

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

“Leishmaniose visceral: estudo de reservatório canino na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil”

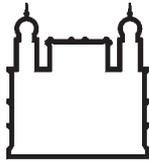
por

Rafaela dos Santos Alonso

Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Barbosa de Souza

Rio de Janeiro, fevereiro de 2014.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Esta tese, intitulada

“Leishmaniose visceral: estudo de reservatório canino na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil”

apresentada por

Rafaela dos Santos Alonso

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior

Prof. Dr. Mauro Célio de Almeida Marzochi

Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo

Prof.^a Dr.^a Fernanda Nunes Santos

Prof. Dr. Marcos Barbosa de Souza – Orientador

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

A454 Alonso, Rafaela dos Santos
Leishmaniose Visceral: estudo de reservatório canino na
Ilha da Marambaia, Município de Mangaratiba, Rio de
Janeiro, Brasil. / Rafaela dos Santos Alonso -- 2014.
vii,89 f. : il. ; tab. ; graf. ; mapas

Orientador: Sousa, Marcos Barbosa de
Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública
Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2014.

1. Leishmaniose Visceral-epidemiologia. 2. Estudos
Soroepidemiológicos. 3. Doenças do Cão-epidemiologia.
I. Título.

CDD – 22.ed. – 616.93640981

Agradeço a Deus pela dedicação de todos que
contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho dedicado a minha querida família,
apoio incondicional que tanto me maravilha.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

No presente estudo foi realizado um inquérito soropidemiológico multimétodo e censitário para leishmaniose visceral na população canina da Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. Embora a região seja considerada indene e silenciosa para a doença é endêmica para leishmaniose tegumentar americana. Neste contexto, a possibilidade de co-infecção de cães *L.brasiliensis* e *L. infantum* e a recente dispersão da leishmaniose visceral canina para áreas do Estado sem relato de casos humanos, reforça a necessidade de avaliar fatores de risco de transmissão que nortearão futuras medidas de controle à doença. No censo foram identificados 125 cães dos quais 121 realizaram exame sorológico pelos métodos de TR DPP Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos, IFI Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos e EIE Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos. Tendo o ELISA como método de referência a soroprevalência foi de 18,1%. 10 cães foram soropositivos para os três métodos sorológicos; cinco para IFI e EIE; dois para IFI e TR DPP; dois para EIE e TR DPP e cinco exclusivamente para o TR DPP; 13 para IFI; quatro para EIE. Tais resultados demonstraram a concordância de ajuste de 0,71% para o TRDPP e 0,67% para o IFI o que eleva a confiabilidade dos dados e diminui as chances de erros de aferição. O desempenho de IFI (Co-sensibilidade- 79,45%, Co-especificidade- 65%, VPP-50%, VPN-95,60%, Verossimilhança positiva- 5,3, Verossimilhança negativa- 2,4), como método de triagem recomendado pelo Ministério da Saúde, ficou a quem ao desempenho do TRDPP (Co-sensibilidade- 59,09%, Co-especificidade- 92,93%, VPP-65%, Verossimilhança positiva- 8,3, Verossimilhança negativa- 4,4). Dos 22 cães positivos no ELISA, sete apresentaram cultivo positivo com isolamento de *Leishmania infantum* e em uma amostra evidenciou-se *Trypanosoma spp.* destacando a possibilidade de reações cruzadas na sorologia. Dos sete animais infectados por *L.infantum* cinco concentravam-se na Praia Suja e todos apresentavam manifestação clínica compatível com leishmaniose visceral, cinco eram criados de forma livre (considerados andarilhos) e dois presos a coleira junto a casa. Em todos os casos os proprietários residiam próximo a mata residual. O inquérito entomológico realizado mostrou várias espécies de flebotomíneos dentre as quais *L.longipalpis* em baixa densidade, *L.intermédia* e *M.migonei*, em elevada densidade sugerindo sobreposição dos ciclos de transmissão de LTA e LVA na Ilha de Marambaia. A evidência epidemiológica da circulação da *L.infantum* na Ilha de Marambaia indica a necessidade de execução de ações de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde e a continuidade de estudos epidemiológicos que possam aferir as medidas empreendidas sobre a população canina da Ilha da Marambaia.

PALAVRAS-CHAVES: Leishmaniose visceral, triagem sorológica da leishmaniose visceral canina, evidência epidemiológica da leishmaniose visceral canina na Ilha da Marambaia- RJ

ABSTRAC

In this study, a multimethod and census seroepidemiological survey for visceral leishmaniasis in the canine population of Marambaia Island, the city of Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brazil was performed. Although the region is considered harmless and silent for the disease is endemic for American cutaneous leishmaniasis. In this context, the possibility of co-infection of dogs *L. brasiliensis* and *L. infantum* and the recent spread of canine visceral leishmaniasis in areas of the state reported no human cases reinforces the need to assess transmission risk factors that will guide future measures control the disease. In the census 125 dogs of which 121 underwent serological examination by DPP TR methods of Canine Visceral Leishmaniasis Bio - Manguinhos were identified, IFI Canine Visceral Leishmaniasis Bio - Manguinhos and EIE Canine Visceral Leishmaniasis Bio - Manguinhos. Since the ELISA as the reference method seroprevalence was 18.1%. 10 dogs were seropositive for all three serological methods, five for IFA and EIA, two IFIs and TR DPP, two for LES and TR DPP -five exclusively for the DPP TR; 13 for IFI, four for LES. These results demonstrated the correlation adjustment of 0.71% to 0.67% and TRDPP for the IFI which increases data reliability and reduces the chances of errors of measurement. The performance IFI (co-sensitivity - 79.45% Co- 65% - specificity, PPV -50%, NPV -95, 60% 5,3 - Likelihood positive, negative likelihood - 2.4), as a method screening recommended by the Ministry of Health, who was the performance TRDPP (co-sensitivity - 59.09%, Co - 92.93% - specificity, PPV -65%, positive likelihood - 8.3, negative likelihood - 4.4). Of the 22 ELISA positive dogs, seven had positive culture with isolation of *Leishmania infantum* and one sample revealed a *Trypanosoma* spp. highlighting the possibility of cross-reactions in serology. Of the seven animals infected with *L. infantum* five massed on the beach dirty and all had clinical manifestations compatible with visceral leishmaniasis, five were set free form (considered wanderers) and two prisoners on the leash by the house. In all cases the owners lived near residual forest. The entomological survey showed several sandfly species among which *L. longipalpis* at low density, and *L. intermedia*, *M. migonei* in high density, suggesting overlap of the transmission cycles of ACL and AVL in Marambaia Island. Epidemiological evidence of movement of *L. infantum* on the island of Marambaia indicates the need for enforcement of control measures recommended by the Ministry of Health and the continuity of epidemiological studies to assess the measures taken on the canine population of Marambaia Island.

KEYWORDS : Visceral leishmaniasis, serological screening of canine visceral leishmaniasis, epidemiological evidence of canine visceral leishmaniasis in Marambaia Island - RJ

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO -----	7
1.1- Leishmanioses -----	7
1.2- Ciclos de Transmissão-----	7
1.3- Os Parasitas -----	8
1.4- Os Vetores -----	10
1.5- Os Reservatórios -----	12
1.6- Leishmaniose Visceral Canina -----	14
1.7- Epidemiologia das Leishmanioses -----	15
1.7.1- Leishmaniose Visceral no Brasil -----	17
1.7.2- Leishmaniose Visceral no Rio de Janeiro-----	18
1.8- Considerações sobre a Área de Estudo -----	21
2- JUSTIFICATIVA -----	24
3-OBJETIVOS -----	25
3.1- Objetivo Geral -----	25
3.2- Objetivos Específicos -----	25
4- MATERIAIS E MÉTODOS -----	26
4.1- Censo Canino -----	26
4.2- População de Estudo -----	26

4.3- Amostra -----	26
4.3- Implantação de Microchips -----	26
4.4- Exame Clínico dos Animais -----	27
4.5- Coleta de Sangue -----	27
4.6- Execução dos Testes Sorológicos -----	28
4.7- Avaliação do Desempenho dos Testes Sorológicos -----	28
4.8- Cultura, Isolamento e Caracterização Fenotípica -----	30
4.9- Inquéritos Flebotômicos-----	31
4.10- Licença e Assinatura de Termo de Consentimento -----	33
4.11- Colaboração-----	33
5- RESULTADOS -----	34
5.1- Censo Canino -----	34
5.2- Avaliação Clínica e Implantação de Microchips -----	35
5.3- Sorologia -----	36
5.4- Cultura, Isolamento e Caracterização Fenotípica-----	41
5.5- Inquéritos Flebotômicos-----	43
6- DISCUSSÃO -----	47
7- CONCLUSÕES -----	55
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	56

ANEXO1	-----	67
ANEXO2	-----	70
ANEXO3	-----	72
ANEXO4	-----	74
ANEXO5	-----	81
ANEXO6	-----	83

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Figura 1- Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i> - Adaptado WHO 2012-----	9
Figura 2- Distribuição dos casos caninos e humanos de LV no Estado do Rio de Janeiro 2007-2012-----	20
Figura 3- Localização da Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro-----	21
Figura 4- Praias habitadas da Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro ----	22
Figura 5- Armadilha HP inserida na Mata da Gruta do Hotel-----	32
Figura 6- Canino Cotó (Praia Suja): primeiro animal identificado com clínica compatível com LV (Caquexia e hiperplasia de nódulo linfático cervical e poplíteo)-----	35
Figura 7- Teste Rápido <i>Dual Path Platform</i> positivo para o canino Cotó residente na Praia Suja, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro -----	36
Figura 8- Lesão cutânea no pavilhão auricular do canino Juli (Praia da Caetana) cuja amostra foi positiva para os três métodos sorológicos utilizados-----	41
Gráfico 1- Casos humanos confirmados de leishmaniose visceral, por município de residência e autoctonia, no período de 2007 a 2012, Estado do Rio de Janeiro. Fonte Sinan/ GDTVZ -----	19
Gráfico 2- Distribuição quanto à localidade (praias) das amostras positivas para os métodos sorológicos usados-----	39
Gráfico 3- Distribuição das amostras positivas para ELISA quanto à localidade (praias)-----	40
Gráfico 4- Frequência de flebotomos de acordo com a pluviosidade. Ilha da Marambaia CADIM – Janeiro a Dezembro /2010-----	46
Tabela 1- Posição taxonômica dos flebotomíneos- Adaptado Young & Duncam-----	11
Tabela 2- Classificação do índice <i>Kappa (K)</i> -----	29
Tabela 3 - Distribuição da população canina ao longo das praias da Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro -----	35
Tabela 4 & 5- Avaliação dos parâmetros sorológicos do TRDPP utilizando ELISA como teste de referência-----	37
Tabela 6 & 7- Avaliação dos parâmetros sorológicos do RIFI para Leishmaniose visceral canina Bio-Manguinhos utilizando ELISA como teste de referência-----	38
Tabela 8- Resultado da cultura e isolamento de amostras dos cães soropositivos para ELISA---	42
Tabela 9- Números totais e percentuais de flebotomíneos coletados na Ilha da Marambaia / CADIM – Período de Janeiro a Dezembro de 2010-----	44

LISTA DE ABREVIATURAS

6PGDH- 6-fosfogluconato desidrogenase

CADIM- Centro de Adestramento da Ilha da Marambaia

CEPA- Centro de Ensino e Pesquisa Aplicada

DTI- Divisão de Transmissíveis e Imunopreviníveis

EFI- Eficiência

ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ENSP- Escola Nacional de Saúde Pública

ESP- Especificidade

G6PDH- Glicose 6-fosfato desidrogenase

GDTVZ- Gerencia de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses

GPI- Glicose fosfato isomerase

IOC- Instituto Oswaldo Cruz

IPEC- Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

K- Kappa

LT- Leishmaniose Tegumentar

LTA- Leishmaniose Tegumentar Americ

LV- Leishmaniose Visceral

LVA- Leishmaniose Visceral Americana

LVc- Leishmaniose Visceral Canina

LVh- Leishmaniose Visceral Humana

MS- Ministério da Saúde

NH- Nucleosidase

NNN- Novy, MacNeal e Nicolle

P- Prevalência

Pe- Concordância bruta

RIFI- Reação de Imunofluorescência Indireta

SEM- Sensibilidade

SESRJ - Secretaria Estadual de Saúde do Governo do Estado de Rio de Janeiro.

SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SINVAS- Sistema Nacional de Vigilância Ambiental e Saúde

SMS- System Management Server

SVEA- Superintendência de Vigilância Epidemiológica e Ambiental

SVS- Subsecretaria de Vigilância em Saúde

TRDPP- Teste Rápido- Dual Path Plataform

V₋ - Verossimilhança negativa

V₊ - Verossimilhança positiva

VPN- Valor Preditivo de Negatividade

VPP- Valor Preditivo de Positividade

1- INTRODUÇÃO

1.1- Leishmanioses

Leishmanioses são infecções causadas por protozoários parasitos intracelulares obrigatórios pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e apresentam significado clínico e epidemiológico diverso envolvendo diferentes espécies de *Leishmania* que podem infectar ser humano, entre outros mamíferos hospedeiros. Cerca de 40 espécies de insetos vetores da família *Phlebotominae* tem papel central na transmissão e manutenção da protozoose. (Dantas-Torres & Filho-Brandão, 2006). No Brasil, são referidas quatro espécies principais de interesse médico-sanitário: *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum*. As três primeiras são responsáveis pelos casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA), e a última pelos casos de leishmaniose visceral americana (LVA) (Marzochi & Marzochi, 1994).

1.2- Ciclos de Transmissão

Por ser um sistema multi-hospedeiros as leishmanioses apresentam ciclos de transmissão complexos, de distribuição focal e descontínua. Peculiaridades temporais, espaciais e outros fatores (clima, ação antrópica no meio ambiente, alterações populacionais de hospedeiros) influenciam na transmissão. (Ashford, 1996; Ashford, 1997).

Estudos epidemiológicos envolvendo parasitos, vetores e hospedeiros são fundamentais a formulação de medidas eficazes de controle. Neste contexto, a competência de reservatório e uma das faces da interação parasito-multi-hospedeiros e

sua compreensão representa uma ferramenta útil na interpretação da dinâmica de circulação do parasito em determinada região (Chaves *et.al.*, 2007).

1.3- Os Parasitos

Leishmania são protozoários digenético (heteroxenos), com formas promastigotas e paramastigotas (único flagelo livre) no trato digestivo do inseto vetor, e amastigotas arredondados (sem flagelo livre) exclusivamente em células do sistema monocítico fagocitário dos hospedeiros vertebrados (Lainson & Shaw, 1987).

Devido a grande semelhança da organização ultraestrutural das leishmanias é difícil ou praticamente inviável a distinção das espécies através das características morfológicas. Ademais, as leishmanias causam doenças com características heterogêneas peculiares e não se pode atribuir sua etiologia a um mesmo agente patogênico.

Afim de superar os entraves na sistemática, métodos moleculares foram implementados, sendo o de multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) considerado a ferramenta-ouro na identificação de espécies de *Leishmania*.

A **Figura 1**, adaptada e baseada no esquema publicado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012) apresenta os subgêneros e espécies de *Leishmania* patogênicas ao ser humano.

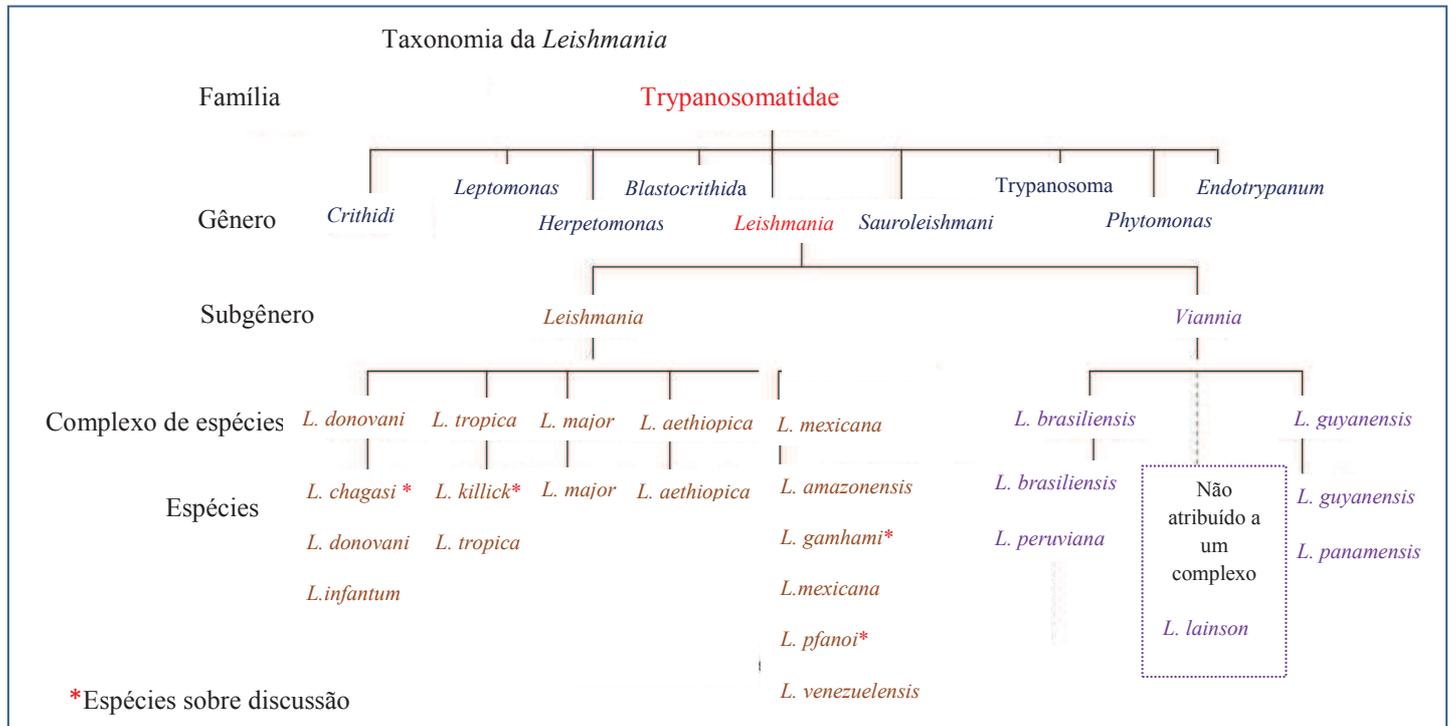


Figura 1- Taxonomia do gênero *Leishmania*- Adaptado WHO 2012

Constantes revisões da taxonomia da *Leishmania sp.*, fomentadas por novas técnicas, trazem conhecimento mais apurado e abrem discussões sobre as espécies identificadas. Na atualidade são descritas cerca de 17 espécies, outrora 22 espécies, associadas as formas viscerotrópicas e dermatrópicas da doença (Banûls *et al.* 2007, Silveira *et al.* 2002).

A infecção por espécies viscerotópicas, pertencentes ao Complexo *L. donovani*, causam em humanos o Calazar ou Leishmaniose Visceral humana (LVh) com sintomatologia diversa e dependente do parasito e da resposta imune do hospedeiro, variando desde casos assintomáticos a atípicos, como nódulos dérmicos pós-calazar, até a doença clássica caracterizada por emagrecimento, caquexia, febre, hepatoesplenomegalia, anasarca, linfadenopatia, hipergamoglobulinamia com concomitante supressão da resposta imune celular (Pearson *et al.*, 1983).

Lukes *et al.* (2007) por meio do detalhamento molecular e análise filogenética propôs a divisão do Complexo *L. donovani* em grupos dois grupos monofiléticos: o

L. donovani e *L. infantum*. A partir desta nova proposta taxonômica estudos no Sudão identificaram *L. infantum* e *L. archibaldi*, assim como *L. donovani*, e no Novo Mundo demonstrou-se que *L. chagasi* é geneticamente homóloga a *L. infantum*, sugerindo uma introdução recente desta última no continente americano (Quinnell & Courtenay, 2009).

As demais espécies são dermatrópicas e causam a leishmaniose cutânea, com formação de úlceras leishmanióticas únicas ou múltiplas, como também de leishmaniose mucocutânea, aonde a mucosa também é acometida. Já a apresentação clínica da forma difusa ocorre em pacientes infectados com *L. amazonensis* e anérgicos a infecção.

1.4- Os Vetores

Embora existam outras formas de transmissão das leishmanioses descritas na literatura (picada de carrapato ou pulga, transfusão sanguínea, transplante de órgão) a mais comum e frequente é pela picada de dípteros da Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, conhecidos como flebotomíneos. Os gêneros de importância sanitária são *Phlebotomus*, no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. (WHO, 2010)

A posição da espécie do Velho Mundo é geralmente aceita e é menos controversa do que as espécies do Novo Mundo. Para os flebotomíneos neotropicais a maioria dos trabalhos segue a classificação de Lewis, revisada por Young & Duncan (1994), que reconhece seis gêneros, sendo 15 subgêneros e 15 grupos de espécie dentro do gênero *Lutzomyia* **Tabela 1.**

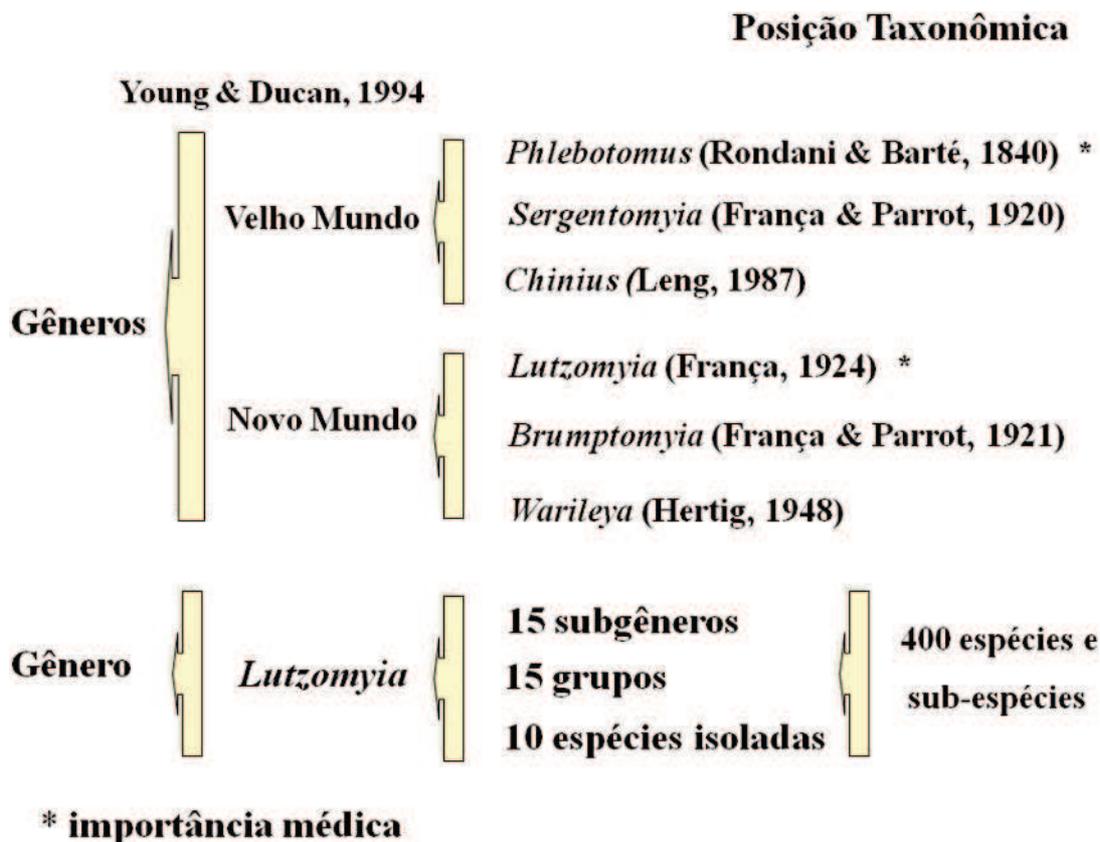


Tabela 1- Posição taxonômica dos flebotomíneos neotropicais. Adaptado Young & Duncam (1994)

Segundo os critérios de Killick-Kendrick (1990) para incriminar flebotomíneos como vetores de leishmanioses (antropofilia, distribuição coincidente com a doença, infecção natural por *Leishmania*), existem no Brasil duas espécies vetores de LVA, a saber: *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938). Ainda que *L. shannoni* e *L. young* também possam transmitir, nas Américas, *L. infantum* em condições epidemiológicas especiais (Gramiccia & Gradoni, 2005) essas espécies não são consideradas vetores importantes da LVA no país. No Estado do Rio de Janeiro verifica-se por meio dos relatos de trabalhos isolados a dispersão de *L. longipalpis* (Carvalho, 1997; Souza *et al.*, 1981; Souza *et al.*, 2005; Rangel *et al.*, 1986;

Araújo, 1978) o que se faz acompanhar da dispersão dos casos de LVA humana requerendo contínua vigilância epidemiológica.

Na estruturação do SINVAS (Sistema Nacional de Vigilância Ambiental e Saúde), considerando-se o controle da LVAh foi ampliado o papel da vigilância dos vetores para além dos limites clássicos. Nesse sentido, o uso de atributos vetoriais na Vigilância Ambiental tende a ser centrada no resgate de processos ecológicos, epidemiológicos, climáticos e sociais envolvidos na domiciliação e urbanização dos insetos vetores. As alterações ambientais e a importação de vetores exóticos requerem, portanto, uma vigilância que seja capaz de monitorar permanentemente esses fatores, para avaliação contínua dos programas de prevenção e de controle das doenças por eles transmitidas.

Para minimizar os riscos de transmissão vetorial das doenças, seja no âmbito da saúde pública ou no âmbito econômico, é necessário ter em mãos o mapa da distribuição das principais espécies dos municípios. Nesse sentido, os flebotomíneos transmissores das leishmanioses, assumem particular potencialidade na introdução, dispersão e manutenção desses agentes patogênicos em ambientes urbanos, rurais e florestais (Costa *et. al.* 2007).

1.5- Os Reservatórios

Por apresentar uma alta diversidade genética as *Leishmanias* têm capacidade de infectar múltiplos e “novos” hospedeiros. As diferentes espécies parasitadas podem ser divididas segundo características epidemiológicas em hospedeiros primários ou reservatórios, os quais mantêm o parasito na ausência de outros hospedeiros; secundários, capazes de transmitir, mas não de manter o parasito na ausência do hospedeiro primário, e acidental que usualmente não transmite o parasito (Quinnell & Courtenay, 2009).

O reservatório, como um sistema ecológico no qual o parasito sobrevive, deve ser consistente, equilibrado e ser considerado sempre numa escala espaço-temporal única (As. Am. Salud Pública, 1970 ; Ashford, 1997; Haydon *et. al.*, 1997). Assim, os critérios para definir uma espécie como reservatório são complexos e é particularmente difícil a distinção entre hospedeiro primário e secundário.

A partir destas considerações, o registro de infecção em animais silvestres, (roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres) e animais domésticos (*Equus caballus*, *Canis familiaris*, *Felis catus domesticus*) por espécies de *Leishmanias sp.* dermatrópicas não se fez acompanhar de evidências científicas que comprovem o papel destes como reservatórios (MS-SINAN, 2007).

No entanto, para a LV observa-se que nos diferentes focos da doença no Mundo há uma grande variedade de animais domésticos e silvestres (p.ex. Chacal- Latyshev *et. al.* 1951; *Lycalopex vetulus*- Deane & Deane 1955) incriminados como reservatórios. Neste contexto, destaca-se o cão doméstico (*Canis familiaris*) cuja importância epidemiológica no ciclo de transmissão de LV é descrita desde 1908 por Nicolle e Conte, na Tunísia (Alencar *et. al.*, 1978).

A presença de formas amastigotas infectivas aos flebotomíneos na pele do cão (Deane & Deane, 1955), a proximidade dos cães aos humanos e a coexistência da LV com a doença humana em todos os focos conhecidos no Brasil sugerem que o cão possa manter e amplificar ciclos instalados no peridomicílio e confirmam o papel do cão doméstico como principal reservatório LV no Brasil (Deane & Deane, 1955; Alencar *et. al.*, 1978; Paranhos-Silva, 1998).

A partir desses estudos, os órgãos sanitários no Brasil implementaram medidas de interrupção do ciclo de transmissão focadas na identificação e eliminação de cães suspeitos.

No período compreendido entre 1980 a 1991 cerca de 137,243 cães foram sacrificados durante as atividades do Programa de Controle das Leishmanioses no Brasil, porém no mesmo período houve expansão da doença para áreas antes silenciosas e elevação da incidência de casos humanos revelando a necessidade de reavaliação das medidas de controle no Brasil (Alves & Bevilacqua, 2004).

Estratégias alternativas no controle da leishmaniose visceral (LVc) têm sido propostas desde o coleira impregnada com inseticida ao uso de vacinas, medidas essas ainda em estudo e que vem sendo aplicadas erroneamente por profissionais da área (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006).

1.6- Leishmaniose Visceral Canina

Embora seja descrita a infecção natural do cão por *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. brasiliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana* e *L. peruviana* sua importância epidemiológica como reservatório encontra-se no ciclo de transmissão de *L. infantum* (Deureure, 1999).

Com um período de incubação variável de 1 mês a 4 anos, a doença no cão apresenta caráter multissistêmico, pois o parasito pode ser encontrado nos mais diferentes tecidos e órgãos provocando reações imunológicas e alterações tissulares características da LVc (Alvar, 2004).

A ativação policlonal de células B com geração de elevados títulos de anticorpos é uma resposta imune importante, pois embora não confira proteção facilita o diagnóstico

sorológico da doença (Pearson *et. al.*, 1983). Ocorre também uma intensa ativação macrofágica que determina um processo inflamatório granulomatoso nos tecidos atingidos. A magnitude e qualidade desta resposta imune celular está diretamente relacionada à base genética de cada animal parasitado e determina uma variabilidade de sinais e sintomas.

De forma geral os principais sinais clínicos da LVC são as alterações cutâneas (alopecia, dermatites, descamações, úlceras cutâneas, onicogribose); sinais oculares (conjutivite, ceratoconjutivite, uveíte); caquexia; linfadenopatia; anemia; febre e hepatoesplenomegalia. De acordo com a presença e ausência de um ou mais sintomas os animais podem ser classificados como assintomático, oligossintomáticos e sintomáticos (Abranches *et al.*, 1991; Ferrer *et al.*, 1991; Ciaramella *et al.*, 1997; Tafuri *et al.*, 2001; Baneth *et. al.*, 2008).

Diferentes estudos revelaram que em áreas endêmicas com elevada prevalência de infecção a maioria dos cães é assintomático e fonte de infecção para os insetos vetores devido ao encontro de parasitos na pele (Cabral & Gomes, 1998).

A existência de animais assintomáticos, como também daqueles que apresentam sinais e sintomas sugestivos de outras doenças, dificulta o diagnóstico de LVC e destaca a importância do uso de testes sorológicos com elevada especificidade e sensibilidade a fim de auxiliar na detecção e eliminação dos animais soropositivos (Bryden, 2002; Ferrer *et. al.*, 1991).

1.7- Epidemiologia das Leishmanioses

Na atualidade as leishmanioses ocupam a 9^a posição do *rank* das doenças infecciosas prioritárias (WHO, 2012), porém é amplamente negligenciada devido à desconsideração sobre sua complexidade epidemiológica/ecológica e escassez de dados sobre a sua incidência.

A epidemiologia das leishmanioses depende das características das espécies de parasitos, características ecológicas do sítio de transmissão, a exposição atual ou passada de seres humanos aos parasitos e a variabilidade do modo de vida das populações (WHO, 2012).

A pobreza aumenta o risco de leishmaniose. Casas pobres com aglomeração de pessoas, má condições sanitárias, criação de animais em regime de subsistência no peridomicílio e mata residual favorecem a dispersão do vetor e sua proximidade ao ser humano. Outro fator que interfere na suscetibilidade das populações às leishmanioses é o estado nutricional do indivíduo. É sabido que condições de pobreza associada a dietas deficientes de proteína, ferro, vitamina A e Zinco aumentam a probabilidade de manifestações clínicas (Dsjeux, 2001).

Já a idade da população atingida depende da espécie de parasito (*p.ex.L. infantum*- menores de cinco anos; *L. donovani*- entre 13 a 23 anos) e também da história de exposição ao parasito. Em áreas endêmicas, onde substancial nível de transmissão se mantém-se por períodos de anos, grande parte da população de adultos adquire imunidade, indicada por elevada positividade ao teste de Montenegro cuja prevalência aumenta com a idade. No entanto, indivíduos não imunes oriundos de áreas não endêmicas, estimulados pela migração orientada pelas questões econômicas, ou imunossuprimidos tem alto risco de adoecimento se o parasito circulante for *L.infantum* (WHO, 2012).

Na atualidade, as leishmanioses ocorrem em 98 países, atingem três territórios e cinco continentes do planeta. Considerando que apenas 2/3 dos países de transmissão ativa das leishmanioses têm dados de incidências por um período de cinco anos e que a

doença é de distribuição focal nestas regiões, decorre que a taxa de incidência de leishmaniose pode ser substancialmente maior (WHO, 2012).

Para a LV a distribuição é mundial com registro de casos em todos os continentes, à exceção da Oceania, e sua incidência está em torno de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos por ano, com 90% destes ocorrendo na Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil. A LV é considerada a mais devastadora das formas de leishmanioses, pois muito embora grande parte dos indivíduos infectados permaneça assintomáticos, os que adoecem, se não tratados, usualmente evoluem para óbito. Pelos dados oficiais, em todo o mundo, cerca de 38.910 mortes/ano ocorrem devido a essa categoria de leishmaniose (WHO, 2010), mas as estimativas de mortalidade contêm ainda mais incerteza do que a estimativa de incidência, pois estudos afirmam que uma grande proporção de mortes ocorre fora das unidades de saúde e a causa provavelmente nunca é reconhecida, excluindo a possibilidade de notificação passiva. Para uma taxa de letalidade de 10% é possível projetar a soma de 20.000 a 40.000 mortes por leishmaniose visceral por ano em todo mundo (WHO, 2012).

Já para LT a incidência estimada foi de 0,7 a 1,2 milhões de novos casos por ano, com distribuição mais ampla, 70% a 75% dos casos no Afeganistão, Colômbia, Brasil, Iran, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Perú. O Brasil detém a maioria dos casos da América Latina e é considerado o mais importante foco da doença (WHO, 2010).

1.7.1- Leishmaniose Visceral no Brasil

Descrita desde 1913 como doença de caráter rural (Chagas *et. al.*, 1938), a LV, na atualidade, é identificada em vários municípios de todas as unidades federativa (UF) do

Brasil apresentado nítida transição epidemiológica, com incremento na incidência, expansão geográfica e amplo processo de urbanização (Costa, 2008).

O desenvolvimento econômico experimentado pelo Brasil nos últimos 30 anos levaram a mudanças nas interações homem/ambiente/biológico (Monteiro *et. al.*, 2009). O rápido crescimento de megacidades foi acompanhado de mudanças ambientais (p.ex. derrubada de mata, construção de estradas) e sociais (p.ex. alto fluxo populacional com aumento da pobreza, baixas condições sanitárias, deslocamento do reservatório doméstico) que conjuntamente a adaptação das espécies vetoras, entre outros fatores de risco (status imunológico dos hospedeiros, resistência parasitária), tornaram a LV uma doença emergente no Brasil (Maia-Elkhoury *et. al.*, 2008, Dujardin, 2005).

Neste contexto, a despeito das diretrizes bem definidas do Programa de Controle das Leishmanioses (PCL), centrado no tratamento precoce dos casos humanos e diminuição dos riscos de transmissão a partir da eutanásia do reservatório doméstico (*Canis familiaris*) infectado e controle químico dos vetores, ocorreu um aumento do impacto da doença na saúde pública nacional apresentando uma média anual de 3.357 casos humanos e 236 óbitos, atingindo principalmente populações de baixa renda.

Ademais, os casos autóctones anteriormente concentrados no Nordeste sofreram uma diáspora para outras regiões do Brasil (em 2010, a região Nordeste representou 47,1% dos casos, seguida pelas regiões Norte (18,0%), Sudeste (17,8%), Centro-Oeste (8,6%) e Sul (0,1%).

1.7.2- Leishmaniose Visceral no Estado do Rio de Janeiro

No Estado do Rio de Janeiro, a LV foi descrita pela primeira vez em 1977 (Salazar *et. al.*, 1979). O caso índice foi descrito na região periurbana do bairro de Bangú em um homem de 55 anos que eventualmente faleceu pela doença (Marzochi *et.al.*, 2009). Na mesma ocasião houve o isolamento do parasito no reservatório canino (Marzochi *et al.*,

1981) e identificação de *Lutzomyia longipalpis* (Souza *e.t al.*, 1981). Desde então ações de controle centradas na identificação e sacrifício de cães infectados vem sendo realizadas periodicamente, a cada seis meses, em regiões endêmicas do Município do Rio de Janeiro.

A transmissão da LV no Estado do Rio de Janeiro é considerada esporádica (média menor que 2,4 casos humanos anuais), entretanto está em expansão tanto espacial quanto em número de casos.

Até agosto de 2006, 87 casos autóctones foram diagnosticados em áreas peri-urbanas da cidade do Rio de Janeiro, na zona oeste da cidade(Marzochi *e.t al.*, 2009), mas recentemente, entre 2007 a 2012, 18 caso de LV foram notificados com autoctonia comprovada em Volta Redonda, Barra Mansa e Miracema (dados do SMS/MS, 2012), ultrapassando os limites da cidade do Rio de Janeiro ao atingir outros municípios do

Estado. **Gráfico 1**

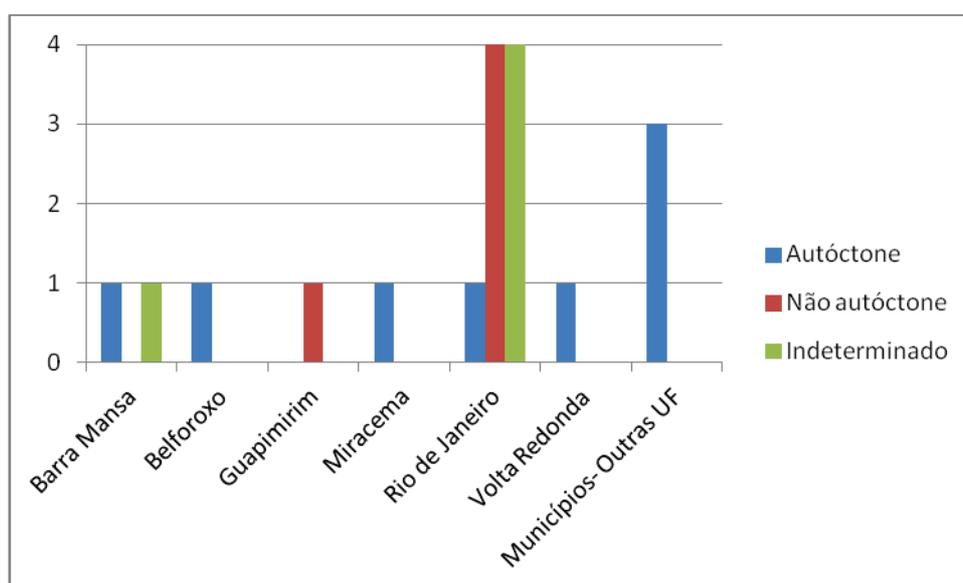


Gráfico 1- Casos humanos confirmados de leishmaniose visceral, por município de residência e autoctonia, no período de 2007 a 2012, Estado do Rio de Janeiro. Fonte Sinan/ GDTVZ

Apesar da análise de distribuição de casos confirmados de LV em humanos e cães no Estado do Rio de Janeiro entre 2007 a 2012 revelar uma sobreposição destes nos municípios de Volta Redonda e Rio de Janeiro, confirmando achados da literatura (Lopes *et al.*, 1994), dezenas de caso de LVc são identificados a cada ano em áreas sem LV humana (dados SMS/RJ). O valor preditivo dessa observação advém do fato de ser o cão considerado o principal reservatório doméstico da doença e, por conseguinte, uma fonte de infecção e elo importante dentro das forças atuantes no ciclo de transmissão da doença no Estado.

De fato, nos últimos anos a LVc sofreu dispersão e houve relato de casos em áreas silenciosas do Rio de Janeiro (Madeira *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2010), o que ressalta a importância do estudo do reservatório canino no Estado, principalmente em áreas consideradas silenciosas, antecipando medidas de controle da doença.

Casos de LV humano e canino

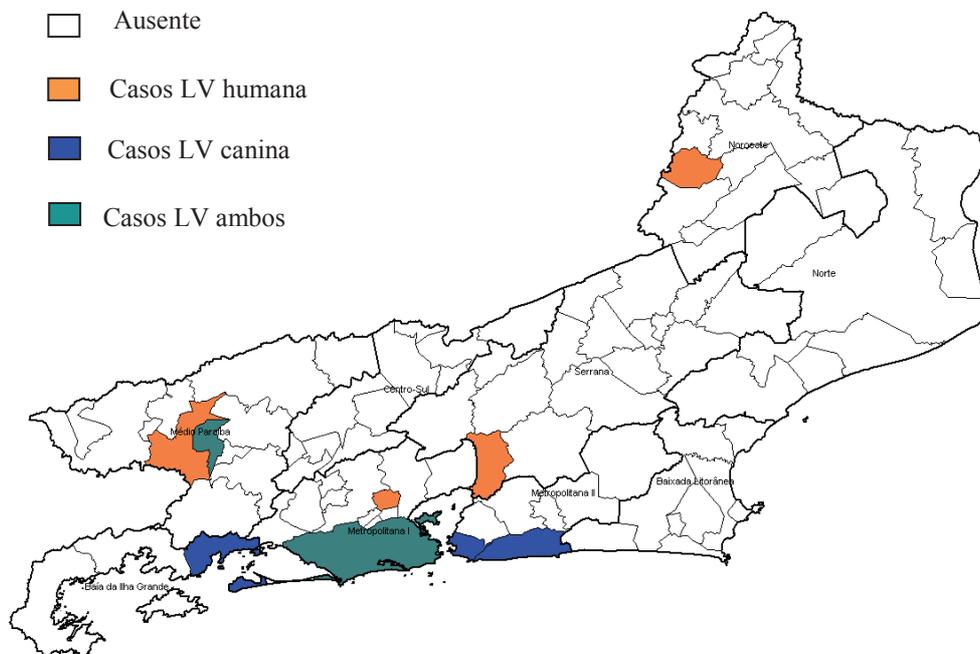


Figura2 - Distribuição dos casos caninos e humanos de LV no Estado do Rio de Janeiro 2007-2012. FonteSinan/GDTVZ

Cumprе ressaltar que em diferentes áreas de ocorrência de LVh não foi encontrado *L. longipalpis*, havendo apenas evidências epidemiológicas de sua participação no ciclo de transmissão e/ou sugerindo a presença de outra espécie vetora de LV no Estado do Rio de Janeiro (Souza *et. al.*, 2003).

1.8- Considerações sobre a área de estudo

A Ilha de Marambaia (latitude -23.066308 S e longitude-43.983771W) corresponde a extremidade oeste, montanhosa, da Restinga da Marambaia e esta situada na entrada da Baía de Sepetiba, no Município de Mangaratiba, dentro da Baía da Ilha Grande. **Figura 3**

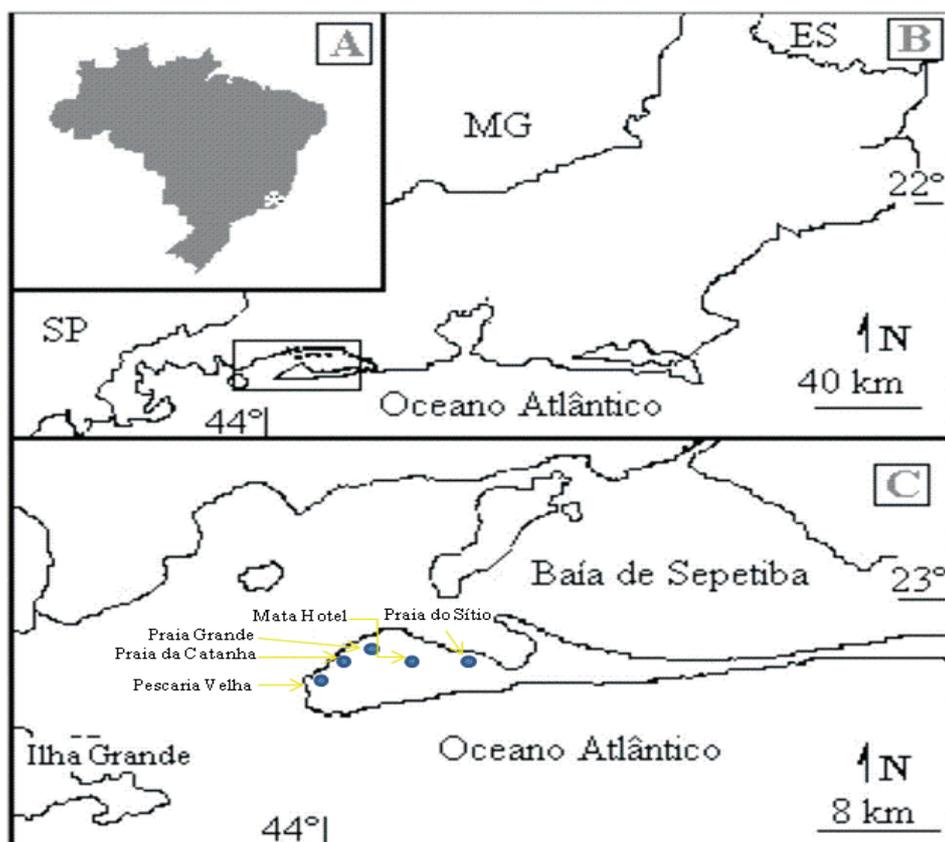


Figura 3- Localização da Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro,

Favorecida tanto pela posição geográfica quanto pelo acesso restrito, a Ilha da Marambaia, com seus 42 km² territoriais, conserva ainda representativa parcela de Mata Atlântica (Pereira *et al.*, 1990) e, segundo a classificação de Köppen (1948), enquadra-se no macroclima tipo Aw- Clima Tropical Chuvoso, com temperatura média de 18°C no mês mais frio e 22°C no mês mais quente do ano (Mattos, 2005).

A Ilha da Marambaia possui no total 14 praias e dentre estas oito são habitadas. **Figura 4**



Figura 4- Praias habitadas da Ilha da Marambaia , município de Mangaratiba, Rio de Janeiro.

Fonte: <https://maps.google.com.br>

Em seu território funciona um Centro de Adestramento da Marinha (CADIM) que promove constantes manobras militares envolvendo tropas nacionais de outros estados, como também internacionais. Há também, em funcionamento um Hotel de Trânsito da Marinha com ampla circulação de turistas, atraídos pelas belezas naturais do local. Tal mobilidade populacional é um fator de risco que pode influir na força de transmissão das leishmanioses, devido a maior suscetibilidade da população que visita a ilha e seu potencial de dispersão a partir do local de origem.

A ilha também possui uma população residente que segundo o censo de 2010 do IBGE é composta por 424 moradores, 94,1 % de origem afrodescendentes (negros e pardos) com 177 mulheres e 213 homens alfabetizados. A maior parte das mulheres possui idade entre 15 e 19 anos e maior parte dos homens entre 45 e 49 anos.

Existem 100 domicílios na Ilha de Marambaia que em sua totalidade são casas localizadas junto à costa (oito praias habitadas) e próximas à mata. Oitenta e nove por cento das casas são próprias possuindo até três moradores por residência, 99 % possuem banheiros ou sanitários, porém o abastecimento de água é realizado pela captação de nascentes ou poço. Poucas casas têm energia elétrica, a maior parte tem o lixo coletado, porém as condições sanitárias não são as ideais. A criação de animais para a subsistência (galinhas e porcos) no peridomicílio é comum, assim como a criação de cães soltos que andam por toda Ilha da Marambaia livremente (cães andarilhos).

Desde 1915 a LTA é relatada no município de Mangaratiba (D'Ultra e Silva, 1915) e mais recentemente uma média de 300 casos são identificados por ano (SVS/MS, 2003). Apesar do isolamento de *L. infantum* em um canino na região continental do município (Madeira, 2004), na Ilha de Marambaia apenas dois casos humanos de LTA foram notificados em 2002, não havendo relato de outros casos de LVh e LVc na localidade.

2-JUSTIFICATIVA

A realização do inquérito sorológico canino conjuntamente a realização de inquéritos flebotômicos na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil, permitirá, com maior confiabilidade, a identificação de cães positivos, acompanhamento da circulação do parasito na área endêmica e a geração de subsídios para fechar a cadeia epidemiológica da LVC na área em estudo, auxiliando, desta maneira, o controle do reservatório canino, delimitação de regiões ou setores de maior prevalência e ainda a identificação de áreas silenciosas.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Mapear o risco de transmissão das leishmanioses por flebotomíneos e a amplificação das mesmas por reservatórios caninos no município de Mangaratiba, localidade Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil, considerada endêmica para LTA e silencioso para LVA, através de um estudo epidemiológico do reservatório doméstico (*Canis familiares*) pela ferramenta da soroprevalência e exame parasitológico/isolamento, no período de fevereiro de 2010 a fevereiro de 2012.

3.2- Objetivos Específicos

- Realizar levantamento soroepidemiológico das leishmanioses caninas na Ilha da Marambaia
- Realizar estudo parasitológico de amostras de cães soropositivos no teste de referência
- Realizar a identificação específica dos parasitos isolados em culturas por técnica isoenzimática.
- Realizar inquérito flebotomínico na Ilha da Marambaia

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Censo canino

Para o inquérito sorológico dos cães primeiramente foi realizado um censo canino nas diversas localidades de Ilha da Marambaia, por meio de visita domiciliar da equipe de trabalho, com apresentação de material informativo sobre LV (cartaz ilustrativo e mostra de flebotomíneos) e aplicação de um questionário (**Anexo 1**), que objetivou à sensibilização da população sobre a protozoose e o trabalho a ser executado pela equipe de campo em encontros posteriores.

4.2- População de estudo

Em se tratando de um inquérito soroepidemiológico, a partir de um censo prévio, participaram do presente projeto a população total de cães presente na Ilha da Marambaia, excluído apenas filhotes com idade inferior a três meses, cuja sorologia poderia gerar falsos resultados por reações cruzadas com anticorpos maternos adquiridos pelo filhote através da mamada (Braga *et al.*, 1998).

4.3- Implantação de Microchip

Devido à característica errante dos cães da localidade da Ilha de Marambaia, que tem livre acesso à mata, como também ao seu domicílio e domicílio de vizinhos próximos e distantes, foi realizada a implantação de microchips transponder esterilizado embalado em blister da marca Animalltag® com cápsula antimigratória, estéril e de uso descartável. Cada microchip possui um número próprio e inalterável que garante sua unicidade e confiabilidade na identificação animal.

O primeiro passo à implantação do microchip foi a verificação, através do uso de leitura universal, da viabilidade do produto e certificação da igualdade entre o número das etiquetas e o número aferido pela leitura. Antes da implantação foi realizada a varredura abrangente do corpo do animal com a leitora, a fim de evitar uma segunda implantação desnecessária. O microchip foi implantado entre as escapulas na linha mediana dorso cranial, a 3 cm do local de alojamento final. Uma leitura final do microchip aplicado, com identificação do animal em documento pertinente, foi realizada logo após a implantação.

O proprietário de cada animal recebeu um certificado de identificação carimbado e assinado pela Médica Veterinária responsável, permitindo o cadastro do animal, como de seu proprietário, no banco de dados da associação brasileira do microchip animal (Abrachip).

4.4- Exame clínico dos animais

Os caninos participantes do estudo passaram por exame clínico; sendo aferido parâmetros fisiológicos relevantes à análise de sinais e sintomas compatíveis com a LV. **(Anexo 2).**

4.5- Coleta de Sangue

Seguindo corretamente as normas de antisepsia e biossegurança, os animais foram submetidos a coleta de sangue. Para as provas sorológicas amostras de sangue foram obtidas através de venipunção da veia cefálica (membro anterior), sendo coletado um volume total de 3 mL com seringas de 5 mL acopladas em agulhas de calibre 25x8mm, estéreis.

4.6- Execução dos Testes Sorológicos

A execução dos testes sorológicos seguiu o protocolo sugerido pelo fabricante dos testes: Imunofluorescência Indireta para Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (RIFI- Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos®), Ensaio Imunoenzimático para Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (ELISA- Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos®). O Teste Rápido Qualitativo para a detecção de anticorpos dos cães contra *Leishmania sp.*, o TRDPP Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos®. Os teste IFI e ELISA foram realizados em ambiente laboratorial com amostras de soro e o TRDPP foi realizado à campo com amostra de sangue total.

4.8- Avaliação do Desempenho dos Testes Sorológicos

Os resultados dos testes sorológicos foram confrontados para a verificação da copositividade, conegatividade e concordância bruta. Estes parâmetros foram obtidos em função da distribuição dos resultados dos testes sorológicos. De maneira semelhante à sensibilidade, especificidade e confiabilidade. A concordância ajustada *Kappa* (K) é um parâmetro que se baseia na comparação do índice de concordância esperada com o índice de concordância observada (Ferreira & Ávila, 2001).

Classificação do índice *Kappa*

Valor de <i>Kappa</i>	Cconcordância
0 – 20%	Ruim
21 – 40%	Fraca
41 – 60%	Moderada
61 – 80%	Substancial
81 – 100%	Quase perfeita

Tabela 2 –Classificação do índice *Kappa*

O valor de predição de positividade (VPP), que permite identificar os doentes em um grupo de indivíduos considerados soropositivos, e o valor de predição de negatividade (VPN) que permite aferir a probabilidade de que a doença estudada não exista em um grupo de indivíduos considerados como soronegativos foram calculados de acordo como teorema de Bayes:

$$VPP = (P \times SEN) : (P \times SEN) + (1 - P) \times (1 - ESP)$$

$$VPN = ESP \times (1 - P) : ESP \times (1 - P) + (1 - SEN) \times P$$

A eficiência (EFI) também chamada de confiabilidade ou acurácia do teste refere-se ao somatório dos resultados positivos e negativos verdadeiros em relação à população estudada. Atrrelada a sensibilidade e especificidade do teste, esta variável

permite estimar a prevalência e incidência da infecção em cães auxiliando no estudo epidemiológico.

$$EFI = (a + d) : n \quad \text{onde} \quad EFI = (300 + 540) : 1000 = 0,84 \text{ ou } 84\%$$

Razão de verossimilhança (RV), por tratar-se de uma razão entre a probabilidade de um determinado resultado do teste em pessoas doentes sobre o mesmo resultado em pessoas saudáveis, fornece seu resultado sob a forma de um valor relativo, ou seja, um número sem unidade, permitindo então, sua utilização em fórmulas de cálculo de probabilidade de doença após combinação de testes. Outra característica da RV é poder ser utilizada em testes diagnósticos com resultados contínuos. Permite, ainda, o cálculo de tabelas e nomogramas que auxiliam o refinamento diagnóstico, levando-se em consideração características próprias de cada paciente. Sua principal desvantagem é a dificuldade de ser calculado, principalmente em situações clínicas.

4.8- Cultura, isolamento e caracterização fenotípica

Os cães que apresentaram positividade para LVC no ELISA (testes de diagnóstico de referência) foram submetidos à punção de linfonodo, punção de medula óssea e biópsia de pele íntegra e lesionada, caso o cão apresentasse lesão cutânea.

A coleta de amostras de aspirados de linfonodo foram obtidas através de punção aspirativa de linfonodos poplíteos (membro posterior) ou cervicais (região cervical), e coletado um volume de aproximadamente 50 µL. Já para a realização da biópsia de pele foi utilizado um fragmento da pele íntegra da região escapular e/ou do bordo da lesão foi utilizado um *punch* dermatológico estéril de 5mm. Cada amostra coletada, devidamente identificada, foi colocada em tubo *vacutainer* estéril (tampa vermelha) contendo 1 ml de

soro fisiológico acrescido de antibióticos (gentamicina- 25g/ml ou penicilina- 100UI/ml + estreptomicina – 100g/ml) e transportada ao laboratório a uma temperatura de 4°C a 8°C.

Os proprietários foram orientados a entrar em contato com o responsável pelo projeto de pesquisa em caso de dúvidas e/ou intercorrências via telefone fornecido no termo de consentimento, previamente assinado pelo proprietário.

A cultura, isolamento e caracterização fenotípica foram realizadas no Laboratório de Vigilância em Leishmaniose, Departamento de Micro-Imuno-Parasitologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/ FIOCRUZ.

As amostras foram semeadas em meio bifásico NNN (Novy, MacNeal, Nicole) contendo como fase líquida o meio Schneider's (*Drosophila medium* - Sigma), acrescido de 10% de soro fetal bovino. As culturas foram feitas em duplicatas e conservadas em estufa biológica a 26-28°C e examinadas semanalmente durante 30-40 dias por exames direto buscando evidenciar formas flageladas. Nos casos onde ocorreu crescimento parasitário, as amostras foram expandidas para produção de massa parasitária para posterior caracterização etiológica.

Todos os isolados obtidos em meio de cultura (formas promastigotas) foram identificadas por eletroforese de enzimas (isoenzimas) de acordo com os protocolos de Cupolillo *et al.* (1994).

4.9- Inquéritos Flebotômicos

Inquéritos flebotômicos foram realizados em conjunto em sete localidades representativas de litoral, floresta e clareira resultante de atividade humana (Praia Suja – Praia Grande – Pescaria Velha – Praia da Caetana – Mata Hotel CADIM – Trilha da Gruta – Praia da Cutuca). Os resultados foram obtidos a partir da coletade seis meses de trabalho com visitas mensais à área, entre Janeiro e Dezembro de 2010. Nestas, foram

utilizadas armadilhas Luminosas Modelo Hoover Pugedo (HP) em todas as estações de coletas (Pugedol, 2005). **Figura 5**

As coletas de flebótomos foram realizadas nos Ecótopos Silvestres, nos intradomicílios e peridomicílios das residências que se situavam próximas à mata residual. Foi estabelecido o horário das 18h às 07 h (12 h captura / armadilhas) para cada área de trabalho.

Os flebótómíneos capturados foram introduzidos em frascos contendo álcool 70% devidamente rotulado e enviados para o Laboratório de Ecologia de Insetos Vetores / INERu / Tanque / Jacarepaguá. Neste, os exemplares foram clarificados em Potassa 10% (2 h), ácido acético 10 % (20 min), lavados em água destilada (3 passagens de 15 min) e introduzido em Lactofenol (24 h). Após as montagens (enfileiramento de duas carreiras de 10 exemplares por lâmina – 20 espécimes) os flebótómíneos foram identificados em nível de espécie de acordo com Gallati (2003).



Figura 5- Armadilha HP inserida na Mata da Gruta do Hotel.

4.10- Licença e Assinatura de Termo de Consentimento

O presente estudo foi realizado sob a licença LW-37/11 concedida pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (**Anexo3**) e após assinatura pelos proprietários dos cães de um termo de consentimento livre e esclarecido. (**Anexo 4**)

4.12- Colaboração

A execução deste trabalho contou com interação intrainstitucional entre Laboratório de Vetores, o Setor de Imunodiagnóstico do Laboratório de Pesquisa e Serviços em Saúde Pública ambos do Departamento de Ciências Biológicas / ENSP/ FIOCRUZ e o Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos/ IPEC/FIOCRUZ e Laboratório de Vigilância em Leishmaniose/IPEC/FIOCRUZ.

5- RESULTADOS

Por se tratar de um estudo com a população canina total da Ilha da Marambaia, os resultados obtidos serão apresentados neste capítulo de forma descritiva e em valores absolutos. A apresentação de tabelas tem o propósito de oferecer uma visão mais simplificada do desempenho dos diferentes métodos diagnósticos utilizados frente a realidade epidemiológica da localidade da Ilha da Marambaia.

5.1- Censo da população canina

Em resultado as ações de sensibilização da população sobre as leishmanioses a aderência da comunidade foi de 99%. Apenas um domicílio não participou do censo, porém no mesmo havia apenas filhotes e um cão adulto.

A população canina total da Ilha de Marambaia foi estimada em 125 cães, não considerando os filhotes com idade inferior a três meses. Destes animais, cinco não possuíam proprietário e 120 possuíam, porém 88,8% dos animais com proprietários eram semi-domiciliados, não restritos ao domicílio.

A distribuição da população canina da Ilha da Marambaia ao longo das oito praias habitadas é desigual e acompanha a densidade humana de cada localidade. Observa-se, porém, que a maioria dos cães desloca-se e pode ser encontrada em praias distantes do local de domicílio de seus proprietários. A **Tabela 3** apresenta o número de cães por praia.

Praias da Ilha da Marambaia	Número de cães
Praia do Sitio	7
Praia do Cajú	2
Praia Suja	17
Praia do CADIM	24
Praia Grande	12
Praia do Cutuca	22
Praia da Caetana	8
Praia da Pescaria Velha	28
Errantes	5
Total	125

Tabela 3- Distribuição da população canina ao longo das oito praias habitadas localizadas na Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro, 2010.

5.2- Avaliação clínica e Implantação de Microchips

Dos 125 cães relacionados no censo, 121 foram submetidos a avaliação clínica, antes da coleta de sangue. Oito possuíam lesão cutânea; três apresentavam magreza intensa (caquexia); um animal apresentava cerato-conjuntivite crônica e um dermatite esfoliativa. **Figura 6**



Figura 6- Canino Cotó (Praia Suja): primeiro animal identificado com clínica compatível com leishmaniose visceral (Caquexia e hiperplasia de nódulo linfático cervical e poplíteo)

Não foi observada nenhuma alteração clínica relevante nos demais animais que participaram do presente estudo. A morte, fuga e dificuldades de contenção justificam a perda de três animais, respectivamente.

A implantação do microchip foi realizada após o exame clínico e dos 121 animais apenas três não foram submetidos ao procedimento, pois dois animais já possuíam microchip implantado pela Secretaria de Saúde de Mangaratiba e outro o proprietário não autorizou a implantação.

5.3- Sorologia

O primeiro teste sorológico realizado foi o TRDPP para Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos[®]. O teste foi aplicado a campo e a leitura foi visual. Dos 121 animais testados 20 foram soropositivos. **Figura 7**



Figura 7- Teste Rápido- *Dual Path Plataforma* positivo para o canino Cotó, residente na Praia Suja, Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro, 2010

Após o processamento das amostras sanguíneas em laboratório, com a separação do soro, realizou-se o ELISA para Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos[®] e RIFI para Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos[®] obtendo respectivamente 22 e 30 amostras positivas.

O ELISA para Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos[®] foi considerado o teste de referência devido sua elevada especificidade frente o IFI. Isto posto, foi calculada soroprevalência geral de 18,1% (22/121), como também a co-positividade e co-negatividade entre os métodos utilizados.

A sensibilidade relativa do TRDPP para leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos[®] foi de 59,09%, a especificidade relativa de 92,93%, o valor preditivo de positividade (VPP) 65,00%, valor preditivo de negatividade (VPN) 91,09% e acurácia 86,78%. A concordância bruta foi de 86,77% e a ajustada de 71%. A obtenção do Valor de Verossimilhança Positiva (Verossimilhança +) 8,3 e de Verossimilhança Negativa (Verossimilhança -) de 4,4 **Tabela 4 & 5**

Observação: TRDPP para leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos[®] estava em processo de validação durante o período quando foi utilizado no estudo.

		ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
TRDPP	Positivo	13	7	20
	Negativo	9	92	101
Total		22	99	121

Parâmetros	
Sensibilidade	59,09%
Especificidade	92,93%
VPP	65,00%
VPN	91,09%
Razão de Verossimilhança+	8,3
Razão de Verossimilhança -	4,4
Concordância bruta	86,77%
Concordância ajustada-K	71%
Acurácia	86,78%

Tabela 4 &5- Avaliação dos parâmetros sorológicos do TRDPP utilizando ELISA como teste de referência

Sensibilidade relativa da RIFI para Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos ® foi de 78,95%, a especificidade relativa de 85,29%, o valor preditivo de positividade (VPP) de 50,00%, valor preditivo de negatividade (VPN) 95,60% e acurácia 84,30%. A concordância bruta foi de 84,29% e a ajustada de 67%. Os valores de Valor de Verossimilhança Positivo (Verossimilhança +) e de Verossimilhança Negativa (Verossimilhança -) para RIFI foram respectivamente de 5,3 e 2,4. **Tabela 6 & 7**

ELISA

		Positivo	Negativo	Total
RIFI	Positivo	15	15	30
	Negativo	4	87	91
Total		19	102	121

Parâmetros	
Sensibilidade	78,95%
Especificidade	85,29%
VPP	50,00%
VPN	95,60%
Razão de Verossimilhança+	5,3
Razão de Verossimilhança -	2,4
Concordância bruta	84,29%
Concordância ajustada-K	67%
Acurácia	84,30%

Tabela 6 & 7- Avaliação dos parâmetros sorológicos do IFI para Leishmaniose visceral canina Bio-Manguinhos utilizando ELISA como teste de referência

A soropositividade dos cães para os três métodos em estudo quanto a localidade (praias) pode ser observada no **Gráfico 2**.

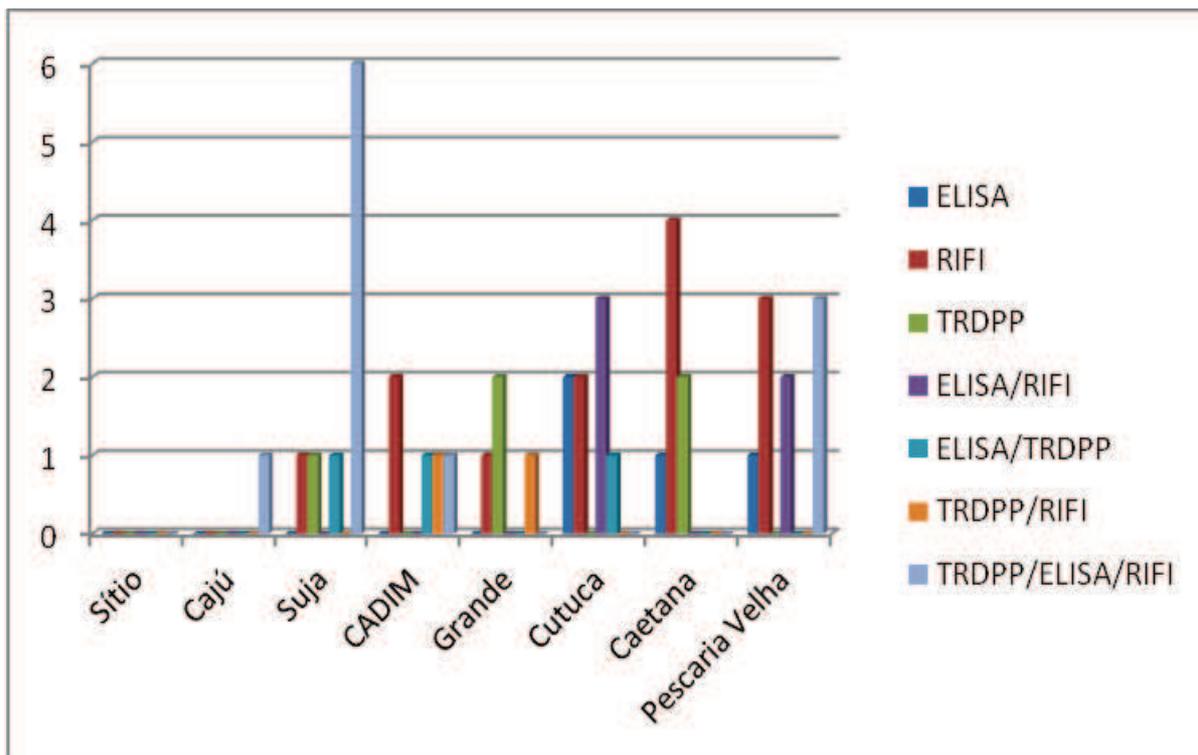


Gráfico 2- Distribuição quanto a localidade (praias) das amostras positivas para os métodos sorológicos usados

Na análise da distribuição por localidades (praias) das amostras soropositividade para o teste de referência EIE para Leishmaniose canina Bio-Manguinhos ®(ELISA) foi observado um número maior de amostras positivas nas praias Suja, Cutuca e Pescaria Velha, com respectivamente sete (41,1% da população canina total da Praia Suja), seis (25% da população canina total da Praia do Cutuca) e seis (21,4% da população canina total da Praia da Pescaria Velha) amostras positivas. **Gráfico 3**

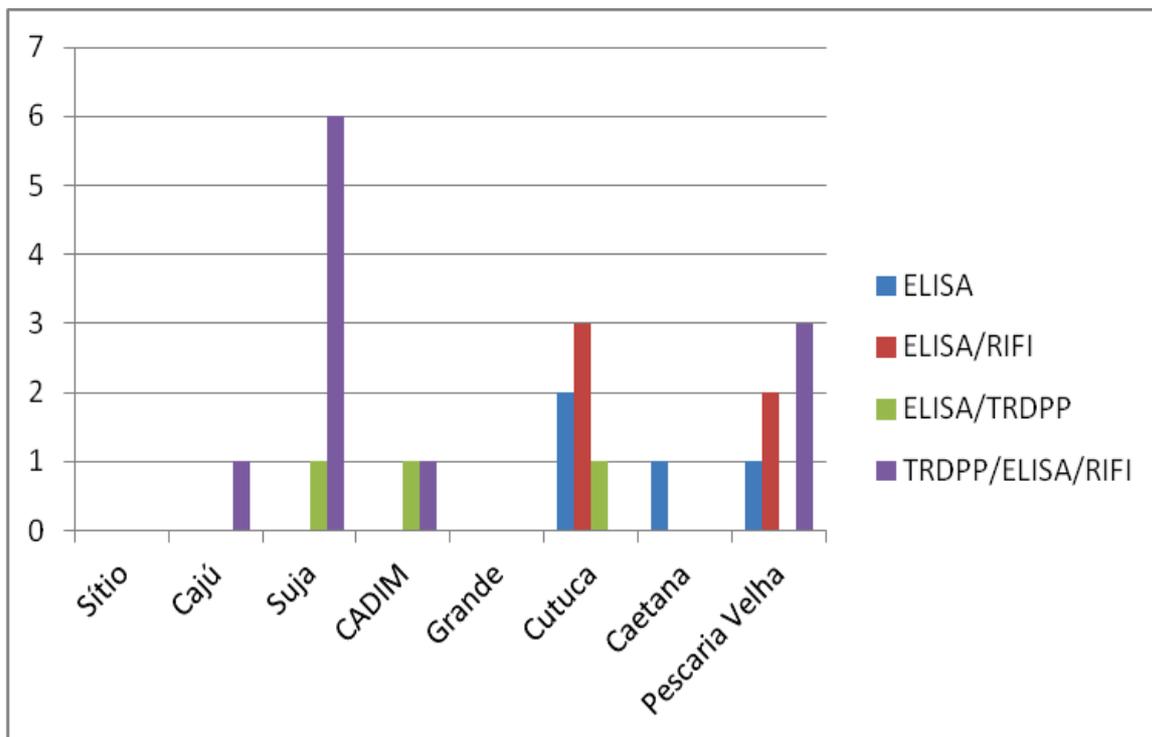


Gráfico 3- Distribuição das amostras positivas para ELISA quanto a localidade (praias)

Quatro dos cinco animais com caquexia (mais dois animais apresentaram caquexia no decorrer do período do estudo), clínica sugestiva de leishmaniose visceral, foram encontrados na Praia Suja e apresentaram reatividade para os três testes utilizados.

Dentre os animais que apresentava lesão cutânea todos foram positivos para o ELISA, exceto dois cães da Praia do Sítio, localidade aonde foram notificados dois casos humanos de LTA, em 2002. **Figura 8**



Figura 8- Lesão cutânea no pavilhão auricular do canino Juli (Praia da Caetana) a qual foi positiva para os três métodos sorológicos utilizados

5.4- Cultura, isolamento e caracterização fenotípica

Os 22 animais que apresentaram soropositividade para o ELISA foram selecionados para a realização de testes parasitológico de cultura e identificação dos isolados parasitários por método molecular.

Antes da coleta de amostra de pele, medula óssea e nódulo linfático, os animais passaram por uma reavaliação clínica. Foi observada uma piora do quadro clínico dos animais sintomáticos e que dois cães, antes assintomáticos (Tônico e Canela), adoeceram apresentando magreza extrema e hiperplasia dos nódulos linfáticos cervicais e poplíteos. Dos 22 animais 17 foram submetidos ao exame parasitológico, pois dois animais haviam morrido e três não foram encontrados. Dos 17 animais testados nove eram sintomáticos (S) e oito assintomáticos (A).

As amostras foram processadas conforme a descrição do capítulo materiais e métodos e os achados gerados foram os seguintes: **Tabela 8**

Alonso RS. Leishmaniose Visceral: estudo do reservatório canino na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba,
Rio de Janeiro, Brasil.

Nome do cão / Status Clínico	Localidade de origem	Positividade nos testes sorológicos	Amostra processada				Resultado do Isolamento
			Lesão de pele	Pele íntegra	Punção de medula óssea	Punção de nódulo linfático	
Branquinha*-S	Praia Suja	Positivo para ELISA, TRDPP, IFI	NR	Positivo	Negativo	Negativo	<i>L. infantum</i>
Jú-S	Praia Suja	Positivo para ELISA, TRDPP, IFI	NR	Negativo	Negativo	Negativo	X
Pútia*-S	Praia Suja	Positivo para ELISA, TRDPP, IFI	Positivo	Contaminado	Negativo	Positivo	<i>L. infantum</i>
Canela*-S	Praia Suja	Positivo para ELISA, TRDPP, IFI	NR	Positivo	Negativo	Positivo	<i>L. infantum</i>
Quilombinho*-S	Praia Suja	Positivo para os ELISA, TRDPP, IFI	NR	Positivo	Negativo	Positivo	<i>L. infantum</i>
Cotó*-S	Praia Suja	Positivo para ELISA, TRDPP, IFI	NR	Positivo	Negativo	Negativo	<i>L. infantum</i>
Tônico*-S	Praia do Cajú	Positivo para ELISA, TRDPP, IFI	NR	Negativo	Negativo	Positivo	<i>L. infantum</i>
Juli*-S	Praia do Caetana	Positivo para ELISA, TRDPP, IFI	Contaminado	Positivo	Positivo	Positivo	<i>L. infantum</i>
Amarelo-S	Praia do Caetana	Positivo para ELISA, TRDPP, IFI	Negativo (microfilária)	Negativo	Negativo	Negativo	X
Rex-A	Praia do Cutuca	Positivo para ELISA, TRDPP, IFI	NR	Negativo	Contaminado	Negativo	X
Betovem-S	Pescaria Velha	Positivo para ELISA, TRDPP, IFI	Positi	Negativo	Negativo	Contaminado	<i>Trypanosoma spp.</i>
Scoob-A	Pescaria Velha	Positivo para ELISA, TRDPP, IFI	NR	Negativo	Negativo	Negativo	X
Pit-A	Pescaria Velha	Positivo para TRDPP e IFI	NR	Contaminado	Negativo	Negativo	X

Nina-A	Pescaria Velha	Positivo para ELISA	NR	Negativo	Negativo	Negativo	X
Valente*-A	Pescaria Velha	Positivo para ELISA	NR	Positivo	Negativo	Negativo	X
Terrorista-A	Pescaria Velha	Positivo para ELISA	NR	Negativo	Negativo	Contaminado	X
Max-A	Praia da Caetana	Positivo para ELISA	NR	Negativo	Negativo	Contaminado	X

Tabela 8- Resultado da cultura e isolamento de amostras dos cães soropositivos para ELISA

*(amostras analisadas por eletroforese de enzimas), A (Assintomáticos), S (Sintomáticos)

Os resultados gerados pelo presente estudo foram repassados à Secretaria de Saúde do Município de Mangaratiba a fim de serem realizadas as devidas ações de controle, com a retirada dos cães soropositivos para a eutanásia.

Também em consequência a notificação de infecção de caninos da Ilha da Marambaia por *L. infantum* houve a inclusão do município de Mangaratiba na nota técnica nº 5/2012 GDTVZ/DTI/SVEA/SVS-SES RJ, de 09 de Maio de 2012 divulgada pela Subsecretaria de Vigilância em Saúde- Superintendência de Vigilância Epidemiológica e Ambiental- Divisão de Transmissíveis e Imunopreveníveis- Gerencia de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses do Governo do Estado de Rio de Janeiro (**Anexo5**).

5.5- Inquéritos Flebotômicos

No período de janeiro a dezembro de 2010 foram capturados 38.714 flebotomos nas sete áreas trabalhadas na Ilha da Marambaia. Entre estes foram identificadas quatorze (14) espécies. *Nyssomyia intermedia*, *Lutzomyia longipalpis*, *Migoneimyia migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Micropigomyia schreiberi*, *Evandromyia*

edwardsi, *Pintomyia bianchigalatae*, *Evandromyia cortellezzii*, *Psathyromyia pascalei*, *Micropygomyia quinquefer*, *Exapillata firmatoi*, *Micropygomyia capixaba*, *Psathyromyia pelloni*. Com relação ao gênero *Brumptomyia*, este ainda carece de estudos taxonômicos mais acurados, entretanto a espécie se aproxima mais a *Brumptomyia brumpti* **Tabela 9**.

Tabela 9: Números totais e percentuais de flebotomíneos coletados de sete localidades na Ilha da Marambaia / CADIM – Período de Janeiro a Dezembro de 2010.

Espécies	Machos		Fêmeas		Totais	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>N.intermedia</i>	16035	78,92	15079	81,97	31114	80,37
<i>Mi.migonei</i>	4095	20,16	2951	16,05	7046	18,2
<i>P.fischeri</i>	33	0,16	173	0,94	206	0,53
<i>B.brumpt</i>	21	0,1	32	0,17	53	0,14
<i>Ev.edwardsi</i>	12	0,06	50	0,27	62	0,16
<i>L.longipalpis</i>	106	0,52	47	0,25	153	0,39
<i>P.bianchigalatae</i>	5	0,02	37	0,2	42	0,11
<i>M.schreiberi</i>	2	0,009	0	0	2	0,007
<i>Ps.pelloni</i>	1	0,007	1	0,007	2	0,007
<i>Ev.cortellezzii</i>	1	0,007	9	0,05	10	0,026
<i>Mi.quinquefer</i>	4	0,019	4	0,02	8	0,02
<i>Ex.firmatoi</i>	0	0,006	1	0,007	1	0,003
<i>M.capixaba</i>	1	0,006	12	0,06	13	0,03
<i>Ps.pascalei</i>	1	0,006	1	0,006	2	0,007
Totais	20317	100	18397	100	38714	100

A espécie predominante vem sendo *N. intermedia* com 80,37 % do total de flebotomíneos capturados, seguida pela *Mi. migonei* com 18,2 %, *P. fischeri* 0,53 % e *L.*

longipalpis com 0,39 %. As demais espécies compareceram com densidades insignificantes. As espécies *N. intermedia* e *Mi. migonei* apresentaram frequências em todas as áreas trabalhadas na Ilha da Marambaia. Entre as menos frequentes estão a *M. schreiberi*, *Ev. cortelezzii*, *Ev. edwardsi*, ambas compareceram em apenas duas localidades.

L. longipalpis apresentou maior densidade na localidade de Pescaria Velha, que é uma área bem impactada pelos moradores da região. Esta espécie só foi coletada em uma ocasião na Praia da Armação (1 exemplar de Macho) e posteriormente na Praia Grande (apenas 2 exemplares).

Quanto a frequências mensais os meses de maior densidade foram Abril e Setembro, onde ocorreram previamente um aumento do índice de pluviosidade na região

Gráfico 4.

Como nas demais áreas endêmicas do Estado do Rio de Janeiro a *N. intermedia* predominou em todos os pontos de coleta da Ilha da Marambaia, seguida pela *Mi. migonei*.

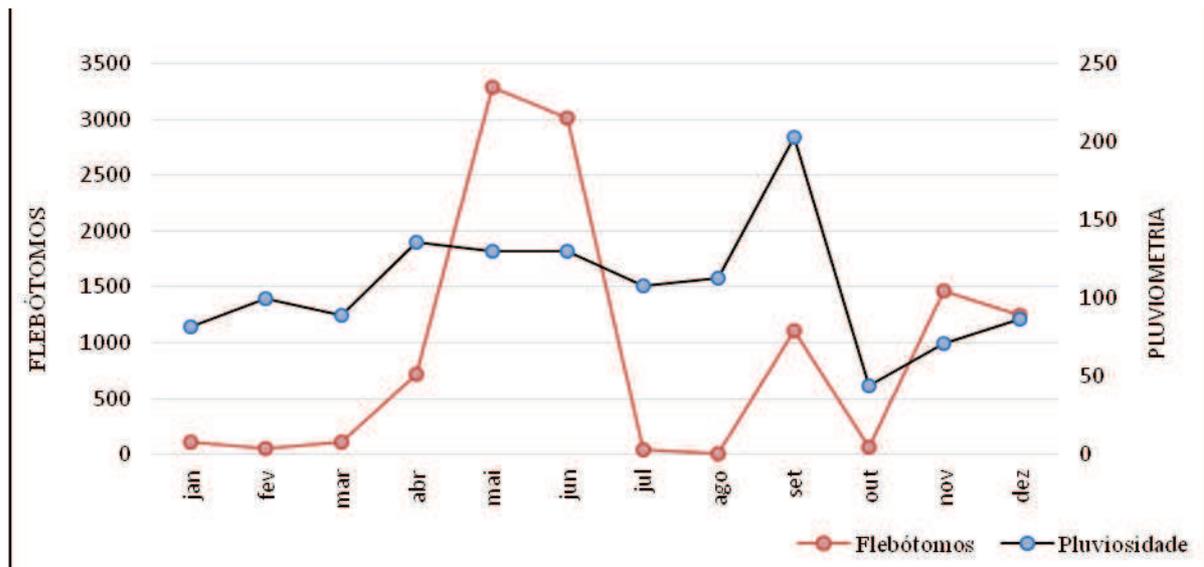


GRÁFICO 4: Frequência de flebotomíneos de acordo com a pluviosidade. Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro – janeiro a dezembro /2010

6- DISCUSSÃO

Embora o Programa Brasileiro de Controle das Leishmanioses tenha adotado por muitos anos ações de identificação e tratamento de casos humanos, controle vetorial e do reservatório canino, recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1990), a LV esta em franco processo de expansão por todo o território nacional e seu controle constitui um desafio, visto que as medidas de contenção aplicadas não se faz acompanhar de queda na incidência do agravo.

A mudança observada do perfil epidemiológico da doença está atrelada aos processos sociais e agropecuários ocorridos nos últimos anos que proporcionaram um contato ainda maior entre a população humana e os animais domésticos e silvestres incrementando a transmissão de zoonoses (WHO, 2010).

Por tanto, é necessário trabalhar integralmente nos diferentes componentes da cadeia de transmissão, bem como no conhecimento dos fatores de risco e determinantes da LV (MS- SINAN, 2006).

A incorporação de novas metodologias de controle de LV inclui vigilância epidemiológica de municípios e localidades consideradas silenciosas, sem relato de casos humanos e caninos, com a finalidade de antecipar medidas de controle, caso necessário, que busque minimizar o impacto do agravo em novas áreas e conter o avanço da doença.

A Ilha da Marambaia pertencente ao município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil, que é considerado endêmico para LTA. De fato, na Ilha houve a notificação de um caso leishmaniose mucocutânea (1996) e dois casos de LTA (2002) em humanos na Praia do Sítio, no entanto para LV, segundo o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (2006) é considerada silenciosa (MS- SINAN, 2006).

Através do presente estudo realizado na Ilha de Marambaia, foi relatado o primeiro caso descrito de LV em cão. O canino Cotó (Praia Suja) apresentava caquexia e hiperplasia de nódulos linfáticos e sua sorologia foi positiva para os três testes utilizados, TRDPP, ELISA e RIFI para leishmaniose canina Bio-Manguinhos ® com caracterização de *L. infantum* em seus tecidos.

Com o objetivo de estudar a epidemiologia das leishmanioses, com possível sobreposição dos ciclos de transmissão de LTA e LVA, e em concordância com as orientações do Manual de Controle de Leishmaniose Visceral (2006), foram iniciadas ações de vigilância epidemiológica do reservatório canino por meio da realização de inquérito soroepidemiológico censitário.

Os testes sorológicos são importantes ferramentas diagnósticas e devem, em um estudo epidemiológico, ser capazes de fornecerem a prevalência de infecção no reservatório canino (Dye *et al.*, 1992). Considerando as observações dos estudos mais recentes, como o de Baneth *et al.* (2008), um estudo transversal que faz uso de apenas um método diagnóstico pode subestimar a prevalência e fornecer um entendimento errôneo da persistência ou não persistência do parasito em seu reservatório (Anderson e May, 1991). Outro problema da abordagem singular de métodos sorológicos são as reações cruzadas com outros patógenos para cães, principalmente tripanossomatídeos (Frank *et al.*, 2003). Por esse motivo, foi utilizada uma abordagem multimétodos para análise das amostras de sangue obtidas dos cães da Ilha da Marambaia. Dos três métodos usados o EIE Leishmaniose visceral canina Bio-Manguinhos ® e o IFI Leishmaniose visceral canina Bio-Manguinhos ® estão padronizados e validados apresentando respectivamente sensibilidade 94,54% para EIE e entorno 90% para IFI. O teste imunocromatográfico TRDPP Leishmaniose visceral canina Bio-Manguinhos ® durante a execução do trabalho

estava em processo de validação, mas atualmente é o teste preconizado para o diagnóstico de triagem da LVC.

O Ministério da Saúde recomendar o ELISA para a triagem de cães sorologicamente negativos e a RIFI para a confirmação dos cães sororreagentes ao teste, o ELISA foi considerado como teste de referência devido a sua elevada especificidade (Scalone *et al.*, 2002)

A soroprevalência obtida no grupo de cães da Marambaia foi de 18,1%, (22/121) mais elevada do que a prevalência obtida em estudo sistemático do reservatório canino (1342 animais) em áreas endêmicas para LV no município do Rio de Janeiro (Marzochi *et al.* 1985a). A diferença entre a prevalência obtida provavelmente ocorreu devido a maior sensibilidade do ELISA utilizado como método de referência no estudo da Marambaia, comparativamente ao RIFI, ou devido ao número total de animais de ambos os estudos; 121 para Marambaia e 1342 para as áreas endêmicas do Rio de Janeiro, este último com maior probabilidade de falsos resultados negativos, como também pela diluição dos resultados devido a aplicação do inquérito soroepidemiológico em área extensa e não em uma área restrita como a Ilha da Marambaia.

A contribuição dos métodos sorológicos nos levantamentos epidemiológicos das doenças endêmicas é de grande valor, sobretudo, nas leishmanioses e principalmente na LVA, que é mais grave e mais simples de diagnosticar sorologicamente, devido às elevadas concentrações de imunoglobulinas séricas nestes hospedeiros. No entanto, a utilização dos resultados sorológicos como parâmetro de prevalência da doença, sem um bom conhecimento sobre a sensibilidade, especificidade e, principalmente, sobre os valores de predição do método empregado, podem gerar taxas equivocadas de positividade, o que leva a um falso conhecimento da dispersão e prevalência desta endemia nas regiões estudadas (Laurentino-Silva *et al.*, 1997).

Os resultados do desempenho dos métodos aplicados nas 121 amostras processadas revelaram co-positividade TRDPP/ELISA 59,09% e RIFI/ELISA 78,95%, achados interpretados como a maior capacidade de RIFI em detectar resultados verdadeiramente positivos. Já a co-especificidade de TRDPP/ELISA 92,93% e RIFI 85,29%, revela a melhor identificação de verdadeiros negativos pelo TRDPP, o que se relaciona com o antígeno presente em cada método, para o TRDPP- proteína purificada de *Leishmania sp.* (não identificado no KIT); para o RIFI- uma reação de superfície de membrana do parasito contendo diversos antígenos (Silva, 1997).

Os resultados de VPP para ambos os métodos avaliados foram para TRDPP 65% e para RIFI 50%, devido a baixa prevalência de LV na população sob estudo. Tais resultados recebem influência direta da prevalência na área de estudo e embora, via de regra, os testes sorológicos não devam ser empregados em áreas de baixa prevalência em consequência da geração de numerosos resultados falso-positivos, é uma exceção a estimativa dessas variáveis para LVA e LTA que apresentam baixas taxas de prevalências (geralmente inferiores a 10%) em áreas endêmicas, elevando a possibilidade de falso resultados e a baixos valores do VPP (Coimbra, 2003). Os valores para VPN foram respectivamente TRDPP 91,09% e RIFI 95,60%, revelando a capacidade dos métodos em detectar indivíduos verdadeiramente doentes, característica desejável para um teste de triagem.

O Ministério da Saúde preconiza o uso de RIFI para a confirmação de resultados soropositivos, porém a geração de muitos resultados falsos positivos leva a eutanásia desnecessária de cães não doentes, o que onera o Programa de Controle das Leishmanioses, como também gera problemas de aceitação pela sociedade, comprometendo o controle da LV no Brasil (Costa, 2011). Nos cães analisados na Ilha da Marambaia 13 apresentaram resultado positivo somente para o RIFI, provavelmente são

falsos positivo, a despeito de seu baixo desempenho quanto a sensibilidade e elevados para especificidade.

Outra forma de analisar o desempenho de um método é através da razão de probabilidades de um teste que é uma medida menos suscetível a mudanças em função da prevalência da doença. Neste contexto, a razão de verossimilhança vem elucidar melhor o desempenho do TRDPP e RIFI. O valor de Verossimilhança Positiva (V+) para TRDPP foi 8,3 e para RIFI de 5,3, destaca o melhor desempenho de TRDPP na probabilidade de detectar verdadeiros positivos devido a sua elevada especificidade. O oposto ocorre como valor de Verossimilhança Negativa (V-) aonde o método RIFI (V-= 2,4) apresentou melhor desempenho que o TRDPP (V-=4,4), devido a melhor sensibilidade estimada, ainda que baixa para o método.

Quanto a distribuição dos resultados positivos por localidade (praias), o percentual de positivos pela sorologia considerando o número de cães é elevado na Praia da Caetana (8/8) devido a elevada positividade de RIFI na localidade (4/8), com apenas um resultado positivo para ELISA. O TRDPP discordou em duas amostras para ELISA e RIFI, porém na amostra positiva para ELISA também foi positivo. Tais achados na Praia da Caetana reforçam o melhor desempenho do TRDPP comparativamente ao RIFI quando se objetiva a triagem dos verdadeiros positivos. Na Praia Suja, a positividade também foi alta (9/17), com destaque para a concordância entre os três métodos em seis amostras (6/9) das quais cinco de animais que apresentavam sintomas clínicos compatíveis com LV. Diferentes estudos demonstraram que, na Europa, por volta de 50% a 60% dos cães infectados são sintomáticos (Gradoni *et. al.*, 1988) e que a infecciosidade está diretamente associada a severidade clínica, acompanhada de elevada resposta humoral e baixa resposta celular CD4+ (Guarga *et al.*, 2000; Da Costa-Val *et al.*, 2007), justificando os achados na Praia Suja. Cumpre ressaltar que uma amostra de cão

sintomático (lesão dérmica) foi positiva somente para o ELISA. Neste contexto, esta localidade da Ilha da Marambaia apresenta um importante fator de tensão na transmissão, pois das 22 amostras positivas para o ELISA, 40,9% eram provenientes de animais com sintomas (9/22) e 55,5% (5/9) destas, cuja clínica era severa, oriundas de cães da Praia Suja.

Muito embora os dados sorológicos sejam imprescindíveis às ações de controle do reservatório canino, o teste confirmatório da infecção (parasitológico), a despeito da discordância de alguns autores (Ferrer *et. al.*, 1999; Koutins *et.al.*, 2001; Moreira *et. al.*, 2002), é considerado, ainda, o teste ouro para o diagnóstico da infecção e auxilia na formulação de evidências epidemiológicas relevantes à formulação de abordagem mais apropriada para cada localidade.

No grupo de 22 cães soropositivos para ELISA sete amostras com cultura positiva tiveram isolados *de L. infantum* (7/22), ou seja, 31,8%. Destas amostras cinco eram de cães da Praia Suja, uma de cão da Praia do Caju (canino Tônico) e outra da Praia da Caetana (canino Juli).

Os resultados dos testes parasitológicos confirmaram a existência de ciclo de transmissão de LV canina ativo na Ilha da Marambaia. A confluência dos resultados positivos com caracterização fenotípica de *L. infantum* (5/7) na Praia Suja sugere aspectos epidemiológicos próprios da microrregião que possibilitou intensa circulação do parasita. De fato, o primeiro relato de caso de LV foi o do canino Cotó, criado preso à coleira, como dito. Ademais, o canino Tônico, com isolamento positivo e caracterizado para *L. infantum*, pertencente a Praia do Caju e devido a seu comportamento andarilho, por vezes, era visto na Praia Suja; e o canino Juli, também andarilho, da Praia da Cutuca (extremo oposto da Ilha) era anteriormente da Praia do CADIM (contigua a Praia Suja) e mudou de praia por ocasião do casamento de sua proprietária. Esses dados ainda que

empíricos são relevantes e falam a favor de um ciclo de transmissão de LVc na Ilha da Marambaia restrito a Praia Suja.

Diferente dos achados de Madeira *et al.* (2005) não se verificou no presente estudo, co-infecção de cães por *L. brasiliensis* e *L. infantum*. Na localidade de ocorrência de LTA (Praia do Sítio) os dois animais que apresentavam lesão dérmica tiveram sorologia negativa e não participaram da pesquisa parasitológica. Já para animais com lesão dérmica oriundos da área de LV (Praia Suja) a sorologia foi positiva e ao estudo parasitológico comprovou-se apenas infecção por *L. infantum*.

Outro achado do estudo parasitológico das amostras foi o isolamento e caracterização de *Trypanosoma sp.* no canino Betovem da Praia da Pescaria Velha, elevando a chance de resposta cruzadas e falsos positivos nos testes sorológicos realizados nesta localidade, quiçá em outras praias de ilha.

Nos resultados do levantamento entomológico realizado, espécies vetoras de LTA (*N. intermédia* e *Mi. migonei*) e LVA (*L. longipalpis*) foram capturadas. As primeiras em alta densidade, porém a última em baixa densidade. O encontro de espécies vetoras para LTA e LVA depõe a favor da sobreposição dos ciclos de transmissão das leishmanioses na Ilha de Marambaia. Ainda que os casos de LTA em humanos tenham sido restritos a Praia do Sítio e os casos de LVA canina concentrados na Praia Suja, parece haver nos extremos da ilha, respeitando a sazonalidade e diferenças de densidade, um perfil entomológico com sobreposição dessas espécies.

Porém, a confirmação de infecção de cães por *L. infantum* não concorda com os vetores registrados na Ilha da Marambaia no inquérito entomológico realizado (Lainson & Rangel, 2005). Segundo Souza *et al.* (2003) no município do Rio de Janeiro *L. longipalpis* é incriminada como vetor de leishmaniose visceral apenas por evidências epidemiológicas, sugerindo a *Mi. migonei* como provável vetor. Na Argentina, Santiago

del Estero, *Mi. migonei* tem sido apontado como potencial vetor de *L. infantum* (Salomom *et. al.*, 2010). No estado de Pernambuco, resultados confirmam a evidência anterior de *Mi. migonei* como o vetor deste parasito no norte da Mata Atlântica, principalmente devido à abundância e predominância desta espécie de flebotomíneos em casas e abrigos de animais, sendo no ambiente peridomicílio é considerada antropofílica e cinofílica em várias regiões do Brasil (Rangel e Lainson, 2009).

Outra espécie que merece atenção na Ilha da Marambaia é *Ev. edwardsi* que foi registrada com infecção natural na Grande São Paulo, por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (SUCEN, 2005).

Tais achados entomológicos concordam com Novo (2011) que ao realizar levantamento da fauna flebotomínica na Ilha da Marambaia procedeu coletas no intra, peri-domicílio e região de mata das praias da Pescaria Velha, Grande e do Sítio baixa densidade de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* na Praia Grande e Pescaria Velha, distantes da Praia Suja, sugerindo possibilidade de transmissão da LV em outras praias da ilha, como também verificou elevada densidade de espécie vetoras da leishmaniose tegumentar.

7- CONCLUSÕES

- O levantamento soropidemiológico multimétodos para LVc demonstrou um excelente desempenho do TRDDP Leishmaniose visceral canina- Bio-Manguinhos ® como método para triagem
- Confirmou-se um ciclo de transmissão de LV na Ilha da Marambaia, com isolamento de parasitos em cães positivos pelo ELISA.
- Identificou-se infecção de *L. infantum* nos cães sintomáticos da Ilha da Marambaia.
- Evidenciou-se pequena frequência de *L. longipalpis* na área de ocorrência de LVc, com elevada frequência de *Mi. migonei*, sugerindo importância epidemiológica na transmissão da Leishmaniose Visceral Canina na Ilha da Marambaia.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N. An experimental model for canine leishmaniasis. *Parasitol. Immunol.* 1991;13:537-550.
- Alencar JE. Leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Med da Universidade do Ceará.* 1978; 17 (18): 129-148.
- Alvar J. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004; 57: 1-88.
- Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, 1993-1997. *Cadernos de Saúde Pública.* 2004; 20(1): 259-265.
- Anderson RM, May RM. *Infectious Diseases of Humans. Dynamics and Control.* Oxford University Press, Oxford. 1991
- Araujo FNA. *Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Ilha Grande, Rio de Janeiro. Estudos sobre a infecção humana, reservatórios e transmissores.* Rio de Janeiro, Brasil, 1978. (Tese de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- Ashford RW. Leishmaniasis reservoir and their significance in control. *Clin Dermat.* 1996;14:523–532.
- Ashford RW. What it takes to be a reservoir host. *Belgian Journal of Zoology.* 1997;127:85–90
- Asociación Americana de Salud Pública. *El control de las Enfermedades transmisibles en el hombre.* Washington, D. C., OPS/OMS, 1970.
- Baneth G, Koutians AF, Solano-Gllego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis: new concepts and insight on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitology.* 2008; 34(7):324-330.
- Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and*

- advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol.* 2007; 64:1-109.
- Braga MDM, Coelho ICB, Pompeu MML, Evans TG, Macaullife IT, Teixeira MJ et al. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998;315 (5): 419-424.
- Bryden S L. Diagnosis of american visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2002; 43:289-295.
- Cabral M, O'grady JE, Gomes S. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 1998; 76:173-180.
- Chaves LF, Hernandez MJ, Dobson AP, Pascual M. Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2007; 23:311–316.
- Carvalho RW. A Leishmaniose Visceral no Estado do Rio de Janeiro. *Acta Parasitol. Portuguesa.* 1997; 4: 88-89.
- Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane L, Deane G, Paumgartten MP. Leishmaniose visceral americana 9relatório dos trabalhos pela Comissão encarregada do estudo da leishmaniose americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1938, 33: 89-229.
- Ciamarella P, Oliva G, Luna R, Ambrosio R, Cortese L, Persechino A, Gradoni L, Scaloni A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Record.* 1997; 141: 539-543.
- Coimbra RA. Parâmetros Sorológicos do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para o Diagnóstico das Leishmaniopses Caninas com a utilização da Imunoglobulina Y (IgY). Tese de Mestrado- Instituto

Oswaldo Cruz- Fiocruz. 2003.

Costa CHN. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011; 44(2): 232-242.

Costa CHN. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil.

Costa CHN, Tapety CMN, Werneck GL. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: ensaio de intervenção randomizada fatorial. *Ver Soc Bras Med Trop*. 2007; 40:415-419.

Cad. Saúde Pública. 2008, 24(12): 2959-2963.

Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 50: 296-311.

Da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, Gotijo NDF, Michalick MSM, Alexandre B, Williams P, Melo MN. Canine visceral leishmaniasis: relationship between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. *Veterinary Journal*. 2007; 174: 636-643.

Danta-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral Leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2006; 48(3): 151-156.

D'Ultra E, Silva O. Sobre a leishmaniose tegumentar e seu tratamento. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*. 1914; 1: 248

Dereure J. Reservoirs des leishmanies. In: Les Leishmanioses Collection. Medicine Tropicale de PAUPELF-UREF, Marketing/Elipses, Paris. 1999; 109-127.

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

Dey C, Killick-Kendrick R, Vitutia MM, Walton R, Killick-Kendrick M, Harith AE, Guy MW, Canavate MC, Hasibeder G. Epidemiology of canine leishmaniasis- prevalence, incidence and basic Number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. Parasitology. 1992; 105:35-41.

Dujardin JC. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? Trends Parasitol. 2005; 22(1): 4-6.

Dsjeux P. The increase in risk factors for the leishmaniasis worldwide. Trans.roy.Soc. Trop. Med. Hyg. 2001; 95: 239-243

Ferreira AW, Ávila SL. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imune. Guanabara Koogan. 2001; 2ª ed: 443.

Ferrer L, Juanola B, Ramos JA. Chronic colitis due to Leishmania infection in two dogs. Vet. Pathol. 1991; 28: 342-343.

Ferrer LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, Spain. Canine Leishmaniasis: an update. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet. 1999, p. 6-10.

Figueiredo FB, Filho CJLB, Schubach EYP, Pereira AS, Nascimento LD, Madeira MF. Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010; 43(1):98-99.

Frank FM, Fernandez MM, Taranto NJ, Cajal SP, Margini RA, Castro e, Thomaz-Soccol V, Malchiodi. Characterization of human infection by *Leishmanis* spp. in the northwest of Argentina: immune response, double infeccion with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitology*. 2003; Jan;126(Pt 1):31-9.

Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel, EF., Lainson, R. (Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro. 2003; pp. 23–51.

Gardoni L, Gramiccia M, Mancianti F, Pieri S. Studies of canine leishmaniasis control. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1988; 82: 568-571.

Gramiccia M, Gardoni L. The current status of zoonótica leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol*. 2005; 35: 1169-1180

Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribanez MA, Alvar J, Castillo JA. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongs naturally infected dogs to sand flies is associ lower proportions of T helper cells. *Research in Veterinary Science*. 2000b; 69: 249-253.

Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases*. 1997; 8: 1468-1473.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis. A review of Medical Veterinary Entomological. 1990; 4: 1-24.

Koutins AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 2001;98:247-61.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press, London. 1987;1:1-120.

Lainson, R., Rangel, E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil—a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 811–827.

Laurentino-Silva V, Freiri RB, Marzochi MCA. Leishmanioses caninas: Avaliação de métodos imunoenzimáticos para pesquisa de IgG sérica. XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belo Horizonte. 1997, p. 35-36.

Lopes UG, Momen H, Grimald JrG, Marzochi MCA, Pacheco RS. Schizodeme and zimodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci visceral and cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitology*. 1994; 70: 89-98.

Lukes JJ, Maurício ILI, Schonian GG, Dujardin JJC, Soteriadou KK, Tintaya KWQKW, Jirku MM, ChoCholova EE, Haralambous CC, Pratlong FF, Obornik MM, Horak AA, Ayala FJFJ, Miles MAM. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104(22): 9375-9380.

Lutz A, Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 191; 24: 84-95.

Madeira MF, Schubach A, Schubach TMP, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Marzochi MCA. Mixed infection with *Leishmania* (*Viannia*) *brasiliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in a naturally infected of from Rio de Janeiro, Brazil. *Royal Society of Tropical*

Medicine and Hygiene. 2005; 1-3.

Madeira MF, Schubach TMP, Leal CA, Marzochi MCA. Identification of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *The Brazilian journal of Infectious Diseases*. 2004; 8(6): 440-444.

Mangabeira OF. Sobre duas novas especies de *Flebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Cruz* [online]. 1938; 33(3): 349-356.

Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saúde Pública* 2008; 24(12): 2941-2947

Marzochi MCA. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 1985a; 1(4): 442-446.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS, Toledo LM, Grimald Jr G, Momen H, Pacheco RS, Sabroza PC, Souza MA, Rangel Jr F, Tramontano N. Canine Visceral Leshmaniasis in Rio de Janeiro, Brasil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological finding. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1985b; 80(3): 349-357.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS, Amendoeira MRR. Leishmaniose visceral-calazar. *J Bras Med*. 1981; 41:69-84.

Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, Schubach AO, Marzochi KBF. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online]. 2009; 42(5) 570-580.

Marzochi MAB, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral Leishmaniasis in Brasil- Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Car. Saúde Pública*. 1994; 10:359-375.

Mattos CCLV. Caracterização climática da Restinga da Marambaia, RJ. In: Menezes LFT, Peixoto AL, Araújo DSD. História Natural de Marambaia. Seropédica-RJ: EDUR. 2005: 55-66. TT

Monteiro WM, Neitzke-Abreu HC, Ferreira MEMC, Melo GC, Barbosa MG, Lonardi MVC, Silveira TGV, Todoru U. Mobilidade populacional e produção da leishmaniose tegumentar Americana no Estado do Paraná, sul do Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2009; 42(5):509-514.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Nunes CM, Silva TCC, Laurenti MD, Corbett CEP. Application of direct immunofluorescence technic for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in lymph nodes aspirate. Braz J Vet Res Anim Sci. 2002;39(2):103-6.

MS-SINAN- Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ed. Ministério da Saúde. 2007; 177p.

MS-SINAN- Secretaria de vigilância em Saúde. Manual de vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 2006; 122p.

Nicolle C, Comte D. Origine Canine Du Kalazar. Bull Soc Pathol Exot. 1908;1:299-301.

Novo SPC. Levantamento da fauna de flebotomíneos, vetores de Leishmanioses, na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro. Tese de Mestrado-Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca- Fiocruz. 2011.

Paranhos-Silva M, Nascimento EG, Miro MCBF, Oliveira GCS, dos Santos WLC, Pontes de Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. Cohort study on canine emigration and Leishmania infection in an endemic area for american visceral leishmaniasis. Implications of the disease control. Acta Trop. 1998; 69: 75-83.

Pearson RD, Wheeler DA, Harrison LH, Kay HD. The immunobiology of leishmaniose. *Reviews of Infectious Diseases*. 1983; 5(5): 907-927.

Pereira LA, Xerez ZR, Pereira AMC. Ilha da Marambaia (Baía de Sepetiba/RJ): resumo Fisiográfico, Histórico e Importância Ecológica Atual. *Revista Ciência e Cultura*. 1990 maio/junho.

Pugedo L, Ricardo A, Barata D, França-Silva JC, Jaime C, Silva E, Edelberto S. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2005; 38(1):70-72, jan-fev.

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission reservoir host of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 2009; 136(4):1915-1934.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Azevedo ACR, Barbosa A F, Andrade CA. Flebotomos de Vargem Grande, foco de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1986; 81(3):347-49.

Salazar HC, Pinto FP, Gouveia LR, Bacha PC, Salgueiro PF. Leishmaniose visceral. Relato de um caso autóctone na cidade do Rio de Janeiro. *Ver médica*. 1979; 8:19-20.

Salomon OD, Quintana MG, Bezzi G, Morán ML, Betbeder E, Valdéz DV. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda,

Argentina. *Acta Trop*. 2010; 113, 84-87.

Scalone A, de Luma R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C, Mondesire RR, Simpson D, Donoghue AR, Frank GR, Gradoni L. Evaluation of *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol*. 2002; 104: 275-285.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico. Ministério da Saúde. 2010.

Silva JCF. Leishmaniose visceral canina no município de Montes Claros Minas Gerais, Brasil. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal de Minas Gerais. 1997.

Silveira AN, Alves WMEA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2008; 24(12):2941-2947.

Silveira FT, Ishikawa EAY, De Souza AAA, Laison R. Na outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (V) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. Parasite. 2002; 9: 43-50.

Souza MB, Assis CHC, Meira AM, Pinna LCL, Meróido JC, Ponte CS, Alves SS, Wermelinger ED. Fauna Flebotomínica de Área com Ocorrência de caso Autóctone de Leishmaniose Visceral canina na Ilha Grande, Município de Angra dos Reis, Rio de Janeiro. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 2005, Porto Alegre.

Souza MB, Marzochi MCA, Carvalho RW, Ribeiro PC, Pontes CS, Caetano JM, Meira AM. Ausência de *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de Leishmaniose visceral no município do Rio de Janeiro. Cad. Saúde Pública. 2003; 19: 1881-1885.

Souza MB, Sabroza PC, Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ. Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro- Flebotomíneo de área de procedência de caso Humano autóctone. Men. Inst. Oswaldo cruz. 1981; 76: 161-168.

SUCEN. Encontro de *Lutzomyia edwardsi* infectada na região da Grande de São Paulo. Informes Técnicos Institucionais. Rev Saúde Pública 2005;39(1):137-8 www.fsp.usp.br/rsp.

Tafuri Wg, Oliveira MR, Melo MN. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. Vet. Parasitol. 2001, 96:203-212.

World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniasis: reporting of the expert committee on the control of leishmaniasis. Geneva: World Health Organization. 2010.

World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniasis: Technical Report serie. Geneva: World Health Organization. 1990.

World Health Organization (WHO). Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization. 2012; 975.

Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera:Psychodidae). Associated Publisher American Entomological Institute 1994; 54: 1-881

ANEXO 1: Questionário de Sensibilização da População da Ilha da Marambaia



Questionário de Sensibilização Populacional em Leishmanioses

Nome:

Localidade:

Data: ___ / ___ / ___

- 1- Você já ouviu falar em Leishmaniose? SIM NÃO
- 2- Aonde? TV RÁDIO AMIGOS COLÉGIO PALESTRAS OUTROS
- 3- Você sabe como essa doença é transmitida? SIM NÃO
- 4- Como?
- 5- Olhe o inseto neste frasco (exemplar de Flebotomo). Você conhece?
SIM NÃO
- 6- Aonde você viu?
 DENTRO DE CASA FORA DE CASA NA FLORESTA
 OUTROS
- 7- Você já viu alguém com essa doença? SIM NÃO
- 8- Como você acha que fica o doente de Leishmaniose?
 C/ FERIDA NA PELE MAGRO C/FEBRE C/ BARRIGA
 D'ÁGUA

9- Você sabia que os animais domésticos, cão, gato e cavalo, podem ter Leishmaniose?

SIM

NÃO

10-Para você o que devemos fazer para evitar a Leishmaniose?

ANEXO 2: Ficha de Avaliação Clínica



Ficha de Avaliação Clínica dos Cães

Data: ___ / ___ / ___

Número do Chip:

Nome:

Raça: Idade: Sexo:

Frequência cardíaca: Frequência respiratória:

Sinais e Sintomas de Doença Atual:

1- Descamação

2- Úlcera na Pele

3- Onicogribose

4- Apatia

5- Vômito

6- Emagrecimento

7- Diarréia

8- Coriza

9- Cerato-
conjutivite

10- Hiperplasia
de Linfonodo

Observações:

ANEXO 3: Licença para utilização animal

ANEXO 4: Termo de Consentimento



(TERMO DE CONSENTIMENTO)

Termo de Consentimento

Eu, _____, portador da carteira de identidade n° _____, expedida pelo órgão _____, proprietário (a) do animal _____, espécie _____, raça _____, registro _____; autorizo a participação do meu cão no projeto de pesquisa “Ecoepidemiologia das Leishmanioses: estudo de vetores e reservatório canino em área endêmica do município de Mangaratiba, Rio de Janeiro.”, autorizando que nele sejam aplicadas técnicas anestésicas como sedação, anestesia local e ou geral para a realização do exame clínico, coleta de fragmento cutâneo através de biópsia de pele, coleta de 5ml sangue através de punção venosa, coleta amostras de 0,5ml de medula óssea e 0,001ml do linfonodo, através de punção das regiões respectivas.

A sedação poderá causar alteração da pressão arterial e dos batimentos cardíacos, rigidez muscular, excesso de salivação e contração muscular. Poderá haver convulsão que será revertido no mesmo momento. Na punção venosa pode ocorrer inflamação da veia, edema local e extravasamento de sangue, sendo realizada compressão local até interrupção. Aspirado de medula óssea pode ocasionar dor, controlada com anestesia local. Nos locais nos quais serão realizadas as biópsias será feita a aplicação de repelentes com o intuito de prevenir bicheira.

Autorizo também a utilização dos dados e materiais coletados para a pesquisa realizada pelo responsável técnico Fabiano Borges Figueiredo CRMV: 6519, sabendo que a identificação desse animal será mantida em sigilo e a participação nesse estudo não acarretará em qualquer custo financeiro para o proprietário.

O acompanhamento pós-operatório será realizado pela equipe de campo no sétimo dia após a realização da biópsia. Se houver algum problema em relação aos procedimentos realizados nos cães o veterinário responsável poderá ser encontrado pelos telefones (021) 38659536 / 38659553, no horário de 8:00 às 17:00 h.

O presente estudo além de trazer um benefício direto aos proprietários de cães da região de estudo, que terão a possibilidade de diagnosticarem seus animais em relação a uma zoonose grave como a leishmaniose visceral, região que atualmente não é realizado esse diagnóstico pela Secretaria Municipal de Saúde estarão também contribuindo para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnósticos para LVC mais sensíveis e específicas.

Estou ciente que caso meu animal apresente resultado positivo, que a equipe do projeto notificará a Secretaria Municipal de Saúde de Mangaratiba, sabendo-se que o animal será recolhido para eutanásia, medida baseada no Decreto do Ministério da Saúde, número 51.838, de 1963.

Mangaratiba, _____ de _____ 20____

Assinatura do proprietário do animal

ANEXO 5: Nota Técnica

SUBSECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA
EPIDEMIOLÓGICA E AMBIENTAL
COORDENAÇÃO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA
DIVISÃO DE TRANSMISSÍVEIS E IMUNOPREVINÍVEIS
GERENCIA DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES E ZOOSES

Rio de Janeiro, 9 de maio de 2012.

NOTA TÉCNICA Nº 5/2012 - GDTVZ/DTI/CVE/SVEA/SVS-SES RJ

Atenção: recomendamos o repasse desta Nota Técnica para as unidades de saúde e clínicas veterinárias nos municípios envolvidos, alertando os profissionais da área.

Assunto: Intensificação da Vigilância para Leishmaniose Visceral no Estado do Rio de Janeiro

Considerando a Nota Técnica nº 4/2011-GDTVZ/DTI/CVE/SVEA/SVS-SES RJ que alerta para aumento na ocorrência de casos de Leishmaniose Visceral Canina e Humana durante o ano de 2011 no Estado do Rio de Janeiro, apontamos para a manutenção e ocorrência de novos casos de Leishmaniose Visceral (LV) em cães e humanos, incluindo óbito, neste início de 2012. Portanto, reiteramos o alerta para necessidade de preparação/atenção pelos serviços de vigilância e assistência municipais, quanto ao enfrentamento de um novo ciclo de transmissão da doença em cães e seres humanos no estado.

Durante os anos de 2011 e 2012 chegaram ao conhecimento da Vigilância Epidemiológica Estadual (GDTVZ) a ocorrência de casos de LV em cães nos seguintes municípios do Estado:

- Município de Mangaratiba
- Município de Maricá
- Município de Niterói
- Município do Rio de Janeiro
- Município de Volta Redonda

Quanto à ocorrência de casos de Leishmaniose Visceral, segundo data de início de sintomas e município de residência, em 2011 foram dois casos humanos: um em Volta Redonda e outro no Rio de Janeiro sendo o primeiro autóctone e o segundo indeterminado. Este ano, tivemos conhecimento de um caso autóctone no Município de Barra Mansa que foi a óbito.

Lembramos que a Leishmaniose Visceral é uma zoonose transmitida pelo inseto vetor *Lutzomyia longipalpis* e, conforme comprovação científica, o cão faz parte do ciclo de transmissão da doença para o homem, sendo considerado um reservatório da doença e fonte de infecção para o ser humano. Desta forma, não é recomendado o tratamento do cão com a doença, sendo indicada a eutanásia destes animais. Diferentemente da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), não sendo recomendada a eutanásia do animal para fins de controle e prevenção da LTA, pois nesta não há comprovação

científica, até o momento, de que o cão faça parte do ciclo de transmissão. As manifestações clínicas também são distintas no homem e no animal e, ainda, conforme a espécie de parasita *Leishmania* envolvida, no caso da visceral seguem os principais sinais clínicos:

SER HUMANO - Definição de caso suspeito:

Leishmaniose Visceral Humana – paciente com febre (por mais de 7 dias), palidez e hepato-esplenomegalia (é importante realizar palpação de fígado e baço). Maior atenção em pacientes menores de 10 anos de idade, porque a incidência de casos costuma ser maior nesta faixa etária. Nos exames laboratoriais complementares ao diagnóstico clínico é comum o aparecimento de anemia, leucopenia, plaquetopenia e aumento das enzimas TGO e TGP.

CÃO - Definição de caso suspeito:

Leishmaniose Visceral Canina – febre irregular, apatia, emagrecimento, lesões cutâneas (principalmente descamação, eczema e úlceras) em geral no focinho, orelhas e extremidades; conjuntivite, paresia do trem posterior, fezes sanguinolentas e crescimento exagerado das unhas (onicogrifose).

Diante dos fatos apresentados e sendo o cão um sinalizador para possível ocorrência de casos em seres humanos, alertamos todos os profissionais e gestores do serviço para aumento no risco de ocorrência de casos de Leishmaniose Visceral Canina e Humana e reiteramos algumas medidas e fluxos que devem ser mantidos ou colocados em prática:

Repasse desta Nota Técnica para as unidades de saúde e clínicas veterinárias nos municípios envolvidos, alertando os profissionais da área.

Cada município deve acrescentar ao documento os contatos (e-mail e telefone) de suas vigilâncias municipais.

Em caso de suspeição de caso de Leishmaniose Visceral Canina a notificação deve ser feita em 24 horas ao serviço de vigilância municipal (contatos: epidemiologia.resende@gmail.com; telefones - (24) 3360-5018/5019) e deste para o estadual. No caso de repasse para o estado devem ser utilizados os seguintes contatos:

e-mail – vigambiental@saude.rj.gov.br; telefones – (21) 2333-3899/3842.

Ressaltamos que o repasse da notificação por telefone e e-mail não desobriga que esta seja feita através dos instrumentos e fluxos já estabelecidos, a saber: por meio do preenchimento e digitação da ficha de EPIZOOTIA no SINAN.

Tanto para Leishmaniose Visceral Canina quanto para a Tegumentar Canina é PROIBIDO o tratamento dos animais com produtos de uso humano, de acordo com a Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008. O uso desses medicamentos nos animais aumentaria o risco para seleção de parasitas resistentes ao medicamento, que é o mesmo utilizado no tratamento humano. Ainda, na LV canina é recomendada a eutanásia do animal.

Para orientações quanto às ações de vigilância entomológica e encaminhamento dos vetores para identificação taxonômica, quando necessário, entrar em contato com o Centro de Estudos e Pesquisa em Antropozoonoses Máximo da Fonseca Filho (CEPA/LACEN/SVS/SES RJ) (e-mail svs.cepa@saude.rj.gov.br, cepa.nnutels@gmail.com; telefones – (21) 2332-8597 e 2332-8606), seguindo metodologia contida no Manual do Ministério da Saúde; Para confirmação diagnóstica do caso canino suspeito de Leishmaniose Visceral, amostras de sangue do cão devem ser coletadas e enviadas para o Lacen-RJ (e-mail – dgnnutels@saude.rj.gov.br e telefones – (21) 2332-8597 e 2332-8606), seguindo protocolos contidos no Manual do Ministério da Saúde;

Observação: destacamos que a partir de dezembro de 2011 os exames para o cão passaram a ser o imunocromatográfico (teste rápido DPP), que uma vez positivo é feito o ELISA para confirmação. Contatar Lacen-RJ e Vigilância Ambiental para maiores orientações.

Quando da suspeição de Leishmaniose Visceral Canina em áreas indenes, no primeiro caso, deve ser feita a identificação do parasita *Leishmania chagasi* para caracterização da mesma.

Em caso de suspeição de Leishmaniose Visceral Humana, considerando que estamos em áreas indenes, solicitamos que a notificação seja feita em 24 horas ao serviço de vigilância municipal e deste para o estadual.

No caso de repasse para o estado devem ser utilizados os seguintes contatos: e-mail – adtvz@saude.rj.gov.br; telefones – (21) 2333-3881/3878. Ressaltamos que o repasse da notificação por telefone e e-mail não desobriga que esta seja feita através dos instrumentos e fluxos já estabelecidos, a saber, através do preenchimento e digitação da ficha de NOTIFICAÇÃO de Leishmaniose Visceral no SINAN.

Para confirmação diagnóstica do caso humano suspeito de Leishmaniose Visceral amostras de sangue do paciente humano devem ser coletadas e enviadas para o Lacen-RJ (e-mail – dgnnutels@saude.rj.gov.br e telefones – (21) 2332-8597 e 2332-8606), seguindo protocolos contidos no Manual do Ministério da Saúde.

O tratamento de casos humanos de Leishmaniose Visceral deve seguir as orientações contidas no Manual do Ministério da Saúde, o qual fornece os medicamentos, cabendo à SES-RJ repassá-los aos municípios. A liberação do medicamento é feita através da apresentação da ficha de notificação e do pedido médico, para tanto os municípios devem entrar em contato com a Vigilância Epidemiológica estadual, Gerência de Doenças Transmitidas Vetores e Zoonoses, nos seguintes contatos: e-mail – adtvz@saude.rj.gov.br; telefones – (21) 2333-3881/3878.

Para maiores informações entrar em contato através dos telefones: Secretaria Municipal de Saúde de Resende/Serviço de Epidemiologia: (24)3360-5018/5019 e e-mail - epidemio.resende@gmail.com.

Secretaria Estadual de Saúde-RJ: (21) 2333-3881/3878 e e-mail –
adtvz@saude.rj.gov.br.

ATENÇÃO: Recomendamos a divulgação desta Nota Técnica entre os demais setores e unidades de saúde pelos municípios que aparecem aqui listados com ocorrência de casos. Entretanto, considerando o deslocamento cada vez maior de pessoas entre cidades, estamos enviando o presente para ciência por todos os 92 municípios do Estado do Rio de Janeiro.

Nos colocamos à disposição, atenciosamente,

PATRÍCIA GANZENMULLER MOZA
Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses

Comissão Municipal de Gerência de Risco Sanitário - CMGRS
Secretaria Municipal de Saúde de Resende
Direção de Vigilância em Saúde
Serviços de Vigilância Sanitária e Vigilância Epidemiológica
Rua Augusto Xavier de Lima, nº 251 - Jardim Jalisco - Resende, RJ
CEP 27510-090
Tel: (24) 3360-5033 / 3360-5147 / 3360-5018 / 3360-5019"

Anexo 6: Produção Científica

Canine Visceral Leishmaniasis in Marambaia Island, Mangaratiba, State of

Rio de Janeiro: a native case report

Leishmaniose Visceral Canina na Ilha de Marambaia, Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro: relato de caso autóctone

Rafaela dos Santos Alonso - Veterinary Doctor / Doctoral Student in Public Health – Escola Nacional em Saúde Pública/ Departamento de Ciências Biológicas / Fundação Oswaldo Cruz - alonsorafaela@yahoo.com.br

Address: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Manguinhos, Rio de Janeiro. CEP: 21041-210 – Tel: (0xx21) 2598-2525

Tuane Rotti Abrantes- Veterinary Doctor/ Graduate student in Sciences – Instituto de Pesquisa Evandro Chagas/ Departamento de Dermatозoonoses /Fundação Oswaldo Cruz - tuane.rotti@ipecc.fiocruz

Address: Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro CEP: 21040-360 Tel.:(0xx21)3865-9595

Fabiano Borges Figueiredo- Doctor Public Health Researcher – Instituto de Pesquisa Evandro Chagas/ Departamento de Dermatозoonoses/ Fundação Oswaldo Cruz - fabiano.figueiro@ipecc.fiocruz.br

Address: Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro CEP: 21040-360 Tel.:(0xx21)3865-9595

Maria de Fátima Madeira- Doctor Public Health Researcher – Instituto de Pesquisa Evandro Chagas/ / Departamento de Micro-Imuno-Parasitologia /Fundação Oswaldo Cruz - fatima.madeira@ipecc.fiocruz.br

Address: Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro CEP: 21040-360 Tel.:(0xx21)3865-9595

Valmir Laurentino Silva- Doctor Public Health Researcher- Escola Nacional em Saúde Pública/ Departamento de Ciências Biológicas / Fundação Oswaldo Cruz– valmir.laurentino@ensp.fiocruz.br

Address: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Manguinhos, Rio de Janeiro. CEP: 21041-210 –
Tel: (0xx21) 2598-2525

Marcos Barbosa de Souza- Head Public Health Researcher Escola Nacional em Saúde Pública/ Departamento de Ciências Biológicas / Fundação Oswaldo Cruz -
mabaza@ensp.fiocruz.br

Address: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Manguinhos, Rio de Janeiro. CEP: 21041-210 –
Tel: (0xx21) 2598-2525

Abstract

Visceral Leishmaniasis (VL) is a major public health problem in the world, and Brazil has a high annual incidence. The State of Rio de Janeiro has its human and canine cases concentrated in the capital, but in frank expansion, supported by recent reports of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) native in other cities in the state. This paper aims to report a native case of the CVL Marambaia Island, the city of Mangaratiba, contributing to the actions of LV epidemiological surveillance and control in the state of Rio de Janeiro.

Resumo

A Leishmaniose Visceral (LV) é um importante problema de saúde pública no mundo, e no Brasil apresenta uma elevada incidência anual. O Estado do Rio de Janeiro tem seus casos humanos e caninos concentrados na capital, porém em franco processo de expansão, corroborado pelos recentes relatos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) autóctone em outros municípios do estado. Este trabalho visa relatar um caso autóctone de LVC na Ilha de Marambaia, município de Mangaratiba, contribuindo para as ações de vigilância e controle epidemiológico LV no estado do Rio de Janeiro.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, epidemiological surveillance and control.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral; vigilância e controle epidemiológico.

Introduction

Visceral Leishmaniasis (VL) is a pandemic, vector-borne and severe protozoosis in untreated individuals whose worldwide incidence, despite under-reporting, experienced major gain in the last two decades¹.

In Brazil VL is caused by *L. (L.) chagasi*, a variant of *L. (L.) infantum* of the Old World, with 3650 cases/yr reported, approximately 60% of these incidences are from Latin America². The main domestic host is the domestic dog (*Canis familiares*)² which lives in close contact with man, attracting the vector (*L. longipalpis*) and highly parasitized in the skin representing a risk of infection to the population. Their euthanasia is indicated in cases tested positive³.

In Rio de Janeiro its transmission is considered as sporadic, with 87 cases from 1977 to 2006, concentrated in the area of Pedra Branca Mountain Range and Gericinó Mountain Range, the city of Rio de Janeiro, overlapping the regions of occurrence LTA4. Similarly, the canine cases are concentrated in the capital, but are in the process of expanding to other cities, with reports of native cases in Angra dos Reis, Mangaratiba, Maricá^{5,6}.

Marambaia Island (Ilha de Marambaia), is located at Marambaia Sandbank, which belongs to the city of Marambaia, having a highly mobile dynamic population. In its territory, is a Naval Military Training Center constantly holding military exercises involving national troops from other states as well as international ones. A Naval Traffic Hotel also functions with a wide circulation of tourists, attracted by the natural beauty of the place, and a resident population of about 400 people who make a living from fishing, in a low socioeconomic status. The canine population of Marambaia Island is high with about 128 wandering dogs, although they have owners. Such features are associated with the reporting, in 2002, of two human cases of American Tegumentary Leishmaniasis (ACL) on the island of Marambaia.

The authors describe a native case report of CVL from Marambaia Island, town of Mangaratiba, State of Rio de Janeiro.

This case study relied support from the interdepartmental Department of Biological Sciences / ENSP, the Laboratory for Clinical Research in dermatozoonoses / IPEC and the Leishmaniasis Surveillance Laboratory / IPEC which collaborated with providing the laboratory structure needed to perform the laboratory tests.

Case Report

During the dog population survey on Marambaia Island, Mangalore, Rio de Janeiro, a dog, coming from Praia Suja, had signs and symptoms compatible with that of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL). The animal was a male mixed breed, born at the local, with habits limited to place of residence and no travel history outside the limits of Marambaia Island.

In the clinical examination, the animal displayed extreme emaciation, alopecia, hair opacity and generalized adenopathy. In order to confirm the clinical suspicion of CVL, a rapid TR DPP Bio-Manguinhos Visceral Leishmaniasis Canine field test was conducted along with a venipuncture of the cephalic vein, collecting 5ml of blood for the indirect immunofluorescence tests (1:80) and immune-enzymatic trials (1:100) using Bio-Manguinhos kits for diagnosing CVL. The serological kits were provided for free by Bio-Manguinhos.

The research results for anti-*Leishmania* antibodies were positive both in the rapid test and in the serology laboratory. From the in-tact healthy skin findings collected, pulling samples from the popliteus lymph node and taking bone marrow for parasitological examination of culture and isolation amid NNN / Schneider's. The culture results were positive in the skin sample processed and for characterization used in the multi-locus enzyme electrophoresis technique, identifying *Leishmania (Leishmania) chagasi*, confirming the first case of CVL on Marambaia Island.

Discussion

The role of the domestic dog as an important link in the chain of transmission of the LV has been known for a long time. Since 1950, the identification of positive tested dogs and their sacrifice has been used as a VL control tool in endemic areas⁴.

Despite reports of CVL preceding human cases, the fact linked to elevated homogenetic concordance between strains of *Leishmania (L.) chagasi* isolated from both humans and canines⁷, shown that the euthanasia of dogs creates a limited impact, reducing the incidence in humans in Brazil¹.

Currently, there is no consensus about its relationship with the real risk of developing human cases⁷, although the SVC is in a weak dispersion process. In recent years, native cases of CVL were reported in cities in Rio de Janeiro, previously

considered as unaffected by LV (Angra dos Reis, Mangaratiba, Maricá)^{5,6}. These findings reinforce the need for monitoring the canine host in the control and surveillance program, collaborating in identifying at risk areas and evaluating implemented control actions.

The seroprevalent variable in dogs from endemic areas of Rio de Janeiro⁷ and in reporting the (*L.(L.) chagasi* / *L.(V.) brasiliensis*) co-infection in dogs from Jacarepaguá and Campo Grande⁸, reinforces the need for a serological multi-method strategy, together with the parasitological evaluation, for a definitive diagnosis to identify the species of *Leishmania* maintained by the domestic host. The case report of CVL in Marambaia Island supports this concept, because the epidemiological studies started at the site beginning from ATL case reports resulting in the isolation and identification of *Leishmania (L.) chagasi* in canine hosts.

The recent ACL epidemic in the state of Paraná (1980 to 2005) showed a positive relationship with the mobility of the population in the region⁹. In this sense, Marambaia Island has an intense transient population flow for maintaining the consolidated native CVL positive host population, which can play an important role in the dissemination and exacerbation of LV, among other diseases, in the State of Rio de Janeiro, Brazil.

The native CVL case reports on Marambaia Island alert the need for epidemiological surveillance of this important zoonosis through the implementation of entomological research and canine seroepidemiological surveying on the site.

REFERENCES

- 1- Dantas-Torres, F;
Brandão-Filho, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of

epidemiology and control. Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo, vol.48(31), may/june, 2006.

- 2- Ministry of Health (Ministério da Saúde). The surveillance and control of Visceral Leishmaniasis manual (*Manual de vigilância e controle da Visceral Leishmaniasis*). Ministry of Health (*Ministério da Saúde*), Brasília122, 2006.
- 3- Marzochi M.C.A; Coutinho S.G; Souza W.J.S; Toledo L.M; JR Grimaldi G; Monen H; Pacheco R.S; Sabroza P.C; Souza M.A; Rangel F.B; Tramontano N.C. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings. (1977-1983). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 80(3) :349-357, jul./set., 1985.
- 4- Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Serra CMB, Pereira SA, Figueiredo FB, Confort EM, Quintella LP, Marzochi MCA. Is *Leishmania (Viannia) brasiliensis* preferentially restricted to the tegumentary lesions of naturally infected dogs? Parasitol 2005; 97: 73-76.
- 5- Figueiredo FB, Filho CJLB, Schubach EYP, Pereira AS, Nascimento LD, Madeira MF. Native canine Visceral Leishmaniasis case report to the area south of the city of Rio de Janeiro. Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine 2010 (Relato de caso de Visceral Leishmaniasis canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2010); 43(1):98-99.

6- Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Conforte E, Bogio A, Madeira MF. Visceral Canine Leishmaniasis in Marica, State of Rio de Janeiro: report of the first native case. Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine 2009 (Visceral Leishmaniasis Canina em Maricá, Estado do Rio de Janeiro: relato do primeiro caso native. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2009); 42(1):77-78.

7- Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, Schubach AO, Marzochi KBF. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. Brazilian Society of Tropical Medicine 2009; 42(5).

Madeira MF, Schubach Schubach TMP, Pereira AS, Figueiredo FB, Baptista C, Leal CA, Melo CX, Confort EM, Marzochi MCA. *Post mortem* parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. Veterinary Parasitology 2006; 138: 366-370.

Monteiro WM, Neitzke-Abreu HC, Ferreira MEMC, Melo GC, Barbosa MG, Lonardi MVC, Silveira TGV, Todoru U. Population mobility and the production of American tegumentary leishmaniasis in the State of Paraná, southern Brazil. Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine 2009 (Mobilidade populacional e produção da leishmaniose tegumentar Americana no Estado do Paraná, sul do Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2009); 42(5):509-514.

