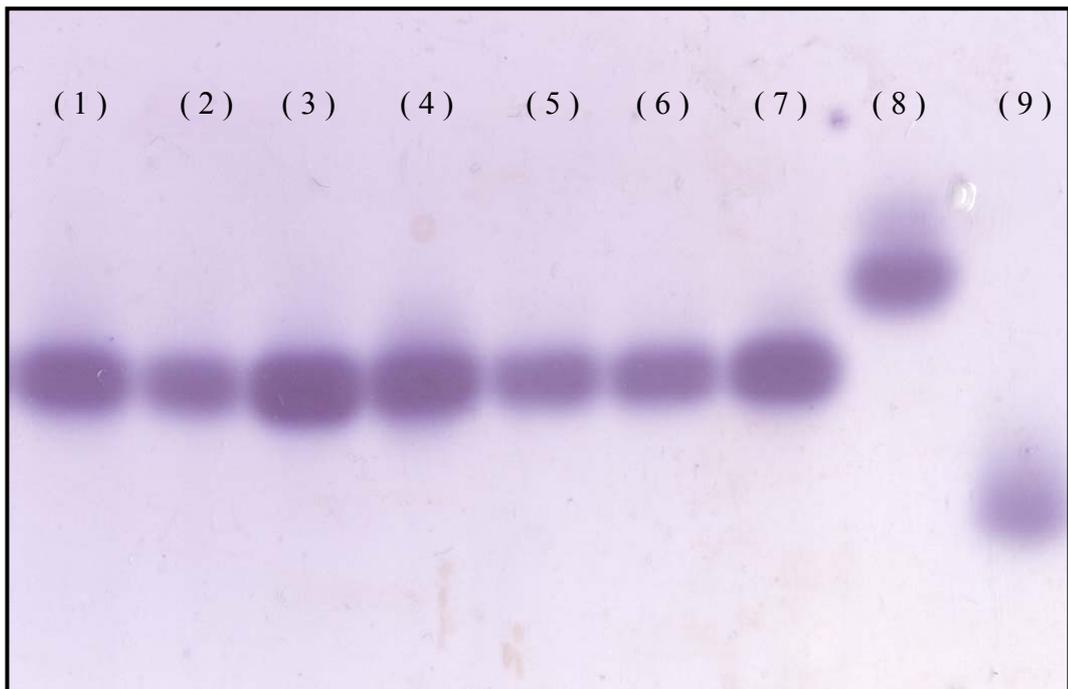


Figura 6. Perfil eletroforético apresentado pela enzima 6-phospho-glucomutase (6PGDH) em amostras isoladas de pele íntegra de seis animais. (1) amostra SE006, (2) amostra SE054, (3) amostra SE070, (4) amostra SE097, (5) amostra SE104, (6) amostra SE135, (7) amostra referência de *L. (L.) chagasi*, (8) amostra referência de *L. (L.) amazonensis*, (9) amostra referência de *L. (V.) braziliensis* no município do Rio de Janeiro no ano de 2008.

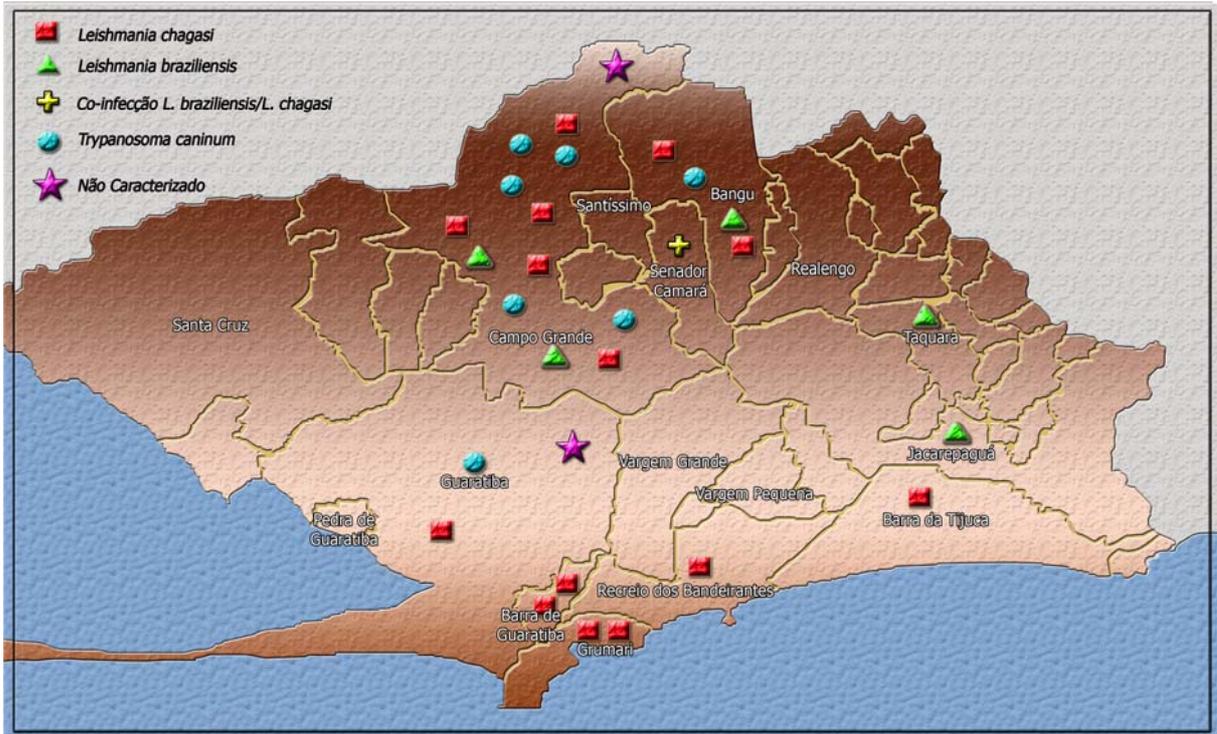


Figura 7. Mapa do município do Rio de Janeiro representando os 29 isolados obtidos no estudo de 155 cães no ano de 2008.

5.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

Amostras de pele íntegra de 150 cães foram analisadas pela PCR usando alvos para a região conservada do gênero *Leishmania*.

Dezessete animais foram considerados positivos, apresentando produtos de amplificação de 120bp. Desses animais, três apresentaram resultados negativos na cultura em amostras de pele íntegra e de baço. As amostras de pele íntegra obtida dos sete animais infectados por *T. caninum* foram negativas à PCR. As amostras de lesão cutânea não foram analisadas pela PCR.

A sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia foram de 73%, 95%, 65%, 97% e 93%, respectivamente, utilizando a cultura para *L. (L.) chagasi* como padrão de referência. As figuras 8 e 9 exemplificam alguns resultados obtidos pela PCR.

Noventa e um (59%) cães avaliados neste estudo foram negativos, simultaneamente, nas técnicas (cultura parasitológica, IFI, EIE e PCR) realizadas. Considerando que desses animais, 42% (n=38) eram assintomáticos, 53% (n=48) oligossintomáticos e 5% (n=5) sintomáticos para LVC.

Na tabela 4 é apresentado um resumo dos resultados laboratoriais obtidos dos 155 cães avaliados neste estudo. Na figura 10, temos o gráfico do número de cães que apresentaram resultado positivo para algum protozoário em pelo menos uma das técnicas realizadas no estudo de acordo com o bairro de origem. Na figura 11 temos a distribuição dos 155 cães avaliados no estudo de acordo com as diferentes técnicas realizadas.

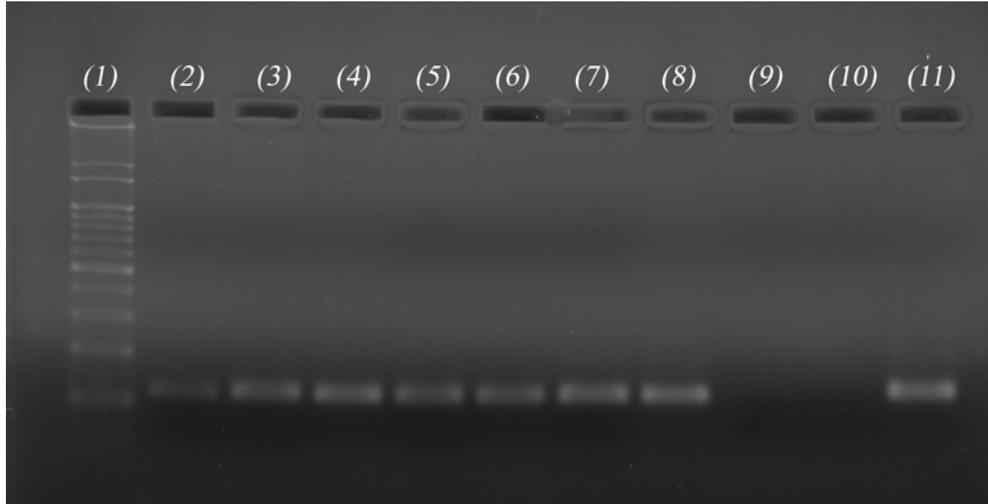


Figura 8. Eletroforese de gel de agarose 2% mostrando os produtos amplificados obtidos com oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 120 pares de base (bp) que corresponde a uma região conservada no minicírculo do kDNA de espécies do gênero *Leishmania*. (1) Marcador tamanho de DNA de 100bp, (2) amostra SE006, (3) amostra SE014, (4) amostra SE041, (5) amostra SE042, (6) amostra SE054, (7) amostra SE070, (8) amostra SE100 (9) amostra SE060, (10) Controle negativo, (11) Controle positivo de *L. (L.) chagasi* no município do Rio de Janeiro no ano de 2008.

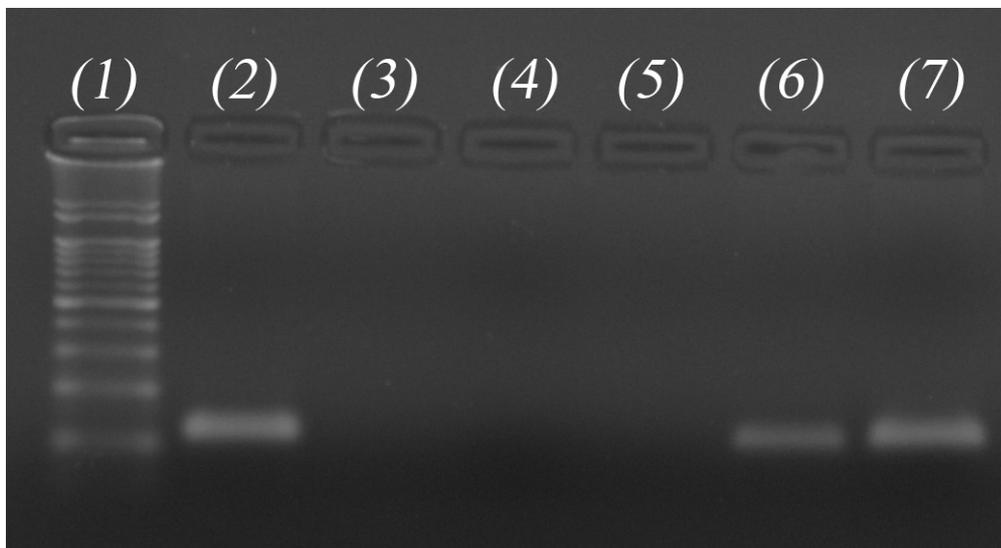


Figura 9. Eletroforese de gel de agarose 2% mostrando os produtos amplificados obtidos com oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 120 pares de base (bp) que corresponde a uma região conservada no minicírculo do kDNA de espécies do gênero *Leishmania*. (1) Marcador tamanho de DNA de 100bp, (2) amostra SE100, (3) amostra SE086, (4) amostra SE087, (5) Controle negativo (6 e 7) Controle positivo de *L. (L.) chagasi* no município do Rio de Janeiro no ano de 2008.

Tabela 4. Resultados laboratoriais dos 155 cães avaliados neste estudo no município do Rio de Janeiro no ano de 2008.

Diagnóstico pela cultura / isoenzimas	PCR (Pele) n=150	Testes sorológicos (n=144)				DPP
		IFI		EIE		
		<i>L. major</i> -like	<i>L. chagasi</i>	<i>L. major</i> -like	<i>L. chagasi</i>	
Cães infectados por <i>L.(L.) chagasi</i> n=14	11	10	8	13	14	13
Cães infectados por <i>L.(V.) braziliensis</i> n=5	2	2	-	3	2	-
Cães co-infectados por <i>L.(L.) chagasi</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> n=1	-	1	1	1	1	1
Cães infectados por <i>T. caninum</i> n=7	-	3	-	2	2	-
Cães com isolamento sem identificação n=2	1	2	1	2	1	2
Cães negativos à cultura n=126	3	23	4	10	5	8
Total: 155	17	41	14	31	25	24

PCR = Reação em cadeia pela polimerase, IFI = Imunofluorescência indireta, EIE = Ensaio imunoenzimático, DPP = Dual Pack Platform

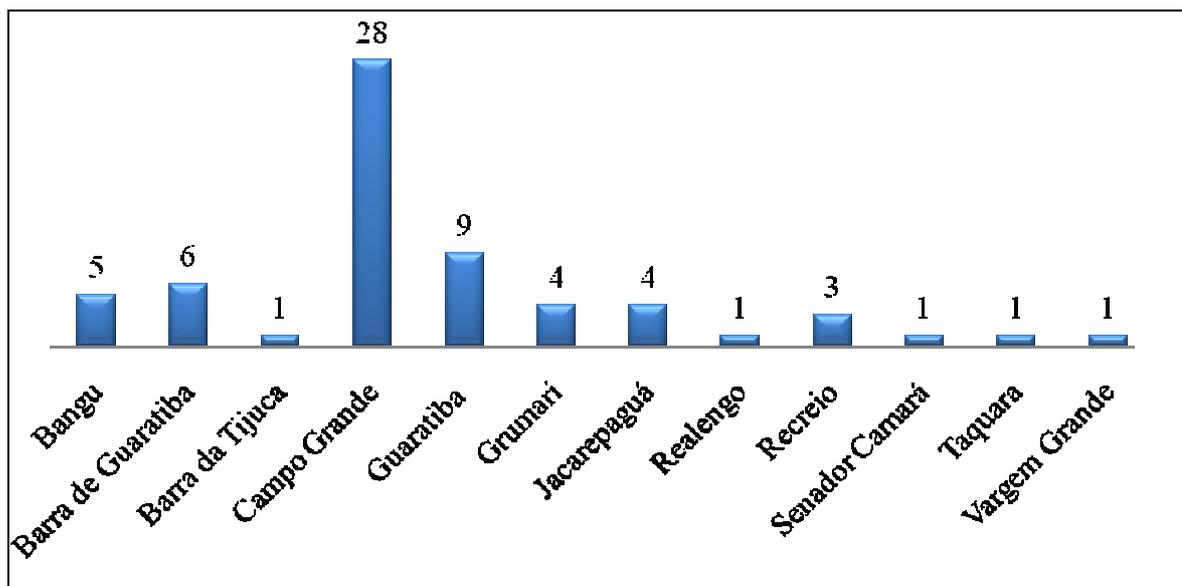


Figura 10. Distribuição dos 64 cães que apresentaram resultado positivo para algum protozoário em pelo menos uma das técnicas (IFI, EIE, DPP, PCR e cultura parasitológica) realizadas no estudo de acordo com o bairro de origem no município do Rio de Janeiro no ano de 2008.

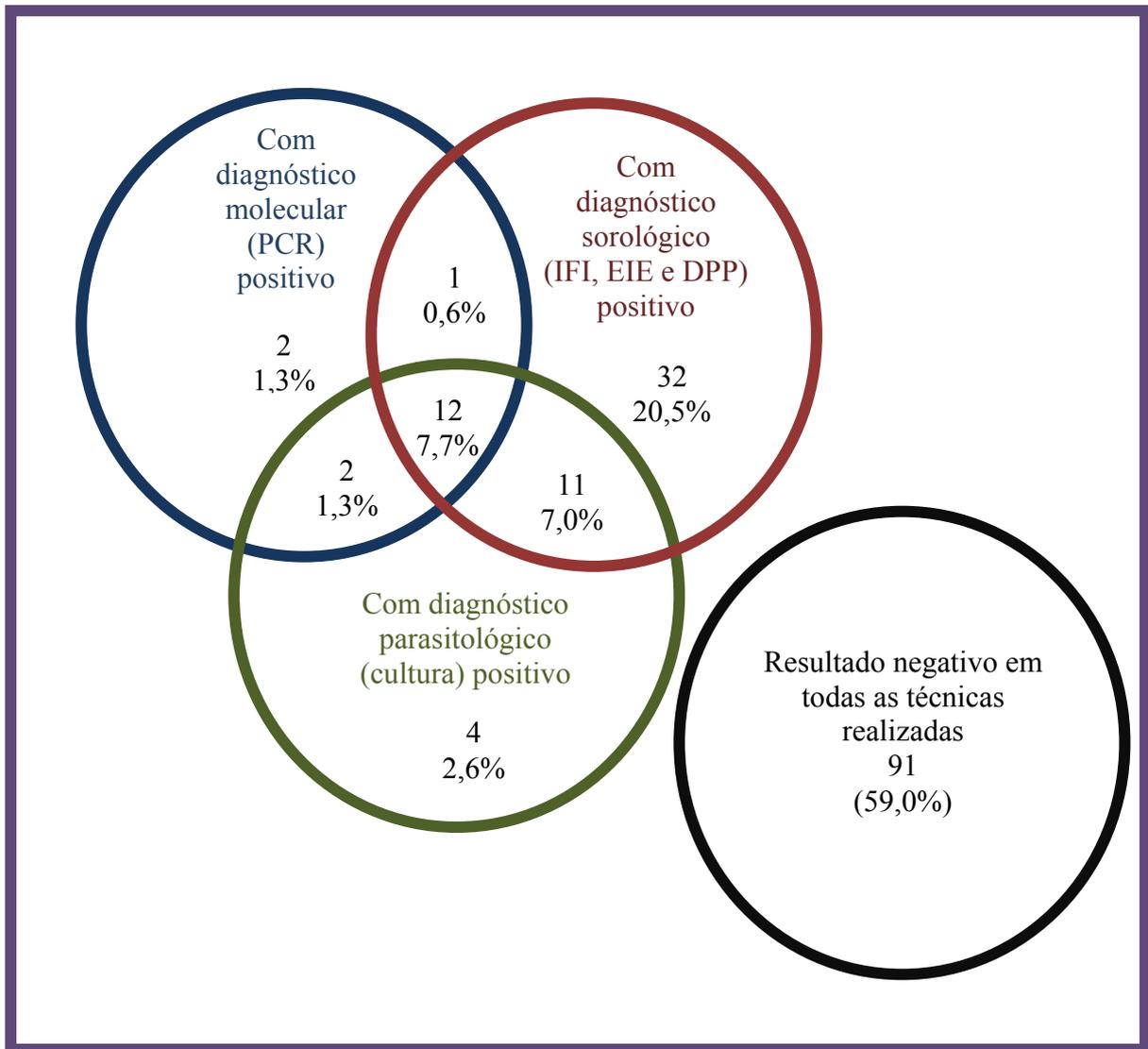


Figura 11. Distribuição dos 155 cães avaliados no município do Rio de Janeiro no ano de 2008 de acordo com as diferentes técnicas realizadas.

6. DISCUSSÃO

Cães domésticos são considerados importantes reservatórios de *L. (L.) chagasi*, agente causador da LV e LVC. Por essa razão, são alvos de atenção por parte dos órgãos responsáveis pelo controle. Nas áreas consideradas endêmicas, esses animais são avaliados por meio dos inquéritos sorológicos e os considerados sororretores são encaminhados para eutanásia, visando à interrupção do ciclo de transmissão.

Embora ferramentas sorológicas sejam de grande utilidade na identificação dos animais com LVC, ainda existe grande discussão nos aspectos que envolvem o diagnóstico e a validade da eutanásia de cães sororretores como medida de controle da LV humana (REITHINGER e DAVIES, 2002; SILVA et al., 2005).

Segundo o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), o município do Rio de Janeiro está classificado como uma área de transmissão esporádica de LV, apresentando média de casos humanos abaixo de 2,4 nos últimos cinco anos. Entretanto, casos caninos são frequentemente relatados (MADEIRA et al., 2006a; MARZOCHI et al., 2009), sendo a prática dos inquéritos caninos realizada desde 1979.

Atualmente, casos humanos não são relatados nesse município, entretanto, a permanência dos índices de soroprevalência canina, que nos últimos anos mostrou-se em elevação, constitui um fato preocupante para o controle (MARZOCHI et al., 2009).

Neste município, o controle canino era feito, por meio da técnica de IFI utilizando sangue dessecado em papel filtro (eluato) cujo resultado positivo era posteriormente confirmado utilizando soro sanguíneo e somente os animais com diluição $\geq 1:80$, resultado confirmado por três laboratórios, com critério de concordância em dois laboratórios, eram recolhidos e eutanasiados. Nessa ocasião, Madeira et al. (2006a), constataram que em 80% dos cães eutanasiados foi possível o isolamento de parasitas do gênero *Leishmania*, dos quais 59% estavam parasitados por *L. (L.) chagasi*.

Embora tal critério tenha sido utilizado por muito tempo nesse município, não correspondia à determinação preconizada no manual do Ministério da Saúde (2006) que recomenda como ponto de corte a diluição $\geq 1:40$ na IFI para eutanásia dos cães, nem

tampouco recomenda a confirmação do resultado em vários laboratórios, fato que além de demandar um custo nessa operação, demanda também, um tempo maior na retirada dos animais sororretores.

Mesmo com tanto critério, observou-se um aumento na soroprevalência canina e, por essa razão, diferentes setores responsáveis pelas ações de controle foram mobilizados, na tentativa de conhecer elementos que pudessem estar contribuindo para elevação desses índices. Ficou estabelecido que o ponto de corte, a diluição $\geq 1:40$, pela IFI em eluato seria considerado para recolhimento dos animais sororretores.

Devido à importância do cão como elo na cadeia da transmissão da LV e a mudança ocorrida para o critério de retirada e eutanásia dos cães no município do Rio de Janeiro, este estudo se propôs a avaliar, por diferentes parâmetros, cães sororretores para *Leishmania*, encaminhados para eutanásia, provenientes do inquérito realizado em 2008, com o objetivo de encontrar elementos que justificassem os índices da soroprevalência encontrados nesse município.

Cento e sessenta e oito animais foram identificados como sororretores durante o inquérito realizado no período compreendido entre março a setembro de 2008 e, desse grupo, 155 cães foram avaliados.

As técnicas sorológicas de IFI e EIE já são consolidadas em inquéritos caninos, apresentando taxas de sensibilidade e especificidade variadas, de acordo com o antígeno ou método empregado nas reações (OLIVEIRA et al., 2005b; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Sabe-se também, que o uso isolado de técnicas sorológicas na análise de rotina é limitado devido à ocorrência de resultados falsos positivos causados pela possível reação cruzada com outros agentes. Lira et al. (2006) analisaram os “kits” IFI e EIE (Bio-manguinhos/Fiocruz) e concluíram que o desempenho do EIE não é estatisticamente diferente do “kit” de IFI e para auxiliar na redução de falso-positivos devem ser usados em paralelo, dessa forma podendo aumentar a sensibilidade.

Todos os 155 cães avaliados neste estudo eram sororretores para *Leishmania* à técnica de IFI empregando eluato, entretanto, quando reavaliamos esse grupo pelo mesmo kit de IFI, com amostra de soro, encontramos 72% (103/144) dos animais com resultados negativos. Essa divergência talvez possa ser explicada pela amostra testada (eluato e soro), como já revelada em outros estudos. Palatnik-de-Sousa et al. (2004) e Figueiredo et al. (2010) demonstraram que a técnica de IFI utilizando eluato apresentou índices de acurácia diferentes quando foi comparada com a utilização de soro sanguíneo.

O grau de absorção do sangue em papel filtro e a possível desnaturação protéica durante o transporte e estocagem dessas amostras podem explicar em parte os resultados falso-negativos, como verificados no estudo de (GUIMARÃES, 1983; GOMES et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2010). Para esse estudo, talvez a goma do papel filtro tenha facilitado a aderência de anticorpos inespecíficos do parasito conduzindo para resultados falso-positivos. Em outros estudos, resultados similares no uso de eluato e soro nas técnicas de IFI e EIE têm sido encontrados (COUTINHO et al., 1985; GOMES et al., 2001).

Em um estudo conduzido no município do Rio de Janeiro, foi comprovada a presença de *L.(L.) chagasi* em cinco animais soronegativos ao eluato (FIGUEIREDO et al., 2010). Este resultado demonstra que a IFI em eluato, atualmente empregada na triagem dos animais, permitiu que cães infectados fossem deixados na área estudada. Esse achado apresenta uma falha no diagnóstico da LVC realizado nesse município, sugerindo que em outras regiões, animais infectados possam estar permanecendo nas áreas endêmicas e dando continuidade ao ciclo da doença.

Outra questão que deve ser abordada está relacionada aos antígenos empregados nos testes sorológicos. Alguns autores relatam que a utilização de antígenos homólogos melhora a especificidade do teste. Por essa razão, diferentes proteínas da superfície de *Leishmania* vêm sendo isoladas e estudadas na tentativa de se obter um antígeno que proporcione aumento dos parâmetros de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico das leishmanioses (ZIJLSTRA et al., 1998; SCALONE et al., 2002; ROSATI et al., 2003). Os “kits” de IFI e EIE, produzidos por Bio-Manguinhos (Fiocruz/RJ) utilizam a cepa de *Leishmania major*-like e, ultimamente tem-se questionado o porquê da não utilização de *L. (L.) chagasi* como antígeno, uma vez que os “kits” são voltados para o diagnóstico da LVC.

Em nosso estudo, considerando o resultado da cultura positiva para *L. (L.) chagasi*, a técnica de IFI com uso do antígeno heterólogo (*L. major*-like) mostrou valores de sensibilidades superiores frente ao emprego do antígeno homólogo (*L. (L.) chagasi*), diferentemente do que ocorreu com o EIE.

O teste de EIE mostrou valores de sensibilidade superiores à IFI, 93% e 100%, quando *L. major*-like e *L. (L.) chagasi* foram empregados, respectivamente como antígenos. Tal resultado demonstra a superioridade do EIE à IFI independente do antígeno empregado. No entanto, tais resultados devem ser observados com certa cautela, uma vez que a amostra estudada possui um viés de seleção, ou seja, não utilizamos amostras populacionais aleatórias de regiões endêmicas e não endêmicas que pode ter ocasionado uma superestimativa dos parâmetros.

Testes imunocromatográficos, de rápida e fácil execução, com sensibilidade e especificidade elevadas, constituem uma promessa do mercado nesse campo. O DPP, utilizado neste estudo, emprega dois antígenos (rk26 e rk39) e, embora em fase de validação, apresentou elevada sensibilidade (93%), sendo superior à IFI (*L. major*-like) com 73% de sensibilidade. Esse “kit” de IFI é disponibilizado para a rede pública. Esse resultado sugere que o DPP pode ser uma alternativa na triagem sorológica da LVC, possuindo também, a vantagem de ser realizada a campo e possuir tempo reduzido de execução comparado às sorologias convencionais. Porém, esses resultados ainda estão sendo analisados com uma população de estudo maior para que este teste possa ser inserido com segurança no programa de controle da LV.

Na LVC, existe um grande espectro de manifestações clínicas (ALVAR et al., 2004) e o grupo de cães avaliados neste estudo, exibia diferentes condições clínicas. Após a avaliação clínica, 40% dos cães foram classificados como assintomáticos, corroborando com outros estudos que descrevem cerca de 40 a 60% dos cães soropositivos são assintomáticos (MARZOCHI e MARZOCHI, 1997; QUEIROZ et al., 2009).

Entretanto, considerando os 14 animais com isolamento de *L. (L.) chagasi*, somente três eram sintomáticos para LVC. Esta observação é importante já que cães assintomáticos além de participarem no ciclo de transmissão da doença, não despertam a atenção dos proprietários e médicos veterinários, o que torna esse grupo de cães reservatórios silenciosos causando assim prejuízo para o controle da LV.

Apesar do amplo espectro da LVC, que pode variar de acordo com a fase da doença e o “status” imune do cão, são as alterações dermatológicas os sinais mais relevantes citados por diversos autores (MARZOCHI et al., 1985; ALVAR et al., 2004). A ulceração cutânea, que constitui uma dessas alterações, pode estar relacionada a uma ação direta do parasita ou mesmo, ser resultado do depósito de imunocomplexos naquele local (PUMAROLA et al., 1991).

Em um estudo feito com 150 cães infectados por *L. infantum*, constatou-se que 40% dos animais possuíam úlceras cutâneas (CIARAMELLA et al., 1997). Em nosso estudo, lesões cutâneas foram encontradas em 28 cães estudados, dos quais, comprovou-se a presença de *L. (V.) braziliensis* em cinco animais, demonstrando que a presença de lesões cutâneas, embora descrita em vários estudos como um dos sinais relevantes de LVC, nem sempre estão associadas à *L. (L.) chagasi*, principalmente em áreas de sobreposição das formas tegumentar e visceral (MADEIRA et al., 2006b).

Assim como no estudo de Madeira et al. (2005), o isolamento de *L. (V.) braziliensis* ocorreu exclusivamente em lesões cutâneas, sugerindo, mais uma vez, que esta espécie tende a se restringir ao sítio das lesões cutâneas em cães naturalmente infectados. Essa informação aponta a necessidade de investigação parasitológica em cães suspeitos e soma-se às discussões sobre a importância do cão doméstico no ciclo de transmissão da LT (REITHINGER e DAVIES, 1999; PADILLA et al., 2002).

Nas áreas de sobreposição, tanto dados clínicos quanto sorológicos devem ser interpretados com cautela. Entretanto, um fato deve ser mencionado: dois dos cinco animais com isolamento de *L. (L.) braziliensis* na cultura, apresentaram resultado positivo pela PCR para alvos genéricos de *Leishmania* em fragmentos de pele. A investigação em nível subgenérico do DNA na pele desses animais deve ser investigada.

As amostras isoladas, a partir do diagnóstico parasitológico indireto (cultura) são de grande importância para diversos estudos, principalmente àqueles que envolvem a vigilância epidemiológica, possibilitando, através da caracterização dos parasitas isolados, o mapeamento das espécies e/ou variantes de parasitas que circulam em áreas endêmicas. A cultura, apesar de ser uma técnica considerada padrão de referência no diagnóstico das leishmanioses, não é realizada na rotina dos programas de controle da LVC devido ao grande volume de trabalho, profissionais especializados e estrutura laboratorial que esse procedimento demanda.

Neste estudo, empregamos a cultura de fragmentos de pele, de lesões cutâneas e de baço para a comprovação parasitológica de cães sororretores. Dos 155 cães estudados obtivemos o isolamento em 29 (19%) cães, dos quais a infecção por *L. (L.) chagasi* foi confirmado em 14, por *L. (V.) braziliensis* em 5 e por *T. caninum* em 7 animais. Um animal foi encontrado co-infectado por *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis*. A identificação não foi realizada em dois isolados de baço devido a perda da amostra, mas podemos sugerir a infecção por *L. (L.) chagasi* nesses dois animais, já que o isolamento foi de promastigotas e em órgão esplênico. Em 59% (91) dos animais não foi isolado qualquer agente, considerando que 42% (38) eram assintomáticos para LVC e apresentaram resultados por outras técnicas (PCR e sorologia) negativos.

Da mesma forma que a cultura, a PCR não é realizada na rotina dos programas de diagnóstico da LV devido, principalmente, aos custos elevados e necessidade de laboratórios bem equipados e equipe técnica especializada, entretanto pode ser considerada uma ferramenta robusta para ações de controle e diagnóstico precoce. Três casos, nos quais a cultura foi positiva, a PCR apresentou resultados negativos. De outro lado, três casos,

positivos na PCR foram negativos na cultura. Este resultado demonstra que a PCR, embora seja uma ferramenta de extrema sensibilidade, deve ser uma técnica a mais para o diagnóstico, auxiliando outras técnicas e/ou em resultados discordantes.

É importante lembrar que estes animais foram avaliados pela cultura, considerando dois sítios (pele íntegra e fragmentos de baço) e isolamento de *L. chagasi* nesses três animais que foram negativos na PCR foi realizado em fragmentos do baço. O processo de disseminação de *L. chagasi* em diferentes órgãos do cão ainda não é totalmente conhecido, no entanto, o parasitismo da pele intacta parece ser um evento tardio neste processo (TAFURI et al., 2001), explicando em parte esse resultado, uma vez que apenas 6% dos cães foram sintomáticos da LV.

Do grupo de cães avaliados neste estudo, 59% (n=91) apresentaram resultados negativos, considerando todas as técnicas realizadas, constatando que uma parcela de cães sororretores submetidos à eutanásia não demonstrou infecção por *L. (L.) chagasi* ou outro agente. Diante desses resultados, levantamos dois pontos os quais consideramos de relevância:

1. A sobreposição de áreas com ocorrência de LT e LV e a circulação de outros agentes como *T. caninum* pode interferir nos resultados dos inquéritos sorológicos?

A sobreposição de áreas endêmicas de LT e LV é fator complicador para o diagnóstico canino, visto que testes sorológicos, que constituem os métodos empregados nos inquéritos, não discriminam ambas as formas da doença, as quais possuem medidas de controle diferenciadas para cães domésticos. Diversos estudos indicam que antígenos de diferentes espécies de *Leishmania* podem interferir nos testes sorológicos. Neste estudo, demonstramos mais uma vez a ocorrência de infecção mista por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*. A frequência de infecções mistas nos cães do município do Rio de Janeiro pode ser ainda maior, uma vez que animais sororretores não são submetidos a testes parasitológicos. Além desse aspecto, não podemos deixar de mencionar a presença de *T. caninum* em cães no município do Rio de Janeiro. A circulação de *T. caninum* entre esses animais poderia gerar mais um fator de confusão no diagnóstico desses animais, já que a reatividade sorológica cruzada entre os diferentes membros da família Trypanosomatidae é um fato conhecido. Neste estudo, sete dos 155 cães eutanasiados, estavam parasitados por *T. caninum*, o que indica a circulação desse parasita em cães no município do Rio de Janeiro assim como já foi relatado em outros estudos (MADEIRA et al., 2009; DE S. PINTO et al., 2010).

2. As ferramentas utilizadas atualmente no município do Rio de Janeiro são seguras na discriminação dos casos de LVC?

Neste sentido temos que considerar a amostra empregada na avaliação sorológica dos animais. Inicialmente, no inquérito, foi utilizado eluato e posteriormente, na reavaliação dos animais recolhidos, empregou-se amostra de soro. Como comentado anteriormente, de acordo com as condições de coleta e armazenamento dos eluatos, pode-se ter interferência na detecção dos anticorpos. No caso deste estudo, a maioria dos resultados sorológicos positivos obtidos inicialmente, não pode ser confirmada com amostras de soro. Do grupo de 155 cães estudados, 59% não demonstraram qualquer indício da infecção por *Leishmania*, embora não possamos descartar completamente a infecção por *Leishmania* ou outro protozoário nesses animais. Um fator importante que deve ser mencionado foi a mudança no ponto de corte de 1:80 para 1:40 na técnica de IFI, o que pode, também, ter contribuído para a retirada de cães negativos.

Dessa forma, esse estudo alerta para as particularidades do município do Rio de Janeiro que devem ser consideradas nos inquéritos e a necessidade da adequação do programa de controle da LV pelos órgãos responsáveis, a fim de evitar a retirada de cães não infectados ou a permanência destes nas áreas endêmicas.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos sugerir que o DPP possa ser usado como um teste para triagem sorológica e o EIE, empregando antígeno homólogo, como um teste confirmatório nos inquéritos sorológicos. Embora tais sugestões tenham sido apresentadas ao programa de controle de LV do município do Rio de Janeiro, ficou decidido que a partir desse momento, os inquéritos sorológicos caninos serão realizados da seguinte forma: triagem com a técnica de EIE com antígeno heterólogo em eluato e os casos positivos confirmados pela técnica de IFI com antígeno heterólogo em soro sanguíneo, utilizando como ponto de corte a diluição de 1:40 para recolhimento e eutanásia dos animais. Essas resoluções consideraram o fato do DPP ainda estar em fase de validação e o EIE, com antígeno homólogo, estar em processo de fabricação. É importante ressaltar que novos estudos devem ser realizados, para reavaliação dos cães identificados em inquéritos sorológicos, principalmente após este estudo, onde novos critérios foram incorporados.

7. CONCLUSÃO

1. Dos cães estudados, a maioria (54%) foram considerados oligossintomáticos, apresentando de 1 a 3 sinais clínicos para leishmaniose visceral;
2. O percentual da reatividade sorológica declinou após a reavaliação com amostras do soro, verificando uma proximidade maior com o padrão de referência. Em 39% (56/144) dos cães, a reatividade sorológica para *Leishmania* foi confirmada em amostras de soro, independente da técnica ou dos antígenos empregados;
3. O antígeno homólogo de *L. chagasi*, independente da técnica empregada, proporcionou os mais elevados parâmetros sorológicos;
4. As concordâncias entre os testes sorológicos não foram satisfatórias apresentando resultados entre elas variando de fraca a moderada. As técnicas que apresentaram as melhores concordâncias com o padrão de referência foram EIE utilizando o antígeno homólogo ($k=0,71$) e o DPP ($k=0,67$). A que apresentou pior concordância foi a técnica utilizada para a realização dos inquéritos sorológicos (IFI *L.major-like*);
5. No município do Rio de Janeiro, foi constatada a presença de animais co-infectados por *L. chagasi* e *L. braziliensis* e a circulação de *Trypanosoma caninum*, revelando mais uma vez a sobreposição da infecção natural canina por diferentes agentes etiológicos em áreas endêmicas de leishmaniose.
6. A presença de DNA de *Leishmania* foi confirmada em 17 animais, demonstrando a utilidade de testes moleculares, empregando o sítio da pele, no auxílio para o diagnóstico de cães sororretores para *Leishmania*;
7. Considerando todas as técnicas para o diagnóstico empregadas neste estudo, não se constatou a presença de *Leishmania* ou outro parasita em 59% dos cães encaminhados para eutanásia, demonstrando que as medidas aplicadas para o diagnóstico da LVC, no município do Rio de Janeiro, devem ser reavaliadas;
8. Neste estudo foram identificadas áreas de sobreposição da infecção canina por *L. (L.) chagasi*, *L.(V.) braziliensis* e *T. caninum* em Campo Grande e Bangu, e por *L. (L.) chagasi* e *T. caninum* em Guaratiba.

REFERÊNCIAS

- 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*. *Vet Parasitol.* 2005;127(3-4):227-32.
- Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004;57:1-88.
- Alves WA, Bevilacqua PD. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad Saúde Publ.* 2004;20(1):259-65.
- Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulalio C et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;53(3):251-5.
- Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MC et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(1):53-7.
- Barker DC. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitol.* 1989;99(Suppl 1):125-149.
- Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(3):273-7.
- Brandao-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97(3):291-6.
- Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec.* 1997;141(21):539-43.
- Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2005;128(1-2):149-55.
- Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MC, 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1985;80(1):17-22.

Cupolillo E, Grimaldi JG, Momen H. A general classification of new world *Leishmania* using numeral zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50:296-311.

de Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol.* 2006;140(3-4):231-8.

De S. Pinto AG, Schubach TM, Figueiredo FB, Baptista C, Fagundes A, Da S. Barros JH et al. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol.* 2010;26:1-8.

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comprovativa do homem, do cão e da raposa (*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.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes UG. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*: a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89:463-469.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis.* 1997;25(5):1240-2.

Donatien A, Letosquard F. Remarques sur l'évolution de la leishmaniose generale du chien. *Bull Soc Pathol Exot.* 1938;31:214-216.

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

Figueiredo FB, Barbosa Filho CJ, Schubach EY, Pereira SA, Nascimento LD, Madeira Mde F. Report on an autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in the southern zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(1):98-9.

França-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.

Galati EA, Nunes VL, Rego Junior Fde A, Oshiro ET, Chang MR. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Saude Publica.* 1997;31(4):378-90.

Galvão E. Bio-Manguinhos lançará teste rápido para leishmaniose. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infolid=879&sid=227>>. Acesso em: 01/10/2010;

Gillespie S, Pearson RD. Principles and practice of clinical parasitology. 1a. ed; 2001.

Gomes AHS, Arine MLB, Szarota RM, Langer MD. Avaliação da capacidade de absorção e distribuição de amostras de sangue total em diferentes tipos de papel-filtro. Rev Inst Adolfo Lutz. 2004;63(2):262-268.

Gomes HR, Rodrigues MS, Silva MP, Nascimento EG, Moreira ED, Pontes-de-Carvalho LC et al. Comparação entre ELISA de soro e de eluato de sangue para o imunodiagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34 Suppl. I:197.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epid. 2004;7(3).

Grimaldi G, Jr., Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin Microbiol Rev. 1993;6(3):230-50.

Guimarães MCS. Inquéritos soropidemiológicos. Coleta, transporte e armazenamento de amostras. Rev Inst Med Trop de São Paulo. 1983;25:93-96.

Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. J Clin Microbiol. 1998;36(7):1989-95.

Hommel M. The genus *Leishmania*. Biology of the parasite and clinical aspects. Bulletin du Institute Pasteur. 1978;75:5-102.

Ikeda-Garcia FA, Feitosa MM. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Rev Clin Vet. 2006;62:32-38.

Killick-Kendrick R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmaniae* and their phlebotomine vectors. Bull Soc Pathol Exot Filiales. 1985;78(5 Pt 2):747-755.

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP et al. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. Parasitol. 2002;125(Pt 3):197-207.

Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O, Souza AA et al. Amazonian visceral leishmaniasis-distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990;85(1):135-7.

Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AG, Silva ED, Abath FG et al. Canine visceral leishmaniasis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. Vet Parasitol. 2006;137(1-2):11-6.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265-275.

Madeira MF, O. SA, Schubach TM, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C et al. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol.* 2006a;138(3-4):366-70.

Madeira MF, Schubach A, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006b;100(5):442-5.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TM, Serra CM, Pereira SA, Figueiredo FB et al. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? *Parasitol Res.* 2005;97(1):73-6.

Madeira MF, Sousa MA, Barros JH, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol.* 2009;136(4):411-23.

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 MC, Coutinho SG, De Souza WJ, De Toledo LM, Grimaldi Junior G, Momen H et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1985;80(3):349-57.

Marzochi MC, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira Mde F, Mouta-Confort E et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(5):570-80.

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

Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. *J Bras Med.* 1992;63:82-104.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Leishmanioses em áreas urbanas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997;30:162-167.

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

Ministério da Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, MS (Ed.), Brasília. 2010:62.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde - MS (ed), Brasília. 2006:122.

Mohapatra TM, Singh DP, Sen MR, Bharti K, Sundar S. Compararative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2010;4(2):114-7.

Momen H, Pacheco RS, Cupolillo E, Grimaldi Junior G. Molecular evidence for the importation of Old World *Leishmania* into the Americas. *Biol Res*. 1993;26(1-2):249-55.

Moreira ED, Jr., Mendes de Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG, Pontes de Carvalho L. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol*. 2004;122(4):245-52.

Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol*. 2007;145(3-4):245-52.

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

Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*. 2005a;129(3-4):219-27.

Oliveira LS, Julião FS, Souza VMM, Freitas DS, Souza BMPS, Paule BJA et al. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. *Ciência Animal Brasileira*. 2005b;6(1):41-47.

Padilla AM, Marco JD, Diosque P, Segura MA, Mora MC, Fernandez MM et al. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniosis in Salta, Argentina. *Vet Parasitol*. 2002;110(1-2):1-10.

Palatnik-de-Sousa CB, Batista-de-Melo LM, Borja-Cabrera GP, Palatnik M, Lavor CC. Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. *Ann Acad Bras Cienc*. 2004;76(3):583-93.

Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi GJ, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveirados-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55(1):39-44.

Parvizi P, Mauricio I, Aransay AM, Miles MA, Ready PD. First detection of *Leishmania major* in peridomestic *Phlebotomus papatasi* from Isfahan province, Iran: comparison of nested PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. *Acta Trop*. 2005;93(1):75-83.

Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(5):544-8.

- Pumarola M, Brevik L, Badiola J, Vargas A, Domingo M, Ferrer L. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J Comp Pathol.* 1991;105(3):279-86.
- Queiroz PV, Monteiro GR, Macedo VP, Rocha MA, Batista LM, Queiroz JW et al. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Res Vet Sci.* 2009;86(2):267-73.
- Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):2931-5.
- Reithinger R, Davies CR. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends Parasitol.* 2002;18(7):289-90.
- Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(4):530-41.
- Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR. Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):748-51.
- Rey L. *Parasitologia*. 3 ed: Guanabara Koogan; 2001.
- Rey L. *Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 2ª ed: Editora Guanabara Koogan SA: 2ª edição.; 1991.
- Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990;65(3):111-25.
- Romero HD, Silva Lde A, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, Guimaraes SF et al. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(1):27-33.
- Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E et al. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(6):1153-6.
- Roura X, Sanchez A, Ferrer L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec.* 1999;144(10):262-4.
- Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet.* 1998;12:315-317.
- Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Araujo FS, Ilha IM et al. Occurrence of co-infection by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* and *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(7):739-41.
- Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and

validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol.* 2002;104(4):275-85.

Shaw JJ. New World Leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In J Farrell, *World Class Parasites: Leishmania*, Kluwer Academic Publishers, Boston 2002;4:11-31.

Shrout PE. Measurement reliability and agreement in psychiatry. *Stat Methods Med Res.* 1998;7:301-317.

Silva AV, Paula AA, Cabrera MA, Carreira JC. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. *Cad Saude Publica.* 2005;21(1):324-8.

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.

Tafari WL, de Oliveira MR, Melo MN. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol.* 2001;96(3):203-12.

Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Goncalves A et al. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50(5):557-65.

Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;164(2-4):118-123.

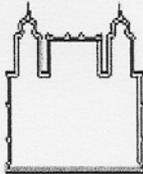
Vexenat JA, Santana JM, Teixeira AR. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop.* 1996;38:177-185.

WHO. World Health Organization Control of Leishmaniases. Technical Report Series 2008.

Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EA, El-Hassan AM, Reed SG et al. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5(5):717-20.

ANEXOS

ANEXO 1. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Fiocruz)



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" Avaliação parasitológica nas Leishmanioses Caninas. "

número P-195/03, proposto por Maria de Fátima Madeira, foi licenciado pelo N° L-023/06.

Sua licença de N° L-023/06 autoriza o uso anual de :

- 100 *Canis familiaris*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 6 de fevereiro de 2010.

Rio de Janeiro, 25/09/2008


Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ

ANEXO 2. Ficha Clínica

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"/> Leve <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"/>			

ANEXO 3. Artigo confeccionado com os resultados desse estudo e submetido à Veterinary Parasitology

A manuscript number has been assigned: Vetpar-D-10-4440

Página 1 de 1

De: "VETPAR" <vetpar@elsevier.com>
Assunto: A manuscript number has been assigned: Vetpar-D-10-4440
Data: Qui, Outubro 14, 2010 11:01 am
Para: denise.silva@ipecc.fiocruz.br

Ms. No. Vetpar-D-10-4440
Concordance among serological, parasitological and molecular tests Leishmania seroreactive dogs euthanized in Rio de Janeiro, Brazil

Dear Dr. Silva,

Your manuscript has been assigned the following reference number: Vetpar-D-10-4440

You will be able to check the progress of your paper by logging in as Author at <http://ees.elsevier.com/vetpar/>

Please note that submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content.

Thank you for submitting your manuscript to Veterinary Parasitology.

Kind regards,

Paula Flynn
Veterinary Parasitology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.
