

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

**TESE**

**Levantamento da Fauna Flebotomínica e Ocorrência de Cães Sororreagentes  
para Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Seropédica,  
Estado do Rio de Janeiro**

**Patrícia Giupponi Cardoso**

**2007**



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

**LEVANTAMENTO DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA E OCORRÊNCIA DE  
CÃES SORORREAGENTES PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA NO MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA, ESTADO DO RIO DE  
JANEIRO**

**PATRÍCIA GIUPPONI CARDOSO**

*Sob orientação do Professor*

**Argemiro Sanavria**

*E co-orientação dos Professores*

**Marcos Barbosa de Souza**

**Mauro Célio de Almeida Marzochi**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em  
Ciências**, Área de Concentração em  
Parasitologia Veterinária

Seropédica, RJ  
Outubro de 2007

636.708969364 Cardoso, Patrícia Giupponi, 1974-  
098153 Levantamento da fauna flebotomínica e  
C2681 ocorrência de cães sororreagentes para  
T Leishmaniose tegumentar americana no  
município de Seropédica. - 2007.  
53 f. : il.

Orientador: Argemiro Sanavria.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Instituto de  
Veterinária.

Bibliografia: f. 29-40.

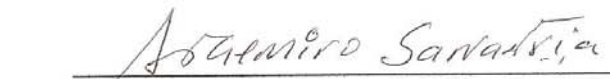
1. Leishmaniose - Seropédica (RJ) -  
Teses. 2. Cão - Doenças - Teses. 3.  
Zoonoses - Teses. I. Sanavria, Argemiro,  
1949- II. Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária.  
III. Título.

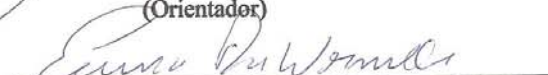
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

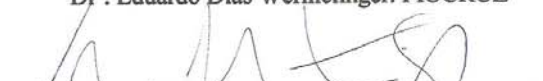
**PATRÍCIA GIUPPONI CARDOSO**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,  
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em  
Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM, 16/10/2007

  
\_\_\_\_\_  
Dr.º Argemiro Sanavria. UFRRJ  
(Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Dr.º Eduardo Dias Wermelinger. FIOCRUZ

  
\_\_\_\_\_  
Dr.º Valmir Laurentino Silva. FIOCRUZ

  
\_\_\_\_\_  
Dr.º Wilson Jacinto S. Sousa. FIOCRUZ

  
\_\_\_\_\_  
Dr.º Aivaldo Henrique da Fonseca. UFRRJ

**À DEUS por iluminar meu caminho, e meus  
Pais Aroldo José Cardoso e Ilda Giupponi  
Cardoso pelo amor incondicional e incentivo.**

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Argemiro Sanavria pela orientação deste trabalho.

À coordenadora do curso Maria Julia Salim Pereira por sua dedicação e incentivo ao curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

Aos funcionários da secretaria do curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pelos seus préstimos na confecção deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Luiz Carlos Ribeiro da Paz e Cléia Guimarães de Castro pelo auxílio e amizade.

Ao pesquisador Dr. Marcos Barbosa de Souza, do Departamento de Ciências Biológicas da ENSP, FIOCRUZ, pela co-orientação, incentivo e constante apoio.

Ao pesquisador Dr. Valmir Laurentino Silva, do Departamento de Ciências Biológicas da ENSP, FIOCRUZ, pelo auxílio na sorologia, sugestões ao trabalho e constante apoio.

Aos doutores Wilson Jacinto Silva Sousa, Eduardo Dias Wermelinger e Aivaldo Henrique da Fonseca pela participação na banca examinadora.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas da ENSP, FIOCRUZ, Jairo Caetano Merodio e Antônio de Medeiros Meira, pelo auxílio nas coletas e identificação dos flebotomínios.

Aos funcionários da FUNASA de Seropédica, Marcos Tupinambá, Adilson Marcos pela ajuda na localização dos clientes afetados pela LTA.

Aos clientes que permitiram a realização da pesquisa em seus domicílios. E aos cães pela colaboração mesmo inconscientes.

Ao amigo Marcus Sandes Pires pela ajuda nos momentos mais difíceis.

Ao amigo Everaldo Nunes Jr. no auxílio com os mapas.

Ao amigo e companheiro Humberto Dantas Amaral por seu carinho, incentivo, compreensão e amparo em todos os momentos.

Ao meu irmão e amigos pelo amor, carinho e compreensão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa a mim outorgada.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram na execução deste trabalho, direta ou indiretamente.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 Ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) .....	3
2.2 Histórico da doença.....	3
2.3 Tipo de lesão de LTA em cães domésticos.....	4
2.4 Classificação taxonômica dos protozoários.....	4
2.5 Classificação taxonômica dos flebotomíneos.....	5
2.6 Morfologia dos protozoários.....	6
2.7 Morfologia dos flebotomíneos.....	7
2.8 Ciclo evolutivo da LTA.....	8
2.9 Diagnóstico laboratorial da LTA.....	8
2.10 Transmissão da LTA.....	10
2.11 Perfil epidemiológico da LTA.....	10
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
3.1 Localização de Seropédica – RJ (área de estudo).....	12
3.2. Inquérito canino da protozoose.....	14
3.2.1 Coleta de sangue periférico e técnicas sorológicas.....	14
3.2.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	14
3.2.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	14
3.3 Estudo da fauna flebotomínica.....	15
3.3.1 Captura.....	15
3.3.2 Identificação taxonômica.....	15
3.3.3 Metodologia de dissecação.....	15
3.3.4 Detecção de infecção natural por <i>Leishmania sp</i> .....	15
3.3.5 Polymerase Chain Reaction (PCR) dos flebotomíneos.....	15
<b>4 RESULTADOS</b> .....	17
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	25
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	28
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29
<b>8 ANEXOS</b> .....	41

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resultado da sorologia dos cães de clientes e vizinhos (residência controle), realizadas no Município de Seropédica-RJ.....	17
<b>Tabela 2.</b> Teste exato de Fisher $p=0,1484$ .....	17
<b>Tabela 3.</b> Resultado da sorologia de animais provenientes de áreas com ocorrência de casos humanos de LTA no Município de Seropédica-RJ. ....	18
<b>Tabela 4.</b> Distribuição segundo sexo e grupos etários dos casos de LTA em habitantes do Município de Seropédica-RJ de 2002 à 2004 .....	18
<b>Tabela 5.</b> Distribuição segundo área e anos de ocorrência dos casos humanos de LTA em habitantes do Município de Seropédica-RJ de 2002 à 2004.....	19
<b>Tabela 6.</b> Números e percentuais de espécies de flebotomíneos coletados em quatro áreas do Município de Seropédica-RJ no período de outubro 2004 à setembro 2005.....	19
<b>Tabela 7.</b> Número de machos e fêmeas coletados e sua média por hora, em cada espécie de flebotomíneos coletados no período de outubro de 2004 à setembro de 2005.....	20
<b>Tabela 8.</b> O número e espécies de flebotomíneos coletados por área no Município de Seropédica-RJ no período de outubro 2004 à setembro de 2005.....	21
<b>Tabela 9.</b> Percentuais de flebotomíneos coletados nas quatro áreas trabalhadas no Município de Seropédica-RJ no período de outubro 2004 à setembro de 2005.....	21
<b>Tabela 10.</b> Número das espécies e sexo dos flebotomíneos capturados no Valão da Louça, Município de Seropédica, no período de outubro de 2004 à setembro de 2005.....	22
<b>Tabela 11.</b> Número das espécies e sexo dos flebotomíneos capturados no Caçador, Município de Seropédica, no período de outubro de 2004 à setembro de 2005.....	22
<b>Tabela 12.</b> Número das espécies e sexo dos flebotomíneos capturados no Km 39, Município de Seropédica, no período de outubro de 2004 à setembro de 2005.....	22
<b>Tabela 13</b> Número das espécies e sexo dos flebotomíneos capturados no Km 40, Município de Seropédica, no período de outubro de 2004 à setembro de 2005.....	23



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Sorologia dos cães provenientes de áreas com ocorrência de LTA em humanos no Município de Seropédica-RJ. ....	17
<b>Gráfico 2.</b> Total de flebotomíneos coletados nas quatro áreas com ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Seropédica, no período de outubro de 2004 à setembro de 2005.....	20
<b>Gráfico 3.</b> Número e espécie de flebotomíneos coletados em quatro áreas com ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana do Município de Seropédica – RJ, no período de outubro de 2004 à setembro de 2005.....	21
<b>Gráfico 4.</b> Frequência mensal das capturas de flebotomíneos realizadas por áreas com ocorrência de LTA no Município de Seropédica-RJ. ....	23
<b>Gráfico 5.</b> Frequência mensal das coletas de flebotomíneos realizadas no Município de Seropédica-RJ... ..	23

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa da localização do Município de Seropédica – RJ.....	12
<b>Figura 2.</b> Mapa do relevo do Município de Seropédica - RJ.....	13
<b>Figura 3.</b> Gel ‘A’ .....	24
<b>Figura 4.</b> Gel ‘B’ .....	24

## RESUMO

CARDOSO, Patrícia Giupponi. **Levantamento da fauna flebotomínica e ocorrência de cães sororreagentes para Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro**. 2007. 53 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa não contagiosa causada por protozoários do gênero *Leishmania* que acomete a pele e mucosa, sendo primariamente uma infecção zoonótica. O objetivo desta pesquisa foi realizar o levantamento da fauna flebotomínica em áreas com ocorrência de casos humanos de LTA. Para coleta dos flebotomos foram realizadas capturas mensais sistemáticas utilizando o capturador de Castro, no horário das 18 às 22h, durante 12 meses. Os dípteros foram colocados em frascos contendo álcool 70% e transportados para o laboratório de Vetores do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, RJ, onde foram clarificados e identificados. Para sorologia dos cães, amostras de sangue foram coletadas por venopunção em animais residentes nos domicílios acometidos e de cães vizinhos. Após centrifugação e separação do soro, as amostras foram conservadas a -20°C, até o momento da realização dos ensaios sorológicos no laboratório de Imudiagnóstico da ENSP, da FIOCRUZ. Empregaram-se os seguintes métodos: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Foram capturados 2390 exemplares de flebotomíneos entre os meses de outubro de 2004 a setembro de 2005, pertencentes a quatro espécies. A espécie predominante foi a *Lutzomyia intermedia* com 97,1% do total coletado, seguida pela *L. whitmani* 1,6% , *L. migonei* 1,21% e *L. oswaldoi* 0,09 %. Da sorologia de 35 cães: 60% (21) animais foram considerados não reativos; 22,9% reativos somente para ELISA; 2,9% somente RIFI e 14,2% (5) dos cães reativos para as duas técnicas, conclusivamente positivos. Não houve evidências de associação entre sorologia (RIFI+/ELISA+ e outros resultados) com a propriedade do animal (paciente ou vizinho), segundo o teste exato de Fisher. Aparentemente a transmissão da LTA no município de Seropédica esteja sendo veiculada pela *L. intermedia*. A presença de cães reativos sem a existência de lesão sugestiva pode contribuir para novos focos da LTA, funcionando como um animal em potencial para manutenção da protozoose.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Tegumentar Americana, Flebotomíneos, Cães domésticos.

## ABSTRACT

CARDOSO, Patrícia Giupponi. **Investigation of phlebotomine fauna and occurrence serum-reactive dogs for American Cutaneous Leishmaniasis in Seropédica Country, Rio de Janeiro State.** 2007. 53 p. Tese (Doctor in Veterinary Science). Veterinary Institute, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

The American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is a non-contagious infectious illness caused by *Leishmania* protozoa genera affecting skin and mucous membranes basically being a zoonotic infection. The aim of this study was to carry out phlebotomine fauna survey in ACL human cases occurrence areas. For sandfly collection monthly systematic captures by Castro trap from 6 o'clock p.m. to 10 o'clock p.m. for 12 months were performed. The diptera were placed on 70% alcohol bottles and carried to Sergio Arouca Public Health National School Biological Sciences Department Vectors Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, where they have been clarified and identified, as well. For dogs serology, blood samples from invaded residences animals as well as from a neighbour one, by venous puncture were taken. After serum centrifugation and separation, samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  till serological assays performance at FIOCRUZ Public Health National School Immunodiagnosis Laboratory. The following methods: Indirect Immunofluorescence Reaction (IFIR) and Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used. From October, 2004 to September, 2005, 2390 units from four species were captured. The predominant species was the *Lutzomyia intermedia* with 97.1% from total collected, followed by *L. whitmani* 1.6%, *L. migonei* 1.21% and *L. oswaldoi* 0.09%. From 35 dogs serology: 60% (21) no reagent animals were reported, 22.9% just for ELISA, 2.9% for IFIR, and 14.2% (5) reagent animals for both techniques, definitely positive. No correlated evidences between serologies (IFIR+/ELISA+ and other results) in regard to animals' residence (ill or neighbour) by Fisher statistical test were reported. It might be suggested that ACL transmission in Seropédica County has basically been spread by *Lutzomyia intermedia* specie. The presence of reagent dogs unless suggestive injury may contribute for new ACL reports.

**Key-words:** American Tegumentar Leishmaniasis, Phlebotomine, Domestic dogs.

## Lista de Abreviações

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CENEPI	Centro Nacional de Epidemiologia
CIEF	Contra-imunoeletróforese
DAT	Reação de Hemaglutinação Direta
DCB	Departamento de Ciências Biológicas
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DESP	Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (ADN ou DNA)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra-acético
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
g	Grama
HAI	Reação de Hemaglutinação Indireta
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
Km	Quilômetro
L	Litro
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LTC	Leishmaniose Tegumentar Canina
LV	Leishmaniose Visceral
mg	Miligrama
mL	Mililitro
M	Mol
mg	Miligrama
µg	Micrograma
µL	Microlitro
NNN	Mc Neal, Novy & Nicolle
OPD	Orto-fenileno-diamino
PA	Puro Absoluto
PBS	Solução Tampão Fosfato
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial Hidrogeniônico
qsp	Quantidade Suficiente Para
RFC	Reação de Fixação de Complemento
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rpm	Rotações por minuto
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
sp	Espécie
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UV	Ultra-violeta
WHO	World Health Organization
°C	Grau Celsius

# 1 INTRODUÇÃO

A implicação dos flebotomíneos como vetor da Leishmaniose Tegumentar foi demonstrada, experimentalmente por Aragão (1922), no antigo estado da Guanabara, capital do Rio de Janeiro, ao inocular e reproduzir a lesão no focinho de um cão a partir de macerado do conteúdo intestinal de *Lutzomyia intermedia*.

Na década de 50 foi registrado um surto de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no interior do estado do Rio de Janeiro, mais precisamente no município de Magé, cujas aspersões de diclorodifeniltricloroetano (DDT) utilizada na campanha de combate ao mosquito da malária, que também afetaram os flebotomíneos (NERY-GUIMARÃES, 1955), reduziram consideravelmente o número de casos desta protozoose.

Com a suspensão do programa da malária e conseqüentemente a suspensão das dedetizações na década de 70 ocorreu um recrudescimento da LTA na maioria das regiões brasileiras (FUNASA/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Deste modo, a LTA passou a ser registrada em baixas incidências com surtos epidêmicos esporádicos, em áreas de colonização antiga e onde se verificavam ocupações humanas desordenadas (SABROZA, 1981; LIMA et al., 1988).

A LTA vem estabelecendo-se no Brasil entre as doenças metaxênicas, após a malária, que apresenta maior importância no campo da Saúde Pública. Esta protozoose é endêmica no Estado do Rio de Janeiro, e vem se expandindo progressivamente, fato esse que pode ser constatado pelo acréscimo de municípios com notificações de casos nos últimos 10 anos.

Segundo Desjeux (2001), os principais fatores de risco relacionados à leishmaniose cutânea zoonótica, em diversas regiões do mundo, são a urbanização, o desmatamento, o estabelecimento de novos povoados, a domesticação do ciclo de transmissão e o desenvolvimento de agricultura com construção de represas para irrigação. Na Região Sudeste do Brasil, esta doença apresenta um caráter de transmissão peri-domiciliar, principalmente pela adaptação dos insetos vetores aos ambientes naturais modificados, possibilitando, desta forma, o envolvimento de animais domésticos (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

Em vários municípios do Estado do Rio de Janeiro, atinge pessoas de diferentes faixas etárias, caracterizando a transmissão intra e peridomiciliares. A *Lutzomyia intermedia*, pré-adaptada ao ambiente alterado, passou a ser considerado vetor potencial desta protozoose (RANGEL et al., 1984; PITA-PEREIRA et al., 2005) acompanhada, mais recentemente no município do Rio de Janeiro pela *L. migonei* (PITA-PEREIRA et al., 2005).

Com a municipalização dos programas de Leishmanioses, o município de Seropédica notificou no ano de 2003, quinze casos humanos autóctones de LTA, sendo que, cinco casos foram procedentes da localidade do Valão da Louça. Embora, houvesse registros de ocorrências de casos autóctones de LTA na supracitada localidade, pode-se constatar que havia escassez de estudos sistemáticos sobre os flebotomíneos.

Os objetivos do trabalho foram: realizar um inquérito epidemiológico envolvendo o estudo da fauna flebotomínica e a detecção sorológica de cães potencialmente infectados, nas principais áreas de risco do Município de Seropédica – Estado do Rio de Janeiro, Brasil.. E os objetivos específicos: determinar a composição da fauna flebotomínica das diferentes áreas de

Seropédica, entre elas: Km 39, Km 40, Caçador e Valão da Louça. Realizar inquéritos sorológicos caninos nas residências de pessoas que contraíram LTA nos anos de 2002 a 2005. Verificar a presença de infecção por *Leishmania* sp em flebotomíneos capturados, através da técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR).

Em função da ocorrência de casos humanos registrados na Secretaria Municipal de Saúde e Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) foram notificados 17 casos humanos de LTA em quatro bairros do Município de Seropédica. Deste modo as atividades relacionadas aos inquéritos flebotomínicos e caninos ficaram concentrados nessas quatro áreas referidas acima

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998), a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é endêmica em regiões tropicais e subtropicais de 88 países; nas Américas atinge 21 países e no Brasil, todos os estados.

A doença apresenta-se em franco crescimento, tanto em magnitude, como em expansão geográfica. Segundo o CENEPI (2002) no período de 1970 a 2001, os casos notificados de LTA elevaram-se de 3.000 para 37.000. Só no ano de 2003 o Ministério da Saúde (2004) relatou 31.343 casos no Brasil, sendo 3.472 na região Sudeste, dos quais 251 no Estado do Rio de Janeiro.

### 2.2. Histórico da doença (LTA)

A forma cutânea da leishmaniose já havia sido descrita no primeiro século da era cristã, com os relatos de feridas na pele que recebiam o nome de acordo com a região geográfica onde ocorriam: botão de Bagdá no Iraque, botão de Aleppo na Síria, ferida de Balkh no Afeganistão, etc. (NEVES, 1998). Na América, a doença é conhecida desde a época pré-colombiana (400 a 900 d.C.), através de cerâmicas peruanas e equatorianas, que documentam em potes Mochica e Huaco, faces humanas com mutilações do nariz e dos lábios, semelhantes às provocadas pela leishmaniose cutâneo-mucosa (BRÜCKER & GENTILINI, 1987; ALTAMIRANO-ENCISO et al, 2003).

Em 1911, Gaspar Vianna, considerando o agente etiológico da “úlcerade-Bauru” diferente da *Leishmania tropica*, propôs o nome de *Leishmania braziliensis*. No mesmo ano, Carlos Chagas, durante uma excursão à Amazônia, suspeitou de casos de leishmaniose visceral. (PESSOA & MARTINS, 1988).

Segundo MONTENEGRO (1926), a LTA ocorreu nas Américas desde o Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile (GONTIJO & CARVALHO, 2003)

No Brasil, os primeiros relatos de cães naturalmente infectados por *Leishmania dermatópica* foram descritos no início do século passado. Em julho de 1912, PEDROSO (1913) fazendo uma excursão pela região noroeste do Brasil, observou um cão na estação de Itapura (Estrada de Ferro Noroeste do Brasil), portador de vasta lesão ulcerosa no focinho, clinicamente semelhante à leishmaniose local do homem. A observação de tal caso, o fez suspeitar da sua ocorrência também no cão.

Entre 1880 e 1930, ocorreram nos surtos de LTA associados ao ciclo econômico da borracha, das fazendas cafeeiras e ao crescimento das cidades brasileiras. Mas, a medicina daquela época considerava essa “nova doença” dentro das manifestações clínicas da lepra, lúpus, sífilis ou tuberculose que também afetavam economicamente o país (ALTAMIRANO-ENCISO et al, 2003).

Atualmente se considera a *Leishmania (Viannia) braziliensis* o principal agente etiológico da leishmaniose tegumentar no Rio de Janeiro, sendo a infecção de animais domésticos, como



cães e equídeos, associada a flebotomíneos que se adaptam bem aos ambientes modificados, os quais propiciam aos insetos abrigo e alimento em maior abundância que nos ambientes naturais (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

### 2.3. Tipo de Lesão de LTA em Cães Domésticos

A Leishmaniose Tegumentar Canina (LTC) é caracterizada pela presença de lesões cutâneas ulceradas ou vegetantes, freqüentemente recobertas por crostas; únicas, múltiplas ou confluentes, predominando nas extremidades, em áreas desprovidas de pelos e no focinho, envolvendo a mucosa respiratória. A evolução é prolongada, não costuma comprometer o estado geral do animal, e pode apresentar comportamento cíclico, ora com cicatrização ora com exacerbação da lesão, particularmente nos meses mais quentes e mais frios e, ainda, pode cursar de forma subclínica (DIAS et al. 1977, ARAÚJO FILHO et al. 1978, PIRMEZ et al. 1988, MARZOCHI 1992).

### 2.4. Classificação taxonômica dos protozoários

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que acometem o homem, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro (SARAVIA et al, 1989). Estes parasitas possuem a seguinte posição sistemática (LEVINE *et al*, 1980):

Reino: PROTISTA Haeckel, 1866

Sub-reino: PROTOZOA Goldfuss, 1817

Filo: SARCOMASTIGOPHORA Honigberg & Balamuth, 1963

Sub-filo: MASTIGOPHORA Desing, 1866

Classe: ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909

Ordem: KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976

Sub-ordem: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880

Família: TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901, emend. Grobden, 1905

Gênero: *Leishmania* Ross, 1903

Subgênero: *Leishmania* (Lainson & Shaw, 1987)

Espécies: Complexo *L. donovani*

(*L. archibaldi*, *L. chagasi*, *L. donovani*, *L. infantum*)

*L. tropica* (*L. killichi*, *L. tropica*)

*L. major* (*L. major*)

*L. aethiopica* (*L. aethiopica*, *L. garnhami*)

*L. mexicana* (*L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis*)

Subgênero: *Viannia* (Lainson & Shaw, 1987)

Espécies: Complexo *L. braziliensis*

(*L. braziliensis*, *L. peruviana*)

*L. guyanensis* (*L. guyanensis*, *L. panamensis*)

Não especificada: *L. lainsoni*, *L. naiffi*

Fonte: Control of Leishmaniosis, WHO, 1990.

No Brasil, as três principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, tendo sido mais recentemente identificadas como novos agentes de leishmaniose a *L. (V.) lainsoni*, a *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* (MARZOCHI et al. 1999). As manifestações clínicas estão associadas à espécie envolvida conforme relacionadas abaixo:

•Leishmaniose Cutânea:

*Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (Lainson & Shaw, 1972)

*Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (Vianna, 1911)

*Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (Floch, 1954)

*Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* (Silveira et al., 1987)

•Leishmaniose Cutâneomucosa:

*Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (Vianna, 1911)

•Leishmaniose Cutâneodifusa:

*Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (Lainson & Shaw, 1972)

•Leishmaniose Visceral:

*Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (Cunha & Chagas, 1937)

Segundo Rey (1992), o gênero *Leishmania*, agrupa espécies de protozoários unicelulares, parasitos pertencentes à família Trypanosomatidae. Os organismos da ordem Kinetoplastida apresentam um flagelo, localizado em uma depressão da membrana plasmática, e uma organela rica em DNA, o cinetoplasto. Dos nove gêneros da família Trypanosomatidae, apenas dois, o *Trypanosoma* e a *Leishmania*, são de interesse médico, sendo o primeiro responsável pela Doença de Chagas (Américas) e pela Doença do sono (África), e o segundo pelas leishmanioses: cutânea, cutânea-mucosa e visceral.

As leishmanias são parasitos digenéticos, encontrados nas formas amastigotas como parasitos de células do SFM de mamíferos e flagelados promastigotas, no trato digestivo de insetos vetores da família Psychodidae ou em meios de cultivo acelulares. Sua transmissão ocorre através da picada do inseto infectado (NEVES, 1998).

O agente etiológico mais frequentemente encontrado é a *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (COUTINHO et al. 1985, FALQUETO et al. 1986, MACHADO & Milder 1986, OLIVEIRA-NETO et al. 1988, PIRMEZ et al. 1988, AGUILAR et al. 1990, YOSHIDA et al. 1990, PASSOS et al. 1993, BARBOSA-SANTOS et al. 1997, SANTOS 1998).

## 2.5. Classificação taxonômica dos flebotomíneos

Classe Insecta

Ordem Diptera

Família Psychodidae

Subfamília Phlebotominae

Sub-Gêneros e spp de *Lutzomyia* registrados com infecção natural por Leishmanias no Brasil:

*Lutzomyia* (Nyssomyia) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912)

*Lutzomyia migonei* (França, 1920)

*Lutzomyia* (Nyssomyia) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939)

*Lutzomyia* (Pintomyia) *pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940)

*Lutzomyia* (Nyssomyia) *umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977)

*Lutzomyia* (Psychodopygus) *wellcomei* (Fraiha, Shaw & Lainson, 1971)

*Lutzomyia* (Trichophoromyia) *ubiquitalis* (Mangabeira, 1942)

*Lutzomyia* (Psychodopygus) *complexa* (Mangabeira, 1941)

*Lutzomyia* (Psychodopygus) *ayrozai* (Barretto & Coutinho, 1940)

*Lutzomyia* (Psychodopygus) *paraensis* (Costa Lima, 1941)

*Lutzomyia* (Nyssomyia) *flaviscutellata* (Mangabeira, 1942)

## 2.6. Morfologia dos protozoários

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam formas evolutivas com semelhanças morfológicas entre suas diversas espécies. As formas amastigotas são arredondadas, intracelulares, vivem e se multiplicam no interior de fagolisossomos das células do SFM dos mamíferos. Ao serem fixadas e coradas pelos métodos derivados do Romanowski (Giemsa ou Leishman) e observadas através do microscópio óptico, as amastigotas são identificadas como organismos ovais ou esféricos, com citoplasma corado em azul-claro, um único núcleo grande e arredondado que se cora em roxo através da coloração de Giemsa; vermelho-púrpura pelo Leishman. No citoplasma, além de vacúolos, encontra-se uma organela característica, o cinetoplasto em forma de bastonete, que também se cora em vermelho-púrpura situando-se próximo ao núcleo, geralmente tangente a este. Não há flagelo livre, mas apenas um rudimento que dificilmente pode ser visualizado em microscopia óptica. Os limites micrométricos dos diâmetros da forma amastigota são de aproximadamente 1,5 a 3,0 x 3,0 a 6,0  $\mu\text{m}$ , dependendo da espécie (REY, 1992; NEVES, 1998). Ao examiná-las em microscópio eletrônico, observa-se que as formas amastigotas, apresentam uma unidade de membrana plasmática trilaminar.

No hospedeiro, a membrana do parasito é responsável pela aquisição de nutrientes, secreção, excreção de metabólitos e principalmente, como proteção dos diversos mecanismos de defesa do hospedeiro (GOTTLIEB & DWYER, 1988 apud SILVA, 2003). Várias moléculas, com diversas funções, têm sido identificadas na superfície das formas amastigotas de *Leishmania*. A maioria destas moléculas está ligada à membrana via âncora de glicosil-fosfatilinositol (MOODY, 1993; McCONVILLE, 1996 apud SILVA, 2003). Sob a membrana plasmática, existe um sistema de microtúbulos (microtúbulos subpeliculares) em hélice disposto ao redor do corpo do parasito. Na parte anterior do protozoário, a membrana forma uma invaginação onde se localiza a bolsa flagelar contendo o pequeno flagelo. Nesta região, não estão presentes os microtúbulos subpeliculares e são grandes as atividades de excreção e pinocitose. São observados ainda, no citoplasma, o aparelho de Golgi, o retículo endoplasmático, além de vacúolos e inclusões (NEVES, 1998). As formas promastigotas se apresentam alongadas, extracelulares e são geralmente encontradas no inseto vetor ou em cultura axênica. As organelas e estruturas moleculares citadas anteriormente para as formas amastigotas são essencialmente as mesmas encontradas nas formas promastigotas. O tamanho das formas promastigotas pode variar, dependendo da espécie, entre 16 e 40  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,5 a 3  $\mu\text{m}$  de largura. Possuem um flagelo longo e funcional que emerge da parte anterior do corpo, proporcionando mobilidade ao

parasito, além de ajudá-lo a se fixar no epitélio digestivo do hospedeiro invertebrado (PESSOA & MARTINS, 1988). A estrutura deste flagelo é típica de um axonema eucariótico com o característico arranjo 9+2 de microtúbulos ligados à dineína. Uma estrutura peculiar, o bastão para flagelar, é encontrado ao longo do axonema do flagelo de alguns organismos, entre eles, diversas espécies da ordem Kinetoplastida (BASTIN et al.,1996). Sua função parece estar envolvida com a motilidade do parasito (SANTRICH et al., 1997). As formas promastigotas metacíclicas são consideradas como estágios infectivos e encontradas no vetor ou em culturas axênicas na fase estacionária (SACKS, 1988; ALEXANDER & RUSSEL, 1992). Segundo SACKS (1988), estes estágios só podem ser realmente identificados ao nível molecular. Formas evolutivas de *Leishmania* bastante semelhante às formas promastigotas, são encontradas aderidas, pelo flagelo, através de hemidesmossomos, ao epitélio do trato digestivo de flebotomos infectados (RANGEL et al.,1992; NEVES, 1998).

A multiplicação assexuada das leishmanias, por divisão binária e simples, é iniciada pela duplicação do cinetoplasto, onde um mantém o flagelo remanescente enquanto o outro promove a reprodução flagelar. Em seguida, o núcleo se divide e, em seqüência, o corpo do parasito se fende, no sentido ântero-posterior (NEVES, 1998). Por outro lado, existem diversas evidências de que o parasito possa sofrer alguma forma de reprodução sexuada, entre elas o encontro de híbridos na natureza (KELLY et al.,1991; KREUTZER et al., 1994).

## **2.7. Morfologia dos flebotomíneos**

Incluem-se na Família dos Dípteros Psicodídeos insetos de pequeno tamanho (0,3 a 0,5mm), entre os quais espécies sugadoras de sangue conhecidas por várias denominações populares: mosquito-palha em virtude de sua coloração amarelada geral semelhante à palha, tatuquira pelo hábito de se abrigarem em buracos de tatu, mosquito-birigui, bererê, cangalhinha, asa dura, asa branca e outros nomes menos comuns (FORATTINI, 1972). Suas asas são grandes e hialinas, densamente revestidas de cerdas longas e na posição de pouso, não se cruzam, permanecendo sempre eretas, dando ao inseto um aspecto bem característico. A cabeça é alongada, achatada dorsoventralmente e fortemente fletida para baixo, formando um ângulo reto com o eixo do corpo. As antenas são longas e constituídas por 16 segmentos. As peças bucais que em seu conjunto formam a probóscida são formadas pelo labro, ao qual se acrescenta a epifaringe; o par de maxilas com os respectivos palpos; o par de mandíbulas; a hipofaringe e o lábio. Juntando-se interiormente a estas estruturas, temos o cibário, que apresenta importância na descrição taxonômica das espécies. A maior parte da região do tórax é ocupada pelo mesotórax e, assim sendo, o panorama dorsal é constituído pelo mesonoto em cuja superfície separa-se com facilidade o pré-escudo, o escudo, o escutelo e o pós-escutelo. Em cada segmento torácico está inserido um par de patas. Estas são longas e delgadas, divididas em coxa, trocanter, fêmur, tíbia e tarsos. Às vezes apresentam nos fêmures posteriores espinhos característicos comuns em representantes do sub-gênero *Pintomyia*. As asas inseridas no mesonoto e no metanoto os balancins. As nervuras das asas apresentam importância na descrição taxonômica das espécies. O abdome é dividido em 10 segmentos, sendo os dois últimos modificados para constituir a terminália também chamada de hipopígio ou genitália.

Aspecto geral da modificação dos últimos segmentos abdominais – formação das terminálias masculina e feminina. No macho a genitália compõe-se de três pares de apêndices: os do par superior, gonapófises superiores (gonóstilos), com dois segmentos, um proximal, o basistilo e outro distal, o dististilo. O par médio, gonapófises média ou parâmeros; e finalmente os apêndices do par inferior, gonapófises inferiores ou lobos laterais. Com o órgão genital

masculino verifica-se que os canais deferentes vindo dos testículos terminam na bomba genital, situada na base dos espículos ou filamentos genitais que em número de dois atravessam duas linguetas esclerotinizadas, o gubernáculo ou pênis, que é o órgão intromissor.

Os órgãos essenciais do aparelho genital feminino são representados pelo par de ovários, como ocorre com os outros dípteros são formados por diversos ovariolos, que estão envoltos em fina bainha que é a membrana ovariolar. Nos folículos vamos encontrar os trofócitos e oócitos. Ao primeiro folículo segue-se um pedículo estreito, que vai terminar ao oviduto lateral. Os dois dutos do ovário vão se abrir na câmara genital ou vagina, onde se encontram os orifícios das espermatecas e das glândulas acessórias, também chamadas de muco. Ainda com relação à morfologia interna, consideraremos apenas os órgãos que apresentam unidade de estudo de infecções naturais dos flebotomos, em particular o aparelho digestivo. À faringe segue-se o esôfago, o qual se encontra situado o tórax. É um tubo curto, no qual se abrem os dutos de algumas glândulas esofagianas e do divertículo esofagiano. Em seguida ao esôfago encontra-se o intestino médio e o estômago, onde se costuma distinguir duas regiões, a anterior e a posterior. O estômago anterior tem recebido a denominação de cárdia, no entanto, este termo deve ser aplicado somente à ligeira dilatação com a união do esôfago. Ali se encontra a válvula esofagiana. Assim essa porção recebe o nome de próventrículo na extremidade distal observa-se a existência de constrição à qual se seguem quatro tubos de Malpighi, o íleo e o reto, que termina no ânus (YOUNG & DUNCAN, 1994 apud SOUZA, 2003).

## **2.8. Ciclo evolutivo da LTA**

Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas infectantes (metacíclicas) são inoculadas, pelas fêmeas dos insetos vetores, durante o repasto sanguíneo. Ao ser inoculado no vertebrado, o parasito necessita superar as defesas orgânicas do hospedeiro.

As formas promastigotas, ao entrarem no macrófago através de um vacúolo endossômo, gradativamente se transformam em amastigotas praticamente imóveis e arredondadas. Dentro do vacúolo fagocitário, as amastigotas multiplicam-se por divisão binária até ocupar todo o citoplasma do macrófago. A membrana do macrófago se rompe mecanicamente liberando as amastigotas no tecido onde novamente são fagocitadas. No entanto, é possível que moléculas produzidas pelo parasito, como a leishporina, promovam a ruptura da membrana do macrófago (HORTA, 1997).

## **2.9. Diagnóstico laboratorial da LTA**

As técnicas utilizadas para o diagnóstico da doença canina são semelhantes àquelas empregadas na doença humana. Entretanto, destaca-se que, no teste cutâneo, quando o antígeno de Montenegro foi aplicado, em cães, mostrou-se pouco eficaz (PIRMEZ et al. 1988). Atualmente, existem antígenos mais específicos, como o Imunoleish® (MARZOCHI & BARBOSA-SANTOS 1988) e o Leishvacin® da BioBRAS, Brazil (GENARO et al. 1993, HERMETO et al., 1993; TAFURI et al., 1993) ou elaborado por um “pool” de *Leishmania* de diferentes espécies (PARANHOS-SILVA et al., 2001).

O diagnóstico da LTA baseia-se no aspecto clínico das lesões cutâneas e mucosas, evidências epidemiológicas, intradermorreação de Montenegro (IDRM) e sorologias positivas; e na demonstração do parasito nas lesões.

A sorologia, através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunoenzimática (ELISA), podem auxiliar no diagnóstico e costumam ser utilizadas em inquéritos epidemiológicos concomitantemente.

Nas leishmanioses, os testes sorológicos em sua maioria destinam-se à investigação de anticorpos (imunoglobulinas) específicos, anti-Leishmania, em amostras de soro e plasma.

A importância diagnóstica destes testes varia em função dos parasitos infectantes e das formas clínicas, uma vez que níveis séricos de imunoglobulinas são elevados nos casos de Leishmaniose Visceral (LV) enquanto que nas formas tegumentares da doença podem ser significativamente baixos, como em alguns casos das formas cutâneas, não sendo detectáveis pelos métodos sorológicos usuais, gerando resultado falso negativo; e baixos ou moderado nas formas mucosas e mucocutâneas.

Diversos testes sorológicos descritos na literatura foram empregados no diagnóstico das leishmanioses: reação de fixação de complemento (RFC), contra-immunoeletroforese (CIEF), reação de hemaglutinação indireta (HAI), reação de aglutinação direta (DAT), ensaios enzimáticos (ELISA, dot-ELISA e Imunoblotting) e imunofluorescência indireta (RIFI).

Estes últimos (RIFI e ELISA) são atualmente os mais utilizados e seu emprego recomendado pelo Ministério da Saúde. Os antígenos utilizados nos testes são em sua maioria extratos parasitários ou parasitas íntegros podendo haver reatividade cruzada com outras infecções por tripanosomatídeos e outros microorganismos gerando resultados falsos positivos. Antígenos purificados ou recombinantes poderiam elevar a sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos, entretanto, estes são ainda pouco empregados na rotina diagnóstica. Reação com especificidade elevada é descrita para o antígeno recombinante k-39 usado no diagnóstico da LV, mas que tem como desvantagem, baixa sensibilidade nos casos de LV assintomática.

A RIFI apresenta baixa especificidade, exige na sua execução pessoal treinado, é uma reação dispendiosa e não está adaptada para estudos epidemiológicos em larga escala. Uma das principais limitações da técnica é a ocorrência de reações cruzadas com LTA, LV, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar. Isto dificulta a interpretação dos dados epidemiológicos, pois no Brasil ocorre superposição da LV, sobretudo com leishmaniose tegumentar e doença de Chagas.

O teste de ELISA é o mais utilizado para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral. É um teste rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI. O teste é sensível, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos. Funciona igualmente bem para o diagnóstico da LV canina (MARZOCHI et al, 1999).

Os antígenos utilizados nos testes diagnósticos são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitos intactos ou moléculas solúveis. Estes antígenos apresentam reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae, e mesmo com microrganismos filogeneticamente distantes. Portanto, no diagnóstico sorológico da LV é necessário considerar o diagnóstico diferencial com outras doenças (GONTIJO et al, 2004). Para realização dos inquéritos caninos pode-se utilizar para coleta de material o soro, plasma ou pelo eluato (sempre coletado em papéis de filtro).

A demonstração do parasito na lesão, ainda, é o mais clássico e desejável método entre as técnicas utilizadas: esfregaço ou aposição de tecido em lâmina, corado pelo Giemsa; isolamento de formas promastigotas em meio Mc Neal, Novy & Nicolle (NNN) enriquecido; inoculação em animais de laboratório (PESSÔA & BARRETTO, 1948; WEIGLE et al., 1987; SCHUBACH et al., 1998b; SCHUBACH et al., 2001); histopatologia convencional corada pela hematoxilina-eosina ou Giemsa (LUNA,1968); imunohistoquímica por imunofluorescência direta e

imunoperoxidase (SELLS & BURTON 1981, SALINAS et al. 1990, SCHUBACH et al. 2001), e reação em cadeia da polimerase (PCR), através da detecção do DNA de *Leishmania* (GUEVARA et al. 1993, HADDAD et al. 1996, SCHUBACH et al. 1998a).

## 2.10. Transmissão da LTA

A LTA é transmitida de hospedeiros reservatórios silvestres, sinantrópicos ou domésticos ao homem pela picada dos inseto do gênero *Lutzomyia*. Nas regiões sul e sudeste, as principais espécies suspeitas são *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia whitmani* (ARAGÃO 1922; FORATTINI et al., 1972; RANGEL et al., 1984; BARRETTO et al., 1986; RANGEL et al., 1986; AGUIAR et al., 1993; SOUZA et al., 2000). Outros flebotomíneos são apontados também como possíveis vetores de LTA nas regiões de Mata Atlântica remanescente, como *Lutzomyia pessoai*, *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia fischeri* (PESSÔA & PESTANA, 1940; PESSÔA & COUTINHO, 1949; FORATTINI, 1960; RANGEL et al., 1984; RANGEL et al., 1986; AGUIAR et al., 1987; AGUIAR et al., 1993; SOUZA et al., 2000). Outra espécie, *Lutzomyia hirsuta*, de hábito silvestre, foi encontrada com infecção natural de *L. (V.) braziliensis*, no Estado de Minas Gerais (RANGEL et al., 1985). Além da *Lutzomyia intermedia*, as espécies *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia fischeri* são comuns nas respectivas regiões, onde cães e equinos têm sido encontrados naturalmente infectados e, ainda, *Lutzomyia migonei* é a espécie que tem demonstrado maior cinofilia, segundo estudos de AGUIAR et al. (1993), no Estado do Rio de Janeiro e, FALQUETO et al. (1986), no Estado do Espírito Santo. A espécie *L. migonei* foi pela primeira vez notificada com infecção natural no Rio de Janeiro através de PCR por PITTA-PEREIRA et al. (2005); portanto, ela atua como vetor secundário no Município do Rio de Janeiro, pois é a segunda espécie com maior prevalência.

No que pese a indefinição sobre a fonte de infecção para os flebotomíneos, a possibilidade do homem e do cão participarem no ciclo de transmissão tem sido levantada (FALQUETO et al., 1986; PACHECO et al., 1986; GRIMALDI et al., 1987; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; SCHUBACH et al., 2001). Tal idéia é suportada pelo fato de que as cepas da espécie *L. (V.) braziliensis*, isoladas em cães e equídeos do Rio de Janeiro (GRIMALDI et al. 1987, GRIMALDI et al. 1989), apresentam mesmos esquizodemas intraespecíficos que circulam nas populações humanas em área endêmicas.

## 2.11. Perfil epidemiológico da LTA no Brasil

A) Surtos epidêmicos associados à derrubada das matas para construção de estradas e instalação de povoados em regiões pioneiras, e a exploração desordenada da floresta (derrubada de matas para extração de madeira, agricultura, pecuária, entre outras). Neste caso a LTA é fundamentalmente, uma zoonose de animais silvestres, que pode atingir o homem quando entra em contato com os focos zoonóticos.

B) Leishmanioses em regiões de colonização antiga, relacionada ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados semiurbanizados na periferia de centros urbanos, não associada à derrubada das matas. Neste padrão, cães, equinos e roedores, parecem ter papel importante como amplificadores do parasito e tem-se discutido a possível adaptação de vetores e parasitas a ambientes modificados e a reservatórios (FUNASA, 2000).

Alterações do meio ambiente em várias regiões do Brasil vêm modificando o perfil epidemiológico das leishmanioses, permitindo a invasão de áreas peridomiciliares por mamíferos silvestres reservatórios de *Leishmania*, onde podem ocorrer espécies de flebotomíneos adaptadas

ao ambiente modificado pelo homem. A manutenção da LTA nessas áreas ecologicamente alteradas, na sua maioria áreas rurais na periferia de grandes cidades, indicam claramente a evolução de um ciclo de transmissão secundário ocorrendo no ambiente peridoméstico (LAINSON & SHAW, 1998). Nesse modelo encontra-se *L. intermedia* como transmissora de *L. (V.) braziliensis* no Sudeste do Brasil, em especial no Rio de Janeiro (LAINSON et al., 1989; RANGEL, 1995).

Durante os anos 80 do século XX, com o surgimento de um foco de LTA no município de Mesquita, periferia da cidade do Rio de Janeiro, estudos realizados revelaram que a doença ocorria, na maioria dos casos, sob a forma de lesão ulcerada única, determinada por *L. (V.) braziliensis*, no qual *L. intermedia* foi sugerido como transmissor e os cães e eqüinos estariam, possivelmente, participando como reservatórios domésticos de um ciclo de transmissão domiciliar e/ou peridomiciliar (RANGEL et al., 1990).

Nessa mesma localidade, recentemente, nas casas construídas numa faixa intermediária entre a comunidade e o resíduo de Mata Atlântica, tem-se observado a freqüente visita de preguiças (*Bradypus variegatus*) que foram sugeridas como reservatório primário da *L. (V.) braziliensis* (PIRMEZ et al., 1998).

A manutenção da LTA nessas áreas ecologicamente alteradas, na sua maioria áreas rurais na periferia de grandes cidades, indicam claramente a evolução de um ciclo de transmissão secundário ocorrendo no ambiente peridoméstico (LAINSON & SHAW, 1998).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Localização

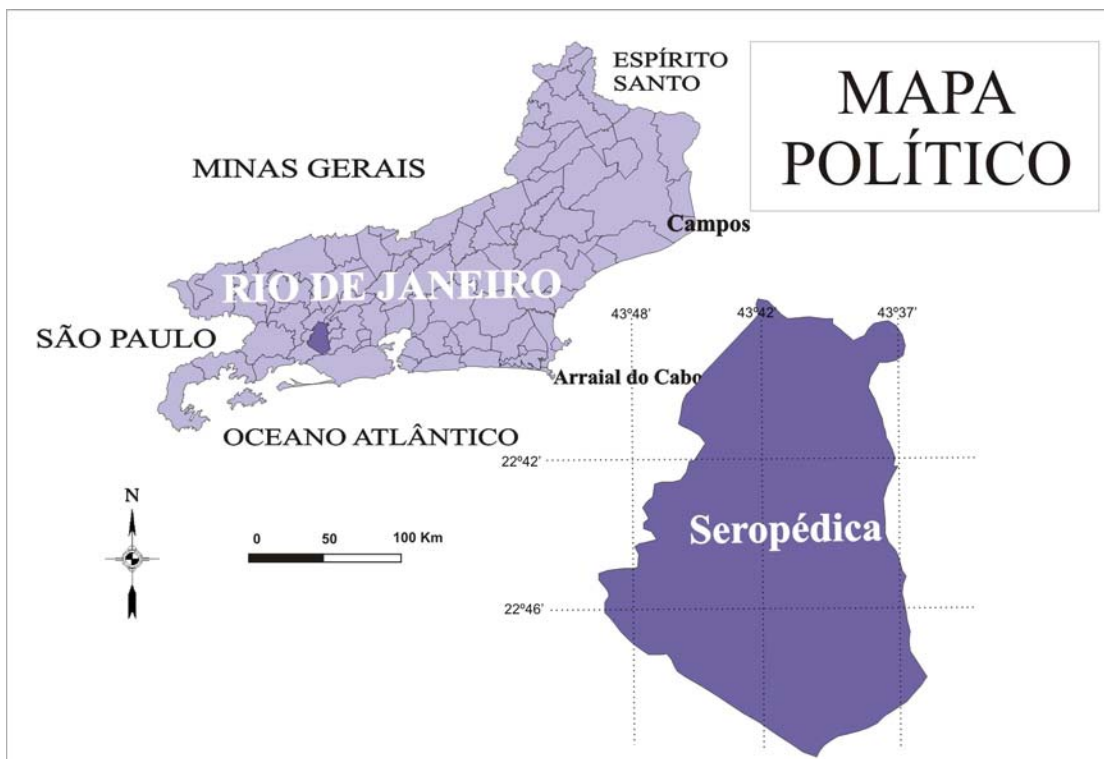


Figura 1. Mapa da localização de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Fonte IBGE.

O inquérito sorológico canino e levantamento da fauna flebotomínica foram realizados no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, em áreas com ocorrência de casos humanos de LTA. Os Municípios limítrofes são Paracambi, Japeri, Queimados, Nova Iguaçu (Ver anexo).

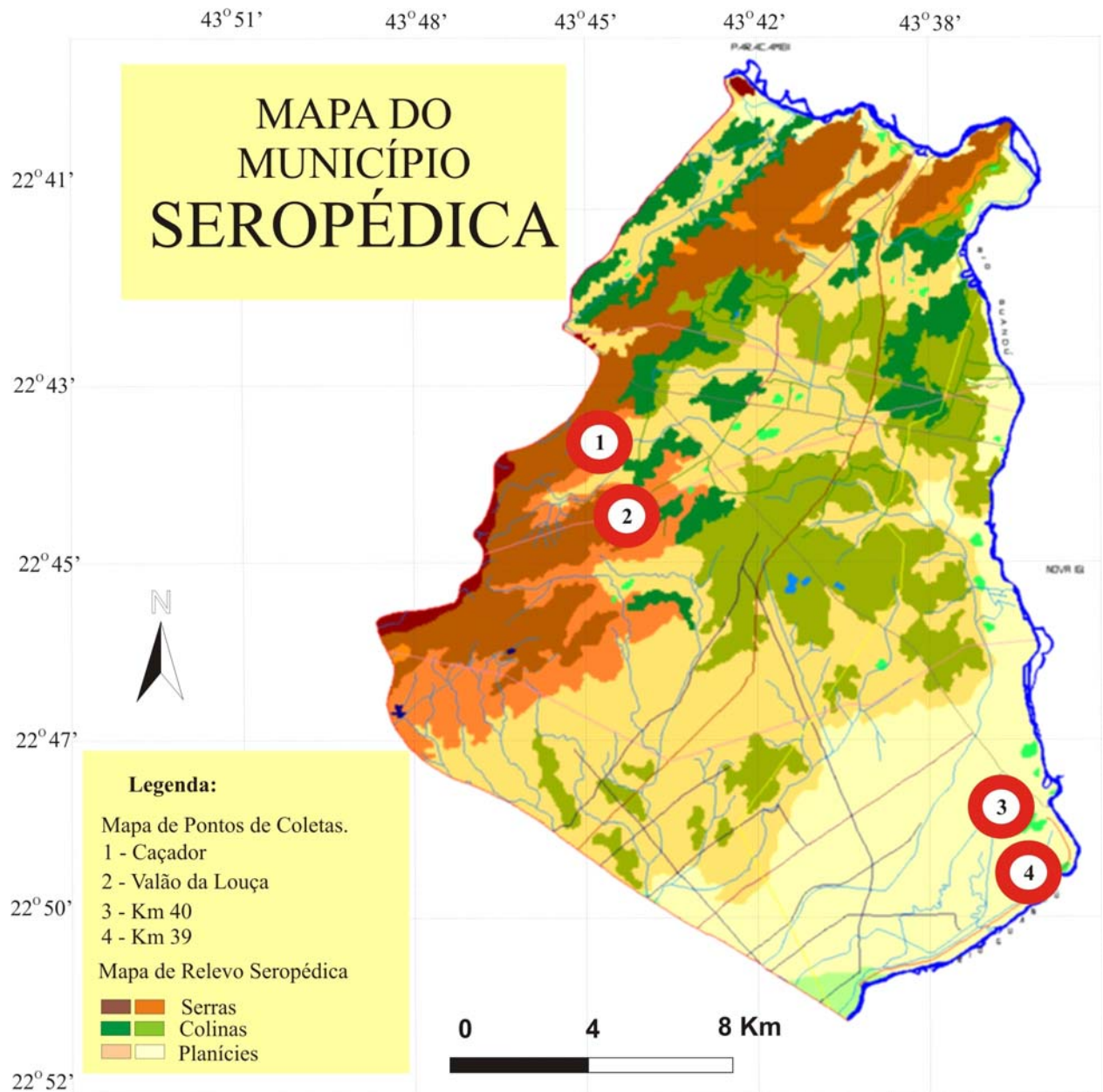


Figura 2. Mapa do relevo do Município de Seropédica-RJ com as quatro áreas de estudo. Fonte: MOREIRA, 2002; modificado por NUNES JR.

No mapa acima referente ao relevo do Município de Seropédica onde as áreas do Valão da Louça e Caçador se encontram em região de encosta, com presença de vegetação e cultivo de bananais; e o Km 39 e 40 em região de baixada com vegetação praticamente extinta, com grande degradação ambiental e próximos a areais. Nas quatro áreas estudadas o padrão das habitações era de alvenaria, e nos quintais havia presença de criação de galinhas.

### **3.2 Inquérito canino da protozoose**

Foi solicitado aos proprietários desses cães fornecerem informações sobre cada animal residente no domicílio (Ver modelo da ficha em Anexo). O total de cães encontrados nas residências estudadas foram 35. Após a entrevista e permissão do proprietário, o animal foi contido e submetido à coleta de sangue.

No inquérito realizado em uma das residências localizada no Km 40 (de um paciente que contraíu a LTA) utilizada no presente estudo não havia cães, só equinos, por isso entraram no estudo epidemiológico.

#### **3.2.1. Coleta de sangue periférico e técnicas sorológicas**

Uma amostra de 5 ml de sangue periférico foi coletada da veia braquicefálica. Posteriormente, no laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto de Veterinária da UFRRJ, o sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos para obtenção dos soros totais; e encaminhados ao Laboratório de Imunodiagnóstico do DCB / ENSP / FIOCRUZ e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem submetidos às técnicas de RIFI e ELISA, como se segue:

#### **3.2.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)**

##### **1 - Princípio e campo de aplicação**

Este método se baseia na capacidade dos anticorpos de se ligarem aos corantes sem, entretanto, perderem a capacidade de reconhecimento do seu antígeno específico. Imunoglobulinas anti-*Leishmania* em amostras de soros, plasma ou eluatos reagem com os parasitos na superfície de lâminas de microscopia. Anti-imunoglobulina humana ou canina conjugada ao isotiocianato de fluorocromo é adicionada à reação e se ligará a imunoglobulina para qual tem especificidade. A visualização da reação se dará por observação da reação em microscópio com iluminação adaptada com luz ultravioleta.

Utilizou-se para diagnóstico da leishmaniose canina o conjugado anti-imunoglobulina (anti-imunoglobulina de cão) produzidos no Laboratório de Imunodiagnóstico do DCB / ENSP / FIOCRUZ. Os testes foram realizados segundo descritos resumidamente a seguir.

2 - Amostra: Soros caninos recém coletados foram mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. Ver material necessário, soluções e reagentes em anexo.

#### **3.2.3. Enzyme -linked immunosorbent assay (ELISA)**

##### **1 - Objetivo, aplicação e princípio da técnica.**

A técnica de ELISA é realizada em soro ou plasma segundo metodologia de Voller (1976), modificada, e tem por objetivo detectar anticorpos específicos anti-*Leishmania*, em amostras de soro ou plasma para diagnóstico de leishmaniose humana ou canina. Imunoglobulinas anti-*Leishmania*, se presentes na amostra analisada, se ligarão ao antígeno adsorvido em superfície sólida, poços de placas de poliestireno. Anti-imunoglobulina canina conjugada a peroxidase adicionada aos poços se ligará ao complexo antígeno-anticorpo anteriormente formado. A reação é revelada pela adição do substrato da enzima, peróxido de hidrogênio e um cromógeno receptor de elétrons da reação. A intensidade de cor da reação é

proporcional à quantidade de imunoglobulina anti-*Leishmania* da amostra. A reação é lida em espectrofotômetro para leitura de placas empregando-se filtro de 492 nm.

2 - Amostra: Soros caninos recém coletados foram mantidos a -20 °C até o momento do uso. Ver material necessário, soluções e reagentes em anexo.

### **3.3 Estudo da fauna flebotomínica**

#### **3.3.1 Captura**

Para avaliar a presença de flebotomíneos e a possível transmissão domiciliar da LTA foram realizadas coletas sistemáticas deste díptero, com o intuito de avaliar a frequência sazonal dos vetores, e possíveis infecções naturais por *Leishmania* sp.

Foram realizadas coletas sistemáticas mensais nos ambientes peridomiciliares (paredes externas). As coletas manuais foram efetuadas no horário das 18h às 22h (4h – captura/área). Foi utilizada uma metodologia para a captura dos flebotomíneos: manual – através de um tubo de sucção, conhecido como Capturador de Castro (CASTRO, 1937).

#### **3.3.2 Identificação Taxonômica**

Os flebótomos coletados em capturas manuais foram introduzidos em frascos contendo álcool 70% devidamente rotulados e transportados para o laboratório.

Diversos métodos de montagens de flebótomos estão disponíveis em diversas referências relacionadas ao assunto (FORATTINI, 1974; RYAN et al., 1986; YOUNG & DUNCAN, 1994). O método de montagem utilizado foi em Berlese (Ver anexo).

#### **3.3.3 Metodologia de Dissecção:**

No laboratório as fêmeas foram dissecadas sobre uma gota de solução de EDTA em uma lâmina de microscopia. Com o auxílio de agulhas descartáveis, foi cortado o penúltimo segmento abdominal, este conjunto foi examinado, para identificação taxonômica no nível de espécie de acordo com YOUNG & DUNCAN (1994). O restante do corpo do inseto foi introduzido em tubo de Eppendorf e rotulados de acordo com cada lâmina onde foram montadas as respectivas cabeças e espermatecas de cada exemplar.

#### **3.3.4 Detecção de infecção natural por *Leishmania* sp.**

Os tubos contendo o corpo dos flebótomos foram mantidos em nitrogênio líquido. No Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, IOC, FIOCRUZ foram realizados os procedimentos das provas de PCR dos exemplares.

Deve-se ressaltar que para cada fêmea dissecada foram utilizadas apenas duas agulhas descartáveis, evitando assim a contaminação do material a ser utilizado nas provas de PCR.

#### **3.3.5 Polymerase Chain Reaction (PCR) dos flebotomíneos**

O DNA total usado na PCR é obtido do pool de amostras contendo 10 abdomens de flebótomos em tampão de lise (pH 8,0) contendo 100 µg/ml de proteinase K (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As preparações foram mantidas em tubos eppendorf e incubadas (2 horas, 56°C) com agitações periódicas. Ao final da incubação o material foi centrifugado (13 000 rpm; 4°C; 15 minutos) e o sobrenadante coletado e aquecido (95°C, 15 minutos) para inativar a proteinase K. O material resultante da precipitação foi submetido ao

fenol clorofórmio. Posteriormente, as amostras foram mais uma vez centrifugadas para resuspender o DNA em 50 µg/ml de tampão lise (pH 8,0). Uma porção de 10 microlitros do DNA extraído foi usado para amplificação. Procedimentos rigorosos foram adotados para reduzir a possibilidade de contaminação, por exemplo, a inclusão de grupos de machos de flebotomíneos como controle negativo, na extração do DNA e a descontaminação dos instrumentos e trabalhar em áreas descontaminadas com solução de cloreto e raios UV. O DNA total foi obtido de culturas de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* usado como controle positivo. Parasitos foram colhidos em fase logarítmica e lavados em PBS antes do isolamento do DNA. Depois solução tampão de lise contendo fenol clorofórmio e precipitação do etanol, como descritas acima para amostras dos insetos de acordo com PITA-PEREIRA et al., 2005.

## 4 RESULTADOS

**4.1** Na sorologia dos cães os considerados positivos foram que tiveram resultados concordantes no RIFI e ELISA + 14,2% (5), os demais obtiveram 2,9% RIFI +/ELISA- (1), 22,9 % RIFI-/ELISA+ (8) e 60% (21) não reativos (Tabela 9).

Tabela 1: Resultado da sorologia dos cães de pacientes e vizinho (residência controle), realizadas no Município de Seropédica-RJ.

	RIFI+ ELISA+	RIFI+ ELISA-	RIFI- ELISA+	RIFI- ELISA-	Total
Paciente	4	0	2	8	14
Vizinho	1	1	6	9	17
Controle				4	4
Total	5	1	8	21	35

**4.2** Segundo Teste exato de Fisher  $p=0,1484$  não houve evidências de associação significativa entre a sorologia (RIFI+/ELISA+ e outros resultados) com a propriedade do animal (Tabela 10).

Tabela 2: Teste exato de Fisher  $p=0,1484$ .

	RIFI+ ELISA+	Outros resultados	Total	% de positivos
Paciente	4	10	14	29%
Vizinho	1	16	17	6%
Total	5	26	31	

**4.3** No resultado da sorologia dos cães 14,2% foram reativos para RIFI e ELISA. Dentre os reativos para RIFI obtiveram as seguintes titulações: 1 cão (1:40), 3 (1:80) e 1 (1:160) (Gráfico 1).

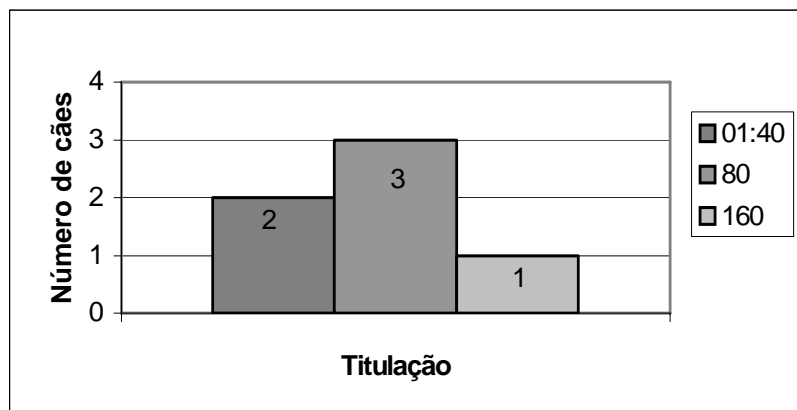


Gráfico 1: Sorologia dos cães provenientes de áreas com ocorrência de LTA em humanos no Município de Seropédica-RJ.

**4.4** Segundo o resultado dos testes sorológicos não houve evidências de associação significativa ( $P>0,05$ ) entre a sorologia (RIFI+/ELISA+ e não reativa) com as duas espécies animais: do total de 35 cães, 5 considerados positivos com resultados concordantes de RIFI+ e ELISA+ e 5 eqüinos não reativos (Tabela 3).

Tabela 3: Resultado da sorologia de animais provenientes de áreas com ocorrência de casos humanos de LTA no Município de Seropédica-RJ.

	RIFI+/ELISA+	Não Reativos	Total
N. cães	5	30	35
N. equinos	0	5	5
Total	5	35	40

**4.5** A menor faixa etária masculina e feminina que adquiriu LTA no Município de Seropédica foi de 6-10 anos (11,7%) Dentre o sexo masculino houve maior número de casos entre 31 a 50 anos; e o feminino 21-30 anos (49,9%) (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição segundo sexo e grupos etários dos casos de LTA em habitantes do Município de Seropédica-RJ de 2002 a 2004.

	Masculino	Feminino	TOTAL (%)
< 2 anos	0	0	0
2 – 5	0	0	0
6 – 10	1 (9,1%)	1 (16,7%)	2 (11,7%)
11 – 15	1 (9,1%)	1 (16,7%)	2 (11,7%)
16 – 20	0	0	0
21 – 30	1 (9,1%)	3 (49,9%)	4 (23,5%)
31 – 40	3 (27,3%)	0	3 (17,7%)
41 – 50	3 (27,3%)	0	3 (17,7%)
> 50	2 (18,1%)	1 (16,7%)	3 (17,7%)
TOTAL	11 (100%)	6 (100%)	17 (100%)

Fonte: FUNASA, Seropédica.

**4.6** Na localidade do Valão da Louça ocorreram 7 casos humanos de 2002 a 2004, sendo 1 caso em (2002), 5 (2003) e 1 (2004). Já no Km 39 (1 caso) e Km 40 ocorreram 7 casos só em 2003, no Caçador 1 caso (em 2002 e 2004) (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição segundo área e anos de ocorrência dos casos humanos de LTA em habitantes do Município de Seropédica-RJ de 2002 a 2004.

ÁREA	2002	2003	2004	TOTAL
Km 39	0	1	0	1
Km 40	0	7	0	7
Valão da Louça	1	5	1	7
Caçador	1	0	1	2
TOTAL	2	13	2	17

Fonte: FUNASA, Seropédica.

Durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005 foram coletados 2390 flebotomos pertencentes a quatro espécies listadas abaixo:

*Lutzomyia* (Nyssomyia) *intermedia* (Lutz & Neiva 1912).

*Lutzomyia migonei* (França, 1920).

*Lutzomyia* (Nyssomyia) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939).

*Lutzomyia oswaldoi* (Mangabeira, 1940).

**4.7** O número de machos de *L. intermedia* capturados nas quatro áreas estudadas foi de 2120 (91,3%) e 202 (8,7%) fêmeas, a espécie predominante. A segunda foi *L. whitmani* com 35 (94,5%) machos e 2 (5,5%) fêmeas. A terceira *L. migonei* com 20 (68,9%) machos e 9 (31,1%) fêmeas. A quarta *L. oswaldoi* apenas 2 (100%) fêmeas (Tabela 6).

Tabela 6: Números e percentuais de espécies de flebotomíneos coletados em quatro áreas do Município de Seropédica-RJ no período de outubro 2004 a setembro 2005.

Espécies	Machos		Fêmeas		Total
	N.	%	N.	%	N.
<i>L. intermedia</i>	2120	91,3	202	8,7	2322
<i>L. whitmani</i>	35	94,5	2	5,5	37
<i>L. migonei</i>	20	68,9	9	31,1	29
<i>L. oswaldoi</i>	0	0	2	100	2

**4.8** O total de 2390 flebotomíneos coletados nas quatro áreas estudadas foi de: 873 (37,5%) no Valão da Louça, 713 (29,8%) no Km 39, 527 (22,1%) no Km 40 e 277 (11,5%) no Caçador (Gráfico 2).



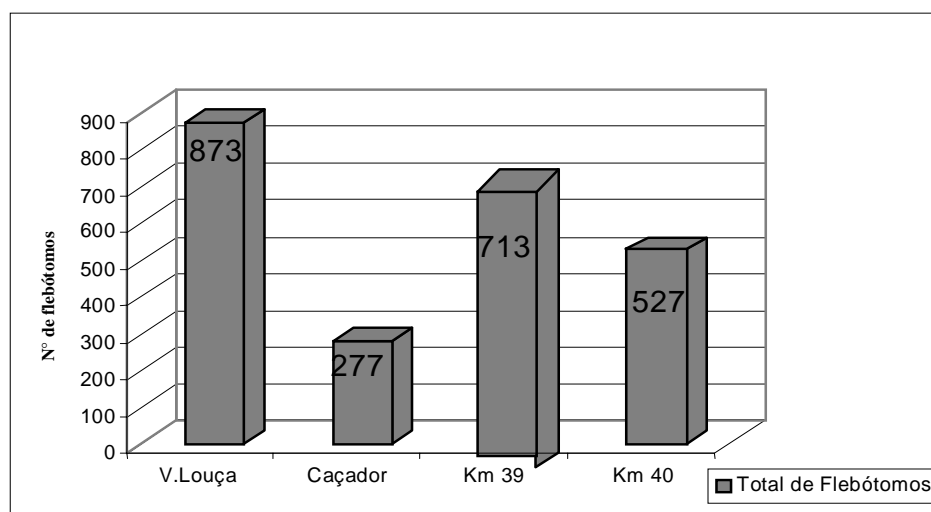


Gráfico 2: Total de flebotomíneos coletados nas quatro áreas com ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Seropédica, no período de outubro de 2004 à setembro de 2005.

**4.9** A média de flebotomíneos coletados por hora de trabalho foi de 44,16 machos e 4,2 fêmeas de *L. intermedia*, respectivamente 0,42 e 0,19 de *L. migonei*; 0,73 e 0,04 de *L. whitmani* e 0 e 0,04 de *L. oswaldoi* (Tabela 7).

Tabela 7: Número de machos e fêmeas coletados e sua média por hora, em cada espécie de flebotomíneos coletados no período de outubro de 2004 à setembro de 2005.

Espécies	Machos		Fêmeas		Total Nº
	Nº	M/h	Nº	M/h	
<i>L.intermedia</i>	2120	44,16	202	4,2	2322
<i>L.migonei</i>	20	0,42	9	0,19	29
<i>L.whitmani</i>	35	0,73	2	0,04	37
<i>L.oswaldoi</i>	0	0	2	0,04	2
Total	2175	45,31	215	4,47	2390

M/h= Média por hora

**4.10** Nas capturas realizadas no Valão da Louça obteve-se as seguintes espécies: *Lutzomyia intermedia* (770 machos / 56 fêmeas), *L. whitmani* (18 / 2), *L. migonei* (18/7), *L. oswaldoi* (0/2). No Caçador: *L. intermedia* (241/16), *L. whitmani* (17/0), *L. migonei* (2/1). No Km 39: *L. intermedia* (636/76) e *L. migonei* (0/1). No Km 40 somente uma espécie foi encontrada, a *L. intermedia* (473/54) (Tabela 8).

Tabela 8: O número e espécies de flebotômíneos coletados por área no Município de Seropédica-RJ no período de out 2004 a set 2005.

Espécies	Valão da Louça		Caçador		Km 39		Km 40	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<i>L. intermedia</i>	770	56	241	16	636	76	473	54
<i>L. whitmani</i>	18	2	17	0	0	0	0	0
<i>L. migonei</i>	18	7	2	1	0	1	0	0
<i>L. oswaldoi</i>	0	2	0	0	0	0	0	0

**4.11** Os percentuais de flebotômíneos da espécie *L. intermedia* capturados nas quatro áreas foi de: 35,57% no Valão da Louça; 30,67% no Km 39; 22,69% no Km 40 e 11,07% no Caçador. A outra espécie que prevaleceu foi a *L. whitmani* com 54,05 no Valão da Louça e 45,95 no Caçador (Tabela 9).

Tabela 9: Percentuais de flebotômíneos coletados nas quatro áreas trabalhadas no Município de Seropédica-RJ no período de outubro 2004 a setembro de 2005.

Espécies	Valão da Louça		Caçador		Km 39		Km 40	
	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%
<i>L. intermedia</i>	826	35,57	257	11,07	712	30,67	527	22,69
<i>L. whitmani</i>	20	54,05	17	45,95	0		0	

**4.12** Com relação à espécie e sexo dos flebotômíneos: foram coletados 2120 machos e 202 fêmeas de *L. intermedia*; respectivamente 35 e 2 de *L. whitmani*; 20 e 9 *L. migonei*; 0 e 2 de *L. oswaldoi* (Gráfico 3).

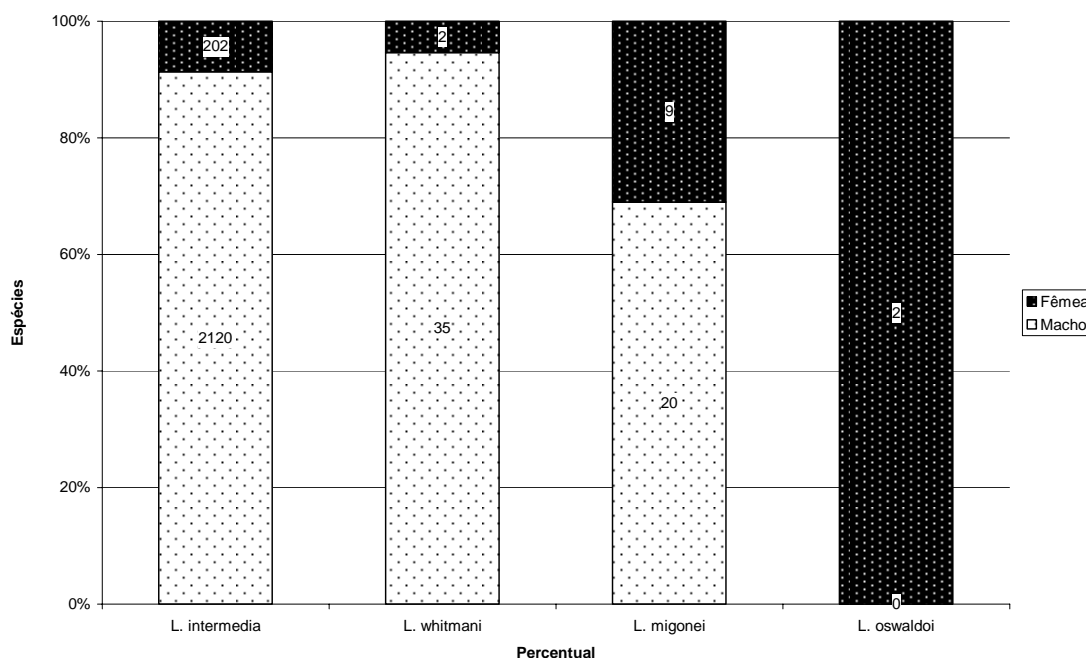


Gráfico 3: Número e espécie de flebotomíneos coletados em quatro áreas com ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana do Município de Seropédica – RJ, no período de outubro de 2004 à setembro de 2005.

**4.13** As espécies capturadas na localidade do Valão da Louça foram: 826 *L. intermedia*; 25 *L. migonei*; 20 *L. whitmani* e 2 *L. oswaldoi* (Tabela 10).

Tabela 10: Número das espécies e sexo dos flebotomíneos capturados no Valão da Louça, Município de Seropédica, no período de outubro de 2004 à setembro de 2005.

Espécies	Valão da Louça		Total
	Macho	Fêmea	
<i>L. intermedia</i>	770	56	826
<i>L. migonei</i>	18	7	25
<i>L. whitmani</i>	18	2	20
<i>L. oswaldoi</i>	0	2	2

**4.14** As espécies capturadas na localidade do Caçador foram: 257 *L. intermedia*, 17 *L. whitmani* e 3 *L. migonei* (Tabela 11).

Tabela 11: Número das espécies e sexo dos flebotomíneos capturados no Caçador, Município de Seropédica, no período de outubro de 2004 à setembro de 2005.

Espécies	Caçador		Total
	Macho	Fêmea	
<i>L. intermedia</i>	241	16	257
<i>L. whitmani</i>	17	0	17
<i>L. migonei</i>	2	1	3

**4.15** As espécies capturadas na localidade do Km 39 foram: 712 *L. intermedia*, e 1 *L. migonei* (Tabela 12).

Tabela 12: Número das espécies e sexo dos flebotomíneos capturados no Km 39, Município de Seropédica, no período de outubro de 2004 à setembro de 2005.

Espécies	Km 39		Total
	Macho	Fêmea	
<i>L. intermedia</i>	636	76	712
<i>L. migonei</i>	0	1	1

**4.16** A única espécie capturada na localidade do Km 40 foi: 527 *L. intermedia* (Tabela 13).

Tabela 13: Espécie e sexo dos flebotômíneos capturados no Km 40, Município de Seropédica, no período de outubro de 2004 à setembro de 2005.

Espécies	Km 40		Total
	Macho	Fêmea	
<i>L. intermedia</i>	473	54	527

**4.17** O mês em que se capturou mais flebotômíneos no Valão da Louça foi outubro de 2004 (256), seguido do mês de julho de 2005 (247). Nos meses de janeiro e maio de 2005, não foram realizadas capturas devido às más condições do tempo; no mês agosto só nas localidades do Valão da Louça e Caçador não se efetuou a coleta pelo mesmo motivo anteriormente citado (Gráfico 4).

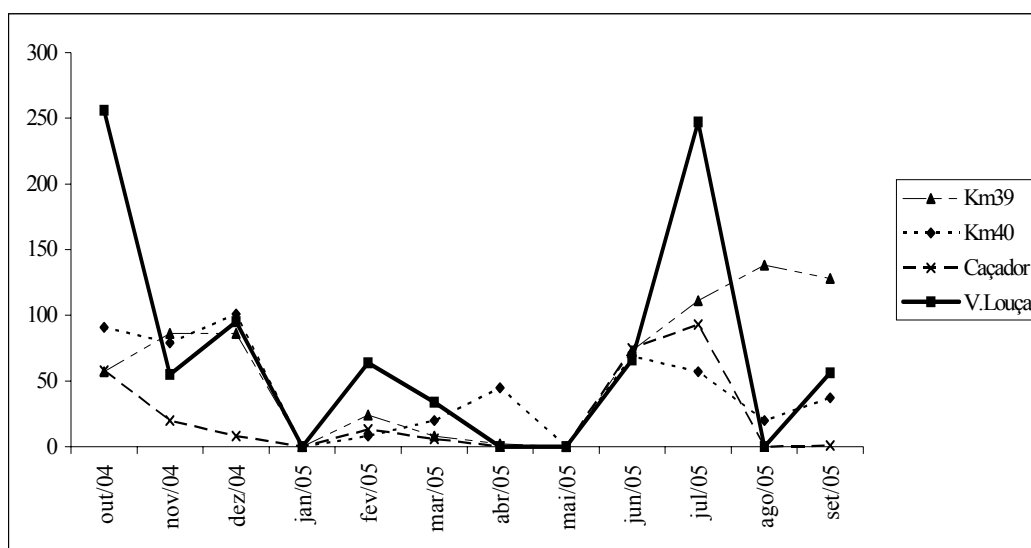


Gráfico 4: Frequência mensal das capturas realizadas por áreas com ocorrência de LTA no Município de Seropédica -RJ.

**4.18** O total de flebotômíneos coletados foram: no mês de outubro de 2004 foi de 463, novembro (240), dezembro (291), janeiro de 2005 (0), fevereiro (109), março (52), abril (50), maio (0), junho (297), julho (508), agosto (158) só no Km 39 e 40 e setembro (222) (Gráfico 5).

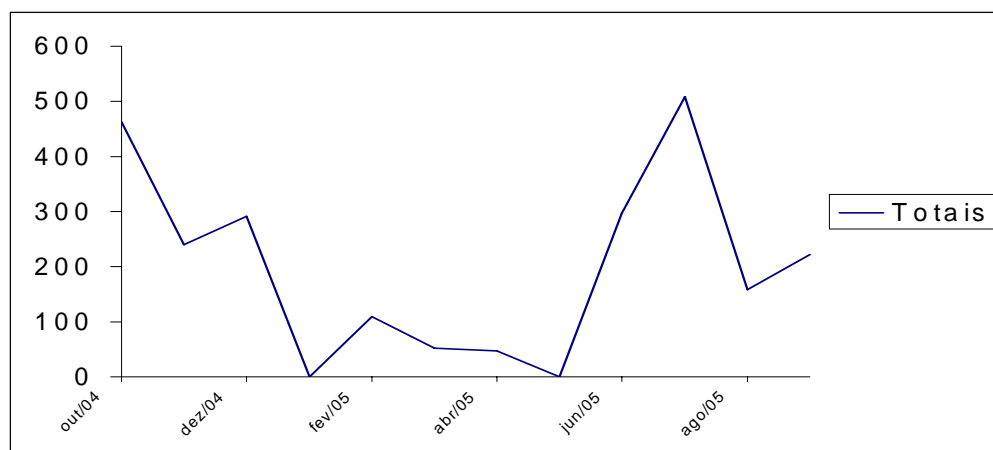


Gráfico 5: Frequência mensal das coletas de flebotomíneos realizadas no Município de Seropédica-RJ

**4.19.** O resultado do PCR foi negativo. No gel 'A' com 15 poços: o primeiro poço da esquerda para direita é o controle negativo da reação, o segundo é o controle negativo da capela e do terceiro ao décimo quinto, um pool com 10 fêmeas de *Lutzomyia* em cada um deles (Figura 1). O gel 'B' com 6 poços: da esquerda para direita os cinco primeiros são pool de fêmeas de *Lutzomyia* e o sexto poço é o controle positivo (Figura 2).

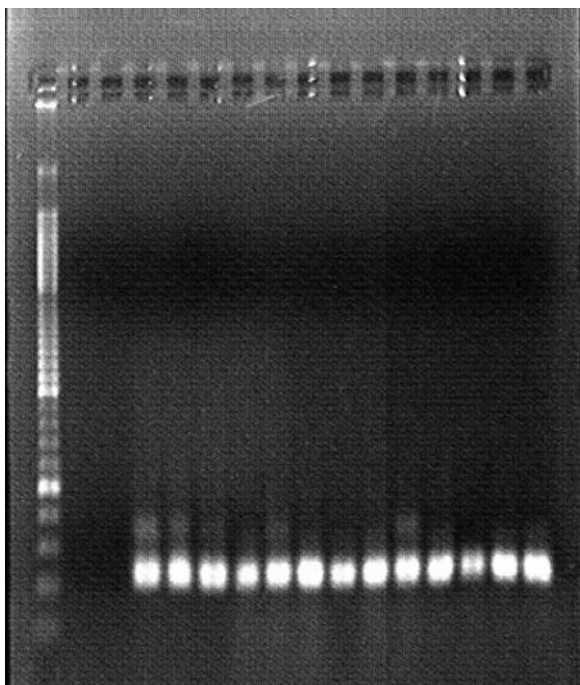


Figura 3. Gel 'A'

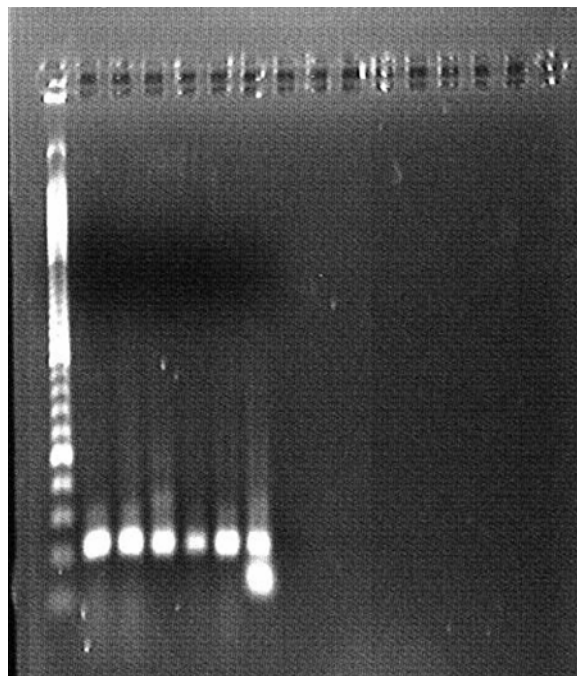


Figura 4. Gel 'B'

## 5 DISCUSSÃO

A predominância das espécies de flebotomíneos capturados foi de *L. intermedia* com 97,1%. Resultado semelhante em todo Estado do Rio de Janeiro obteve ARAÚJO FILHO (1978) com 59,47% na praia Vermelha, Ilha Grande; SOUZA *et al.*, (1981) em Bangu. AGUIAR (1996) constatou que a *L. intermedia* é prevalente a 100m do nível do mar em Itaguaí. Na localidade de Camorim, em Jacarepaguá, SOUZA *et al.* (2000) capturou 84,69% de *L. intermedia* e COSTA *et al.* (2004) 85,8% em Paraty. Na região serrana do Estado, Município de Bom Jardim, SOUZA *et al.* (2003) 51,8%. No Estado de São Paulo, DOMINGOS *et al.* (1998) 96,4% e CAMARGO NEVES *et al.* (2002) 88,1%. Características essas confirmam segundo GOMES *et al.* (1978); LIMA (1986); TEODORO & KUHL (1997) que a dominância da *L. intermedia* é em função da sua capacidade de melhor adaptação a ambientes alterados.

A fauna flebotomínica do município de Seropédica apresentou baixa diversidade de espécies, ou seja, apenas quatro espécies, não corroborando com os resultados obtidos neste mesmo município por SOUZA *et al.*, 2003; que apresentaram sete espécies. A baixa diversidade de espécies de flebotomos no município de Seropédica se deve às características paisagísticas de planície aberta com pouca vegetação arbórea, estas restritas às encostas de morros como a localidade do Valão da Louça.

A espécie *L. intermedia* (97,1%) prevaleceu sobre a segunda *L. whitmani* (1,5%), resultado observado por TEODORO & KUHL (1997) no sul do Brasil essas duas espécies acima citadas, a primeira (60,1%) prevaleceu sobre a segunda (38,9%).

O número de machos (91,3%) de *L. intermedia* prevaleceu sobre fêmeas (8,7%) estes dados são indicadores de que os criadouros desta espécie estejam próximos aos locais de captura. Outros autores como TEODORO & KUHL (1997) no Estado do Paraná obtiveram 74,6% de machos em capturas no domicílio e peri-domicílio na primeira etapa do estudo e 63,8% de machos no ano seguinte; SOUZA *et al.* (2003) na região serrana do Rio de Janeiro capturou 67,5% de machos e 32,5% de fêmeas.

O principal vetor de *Leishmania (Viannia) braziliensis* no Rio de Janeiro vem sendo a *L. intermedia*. No bairro de Vargem Grande, Jacarepaguá, RANGEL *et al.*(1985) diagnosticou a infecção natural desta mesma espécie por *Leishmania*. Mais recentemente PITTA PEREIRA, *et al.* (2005) registraram *L. intermedia* e *L. migonei* com infecção natural em diferentes bairros do município do Rio de Janeiro.

A *L. whitmani* também está associada à transmissão de *L. braziliensis*, nos estados da Bahia e Minas Gerais (MAYRINK *et al.*,1979; VEXENAT & BARRETO, 1986). A principal caracterização de *L. migonei* na participação da cadeia epidemiológica da LTA em área urbana foi mais bem evidenciada no estado do Ceará, cujo vetor em áreas silvestre é a *L. wellcomei* (READY *et al.*, 1983).

A espécie *L. intermedia* prevaleceu em todos os locais de captura, confirmando a sua grande valência ecológica em ambientes alterados (GOMES *et al.*, 1980; LIMA, 1986). Diferentemente das outras áreas endêmicas do Estado do Rio de Janeiro, a *L. whitmani* foi à segunda espécie mais freqüente, substituindo a *L. migonei* que comumente precede a *L. intermedia* como a segunda espécie mais freqüente nas áreas endêmicas de LTA (CARVALHO

et al., 1995). Apesar da baixa densidade de *L. whitmani*, é importante observar que esta espécie é tida como o principal vetor de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em diversas regiões do país (MAYRINK et al., 1979; QUEIROZ et al., 1991) e associado à transmissão de *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) shawi* (LAINSON et al., 1989).

Na região sudeste, diversos autores correlacionaram a baixa densidade de *L. intermedia* aos meses mais frios do ano (junho e julho) (FORATTINI, 1954, 1960; ARAÚJO FILHO, 1978). AGUIAR et al. (1987), no município de Itaguaí, obtiveram os menores índices de densidade de *L. intermedia* em julho, agosto e setembro. SOUZA et al. (1996), no município de São José do Vale do Rio Preto, verificaram que a espécie *L. intermedia* apresentava maior pico de atividade no mês de junho. Estes dados não corroboram com os resultados obtidos no município de Seropédica, cujo pico foi observado no mês de julho. Nos diferentes trabalhos relacionados à frequência mensal de *L. intermedia*, existem nítidas discrepâncias de resultados, tal fato ocorre, provavelmente, em função das diferentes características físico e fito-geográficas de cada região e a metodologia de coleta realizada em cada trabalho.

No município de Uberlândia LEMOS & LIMA (2005) obtiveram maior quantidade de *L. intermedia* no mês de outubro que precede o período chuvoso levando a considerar que neste período pode ocorrer um maior risco de infecção da LTA.

Na localidade do Valão da Louça a vegetação foi devastada e predomina a cultura de bananais, onde quase todos os moradores contraíram a LTA, dados que corroboram com BARROS et al (1985) que observou no Espírito Santo, FORATTINI (1973) em áreas litorâneas, MENEZES (1976) no Estado de São Paulo, ARAÚJO FILHO (1978) e SABROZA (1983) no Estado do Rio de Janeiro. Esta devastação da mata primitiva e a substituição por bananal, em meio aos quais os habitantes constroem suas casas, parece terem criado um ambiente favorável ao desenvolvimento dos flebotomíneos. Nesta localidade foram realizadas as coletas de flebotomíneos para o PCR, seu resultado foi negativo, talvez pelo motivo da maior frequência de machos capturados. A razão total de machos / fêmeas próximo de 9 / 1 caracteriza que as coletas manuais foram realizadas muito próximas dos criadouros, e é sabido que os machos nascem primeiro que as fêmeas e os mesmos se agrupam com o objetivo de acompanhar as fêmeas para o acasalamento (FELICIANGELI, 1987).

Segundo BARROS et al. (1985) a maior prevalência da doença está na faixa de 0-10 anos, o acometimento indiferenciado quanto ao sexo, a elevada taxa de infecção dos cães, a captura de flebotomíneos pertencentes a espécies já incriminadas na transmissão e a alta densidade dessas espécies no domicílio e peridomicílio, levam a admitir que a transmissão esteja ocorrendo nesses dois ambientes. No município de Seropédica os resultados também sugerem que a transmissão ocorra nos ambientes domiciliares e peridomiciliares.

Na sorologia os equinos não foram reagentes, no habitat havia presença de flebotomíneos e foi um dos locais escolhidos para captura, o que sugere que a transmissão não ocorreu nesse peridomicílio e sim em outra área. Ainda há possibilidade de não ter sido detectada na época da coleta de sangue e após um período haver a soroconverção dos animais.

A soropositividade entre os cães nas quatro áreas estudadas do Município de Seropédica foi de 14,2%, em áreas peri-urbanas do Rio de Janeiro onde a LTA é endêmica, COUTINHO et al. (1985) relataram um índice de 8,6% de positividade para LTC, utilizando a RIFI em eluatos sangüíneos.

Foi realizado um inquérito soroepidemiológico através da técnica de RIFI em Uberlândia, Estado de Minas Gerais por MAYWALD et al. (1993) onde os resultados mostraram que 1% e 10% dos cães foram reagentes para *Leishmania* em áreas rural e urbana, respectivamente.

Ao analisar a soropositividade canina para *Leishmania* em soros de animais procedentes de área urbana MAYWALD et al. (1996) observaram que os percentuais de 4,5% e de 5,6% estão próximos aos obtidos em outras áreas do País, onde também ocorrem surtos epidêmicos (GOMES et al., 1990; PASSOS et al., 1994).

GOMES et al. (1990) obtiveram taxa de positividade da infecção canina entre 2,4 a 5,6%, foi concordante com outras áreas endêmicas brasileiras, porém sugeriu papel epidemiológico não significativo do cão como hospedeiro extraflorestal do parasito. O mesmo concluiu SAVANI et al. (1999) ao realizar inquérito sorológico em cães errantes no município de São Paulo próximo a matas residuais, utilizando a RIFI, das amostras de 973 cães todos não reagentes, afirmaram que os cães não apresentam participação no ciclo de transmissão da LTA.

Em Paraty, Estado do Rio de Janeiro BARBOSA et al. (1999) obtiveram soropositividade para RIFI em 3,2% dos cães, com titulação variando de 1:40 a 1:160. Já na soropositividade revelada pela técnica de ELISA foi de 10,2%. E a copositividade entre RIFI e ELISA foi de 1,3%.

Ao realizar um inquérito sorológico em cães no Município de Paracambi, SANTOS et al. (1994) utilizando a RIFI obtiveram 35 (16,9%) positivos em 207 avaliados. No mesmo município SANTOS et al. (2005) observaram entre os animais de áreas semi-urbanizadas 8,2% reativos para RIFI e 11,2% para ELISA. Na área rural estes índices elevaram-se para (39,5%) RIFI e (47,4%) ELISA.

Em pesquisa de anticorpos na população canina em área endêmica no Paraná revelou uma soroprevalência de 18,2% de anticorpos para *Leishmania* em uma população de 132 cães investigados (SILVEIRA et al. 2006).

Através da realização do estudo (JESUS et al. 2006) na cidade de Porto Alegre, concluíram que 3,5% dos cães estudados apresentaram positividade na RIFI; a soropositividade baixa associada ao fato de os animais positivos terem sido assintomáticos, não descartam o seu papel como fonte de infecção e potencial risco à saúde pública.



## 6 CONCLUSÕES

O trabalho demonstrou que a espécie de flebotomíneo *L. intermedia* predomina nos bairros estudados do Município de Seropédica, representando 97,1% entre as quatro espécies encontradas.

A frequência de pacientes do sexo feminino e de crianças com LTA sugere que a transmissão ocorra no peridomicílio.

A soropositividade de 14,2%, detectado através das técnicas de RIFI e ELISA na população canina, considerando que os mesmos podem contribuir para novos focos da LTA, funcionando como animais amplificadores na transmissão da protozoose.

Todos os cães positivos para Leishmaniose, que vivem nos bairros de Seropédica estudados eram subclínicos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, G. M.; VILELA, M. L.; LIMA, R. B. Ecology of the sandflies of Itaguaí, na area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.82, p.583-584, 1987.

AGUIAR, G.M.; MEDEIROS, W.M.; SANTOS, T.G.; KLEIN, A.F.L.; FERREIRA, V.A. Ecology of sandflies in a recent focus of cutaneous Leishmaniasis in Paraty, litoral of Rio de Janeiro state (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.88, p.339-340, 1993.

AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M.; DE MARCO, T. S.; SANTOS, S. C.; GAMBARDELLA, S. Ecologia dos flebotomíneos da Serra do Mar, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. I – A fauna flebotomínica e prevalência pelo local e tipo de captura (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v.12, n.2, p.195-206, 1996.

AGUILAR, C.M.; RANGEL, E.F.; GARCIA, L.; FERNANDEZ, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI FILHO, G.; DE VARGAS, Z. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.19-28, 1990.

ALEXANDER, J., RUSSEL, D.G. The Inetraction of Leishmania especies with macrophages. **Advances in Parasitology, London**, v.31, p.175-254, 1992.

ALTAMIRANO-ENCISO, A.J.; MARZOCHI, M.C.A.; MOREIRA, J.S.; SCHUBACH, A.O.; MARZOCHI, K.B.F. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro**, v.10, n.3, p.853-82, 2003.

ARAGÃO, H. B. Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. **Brazil Medico**, v.36, p.129, 1922.

ARAÚJO-FILHO, N. A. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro, Estudo sobre a infecção humana, reservatórios e transmissores. 1978, 148f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí.

BARBOSA, G. M. S.; MARZOCHI, M. C. A.; MASSARD, C. L.; LIMA, G. P. S.; CONFORT, E. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em cães, no Município de Paraty, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, n.3, p.641-646, 1999.

BARBOSA-SANTOS, E.; MARZOCHI, M.C.A.; CONCEIÇÃO, N.F.; BRITO, C.M.; PACHECO, R. Epidemiological survey on canine population with the use of Imunoleish test in endemic areas of human American cutaneous leishmaniasis in the states of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.40, p.42-47, 1997.

BARRETTO, A.C.; VEXENAT, J.A.; PETERSON, N.E. The susceptibility of wild caught sand flies to infection by a subspecies of *Leishmania mexicana* isolated from *Proechimys iheringi denigratus* (Rodentia, Echimyidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, p.235-236, 1986.

BARROS, G.C.; SESSA, P.A.; MATTOS, E.A.; CARIAS, V.R.D.; MAYRINK, W.; ALENCAR, J.T.A.; FALQUETO, A.; JESUS, A.C. Foco de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Viana e Cariacica, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.19, p.146-53, 1985.

BASTIN, P., MATHEWS, K.R., GULL, K. The paraflagellar rod of kinetoplastide: solved and unsolved questions. **Parasitology Today, Cambridge**, v.12, p.302-307, 1996.

BRÜCKER, G.; GENTILINI, M. Las Leishmaniasis em América Latina. Paris: **La Fondation Rhône-Poulenc Snaté**, 30p, 1987.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; GOMES, A. C.; ANTUNES, J. L. F. Correlação da presença de flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) com registro de casos de leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.4, p.299-306, 2002.

CARRERA, M. Insetos de Interesse Médico e Veterinário. **Curitiba: Ed. Da UFPR**, 1991. 228p. Cap 10, p.111.

CARVALHO, R.W., SERRA-FREIRE, N.M., SOUZA, M.B. Fauna de flebotomos da Ilha do Araújo, município de Paraty-RJ. 1 - Diversidade e aspecto do comportamento. **Parasitologia Al Dia**, v.19, p.104-112, 1995.

CASTRO, G.O. Sobre um processo de cultura de flebotomos. Nota prévia. *In* **Sociedade de Biologia**, sessão de 8 de outubro, Rio de Janeiro, 1937.

CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA-CENEPI. Boletim Epidemiológico. Fundação Nacional de Saúde - **Ministério da Saúde**. Ano II, n.5. Brasília, 2002.

COSTA, C. M.; MOUTINHO, F. F. B.; BRUNO, S. F. A experiência do município de Paraty (Rio de Janeiro, Brasil) na prevenção e controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Parasitologia Latinoamericana**, v.110, p.110-114, 2004.

COUTINHO, S. G.; NUNES, M. P.; MARZOCHI, M. C. A.; TRAMONTANO, N. A survey for american cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 17-22, 1985.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 95, p.239-43, 2001.

DIAS, M. ; MAYRINK, W. ; DEANE, L.M.; COSTA, C.A.; MAGALHÃES, P.A.; MELO, M.N.; BATISTA, S.M.; ARAÚJO, F.G.; COELHO, M.V.; WILLIAMS, P. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana. I. Estudo de reservatórios em área endêmica do Estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 19, p.403-410, 1977.

DOMINGOS, M. F.; CARRERI-BRUNO, G. C.; CIARAVOLO, R. M. C.; GALATI, E. A.B.; WANDERLEY, D. M. V.; CORRÊA, F.M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: flebotomíneos de área de transmissão, no município de Pedro de Toledo, região sul do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n.5, p.425-432, 1998.

FALQUETO, A.; COURA, J.R.; BARROS, G.C.; GRIMALDI FILHO, G.; SESSA, P.A.; CARIAS, V.R.; DE JESUS, A.C.; DE ALENCAR, J.T. Participation of the dog in the cycle of transmission of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Viana, State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 155-163, 1986.

FELICIANGELI, M. D. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela, I. Description of the study area, catching methods and species composition., **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n.1, p.119-124, 1987.

FORATTINI, O. P. Algumas observações sobre biologia de flebotomos (*Diptera, Psychodidae*) em região da bacia do Rio Paraná. **Arq. Fac. Hig., S. Paulo**, v.8, p.40-86, 1954.

FORATTINI, O. P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. **São Paulo: Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 2, p.195-203, 1960.

FORATTINI, O.P.; RABELLO, E.X.; PATTOLI, D.B.; FERREIRA, O.A. Note on a focus of cutaneous leishmaniasis in the Northeast region of Sao Paulo, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 6, p.103-105, 1972.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE / Ministério da Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana: **Centro Nacional de Epidemiologia**. 62p. Brasília, 2000.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE / Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana: Vigilância e Monitoramento da Leishmaniose Tegumentar em Unidades Territoriais –Brasil, 1994-2001. **Boletim (eletrônico) Epidemiológico**, Ano 02, Nº 05, 13/12/2002. www.funasa.gov.br, 2002.

GENARO, O.; RASO, P.; COSTA, C.A.; CARVALHO, M.D.; AMARAL, F.; BOTELHO, A.C.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; MAYRINK, W. Montenegro skin tests in dogs experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, p.163-164, 1993.

GOMES, A.C.; RABELLO, E. X.; GALATI, E. A. B. Flebotomíneos encontrados em galinheiros experimentais nos estados de São Paulo e Minas Gerais (Brasil) e algumas observações ecológicas. **Revista de Saúde Pública de São Paulo**, v. 12, n.3, p.403-407, 1978.

GOMES, A.C.; RABELLO, E.X.; SANTOS, J.L.; GALATI, E.A. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana, 1. Estudo experimental da frequência de flebotomíneo e ecótopos artificiais com referência especial a *Psychodopygus intermedius*. **Revista de Saúde Pública, S. Paulo**, v.14, p.540-56, 1980.

GOMES, A.C.; COUTINHO, S.G.; PAIM, G.V.; OLIVEIRA, S.M.O.; GALATI, E.A.B.; NUNES, M.P.; CAPINZAIKI, A.N.; YAMAMOTO, Y.T.; ROTTER, P. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.32, p. 105-115, 1990.

GONTIJO, B. & CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p.71-80, 2003.

GONTIJO, C.M.F. & MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n.3, p.338-349, 2004.

GRIMALDI, G. Jr., DAVID, J., MCMAHON-PRATT, D. Identification and distribution of New World "*Leishmania*" species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v.36, p.270-287, 1987.

GRIMALDI, G. Jr., TESH, R.B, MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 41, p.687-725, 1989.

GUEVARA, P.; RAMIREZ, J.L.; ROJAS, E.; SCORZA, J.V.; GONZALEZ, N.; ANEZ, N. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. **Lancet**, v. 341, p. 1341, 1993.

HADDAD, F.; SCHUBACH, A.O.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; DEGRAVE, W.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O. Detection of minicircle DNA of *Leishmania* in paraffin-embedded tissue from scars of treated patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, p.185, 1996.

HERMETO, M.V.; VIEIRA-DIAS, D.; GENARO, O.; DA COSTA, C.A.; TOLEDO, V.P.; MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L.; CHAVES, K.M.; MAYRINK, W. Delayed hypersensitivity skin-test using Leishvacin for epidemiological survey of canine cutaneous leishmaniasis in a rural area of Minas Gerais state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.88, p. 635-636, 1993.

HORTA, M.F. Pore-forming proteins in pathogenic protozoan parasites. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.5, p.363-366, 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Censo Demográfico, 2000. Base Regional Cartográfica Digital Integrada – 1: 1 000 000 – bCDMd. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 01 nov. 2007.

JESUS, J.R.; ARAUJO, F.A.P.; SPALDING, S.; TIECHER, F. Avaliação sorológica de anticorpos para *Leishmania* spp. na população canina em região de foco de leishmaniose tegumentar americana na Lomba do Pinheiro, Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil **Parasitologia Latinoamericana**, v. 61, p. 121-125, 2006.

KELLY, J.M., LAW, J.M., CHAPMAN, C.J., VANS EYS, G.J., EVANS, D.A. Evidence for genetic recombination in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology, Amsterdam**, v.46, p. 253-263, 1991.

KREUTZER, R.D., YEMMA, J.J., GROGL, M., TESH, R.B., MARTIN, T.I. Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Atlanta**, v. 51, p.301-307, 1994.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. Evolution, classification and geographic distribution, 1-120. In W Peters & R Killick-Kendrick. *The Leishmaniases in Biology and Medicine. Vol 1 Biology and Epidemiology*, Academic Press, London, 1987.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. New World leishmaniasis – the neotropical leishmania species. In Francis Cox et al. *Microbiology and microbial infections. Parasitology*, 9<sup>a</sup> ed., Londres/ Nova York, Topley & Wilson, vol. 5, pp.241-68, 1998.

LAINSON, R.; BRAGA, R. R.; de SOUZA, A.A.A.; PÓVOA, M. M.; ISHIKAWA, E. A. Y.; SILVEIRA, F. T. *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* sp.n. a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Ann Parasit Hum Comp**, v.64, p.200-207, 1989.

LEMOS, J.C.; LIMA, S.C. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos em área de transmissão no Município de Uberlândia, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.1, p.22-26, 2005.

LEVINE, N.D; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G. GRAIN, J.; RONIGBERG, B.M.; LIEEDALE, G.F.; LEOBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D. MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VÁVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the PROTOZOA. **Journal of Protozoology**, v.27, p.37-58, 1980.

LIMA, L. C. Ruralização da *Lutzomyia intermedia*, um provável caso de pré-adaptação. **Revista de Saúde Pública**, v.22, p.102-104, 1986.

LIMA, L. C.; MARZOCHI, M. C. A.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A. Observações sobre leishmaniose tegumentar cinco anos após profilaxia. **Revista de Saúde Pública**, v.22, p.73-77, 1988.

LUNA, L.G. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3. ed. **McGraw-Hill, New York**. 1968.

- MACHADO, M.I.; MILDNER, R.V. Isolation and identification of *Leishmania braziliensis braziliensis*, in human cases and domestic dog, in the state of Sao Paulo. **Revista do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia**, v.2, p. 9-21, 1986.
- MARZOCHI, M.C.A.; BARBOSA-SANTOS, E.G. Evaluation of a skin test on the canine mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.83, p.391-392, 1988.
- MARZOCHI, M.C.A.. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.63, p. 82-104, 1992
- MARZOCHI, M.C.A. & MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v.10, n.2, p.359-375, 1994.
- MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; CARVALHO, R.W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, v.10, p.37-40, 1994.
- MARZOCHI, M.C.A.; SCHUBACH, A.O.; MARZOCHI, K.B.F. Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral Americana. In: Cimerman, B. & Cimerman, S. Parasitologia Humana e Seus Fundamentos. Editora Atheneu, 1999. Cap. 9.
- MAYRINK, W.; Da COSTA, C. A.; MAGALHÃES, P.A. et al. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, p.385-387, 1979.
- MAYWALD, P.G.; MACHADO, M.I.; CRUZ, J.M.C.; OLIVEIRA, M. G.; PIRES, M.R.F.G. Leishmaniose Tegumentar Canina: inquérito soropidemiológico em áreas rural e urbana no município de Uberlândia, Minas Gerais. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.30, n.1, p.25-29, 1993.
- MAYWALD, P.G.; MACHADO, M.I.; COSTA-CRUZ, J.M.; GONÇALVES PIRES, M.R.F. Leishmaniose tegumentar, visceral e doença de Chagas caninas em municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v.12, n.3, p.321-328, 1996.
- MENEZES, J.A. Leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. Inquéritos por intradermorreação. Rio de Janeiro, 1976. Dissertação de Mestrado — Faculdade de Medicina UFRJ.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância em Saúde: dados e indicadores selecionados / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. – Brasília, Ministério da Saúde, 2003 – Ano 2, n.2, 2004.
- MONTENEGRO J. Cutaneous reactions in leishmaniasis. **Archives of Dermatology and Syphilology**, v.13, p.187, 1926.

MOREIRA, I.C. Dissertação. Análise Geo-ambiental por Geoprocessamento Dirigida à Instalação de Usinas Termelétricas e Estudos Sobre Seus Principais Riscos de Impactos Ambientais. Instituto de Geociências, UFRJ, 2002.

NERY-GUIMARÃES, F. Estudo de um foco de leishmaniose mucocutânea na Baixada Fluminense (Estado do Rio de Janeiro). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.53, p.1-11, 1955.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. São Paulo: Atheneu, Cap. 4 – 9, p.23 – 81, 1998.

OLIVEIRA-NETO, M.P.; PIRMEZ, C.; RANGEL, E.; SCHUBACH, A.; GRIMALDI JUNIOR, G. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.83, p.427-435, 1988.

PACHECO, R.S., LOPES, U.G., MOREL, C.M., GRIMALDI Jr., G., MOMEN, H. Schizodeme analysis of *Leishmania* and comparison with some phenotypic techniques. In AJ Rioux, *Leishmania Taxonomie et Phylogenese Application Eco-Epidemiologique*, IMEEE, Montpellier, p. 57-65, 1986.

PARANHOS-SILVA, M.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; DE SA OLIVEIRA, G.G.; NASCIMENTO, E.G.; DOS-SANTOS, W.L. Skin reactions to thimerosal and *Leishmania* in dogs from a leishmaniasis endemic area: it is better to keep them apart. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p.679-681, 2001.

PASSOS, V.M.A.; FALÇÃO, A.L.; MARZOCHI, M.C.A.; GONTIJO, C.M.; DIAS, E.S.; BARBOSA-SANTOS, E.G.; GUERRA, H.L.; KATZ, N. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.88, p.103-110, 1993.

PASSOS, V.M.A.; GONTIJO, C.M.F.; ANDRADE, A.C.; FIGUEIREDO, E.M.; SILVA, E.S.; FALÇÃO, A.J. Inquérito canino em foco recente de leishmaniose tegumentar no Município de Sabará, região metropolitana de Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.27, n.1, p.34, 1994.

PEDROSO, A.M. Leishmaniose local do cão. **Annaes Paulistas de Medicina e Cirurgia**, v.1, n.2, p.33-39, 1913.

PEREZ, J.E.; OGUSUKU, E.; INGA, R.; LOPEZ, M.; MONJE, J.; PAZ, L.; NIETO, E.; AREVALO, J. GUERRA, H. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. V.88, n.2, p.161-4, 1994.

PESSOA, S.B., PESTANA, B.R. Infecção natural de *Phlebotomus migonei* por formas Leptomonas, provavelmente da *Leishmania braziliensis*. **Acta Med São Paulo**, v.5, p.106-111, 1940.



PESSOA, S.B.; BARRETO, M.P. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Ministério da Educação e Saúde, Serviço de Documentação, Rio de Janeiro**, 527 pp. 1948.

PESSOA, S.B., COUTINHO, J.O. Infecção natural do *Phlebotomus pessoai* por formas em Leptomonas, provavelmente da *Leishmania braziliensis*. **Revista de Biologia e Higiene**, v.10, p. 139-142, 1949.

PESSOA, S.B. & MARTINS, A.V. In: \_\_Parasitologia Médica. 10.<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977.

PESSOA, S.B. & MARTINS, A.V. Leishmanioses tegumentares. In: \_\_Parasitologia Médica. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.78-87, 1988.

PIRMEZ, C.; COUTINHO, S. G.; MARZOCHI, M. C. A.; NUNES, M. P. & GRIMALDI Jr., G. Canine american cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.38, p.52-58, 1988.

PITA-PEREIRA, D.; ALVES, C. R.; SOUZA, M. B.; BRAZIL, R. P.; BERTHO, A.L.; BARBOSA, A. F.; BRITTO, C.C. Identification of naturally infected *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p.905-913, 2005.

QUEIROZ, R.G., VASCONCELOS, A.W., VASCONCELOS, A., SOUSA, R.N., PESSOA, F.A., ALENCAR, J.E., DAVID, J.R. Phlebotominae sand flie (Diptera: Psychodidae) fauna survey in na American cutaneous leishmaniasis (ACL) focus in Baturité, Ceará State, northeast Brazil. **Parassitologia**, v. 33, p.159-167, 1991.

RANGEL, E. F.; SOUZA, N.A.; WERMELINGER, E. D.; BARBOSA, A. F. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva 1912, em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.79, p.395-396, 1984.

RANGEL, E., RYAN, L., LAINSON, R., SHAW, J.J. Observation on the sandfly (Diptera, Psychodidae) fauna of Alem Paraiba, state of Minas Gerais, Brazil, and the isolation of a parasite of the *Leishmania braziliensis* complex from *Psychodopygus hirsuta hirsuta*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, p. 373-374, 1985.

RANGEL, E.F.; SOUZA, N. A.; WERMELINGER, E.D.; AZEVEDO, A.C.; BARBOSA, A.F.; ANDRADE, C.A. *Phlebotomus* of Vargem Grande, a focus of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, p.347-349, 1986.

RANGEL, E.F., BARBOSA, A.F., ANDRADE, C.A., SOUSA, N.A., WERMELINGER, E.D. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) under experimental conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v.87, p.235-238, 1992.

RANGEL, E.F., 1995. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. Tropical diseases, society and the environment. Proceedings from research seminary. Conference reports, Sarec documentation.

READY, P. D.; RIBEIRO, A. L. et al. Presence of *Psychodopygus wellcomei* (Diptera, Psychodidae) a proven vector of *Leishmania braziliensis* in Ceará State. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.78, p.235-236, 1983.

REY, L. Leishmanioses cutâneas e mucocutâneas do Novo Mundo. In: \_\_ Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.5, p. 47-65, 1992.

REY, L. *Leishmania* e Leishmanioses: os parasitos. In: \_\_Parasitologia 2ª edição Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.15, p. 182-192, 1992.

ROSS, R. Further Notes on *Leishmania's* bodies. **British Medical Journal**, v.11, p.1401, 1903.

SABROZA, P. C. Tese. O domicílio como fator de risco na leishmaniose tegumentar americana. Estudo epidemiológico em Jacarepaguá, município do Rio de Janeiro. Escola Nacional de Saúde pública, FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 1981.

SACKS, D.L. Developmental biology of *Leishmania* promastigotes. In: ENGLUND. P.T., SHER, A., (ed). The biology of parasitism. New York: Alan R. Liss.,p.93-103, 1988.

SALINAS, G.; VALDERRAMA, L.; PALMA, G.; MONTES, G.; SARAVIA, N.G. Detection of amastigotes in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis using the immunoperoxidase method, using polyclonal antibody: sensibility and specificity compared with conventional methods of diagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.53-60, 1990.

SANTOS, G.P.L.; PONTE, C.S.; MASPERO, R.C.; ESPÍNOLA, C.B.; SILVA, V.L.; SANTOS, E.G.O.B.; MARZOCHI, M.C.A.; ANDRADE, M.V.; CONCEIÇÃO, N.F.; SILVA, A.F.; ALMEIDA, D.C.; LEITE, R.F. Leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro. III- Inquérito canino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.27, n.1, p.35, 1994.

SANTOS, G.P.L. Estudo da população canina e da fauna flebotômica em áreas de leishmaniose tegumentar no Município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro. Uma abordagem epidemiológica. Curso de Parasitologia Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, p. 228. 1998.

SANTOS, G.P.L.; SANAVRIA, A.; MARZOCHI, M.C.A.; SANTOS, E.G.O.B.; SILVA, V.L.; PACHECO, R.S.; MOUTA-CONFORT, E.; ESPÍNOLA, C.B.; SOUZA, M.B.; PONTE, C.S.; CONCEIÇÃO, N.F.; ANDRADE, M.V. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.2, p.161-166, 2005.

SANTRICH, C., MOORE, L., SHERWIN, T., BASTIN, P., BROKAW, C., GULL, K., LEBOWITZ, J.H. A motility function for the paraflagellar rod of *Leishmania* parasites revealed by PFR-2 gene Knockouts. **Molecular and biochemical. Parasitology, London**, v. 90, p.95-109, 1997.

SARAVIA, N.G.L.; VALDERRAMA, M.; LABRADA, A.F.; HOLGUÍN, C.; NAVAS, G.; PALMA, A.; WEIGLE, K.A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v.159, p.725-735, 1989.

SAVANI, E.S.M.M.; GALATI, E.A.B.; CAMARGO, M.C.G.O.; D'AURIA, S.R.N.; DAMACENO, J.T.; BALDUINO, S.A. Inquérito sorológico sobre leishmaniose tegumentar americana em cães errantes no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.33, n.6, p.629-31, 1999.

SCHUBACH, A.; HADDAD, F.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; DEGRAVE, W.; PIRMEZ, C.; GRIMALDI, G. Jr.; FERNANDES, O. Detection of *Leishmania* DNA by the polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **Journal of Infectious Diseases**, v.178, p.911-914, 1998a.

SCHUBACH, A.; MARZOCHI, M.C.A.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A.V.; ARAUJO, M.L.; OLIVEIRA, A.L.; PACHECO, R.S.; MOMEN, H.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, K.B.F. Cutaneous scars in american tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, p.824-827, 1998b.

SCHUBACH, A.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A.V.; SARTORI, A.; DE OLIVEIRA-NETO, M.P.; MATTOS, M.S.; ARAUJO, M.L.; SOUZA, W.J.; HADDAD, F.; PEREZ, M.D.E. A.; PACHECO, R.S.; MOMEN, H.; COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; COSTA, S.C. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.987-996, 2001.

SELLS, P.G., BURTON, M. Identification of *Leishmania* amastigotes and their antigens in formalin fixed tissue by immunoperoxidase staining. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, p.461-468, 1981.

SILVA, O.V. Avaliação do teste de aglutinação direta (TAD) no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). 2003. 78f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife – PE.

SILVEIRA T G, TEODORO U, LONARDONI M V C.; TOLEDO, M.J.O.; BERTOLINI, D.A.; ARRAES, S.M.A.A.; VEDOVELLO FILHO, D. Investigação sorológica em cães de área endêmica de leishmaniose tegumentar, no estado do Paraná, Sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v.12, p.89-93, 1996.

SOUZA, M. A.; SABROZA, P. C.; MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S. Leishmaniose Visceral no Rio de Janeiro. I – Flebotômíneos de área de procedência de caso humano autóctone. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.76, p.161-168, 1981.

SOUZA, M.B. Vetores das Leishmanioses no Brasil. *In*: Curso de Atualização em Leishmanioses para Profissionais de Nível Médio. IPEC, FIOCRUZ, 2003.

SOUZA, M.B., MARZOCHI, M.C.A., CARVALHO, R.W., CONCEIÇÃO, N.F., PONTE, C.S. Flebotômíneos em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar no município de São José do Vale do Rio Preto, Rio de Janeiro, Brasil. **Parasitology Al Dia**, v.19, n.3-4, p.97-103, 1995.

SOUZA, M.B., PUJOL-LUZ J.R., MARZOCHI, M.C.A., CARVALHO, R.W., PONTE, C.S., MEIRA, A.M. Estudo da fauna flebotomínica em área de leishmanioses tegumentar americana e visceral, zona peri-urbana do bairro de Jacarepaguá, Rio de Janeiro. **Revista Entomologia y Vetores**, v.7, p.365-375, 2000.

SOUZA, M. B.; PÉCHE, W. E. S; BORJA, G. E. M. Fauna Flebotomínica do Município de Seropédica, Rio de Janeiro: Área de Ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Humana e Canina.. *In*: XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2003, Rio de Janeiro, 2003.

SOUZA, M.B.; CARDOSO, P.G.; SANAVRIA, A.; MARZOCHI, M.C.A.; CARVALHO, R.W.; RIBEIRO, P.C.; PONTE, C.S.; MEIRA, A.M.; MERODIO, J.C. Fauna flebotomínica do Município de Bom Jardim, região serrana do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.4, p.150-153, 2003.

TAFURI, W.L.; RASO, P.; HERMETO, M.V.; VIEIRA DIAS, D.; MAYRINK, W. Comparative histopathologic study of the skin test in dogs from an endemic area of tegumentary leishmaniasis, using 2 antigens: Leishvacin and P10.000G. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.26, p.11-14. 1993.

TEODORO, U.; KUHL, J. B. Interação flebotômíneos, animais domésticos e dominância de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) em área com alto grau de antropia, no Sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.31, n.5, p.512-516, 1997.

VEXENAT, J. A.; BARRETO, A. C.; CUBA, C. A.; MARSDEN, P. D. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do Estado da Bahia. III. Fauna flebotomínica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, p.293-301, 1986.

VOLLER, A.; BORTLTT, A.; BATWELL, D.E. Enzyme immunoassays for parasite diseases. **Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, p.58-106, 1976.

WEIGLE, K.A.; DE DAVALOS, M.; HEREDIA, P.; MOLINEROS, R.; SARAVIA, N.G.; D'ALESSANDRO, A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.36, p.489-496, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series N° 793. WHO, Geneva, Switzerland, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. DIVISION OF CONTROL OF TROPICAL DISEASES. Disease sheet: Leishmaniasis (the disease). {WHO Home Page}. {capturado em 02 de Março de 1998}.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M.A. Guide to identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in México, West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Associated Publishers, American Entomological Institute. 881pp, 1994.

YOSHIDA, E.L.; CORREA, F.M.; MARQUES, A.S; STOLF, H.O.; DILON, N.L.; MOMEN, H.; GRIMALDI Jr, G. Human, canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis braziliensis*) in the south-west region of São Paulo State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.85, p.133-134, 1990.

## **8 ANEXOS**

Anexo A. Material Necessário para Realização da técnica RIFI.....	42
Anexo B. Material Necessário para Realização da técnica ELISA.....	44
Anexo C. Método de Berlese.....	47
Anexo D. Ficha de inquérito canino de Seropédica.....	48
Anexo E. Mapa limítrofe do Município de Seropédica.....	49
Anexo F. Localização da residência do Caçador no Mapa.....	50
Anexo G. Localização da residência do Valão da Louça no Mapa.....	51
Anexo H. Localização da residência do Valão do Km 39 no Mapa.....	52
Anexo I. Localização da residência do Valão do Km 40 no Mapa.....	53

## **Anexo A. Material necessário para realização da técnica RIFI**

- Antígeno
- Conjugado fluorescente
- Glicerina tamponada
- Azul de Evans
- Soro controle positivo (com título, preferencialmente entre 1:160 e 1:640)
- Soro controle negativo
- Solução tampão fosfato (PBS) : Cloreto de Sódio (NaCl) PA  
Fosfato de sódio dibásico Anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) PA  
Fosfato de sódio Monobásico Anidro (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O)PA
- Lâminas para RIFI (perfecta n° 4)
- Lamínulas (24x24 m/m)
- Microplacas e micropipetas ou tubos e pipetas para diluição
- Câmara úmida e cubas de lavagem
- Microscópio de fluorescência
- Água destilada

### **Soluções e reagentes**

#### **1. Tampão Fosfato (PBS)**

Cloreto de Sódio (NaCl)PA 0,15M 16.36g

Fosfato de sódio dibásico Anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) PA- 268.07M 3.97g

Fosfato de sódio Monobásico Anidro (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O)PA- 137.99M 0.71g

Água destilada qsp (quantidade suficiente para) 2L

### **Preparo**

Diluir os sais em aproximadamente 1L de água destilada, transferir a solução para balão volumétrico de 2 litros e completar o volume até a marca do balão.

Conservar em geladeira

### **Glicerina tamponada**

#### **TAMPÕES:**

- **Bicarbonato PM: 84,01**

Pesar 4,2005g de bicarbonato. Dissolver em um béquer com 50 mL de água destilada e por último completar o volume para 100 ml em água destilada num balão volumétrico.

- **Carbonato PM: 105,99**

Pesar 5,2995g de carbonato. Dissolver em um béquer com 50 ml de água destilada e por último completar o volume para 100 ml em água destilada num balão volumétrico.

### **Tampão Carbonato/bicarbonato:**

Colocar aproximadamente 3 partes do tampão bicarbonato para  $\frac{1}{2}$  parte de carbonato, acertar o pH para 9.0

Se estiver maior que 9.0 colocar bicarbonato e se estiver menor que 9.0 colocar carbonato.

Colocar 100 ml do tampão, depois do pH aferido, e 900 ml de glicerina pura.

O pH deverá ficar em torno de 9,35.

#### **Procedimento**

- 1- Transferir 10 $\mu$ l do antígeno para cada área marcada na lâmina, tendo o cuidado de mantê-lo homogêneo durante o preparo. Deixar secar 1 ou 2 horas na estufa a 37° C;
- 2- Diluir os soros testes (1:20 e 1:40) e os controles positivo (1:40) e negativo (1:40), em PBS.
- 3- Adicionar 10ul das diluições de soro por orifício, conforme o protocolo devidamente elaborado. Deve-se tomar cuidado para que as amostras não se misturem durante a incubação.
- 4- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 min na estufa à 37° C.
- 5- Lavar as lâminas 3 vezes em PBS, nas cubas de lavagem por 5 minutos cada banho.
- 6- Lavar 1 minuto em água destilada.
- 7- Colocar as lâminas 15 minutos na estufa à 37° C para secar.
- 8- Preparar o diluente do conjugado adicionando-se azul de Evans em PBS na diluição 1:19.
- 9- Diluir o conjugado na proporção adequada, conforme a titulação anteriormente testada e pingar 10ul em cada orifício.
- 10- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos à 37° C na estufa.
- 11- Lavar as lâminas 3 vezes em PBS, nas cubas de lavagem por 5 minutos cada banho.
- 12- Lavar 1 minuto em água destilada.
- 13- Colocar as lâminas 15 minutos na estufa à 37° C para secar.
- 14- Adicionar aproximadamente 30ul de glicerina tamponada sobre as lâminas, cobrindo-as lamínulas. Mantenha-as sob abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura.
- 15- Levar as lâminas ao microscópio de fluorescência e:
  - Focalizar o orifício do soro controle positivo e observar a fluorescência;
  - Focalizar o orifício do soro controle negativo e avaliar a coloração de fundo.
  - Fazer a leitura dos outros soros a serem examinados.



## Anexo B. Material necessário para realização da técnica ELISA

### 1 - Equipamentos

- a) Lavador automático de placas de ELISA
- b) Leitor automático de placas de ELISA
- c) Balança analítica

### 2 - Materiais

- a) Microplacas de poliestireno de 96 poços
- b) *Micropipetas automáticas de 1, 10 e 200µL*
- c) Pipetas sorológicas de 1 e 10 mL

### 3 - Reagentes

- a) Antígeno
- b) PBS PH 7,2 a 7,4
- c) Anti-imunoglobulina canina conjugada à peroxidase
- d) Orto-fenilenodiamino (OPD)
- e) Tween 20
- f) Leite desnatado

Controles: Soros controles positivos e controles negativos

### 4 - Preparo das soluções e reagentes

#### Antígeno

O antígeno é obtido por centrifugação a 14000g de massa parasitária de formas promastigotas *L.major* -“like” rompida por ultra-som. O sobrenadante desta centrifugação é coletado e usado como antígeno para o teste (ver protocolo de obtenção do antígeno); é analisado quanto ao teor de proteína total pelo método de Folin-Lowry e conservado a -20° C em pequenas alíquotas. A concentração de proteína utilizada no teste é determinada por titulação.

Para emprego no teste o antígeno é diluído em tampão carbonato bicarbonato 0,06M pH 9,6 com concentração final estabelecido pela titulação do lote a ser usado.

#### *Tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 - 0,06M*

NaHCO<sub>3</sub> ----- 4,03 g (Bicarbonato de Sódio)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ----- 1,27 g (Carbonato de Sódio)

Pesa-se os sais carbonato e bicarbonato de sódio e dilui-se em 1 litro de água destilada, verifica-se o pH que deverá estar em 9,6. Se o pH necessário não for alcançado, utiliza-se uma solução de carbonato para elevar e de bicarbonato para reduzir.

#### Solução salina tamponada com fosfatos (PBS).

Pesa-se então:

NaCl ----- 16,36 g cloreto de sódio

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) ----- 3,98 g fosfato de sódio dibásico

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O) ----- 0,71 g fosfato de sódio monobásico

Diluem-se os reagentes em 2 litros de água destilada e verifica-se o pH que deverá estar na faixa de 7,2.

Tampão de Lavagem (PBS TWEEN)

Tween 20-----1 mL

PBS 0,01M PH 7,2-7,4 -----qsp-----2L

Mede-se 1 mL de Tween 20 com pipeta e adiciona-se a 2 L de PBS

Tampão citrato-fosfato

pH 4,9 - 5,2 (para DAB e OPD)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O) ----- 9,15 g (Fosfato de Sódio dibásico)

C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> ----- 4,7 g (Ácido Cítrico)

Pesar os reagentes acima e dilui-se em 1 litro de água destilada.

Mede-se o pH que deve estar entre 4,9-5,2. Se o pH necessário não for alcançado, utiliza-se uma solução de fosfato para elevar e de ácido cítrico para reduzir.

Solução diluente

Leite em pó desnatado a 1 %

1 g de leite ---- q. s. p. 100 mL

Procedimento: pesa-se o leite em papel alumínio; em becker, dilui-se o leite em 100mL PBS

Tween (Tampão de lavagem). Filtra-se em papel de filtro antes do uso.

Solução reveladora ( preparar na hora de utilizar)

Orto-fenileno-diamino (OPD) ----- 0,01g

Tampão citrato-fosfato pH 5,1 ----- 25 mL

Dilui-se o OPD no tampão citrato-fosfato e adiciona-se 10 µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 30%.

**Solução bloqueadora da reação: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N**

## 5 - Procedimentos técnicos-passo a passo

a. Sensibiliza-se os poços da placa, colocando-se em cada poço 100 µL de antígeno anteriormente titulado diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 em concentração previamente definida por titulação. Geralmente a concentração do antígeno para uso obtida por titulação está em torno de 2,5 a 5,0 µg/mL.

b. Incuba-se a placa em câmara úmida durante 2 horas a 37 °C ou a 4 °C 16 a 24 horas.

c. Faz-se 4 (quatro) lavagens rápidas com PBS 0,01M, com 0,05% de Tween 20 tampão de lavagem em lavador de placas automático observando-se a programação apropriada para o teste.

d. Dilui-se o soro em solução de leite desnatado a 1% em PBS 0,01M, 0,05% Tween20. Para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*, faz-se diluições a 1:20. Dilui-se os soros a 1:20 separadamente em outra placa; faz-se diluições em duplicatas e transporta-se 100 µL por poço da placa sensibilizada e já lavada.

Esquema da placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C +	C -	C +									
B	C +	C -	C +									
C												
D												
E												
F												
G												
H												

C=Controle

- e. Incuba-se a 37°C em câmara úmida, durante 45 minutos.
- f. Faz-se 4 lavagens com tampão de lavagem como no item 3 (três)
- g. Dilui-se o conjugado anti-imunoglobulina marcado com peroxidase na diluição determinada por titulação prévia, em solução de leite desnatado a 1% em PBS Tween (o mesmo diluente usado para o soro).
- h. Coloca-se 100 µL do conjugado diluído em cada poço da placa.
- i. Incuba-se a 37°C, em câmara úmida, durante 45 minutos.
- j. Lava-se a placa, da mesma maneira que no item 3.
- k. Após lavagem da placa coloca-se 100 µL da solução reveladora por poço da placa, preparada imediatamente antes do uso.
- l. Incuba-se à temperatura ambiente por 20 minutos ao abrigo de luz.
- m. Bloqueia-se a reação com 50 µL de ácido sulfúrico 1N.
- n. Lê-se a absorbância da reação a 492 nm.
- o. Após a leitura e antes de desprezar a placa neutraliza-se o ácido por adição de 100 µL de hidróxido de sódio 2N em cada poço da placa.

6 - Interpretação dos resultados:

A linha de corte entre amostras consideradas positivas (reatoras) e negativas (não reatoras) é calculada tendo-se como base a média de leitura dos soros negativos mais dois desvio padrão.

Linha de corte = x soros neg + 2dp

**Anexo C. Método de Berlese (Hoyer modificado):**

- 1-Três horas em Potassa 10 % (KOH)
- 2- Vinte minutos em ácido acético 10 %
- 3 –Três séries de vinte minutos em água destilada
- 4 – Vinte e quatro horas em Lactofenol
- 5 - Montagem em Berlese (Lâmina e lamínula)

Formulações:

Lactofenol

- Fenol cristalizado(100 mg)
- ácido láctico (100 ml)
- Glicerina (100 ml)
- água destilada (100 ml).

Berlese

- Goma arábica (08g)
- hidrato de cloral (74g)
- xarope de glicose (5 ml)
- água destilada (10 ml)
- acido acético (3ml)
- Todos estes ingredientes são misturados e aquecidos sem deixar a solução ferver.
- Manter o Berlese em frasco âmbar.

Anexo D. Ficha do inquérito canino em Seropédica.

**FICHA DE INQUÉRITO CANINO DE SEROPÉDICA**

Data :..... No. Frasco:.....Vadio Cod:.....  
Proprietário:.....  
Profissão:.....Biópsia:( ) sim ( ) não  
Endereço:.....  
Conhece a doença: ( ) sim ( ) não. Vetor ( ) sim ( ) não

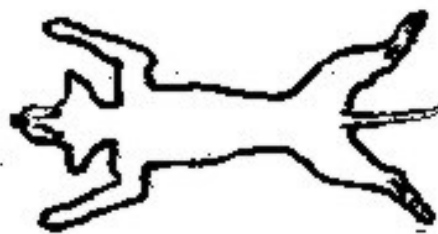
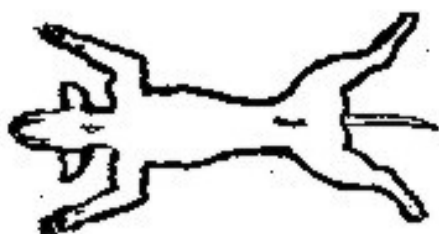
**PERFIL DO DOMICÍLIO**

Construção: ( ) alvenaria ( ) madeira ( ) sopapo  
Tempo de construção:.....Tempo de resid. no local:.....  
Água: ( ) encanada ( ) poço ( ) fonte  
Banheiro: ( ) padrão ( ) fossa seca ( ) mata  
Distância da mata: ( ) 5m ( ) 10m ( ) 20m ( ) 50m ( ) 100m  
Terreno: ( ) plano ( ) íngreme ( ) +100m altitude.....m  
Número de cães:.....  
Peridomicílio:( ) galinheiro ( ) pocilga ( ) curral ( ) outros.....

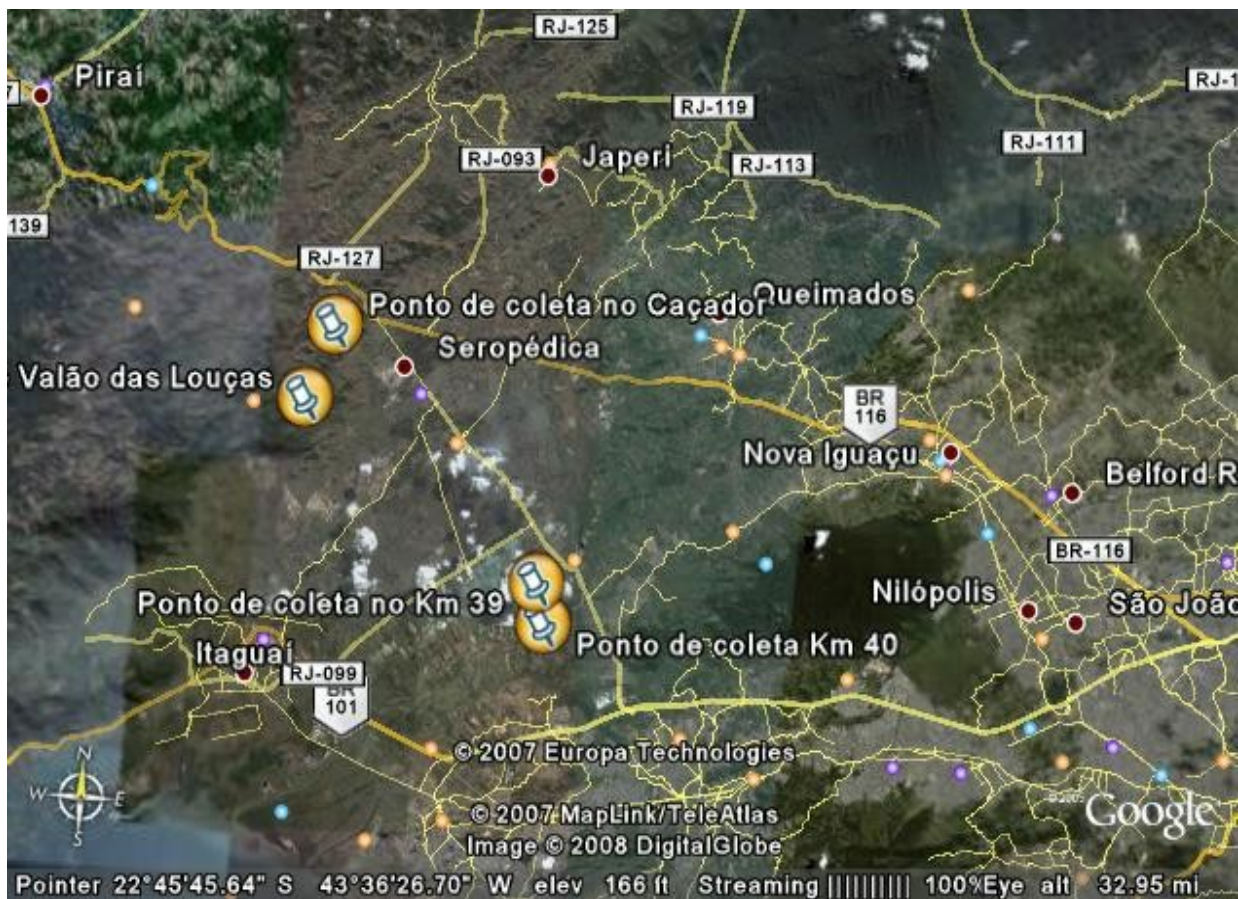
**PERFIL DO ANIMAL**

Nome:.....Raça:.....Idade:.....  
Origem:.....Cor da pelagem:.....Sexo:( ) F ( ) M  
Pelagem: ( ) curta ( ) média ( ) longa  
Cão: ( ) domiciliado ( ) semidomiciliado ( ) vadio  
Atividade: ( ) caça ( ) ecoturismo ( ) outro.....  
Estado Clínico Geral:.....  
Medicação usada na lesão:.....

Presença de lesão suspeita: ( ) sim ( ) não

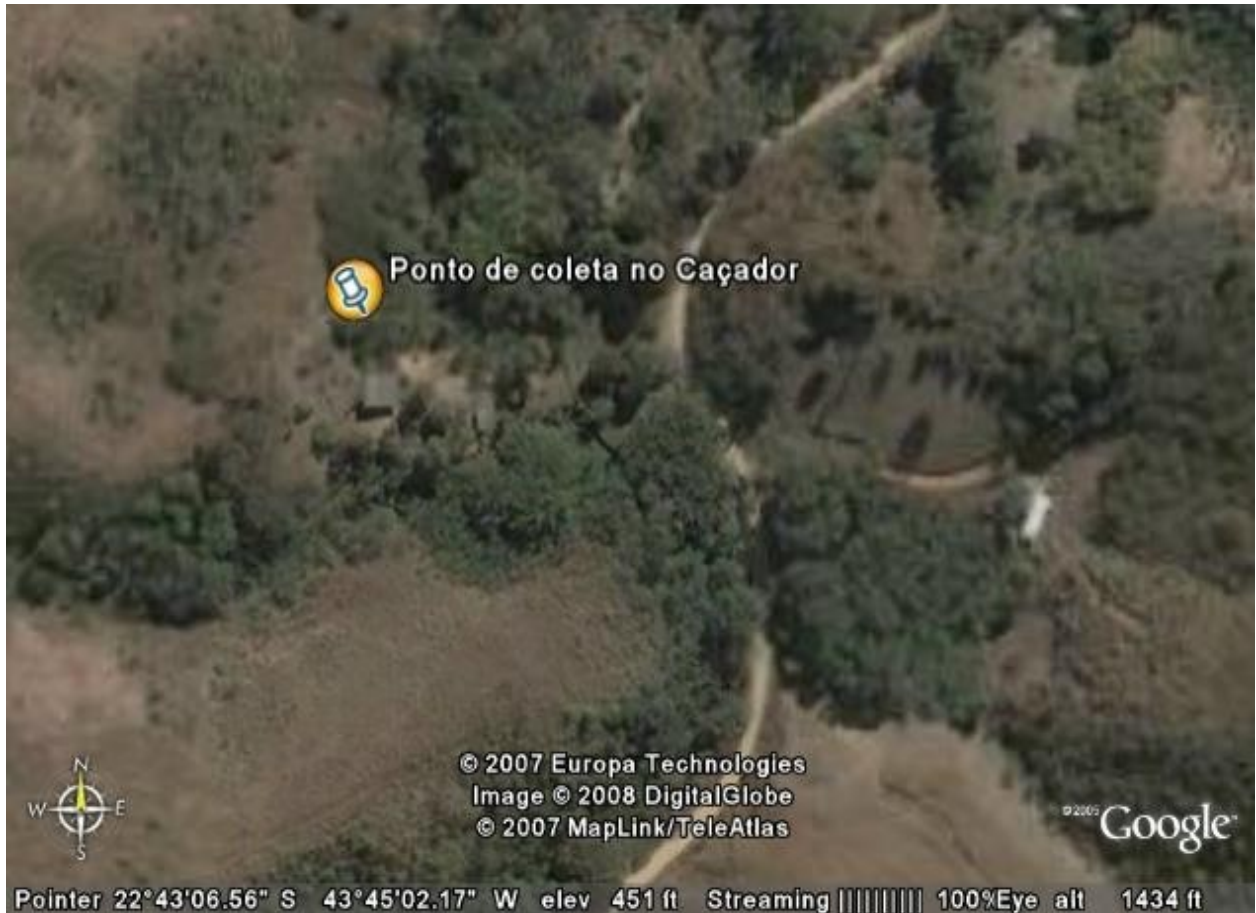


## Anexo E. Mapa limítrofe do Município de Seropédica



Fonte: Google Earth

## Anexo F. Localização da residência do Caçador no Mapa



Fonte: Google Earth

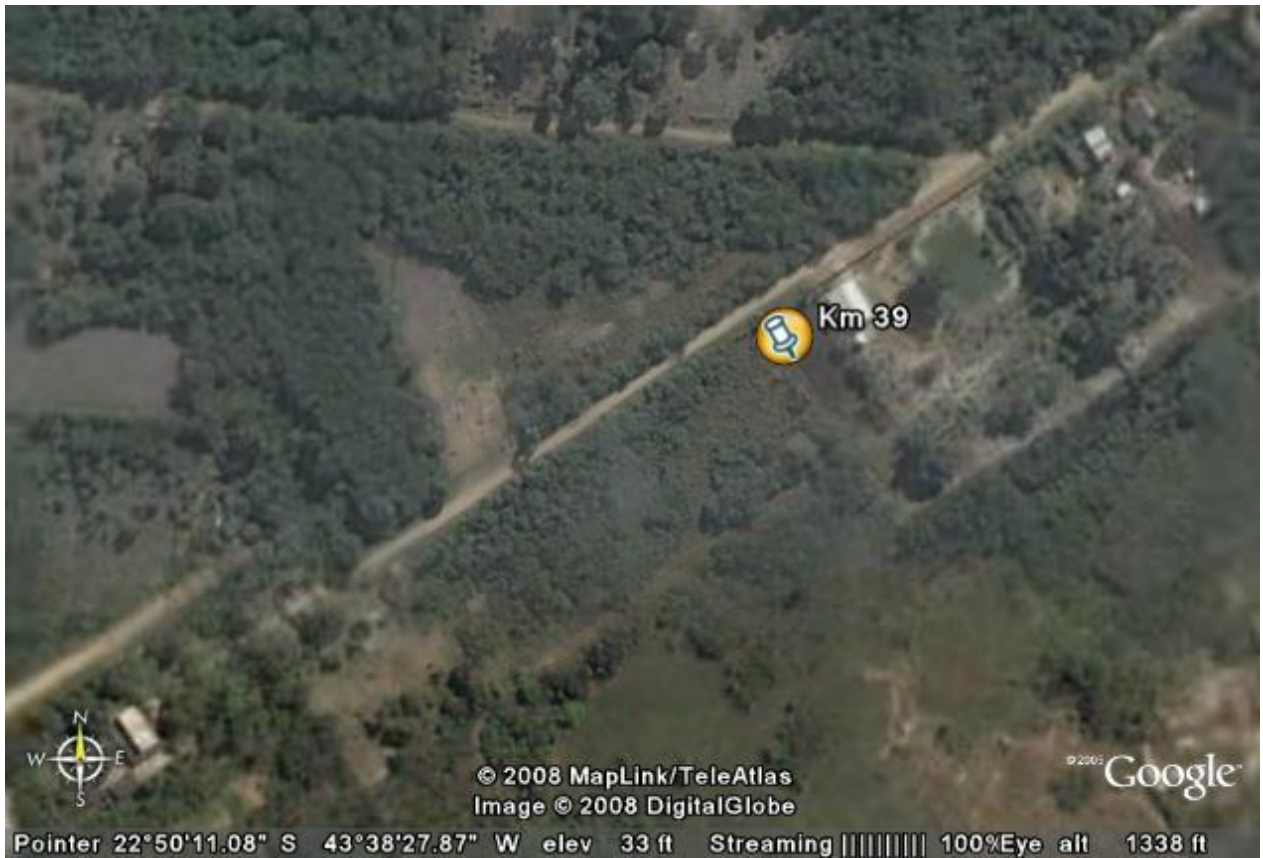
## Anexo G. Localização da residência do Valão da Louça no Mapa



Fonte: Google Earth



## Anexo H. Localização da residência do Km 39 no Mapa



Fonte: Google Earth

## Anexo I. Localização da residência do Km 40 no Mapa



Fonte: Google Earth