



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

FABIANO BORGES FIGUEIREDO

IDENTIFICAR A PERMANÊNCIA DE CÃES INFECTADOS POR
Leishmania (Leishmania) chagasi EM ÁREA ENDÊMICA, APÓS
INQUÉRITO SOROLÓGICO REALIZADO NO MUNICÍPIO DO RIO DE
JANEIRO

RIO DE JANEIRO

2008

Tese PCDI – IPEC

F. B. Figueiredo 2008

IDENTIFICAR A PERMANÊNCIA DE CÃES INFECTADOS POR
Leishmania (Leishmania) chagasi EM ÁREA ENDÊMICA, APÓS
INQUÉRITO SOROLÓGICO REALIZADO NO MUNICÍPIO DO RIO DE
JANEIRO

FABIANO BORGES FIGUEIREDO

Tese apresentada ao curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientado por Tânia Maria Valente Pacheco e Maria de Fátima Madeira.

Rio de Janeiro

2008

Ficha catalográfica elaborada
pela biblioteca de Manguinhos

XDOO Figueiredo, Fabiano Borges

Identificar a possível permanência de cães infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* em área endêmica, após inquérito sorológico realizado no Município do Rio de Janeiro. FIGUEIREDO, FABIANO BORGES, 2008

TESE DE DOUTORADO INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS,
PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS 2008 BIBLIOTECA 00F

CDD: 000.000

FABIANO BORGES FIGUEIREDO

IDENTIFICAR A PERMANÊNCIA DE CÃES INFECTADOS POR *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi* EM ÁREA ENDÊMICA, APÓS INQUÉRITO
SOROLÓGICO REALIZADO NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO

Tese apresentada ao curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientado por Tânia Maria Valente Pacheco e Maria de Fátima Madeira.

Aprovada em / / .

Banca examinadora

Dr. Armando de Oliveira Schubach (Presidente) IPEC/Fiocruz

Dra. Fátima Conceição Silva (componente) IOC/Fiocruz

Dra. Teresa Cristina Bergamo do Bonfim (componente) UFRRJ

Dr. Reginaldo Peçanha Brazil (componente) IOC/Fiocruz

Dr. Rodrigo Caldas Menezes (componente) IPEC/Fiocruz

Dra. Isabel Cristina Fábregas Bonna (suplente) IOC/Fiocruz

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Dra. Tânia e Dra. Fátima por toda paciência, dedicação e apoio.

Aos integrantes da equipe de campo Carlos, Daniela, Gilberto, Marina que apesar de todas dificuldades convivemos com bom humor e grande amizade durante todos os trabalhos.

À toda equipe dos laboratórios, A Dra. Raquel, Marize, Andressa, Eliame e Cibele.

À Dra. Sonia Lambert pela colaboração no desenho desse estudo.

Aos meus grandes amigos do LAPCLIN-DERMZOO: Sandro, Rodrigo, Isabella, Tuarne, Vanessa, Roseli e Leandra por toda ajuda e carinho.

Aos colaboradores da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro o senhor Moacir e o senhor Valdir.

À Coordenação do Programa de Pós –Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

À Lílian por todo amor, dedicação, carinho e paciência.

Aos meus pais por todo amor.

À todos os proprietários que participaram desse estudo dando a oportunidade de construir esses resultados.

Figueiredo, F. B. Identificar a permanência de cães infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em área endêmica, após inquérito sorológico realizado no Município do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

Resumo

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) representa um importante problema em saúde pública para o Brasil, sendo o cão doméstico a principal fonte de infecção para o vetor. O objetivo deste estudo foi identificar a permanência de cães infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em área endêmica, após inquérito sorológico realizado no Município do Rio de Janeiro, utilizando amostras coletadas em papel filtro (eluato) e processadas pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Inicialmente realizou-se inquérito em área endêmica para seleção dos animais soronegativos. Cães domiciliados foram submetidos a: 1) exame clínico; 2) coleta de sangue (soro e papel filtro) para a realização das técnicas de ensaio imunoenzimático (EIE), IFI e reação em cadeia da polimerase (PCR); e 3) biópsia de pele para o exame parasitológico (cultura), histopatológico e imunohistoquímico. Os resultados são apresentados em dois manuscritos submetidos para publicação: o primeiro descreve os resultados obtidos do inquérito realizado na região de Carapiá, onde 305 cães foram avaliados. *L. (L.) chagasi* foi isolada de nove animais, resultando em uma prevalência de 3%. Nos testes sorológicos a sensibilidade e especificidade foram, respectivamente, 100% e 96,6% para a EIE; 100% e 65,5% para a IFI utilizando o ponto de corte de 1:40, titulação empregada pelo Ministério da Saúde para o controle da LVA; 100% e 83,4% para a IFI com ponto de corte de 1:80; e de 22,2% e 97,0% para a IFI em papel filtro. As razões de verossimilhança (RV) para os resultados positivos foram de 29,4 no EIE, 2,98 na IFI 1:40, 6,02 na IFI 1:80 e 7,4 na IFI em papel filtro. No segundo manuscrito, apresenta-se o resultado da avaliação clínica e laboratorial de 146 cães negativos IFI em papel filtro selecionados aleatoriamente. Nesse grupo, encontrou-se uma soroprevalência de 34,9% e 6,8% às técnicas de IFI 1:40 e EIE, respectivamente. Foi possível isolar *L. (L.) chagasi* de cinco cães, demonstrando que a IFI em papel filtro, empregada na triagem dos animais, não permitiu identificar estes cães infectados. Os resultados apresentados demonstram que cães infectados possam estar permanecendo nas áreas endêmicas, dando continuidade ao ciclo da doença.

Palavras-chave: 1. Leishmaniose 2. Diagnóstico 3. Cão.

Figueiredo, F. B. . Identify the permanence of infected dogs by *Leishmania (Leishmania) chagasi* in endemic area, after serological survey conducted in the Municipality of Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008 XX f. Thesis [Doctor Thesis in Clinical Research on Infectious Diseases]. Evandro Chagas Clinical Research Institute

Abstract

The American Visceral Leishmaniasis (AVL) represents a major problem of public health in Brazil, and domestic dog is the main source for the vector infection. The purpose of this study was to identify the permanence of infected dogs by *Leishmania (Leishmania) chagasi* in endemic area, after serological survey in the Municipality of Rio de Janeiro, using samples collected in filter paper (eluate) and processed by indirect immunofluorescence (IIF) technique. Initially, an inquiry in endemic area for selection of seronegative animals was done. Domiciliated dogs were submitted to: 1) clinical examination; 2) collection of blood (serum and filter paper) for the techniques of immunoenzymatic assay (EIA), indirect immunofluorescence (IIF) and polymerase chain reaction (PCR) and 3) skin biopsy for parasitological (culture), histopathological and immunohistochemical exams. The results are presented in two manuscripts submitted for publication: the first one describes the results of a survey conducted in the region of Carapiá, where 305 dogs were evaluated. *L. (L.) chagasi* was isolated in nine animals, resulting in a prevalence of 3%. In serological tests the sensitivity and specificity were, respectively, 100% and 96.6% for EIA, 100% and 65.5% for IIF using the cutoff of 1:40, titre utilized by Ministry of Health for AVL control; 100% and 83.4% for IIF with the cutoff of 1:80, and 22.2% and 97.0% for IIF in filter paper. The likelihood ratio (LR) for positive results were 29.4 for EIA, 2.98 for 1:40 IIF, 6.02 for 1:80 IIF and 7.4 for filter paper IIF. The second manuscript showed the results of clinical and laboratorial evaluation of 146 dogs negative in filter paper IIF that were randomly selected. In this group, the seroprevalences were 34.9% and 6.8% in the techniques of 1:40 IIF and EIA, respectively. It was possible to isolate *L. (L.) chagasi* of five dogs, which demonstrated that filter paper IIF used in the screening of animals failed to identify those infected dogs. The presented results showed that infected dogs might be remaining in endemic area, giving continuity to the cycle of disease.

Keywords: 1. Leishmaniasis 2. Diagnosis 3. Dog.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	9
3. OBJETIVOS	11
3. 1. OBJETIVO GERAL.....	11
3. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4. ARTIGOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO	12
4.1. PREVALENCE OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN THE REGION OF CARAPIÁ, MUNICIPALITY OF RIO DE JANEIRO: STUDY OF METHODS FOR THE DETECTION OF IGG IN SERUM AND ELUATE SAMPLES.	13
4.2. REGISTRO DE SUBMISSÃO AO PERIÓDICO JOURNAL OF VETERINARY DIAGNOSTIC INVESTIGATION	14
4.3. CLINICAL AND LABORATORY EVALUATION OF DOGS TESTING SERONEGATIVE IN ELUATES FROM A VISCERAL LEISHMANIASIS- ENDEMIC AREA IN THE MUNICIPALITY OF RIO DE JANEIRO	33
4.4. REGISTRO DE SUBMISSÃO AO PERIÓDICO THE VETERINARY JOURNAL	34
5. DISCUSSÃO.....	52
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8. ANEXOS	64
8.1. TERMO DE CONSENTIMENTO	64
8.2. FICHA DE AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS ESTUDADOS	65

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses, que acometem os seres humanos e outras espécies de mamíferos silvestres e domésticos, sob a forma de doenças infecciosas crônicas com diversas manifestações clínicas. São causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitidas através da picada das fêmeas de insetos vetores do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae), conhecidos como flebotomíneos (DEANE; DEANE, 1962; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; W.H.O., 2008).

A distribuição geográfica das leishmanioses abrange o continente Asiático, Africano, Europeu e o Americano, acometendo cerca de 88 países localizados em regiões de clima tropical e subtropical. Dados da Organização Mundial de Saúde revelam uma prevalência de 12 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões de pessoas expostas ao risco de adquirir a doença (PEREIRA; FONSECA, 1994; W.H.O., 2008). Atualmente, as espécies de *Leishmania* estão agrupadas e classificadas em dois subgêneros, de acordo com a classificação proposta por Lainson & Shaw (1987): *Leishmania (Leishmania)* e *Leishmania (Viannia)*. Estão descritas, até o momento, 31 espécies infectando uma ampla variedade de mamíferos hospedeiros silvestres ou domésticos e vetores, das quais 22 espécies são patogênicas para os seres humanos (SHAW, 1994; ASHFORD, 2000; SILVEIRA et al., 2002).

Nas Américas, as leishmanioses podem ser agrupadas em Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral Americana (LVA) de acordo com os distintos tropismos das espécies envolvidas na infecção. A notificação de ambas as doenças é compulsória. No entanto, somente é realizada em cerca de 40 dos 88 países afetados, denotando que as taxas de incidência possam ser maiores que as declaradas. As formas clínicas apresentam padrões distintos em variados aspectos, ocasionados principalmente pela multiplicidade de espécies do parasita, de insetos vetores, de diferentes reservatórios e dos

diferentes fatores ambientais que afetam essa cadeia (LAINSON et al., 1987; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Admite-se que nas Américas, a LTA seja autóctone, como sugerem os inúmeros registros da doença mucosa em vasos de cerâmica pré-colombiana confeccionados no Peru e no Equador. Os primeiros registros de casos com demonstração do parasita foram feitos por CARINE; PARANHOS, 1909 e por LINDENBERG, 1909.

No Brasil, são registrados por ano aproximadamente 35 mil casos de LTA (CENEPI, 1997) distribuídos por todo território brasileiro, desde a Amazônia até os estados do Sul, constituindo um sério problema de saúde pública (M.S., 2006). Conhecida como leishmaniose mucocutânea ou úlcera de Baurú, é causada por sete espécies de *Leishmania*: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, *L. (V.) lindenbergi*. Tal variedade reflete-se na complexidade da doença tegumentar, cujas características se alteram de acordo com a espécie envolvida.

A transmissão da doença segue dois padrões epidemiológicos: o primeiro, silvestre, tipicamente relacionado a populações adultas do sexo masculino, ocorre em surtos epidêmicos atingindo principalmente militares em incursões pelas matas, trabalhadores que atuam na derrubada destas e exploradores de recursos florestais (SAMPAIO, 1951; BASANO; CAMARGO, 2004). O segundo padrão ocorre em áreas de colonização antiga com maior frequência nas regiões Sudeste e Nordeste do país, relacionado ao processo migratório com ocupação de áreas rurais, de periferias urbanas (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; SERRA et al., 2003) e de áreas urbanas adjacentes a ambientes rurais (OLIVEIRA et al., 2004).

O padrão silvestre pode estar relacionado a diferentes espécies de protozoários e de vetores, dependendo do ambiente e da região que se encontra. *L. (L.) amazonensis* distribuiu-se pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e

sudeste do Maranhão), Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-Oeste (Goiás). Seu principal hospedeiro vertebrado é o rato-soiá (*Proechymis*) e as espécies vetoras são *Lu. flaviscutellata*, *Lu. reducta* e *Lu. olmeca nociva* (M.S., 2007). *L. (V.) guyanensis* é encontrada ao norte da bacia Amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e está freqüentemente relacionada a florestas de terra firme. Vários mamíferos silvestres foram identificados como hospedeiros vertebrados naturais, tais como a preguiça (*Choloepus didactylus*), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), marsupiais e roedores. As espécies vetoras são *Lu. anduzei*, *Lu. whitmani* e *Lu. umbratilis* (M.S., 2007).

Leishmania (V.) braziliensis se destaca por apresentar tanto o padrão de transmissão silvestre quanto o urbano. O padrão silvestre ocorre do sul do Pará ao Nordeste e em algumas áreas da Amazônia oriental. Os hospedeiros naturais são desconhecidos e seu vetor é *Psychodopigus wellcomei* (M.S., 2007). No padrão urbano, a transmissão ocorre no intra e no peridomicílio, condicionada à adaptação de algumas espécies de flebotomíneos ao meio ambiente modificado da periferia das cidades, atingindo também mulheres e crianças (D'UTRA; SILVA, 1915; CERQUEIRA; VASCONCELOS, 1922; PASSOS et al., 1993; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Neste contexto, é importante ressaltar a presença de hospedeiros domésticos como cães e equinos, criando a possibilidade, ainda não comprovada, desses animais atuarem como reservatórios (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; FERREIRA et al., 2003).

Dentre os animais domésticos que podem estar envolvidos no ciclo de transmissão da LTA, o cão apresenta maior relevância, pois freqüentemente altas taxas de infecção nesses animais são associadas à doença humana (LOPES et al., 1984; FALQUETO et al., 2003; REITHINGER et al., 2003).

No Brasil, os primeiros relatos de cães naturalmente infectados por espécies de *Leishmania* dermatrópicas ocorreram no início do século passado (PEDROSO, 1913;

ARAGÃO, 1922; FONSECA, 1928). Clinicamente, a LTA canina caracteriza-se pela presença de lesões cutâneas ulceradas ou ulcero-vegetantes, freqüentemente recobertas por crostas; únicas, múltiplas ou confluentes; predominando nas extremidades, em áreas desprovidas de pêlos, no focinho e envolvendo a mucosa respiratória. A evolução é prolongada, não costuma comprometer o estado geral do animal e pode apresentar comportamento cíclico, ora com períodos de cicatrização ora com exacerbação da lesão (DIAS et al., 1977; ARAÚJO FILHO et al., 1978; PIRMEZ et al., 1988; MARZOCHI, 1992; SANTOS et al., 1998; BARBOSA et al., 1999; SERRA et al., 2003; MADEIRA et al., 2003).

A Leishmaniose Visceral (LV) foi descrita na Grécia em 1835, mas, foi na Índia que ficou popularmente conhecida como calazar (febre negra), pelos sintomas de febre e escurecimento da pele dos indivíduos acometidos. É causada por três espécies de parasitas do subgênero *Leishmania*: *L. (Leishmania) donovani* e *L. (L.) infantum* no Velho Mundo e *L. (L.) chagasi* nas Américas. No Brasil, ocorre em todos os estados costeiros, do Pará ao Paraná e em estados centrais como Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul com cerca de 4 mil casos humanos registrados anualmente (CENEPI, 1997). No Nordeste, os estados da Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão correspondem a 92,4% dos casos notificados no Brasil (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Apesar das semelhanças epidemiológicas, taxonômica e clínicas, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, por muito tempo, foram consideradas espécies distintas. Atualmente, admite-se que *L. (L.) chagasi* seja uma variante de *L. (L.) infantum*, introduzida na América do Sul por cães e pessoas infectadas durante a colonização européia. Na América, o parasito se adaptou a novos vetores e hospedeiros (DEANE; DEANE, 1954; MOMEN et al., 1993; MAURICIO et al., 1999; MAURICIO et al., 2000).

No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu em 1934, quando foram encontradas amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com

suspeita de febre amarela (PENNA, 1934). Somente 20 anos depois é que se registrou o primeiro surto de LVA em Sobral, no Ceará (DEANE, 1956).

Em meados dos anos 80, constatou-se uma transformação drástica na distribuição geográfica da LVA no Brasil. A doença, antes restrita às áreas rurais do Nordeste brasileiro, avançou para outras regiões indenes alcançando a periferia de grandes centros urbanos. A partir dos anos 90, os estados do Pará e Tocantins (região Norte), Mato Grosso do Sul (região Centro-Oeste), Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste) passaram a influenciar de maneira significativa nas estatísticas da LVA no Brasil (M.S., 2007). *L. (L.) chagasi* é o único agente etiológico responsável pela doença e *Lu. longipalpis* é incriminada como o principal vetor. Entretanto, *Lu. cruzi* foi descrita no Estado do Mato Grosso do Sul exercendo esse papel (GENARO et al., 1990; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001; M.S., 2006). No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). Na área urbana, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção para o flebótomo. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção destes tem sido mais prevalente que nos seres humanos (DEANE; DEANE, 1955a; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; PARANHOS-SILVA et al., 1996; GALIMBERTTI et al., 1999; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001).

A LVA no ser humano pode apresentar-se de duas formas: assintomática e sintomática. Na forma assintomática, não há evidências de manifestações patológicas. A forma sintomática pode ser classificada em três períodos. O período inicial, também chamado de “forma aguda”, é caracterizado por febre, com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa, hepatoesplenomegalia e, muitas vezes, tosse e diarreia. O período de estado é caracterizado por febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa, aumento da hepatoesplenomegalia e comprometimento do estado

geral. O período final ocorre em pacientes não tratados. Cursa com desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca), edema dos membros inferiores, que pode evoluir para anasarca, hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), febre contínua, comprometimento intenso do estado geral, icterícia, ascite e evolução para o óbito que, em grande parte dos casos, é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramentos (M.S., 2006).

No cão, a doença é de evolução lenta e de início insidioso. Classicamente, a LVA canina apresenta lesões cutâneas: descamação e eczema, em particular no espelho nasal e nas orelhas, e pequenas úlceras rasas, localizadas mais freqüentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações. Nas fases mais adiantadas da doença, observam-se onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, hiperqueratose, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômitos. No quadro final da infecção, ocorre paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo (DEANE; DEANE, 1955b, 1955a; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; ALMEIDA et al., 2005).

O diagnóstico da LVA, humana ou canina, compreende a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Os testes laboratoriais consistem na evidenciação do parasita e em provas imunológicas. Os espécimes clínicos, coletados para o diagnóstico parasitológico de cães, podem ser obtidos a partir de aspirado de medula óssea, de baço, de fígado ou de linfonodos e, em alguns casos, de biópsias de pele íntegra, de lesão cutânea ou de vísceras. No exame parasitológico direto, é realizada a pesquisa de formas amastigotas, em lâminas de vidro, por aposição do material coletado na punção, corado pela técnica de Giemsa ou de Leishman. O exame parasitológico indireto visa o isolamento do agente infeccioso em meios de cultivo apropriados, por exemplo, NNN (iniciais dos nomes de seus idealizadores

Novy, McNeal e Nicolle) acrescido de meio Schneider e enriquecido com soro fetal bovino (DEANE; DEANE, 1955a; M.S., 2006).

A análise histopatológica dos fragmentos teciduais também é importante no diagnóstico da LVA, pois permite identificar as formas parasitárias e ao mesmo tempo contribuir para o diagnóstico diferencial com outras doenças como pênfigo foliáceo, lúpus eritematoso sistêmico e eritema necrolítico migratório (SLAPPENDEL, 1988; LIMA et al., 2004). Outros métodos utilizados são a imunohistoquímica e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (DEGRAVE et al., 1994; KENNER et al., 1999; SCHUBACH et al., 2001; MARCONDES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005). Em relação a imunohistoquímica, Tafuri et al. (2004) descreveram um método alternativo, preciso e de menor custo, utilizando soro canino hiperimune como anticorpos primários. Com este método, os autores observaram facilmente formas amastigotas de leishmanias em diferentes órgãos.

Andrade et al. (2002), investigando a transmissão vertical da LVA canina, testaram a sensibilidade da técnica de PCR em comparação com microscopia direta. Os resultados obtidos revelaram 100% de sensibilidade nas amostras de medula óssea, 71,4% no baço e 66,6% no fígado.

Entre os métodos diretos e indiretos, a imunofluorescência indireta (IFI) realizada através de amostras sangüíneas coletadas em papel filtro (Eluato) é a mais utilizada em estudos epidemiológicos e inquéritos para medidas de controle da LVA, devido à facilidade da coleta de amostras, ao baixo custo e reprodutibilidade (NUNES et al., 2001; ALMEIDA et al., 2005; W.H.O., 2008). Entretanto, alguns autores relatam reações cruzadas com infecções por outros tripanosomatídeos, como outras espécies de *Leishmania* ou com o agente da doença de Chagas. Essas reações falso positivas geram um problema, pois nesses casos não há indicação de eutanásia (DA COSTA et al., 1991; RIBEIRO et al., 2007). Outro problema, citado por De Paula et al. (2003) refere-se à baixa sensibilidade desses testes, acarretando

taxas de infecções subestimadas e conseqüentemente permitindo a manutenção de animais infectados em área endêmica.

Pela severidade da LVA no ser humano, as ações sanitárias direcionadas para esta forma da doença são mais rigorosas que aquelas direcionadas à LTA. Assim, programas de controle são implantados nas áreas endêmicas, objetivando interromper o ciclo de transmissão. Tais programas assumem três pontos principais: detecção e tratamento dos casos humanos; borrifação de inseticidas no domicílio e peridomicílio; e monitoramento de cães domésticos, recolhendo e sacrificando os sororeatores (M.S., 2006). No Brasil, estes programas iniciaram-se por volta da década de 50, durante um surto ocorrido no Estado do Ceará, estendendo-se mais tarde para outras regiões do país. A estratégia do sacrifício canino foi por muito tempo priorizada. No entanto, a partir de observações que a eliminação de cães sororeatores exerceu pouca ou nenhuma influência no surgimento de novos casos, humanos ou caninos (EVANS et al., 1992; DIETZE et al., 1995; ASHFORD et al., 1998; PARANHOS-SILVA et al., 1998) abriu-se um questionamento quanto à aplicação dessa medida, realizada de forma vertical, desconsiderando outras variáveis (PARANHOS-SILVA et al., 1998; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001). A partir dessas observações, o Ministério da Saúde elaborou um programa considerando as particularidades de cada região para o estabelecimento de ações de controle individualizadas (M.S., 2006). Para tal, são aplicados esforços no controle vetorial, no conhecimento da fauna e dos parasitas que possam estar circulando nessas regiões.

Devido à complexidade do cenário epidemiológico desse grupo de doenças, as ações de controle devem ser adequadas ao contexto epidemiológico da área em questão para que possam ser efetivas. Na LVA, em área urbana, o cão doméstico continua sendo a principal fonte de infecção para os insetos vetores, fato que tem direcionado esforços na aplicação de métodos cada vez mais sensíveis e específicos para o diagnóstico da LVA nesses animais.

2. JUSTIFICATIVA

A importância das leishmanioses em saúde pública tem aumentado, não só pela expansão geográfica, mas principalmente pela sua introdução e instalação em áreas urbanizadas (M.S., 2006). No Município do Rio de Janeiro, embora não sejam descritos, atualmente, casos humanos de LVA, casos caninos são frequentemente diagnosticados, sendo que nos últimos anos, tem-se observado um aumento nos índices de soroprevalência canina. Tal fato, já foi em outras ocasiões, relacionado ao aparecimento dos casos humanos. Por essa razão, os órgãos responsáveis pelo controle têm tido uma preocupação maior com as ações desenvolvidas neste Município¹.

Atualmente, o Ministério da Saúde brasileiro recomenda a utilização do ensaio imunoenzimático (EIE) para triagem dos animais sororeatores e posterior confirmação pela técnica de IFI, empregando para ambos os métodos, amostras de soro sanguíneo. No município do Rio de Janeiro, a técnica utilizada para o diagnóstico canino é a IFI em amostras de sangue coletadas em papel filtro. Embora o papel filtro seja utilizado no diagnóstico sorológico de inúmeros agravos, nas leishmanioses, poucos estudos compararam o seu uso e o do soro na rotina diagnóstica canina. Um desses estudos demonstrou a ineficiência do controle da LVA em cães quando se utilizou sangue coletado em papel filtro como amostra para os testes sorológicos (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001).

Em recente estudo realizado no município do Rio de Janeiro, no qual 66 cães sororeatores foram submetidos à eutanásia por suspeita de LVA canina, observou-se que 59% estavam parasitados por *L. (L.) chagasi*; 18% por *L. (V.) braziliensis* e 3% estavam co-infectados por ambos agentes (MADEIRA et al., 2006a). Estes achados evidenciaram que a

¹ Dados fornecidos pela pelo Laboratório de Epidemiologia e Controle das Leishmanioses da Secretaria Municipal de Saúde – Rio de Janeiro, RJ.

sorologia não tem poder discriminatório entre a LTA e a LVA canina e que ainda existem questões que merecem ser investigadas, como o emprego das amostras de sangue em papel filtro para triagem sorológica dos animais, uma vez que os cães negativos examinados por essa técnica não são reavaliados nas áreas endêmicas.

Diante desse cenário e devido à importância do cão doméstico na manutenção do ciclo de transmissão da LVA em áreas endêmicas, a IFI realizada através papel filtro para o diagnóstico da LVA canina foi avaliada em uma área do Município do Rio de Janeiro.

3. OBJETIVOS

3. 1. Objetivo Geral

Identificar a permanência de cães infectados por *L. (L.) chagasi* residentes na região de Carapiá, zona oeste do Rio de Janeiro após inquérito sorológico realizado pela Secretaria Municipal de Saúde, utilizando amostras coletadas em papel filtro e processadas pela técnica de IFI.

3. 2. Objetivos Específicos

- i. Identificar um grupo de cães soronegativos diagnosticados através da IFI em papel filtro em área endêmica de LVA;
- ii. Avaliar a acurácia da técnica de IFI em papel filtro e das técnicas EIE e IFI em amostras de soro sanguíneo;
- iii. Identificar, em cães soronegativos a técnica de IFI em papel filtro, a presença de parasitas do gênero *Leishmania* por isolamento em cultura; exame histopatológico; imunohistoquímica e reação em cadeia da polimerase;
- iv. Descrever as possíveis alterações clínicas encontradas em cães infectados por *L. (L.) chagasi* e soronegativos a técnica de IFI em papel filtro.

4. ARTIGOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO

A metodologia empregada neste estudo e os resultados obtidos serão apresentados no formato de artigos científicos submetidos para publicação. Nesta seção encontram-se dois artigos com os resultados relacionados ao projeto.

4.1. Prevalence of canine visceral leishmaniasis in the region of Carapiá, Municipality of Rio de Janeiro: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples.

Artigo submetido ao periódico *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*

Durante um ano de estudo, foi realizado um censo canino em Carapiá, zona oeste do Município do Rio de Janeiro. O inquérito foi realizado em colaboração com a Secretaria Municipal de Saúde (SMS-RJ) para que todas as amostras de cada cão fossem coletadas no mesmo momento. Fragmentos de pele íntegra da face interna do pavilhão auricular foram coletados para isolamento em cultura e sangue (soro e papel filtro) para a realização das técnicas sorológicas EIE e IFI. Os animais foram avaliados clinicamente e aqueles que apresentaram lesões cutâneas também foram biopsiados nestes sítios, para avaliação parasitológica. Foram avaliados 89,4% (n=341) da população de cães pelos métodos descritos acima. A técnica de IFI em papel filtro foi realizada no Laboratório de Epidemiologia da SMS-RJ e as demais foram realizadas no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (IPEC/FIOCRUZ). Foi possível descrever a prevalência da LVA canina na região de Carapiá, avaliar a acurácia, as razões de verossimilhança (RV), os valores preditivos positivos (VPP) e os valores preditivos negativos (VPN) das técnicas sorológicas utilizadas em amostras de papel filtro e de soro sanguíneo, utilizando como padrão ouro os resultados do exame parasitológico (cultura). Os resultados obtidos respondem aos objetivos específicos de nº 1 e 2 desta tese.

4.2. Registro de submissão ao periódico Journal of Veterinary Diagnostic Investigation

Assunto: Journal of Veterinary Diagnostic Investigation - Manuscript ID 08-0278

De: editorial@jvdi.org

Data: Qui, Outubro 2, 2008 3:26 pm

Para: fabiano.figueiredo@ipecc.fiocruz.br ([mais](#))

Prioridade: Normal

Opções: [Ver cabeçalho completo](#) | [Ver Versão para Impressão](#) | [Baixar como um arquivo](#) | [Ver detalhes da mensagem](#)

02-Oct-2008

Dear Dr. Figueiredo:

Your manuscript entitled "Prevalence of canine visceral leishmaniasis in the region of Carapiá, Municipality of Rio de Janeiro: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Veterinary Diagnostic Investigation in chronological order.

Your manuscript number is 08-0278.

Please mention the above manuscript number in all future correspondence or when contacting the Editorial Office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/jvdi> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/jvdi> .

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.

Sincerely,

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Editorial Office

4.3. Clinical and laboratory evaluation of dogs testing seronegative in eluates from a visceral leishmaniasis-endemic area in the Municipality of Rio de Janeiro

Artigo submetido ao periódico *The Veterinary Journal*

O objetivo desse artigo foi verificar a permanência de cães infectados por *L. (L.) chagasi* na região de Carapiá após inquérito epidemiológico realizado em 305 cães para o controle da LVA. Esta fase do estudo visou avaliar, por diferentes métodos, uma amostra cães soronegativos a Imunofluorescência indireta (IFI) em papel filtro. A seleção da amostra foi realizada de forma aleatória a partir do banco de dados onde todos os cães de uma residência foram incluídos, sendo descartados os da subsequente, até completar o total de 146 cães. Os resultados da pesquisa de IgG anti-*Leishmania* na IFI e no Ensaio Imunoenzimático (EIE) nestes animais foram confrontados com os resultados obtidos por outros exames para detecção de *L. (L.) chagasi* realizada em fragmentos cutâneos (isolamento em cultura, exame histopatológico e imunohistoquímica) e no sangue (PCR em papel de filtro). Os resultados obtidos respondem aos objetivos de nº 3 e 4 desta tese.

4.4. Registro de submissão ao periódico The Veterinary Journal

Assunto: A manuscript number has been assigned: YTVJL-D-08-00533
De: "TVJL" <TVJL@elsevier.com>
Data: Sex, Outubro 3, 2008 7:47 am
Para: fabiano.figueiredo@ipef.fiocruz.br
Prioridade: Normal
Opções: Ver cabeçalho completo Ver Versão para Impressão Baixar como um arquivo Ver detalhes da mensagem

Ms. No. YTVJL-D-08-00533
Clinical and laboratory evaluation of dogs testing seronegative in blood eluates from a visceral leishmaniasis-endemic area in the Municipality of Rio de Janeiro

Dear Dr Figueiredo,

Your manuscript has been assigned the following reference number:
YTVJL-D-08-00533

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

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 The Veterinary Journal.

Kind regards,

J. Holdridge
The Veterinary Journal

5. DISCUSSÃO

A LVA representa um grave problema em saúde pública no Brasil, sendo o cão doméstico (*Canis familiaris*) um importante elo na cadeia de transmissão. Com base na expressiva resposta imune humoral apresentada por cães com LVA, inquéritos soropidemiológicos são realizados para o rastreamento de cães supostamente infectados, embora para a confirmação diagnóstica sejam fundamentais a detecção e identificação do parasita. Segundo o manual de controle da LVA do Ministério da Saúde, o teste utilizado para os inquéritos deve ser a IFI (IFI Leishmaniose Visceral Canina/Bio-Manguinhos), distribuído à rede pública de saúde e realizado em amostras de soro sanguíneo. Ainda segundo o manual, os cães sororeatores que apresentarem titulações iguais ou superiores a 1:40 deverão ser submetidos à eutanásia visando à interrupção do ciclo no ambiente urbano. Apesar dessas recomendações a eutanásia desses animais ainda gera polêmica, principalmente nos aspectos relacionados à veracidade dos resultados obtidos nos inquéritos sorológicos (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

No município do Rio de Janeiro, a eutanásia de cães sororeatores vem sendo empregada como medida de controle desde 1979. Para esse controle são realizados inquéritos sorológicos em cães domiciliados, em ciclos semestrais, utilizando a técnica de IFI e amostras de sangue coletadas em papel filtro. Uma vez que nesse município ocorrem simultaneamente ambas as formas das Leishmanioses (LTA e LVA) em cães, os métodos sorológicos apresentam valor limitado na discriminação das infecções (MADEIRA et al., 2006a). O diagnóstico errôneo dos casos positivos pode prejudicar o controle da doença principalmente por criar um fator de confusão, já que os cães infectados por *L. (V.) braziliensis* não possuem a indicação de eutanásia, gerando assim desconfiança na comunidade e insegurança nos profissionais da saúde responsáveis pela retirada de cães sororeatores (M.S., 2006). No

entanto, testes confirmatórios da infecção não são rotineiramente realizados, sendo poucos os estudos que mencionam as espécies de *Leishmania* circulantes nesses animais (LOPES et al., 1984; MARZOCHI et al., 1985; MADEIRA et al., 2006b), e menos ainda estudos relacionados a animais possivelmente infectados, cujos testes sorológicos apresentem resultados negativos, o que poderia estar dando continuidade ao ciclo de transmissão nas áreas endêmicas.

Diante dessas questões, o Ministério da Saúde Brasileiro tem direcionado esforços para o controle da LVA. Em dezembro de 2007, na cidade de Brasília, realizou-se um encontro reunindo representantes dos Laboratórios Centrais (LACENs), do Ministério da Saúde e de pesquisadores de todo o Brasil para a discussão de problemas relacionados ao diagnóstico canino. Ao término do encontro, ficou constatado que existe a necessidade de uniformizar os diferentes métodos de diagnóstico empregados, principalmente no que tange a amostra utilizada para os testes sorológicos (soro e sangue em papel filtro). Ficou evidente, também, a importância da construção de um painel multicêntrico de soros canino para que seja feita a validação das técnicas utilizadas atualmente para o diagnóstico da LVA canina. Tal compromisso foi assumido por um grupo da FIOCRUZ e da Secretaria de Vigilância em Saúde - M.S. No momento, encontra-se em andamento a coleta de amostras biológicas (sangue, sangue em papel filtro e fragmentos de pele de cães em diferentes áreas endêmicas de LVA no Brasil).

O objetivo principal desta tese foi identificar a permanência de cães infectados por *L. (L.) chagasi* em área endêmica, após inquérito sorológico realizado no Município do Rio de Janeiro, utilizando amostras coletadas em papel filtro processadas pela técnica de IFI. Para isto, selecionou-se uma área onde o inquérito sorológico canino é realizado rotineiramente, com registro de casos.

Os resultados obtidos foram apresentados em dois artigos. No primeiro artigo, que trata da seleção dos animais soronegativos a IFI em papel filtro, foram avaliados 305 animais da região de Carapiá, área endêmica de LVA. Neste artigo, foram descritos os resultados da avaliação da IFI (utilizando dois pontos de corte: 1:40 e 1:80) e do EIE em amostras de soros, comparando com os resultados obtidos na IFI em papel filtro. Dos 305 animais avaliados, foi possível isolar *Leishmania* sp. de nove, resultando em uma prevalência de 3% (1,4;5,7) com um intervalo de confiança (IC) de 95%. A sensibilidade da IFI em amostras de sangue coletadas em papel filtro, processadas e analisadas no Laboratório de Epidemiologia do Rio de Janeiro (SMS), mostrou-se muito inferior aos resultados obtidos pelas técnicas sorológicas de IFI e EIE, quando empregou-se amostras de soro. Embora, as técnicas, empregando soro e papel filtro, tenham sido realizadas em laboratórios distintos, os resultados sugerem que a IFI em papel filtro pode não ser adequada nos inquéritos epidemiológicos. No presente estudo, a especificidade do EIE em soro foi superior aos 96% recomendados pelo Ministério da Saúde. Tais resultados sugerem que o EIE possa ser empregado como teste de triagem, uma vez que apresentou uma melhor acurácia que a IFI. Outro motivo para indicação do EIE como método de triagem é a leitura automatizada dos resultados, que permite maior padronização e reprodutibilidade em diferentes laboratórios, quando comparada a IFI.

No segundo artigo, foram descritos os resultados de uma amostra de cães dos 305 examinados anteriormente, selecionada aleatoriamente a partir dos animais soronegativos pela técnica IFI em papel filtro e que foram analisados por IFI e EIE empregando soro sanguíneo e por outros métodos (cultura, histopatologia, imunohistoquímica em biopsia de pele e PCR em sangue dissecado em papel filtro) objetivando evidenciar o parasita ou DNA parasitário. Dos 146 cães soronegativos a IFI em papel filtro selecionados, foi comprovada a presença de *L. (L.) chagasi* em cinco animais, cujo isolamento foi feito a partir de fragmentos de pele íntegra. Este resultado demonstra que a IFI em papel filtro, atualmente empregado na triagem

dos animais, nos inquéritos realizados no município do Rio de Janeiro, permitiu que cães infectados fossem deixados na área estudada. Esse achado aponta uma possível falha no diagnóstico da LVA canina, sugerindo que em outras regiões, animais infectados também possam estar permanecendo nas áreas endêmicas, dando continuidade ao ciclo da doença. Neste estudo, o EIE e a IFI em amostras de soro, mostraram-se 100% sensíveis entre os animais positivos para as outras técnicas de identificação do parasito e baixa especificidade da IFI no diagnóstico dos animais verdadeiramente sadios o que também foi comprovado pelos resultados do primeiro artigo. Em relação ao exame clínico, somente um animal, com diagnóstico confirmado pelo exame parasitológico, apresentaram alterações compatíveis com LVA canina. O baixo número de animais sintomáticos observados neste grupo pode estar relacionado à periodicidade da realização do inquérito, com retirada dos animais com quadros mais graves da doença.

O método considerado padrão ouro no diagnóstico das leishmanioses é o isolamento do agente infeccioso em meios de cultivo apropriados. Na LVA canina, os espécimes clínicos 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 (BARROUIN-MELO et al., 2004; MADEIRA et al., 2006b; BARROUIN-MELO et al., 2006). Em estudo anterior, 394 cães sororeatores para leishmaniose, provenientes da cidade de Belo Horizonte (MG), foram eutanasiados pelo Programa de Controle das Leishmanioses. Dos animais estudados, pode-se comprovar a presença de *L. (L.) chagasi* em 310 (78,7%) cães, independente do local de pele investigado². Tais resultados reforçam o parasitismo de pele íntegra por *L. (L.) chagasi*, já descrito em outros estudos em animais assintomáticos, demonstrando importância desses animais no ciclo epidemiológico (MADEIRA et al., 2006a).

² Artigo aceito ao periódico Veterinary Science com o título: Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target?

Os resultados dessa tese foram apresentados aos profissionais responsáveis pelo controle das leishmanioses das Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde do Rio de Janeiro. Após uma reunião entre essas instituições e o IPEC/FIOCRUZ, foram propostas as seguintes mudanças nas ações de controle da LVA canina: utilização de amostras de soro sanguíneo processadas pelo EIE.

6. CONCLUSÕES

- i. Foi identificado um grupo de cães soronegativos diagnosticados através da IFI em papel filtro.
- ii. O ensaio imunoenzimático (EIE) apresentou melhor acurácia quando comparado à IFI em amostras coletas em papel filtro e em soro sanguíneo.
- iii. *Leishmania (L.) chagasi* foi isolada de 3,4% cães soronegativos à IFI em papel filtro, confirmando a presença de resultados falso negativos por essa técnica.
- iv. Entre os 5 cães infectados por *L. (L.) chagasi*, apenas um animal apresentou sintomatologia clássica da LVA canina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Alves WA, Bevilacqua PD. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cadernos de Saúde Pública*. 2004;20(1):259-65.

Andrade HM, de Toledo Vde P, Marques MJ, Franca Silva JC, Tafuri WL, Mayrink W, et al. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Veterinary Parasitology*. 2002;103(1-2):71-81.

Aragão HB. Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. *Brazil Médico*. 1922;36:129.

Araújo Filho NA, J. R. Coura, et al. Leishmaniose tegumentar americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro. IV. Reservatórios domésticos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1978; v.15:82-103.

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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;59(1):53-7.

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

Barbosa GM, Marzochi MC, Massard CL, Lima GP, Confort EM. Epidemiological aspects of canine American tegumentary leishmaniasis in the Municipality of Paraty, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 1999;15(3):641-6.

Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, de Andrade Filho FA, Trigo J, Juliao FS, Franke CR, et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Veterinary Journal*. 2006;171(2):331-9.

Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Trigo J, Aguiar PH, dos-Santos WL, Pontes-de-Carvalho L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(2):195-7.

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

CARINE A, PARANHOS U. Identification de l'Úlcera de Bauru avec le bouton d' Orient. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 1909;2:225.

CENEPI. Centro Nacional de Epidemiologia. Informe Epidemiológico do SUS, Ano VI. 1997(I,II,III).

Cerqueira AGC, Vasconcelos A. A leishmaniose nesta capital. Boletim Sanitário. 1922;1:35.

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

Da Costa CA, Genaro O, de Lana M, Magalhaes PA, Dias M, Michalick MS, et al. Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1991;24(1):21-5.

De Paula AA, da Silva AV, Fernandes O, Jansen AM. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. Journal of Parasitology. 2003;89(4):832-6.

Deane LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre Reservatórios e Transmissores no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária. 1956.

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

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

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

Deane LM, Deane MP. Encontro de Leishmanias nas visceral e na pele de uma rapôsa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. O Hospital. 1954;45:419 - 421.

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. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1994; 89:463-469.

Dias M, Mayrink W, Deane LM, da Costa CA, Magalhaes PA, Melo MN, et al. Epidemiology of mucocutaneous leishmaniasis Americana. I. Study of reservoirs in an endemic region of the State of Minas Gerais. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1977;19(6):403-10.

Dietze R, Falqueto A, Valli LC, Rodrigues TP, Boulos M, Corey R. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis with a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1995;53(1):40-2.

Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa Ade A, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. The Journal of Infectious Diseases. 1992;166(5):1124-32.

Falqueto A, Sessa PA, Ferreira AL, Vieira VP, Santos CB, Varejao JB, et al. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espirito Santo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98(8):1003-10.

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

Fonseca F. Infecção experimental do cão por cultura de *Leishmania braziliensis*. *Ann. Fac. Med.* 1928;3:53.

Galimbertti MZ, Katz G, V.L.F. C-N, Rodas LAC, Casanova C, Costa AI. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1999;1:217.

Genaro O, da Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL, et al. Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1990;23(2):121.

Kenner JR, Aronson NE, Bratthauer GL, Turnicky RP, Jackson JE, Tang DB, et al. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. *Journal of Cutaneous Pathology - Journal Information*. 1999;26:130-136.

Lainson R, Ryan L, Shaw JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1987;82(3):421-4.

Lima WG, Michalick MS, de Melo MN, Luiz Tafuri W, Luiz Tafuri W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica*. 2004;92(1):43-53.

LINDENBERG A. A úlcera de Bauru e seu micróbio. *Revista de Medicina, Universidade de São Paulo*. 1909;12: 116-120.

Lopes UG, Momen H, Grimaldi G, Jr., Marzochi MC, Pacheco RS, Morel CM. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitology*. 1984;70(1):89-98.

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

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

Madeira F, Uchoa CM, Leal CA, Macedo Silva RM, Duarte R, Magalhaes CM, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003;36(5):551-5.

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. *Veterinary Parasitology*. 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. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006b;100(5):442-5.

Marcondes CB, Pirmez C, Silva ES, Laurentino-Silva V, Steindel M, Santos AJ, et al. A survey of visceral leishmaniasis in dogs from Santa Maria and neighbouring municipalities, State of Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003;36(4):499-501.

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). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1985;80(3):349-57.

Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina*. 1992;63:82-104.

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

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

Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. 2000;16(5):188-9.

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

Nunes VL, Galati EA, Nunes DB, Zinezzi RO, Savani ES, Ishikawa E, et al. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2001;34(3):299-300.

Oliveira CC, Lacerda HG, Martins DR, Barbosa JD, Monteiro GR, Queiroz JW, et al. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Tropica*. 2004;90(2):155-62.

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*. 2005;6(1):41-47.

Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, Franca-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral

leishmaniasis in Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2001;65(5):510-7.

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*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1996;55(1):39-44.

Paranhos-Silva M, Nascimento EG, Melro MC, Oliveira GG, dos Santos WL, Pontes-de-Carvalho LC, et al. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. Acta Tropica. 1998;69(1):75-83.

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

Pedroso A. A leishmaniose local do cão. Ann. Paul. Med. Cir. 1913;1:1-33.

Penna HA. Leishmaniose visceral no Brasil. Brasil Médico. 1934;949-950.

Pereira GMF, Fonseca HHR. Leishmaniose tegumentar americana: epidemiologia e controle. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1994;27:45-50.

Pirmez C, Coutinho SG, Marzochi MC, Nunes MP, Grimaldi G, Jr. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1988;38(1):52-8.

Reithinger R, Canales Espinoza J, Llanos-Cuentas A, Davies CR. Domestic dog ownership: a risk factor for human infection with *Leishmania (Viannia)* species. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2003;97(2):141-5.

Ribeiro FC, Schubach AO, Mouta-Confort E, Schubach TM, Madeira Mde F, Marzochi MC. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. Veterinary Parasitology. 2007;148(3-4):200-6.

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

Santa Rosa ICA, Oliveira ICS. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. Clínica Veterinária. 1997;2:24-28.

Santos EG, Marzochi MC, Conceicao NF, Brito CM, Pacheco RS. Epidemiological survey on canine population with the use of immunoleish skin test in endemic areas of human American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1998;40(1):41-7.

Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira A, Sartori A, de Oliveira-Neto M, Mattos M, et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001;96:987-996.

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

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

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

Slappendel RJ. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *The Veterinary quarterly*. 1988;10(1):1-16.

Tafari WL, Santos RL, Arantes RM, Goncalves R, de Melo MN, Michalick MS, et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunological Methods*. 2004;292(1-2):17-23.

W.H.O. World Health Organization Control of Leishmaniasis. Technical Report Series 2008:793.

8. ANEXOS

8.1. Termo de consentimento



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



Termo de Consentimento

Eu, _____, portador da carteira de identidade nº _____, expedida pelo órgão _____, proprietário (a) do animal _____, espécie _____, raça _____, registro _____; autorizo que nele sejam aplicadas técnicas anestesiológicas como sedações, anestésias locais e ou gerais.

Autorizo também a utilização dos dados e materiais coletados para a pesquisa relacionada à Leishmaniose Visceral Americana canina com o título “**Identificar a permanência de cães infectados por *Leishmania (leishmania) chagasi* em área endêmica, após inquérito sorológico realizado no Município do Rio de Janeiro**”, realizada pelo responsável técnico Fabiano Borges Figueiredo CRMV: 6519, sabendo que a identificação desse animal será mantida em sigilo.

Se houver algum problema em relação aos procedimentos realizados nos cães o veterinário responsável poderá ser encontrado pelo telefone (021) 38659536.

Rio de Janeiro, _____ de _____ 200_____

8.2. Ficha de avaliação dos animais estudados

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"/> VS		<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"/>			

