

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA E MÉTODOS QUANTITATIVOS

CICLO ENZOÓTICO DE TRANSMISSÃO DA *LEISHMANIA*
(*LEISHMANIA*) *CHAGASI* CUNHA & CHAGAS, 1937
NO ECÓTOPO PERIDOMÉSTICO EM
BARRA DE GUARATIBA, RIO DE JANEIRO - RJ :
ESTUDO DE POSSÍVEIS VARIÁVEIS PREDITORAS

Maria Alice Airosa Cabrera

**Orientadores: Luiz Antonio Bastos Camacho
Mauro Célio de Almeida Marzochi
Ana Maria Jansen**

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção de grau de Magister
Scientiae em Saúde Pública

RIO DE JANEIRO, RJ

1999

Este trabalho foi realizado
no Laboratório de Biologia de
Tripanosomatídeos do Depto
de Protozoologia do I. O. C.
da Fundação Oswaldo Cruz.

RESUMO

Barra de Guaratiba é uma região litorânea do Município do Rio de Janeiro onde a Leishmaniose Visceral Americana é endêmica. É um local onde a soroprevalência canina é 25% e, durante os três anos de estudo na área, foram notificados onze casos humanos. As atuais estratégias de controle não conseguem erradicar a doença provavelmente porque existem na área, fatores que interferem na transmissão da *L.(L.) chagasi* que não estão sendo considerados. A distância da residência do cão à mata, a altitude da residência, o confinamento do cão ao quintal da casa, a visita de gambás (*Didelphis marsupialis*) ao peridomicílio e o sexo dos cães foram avaliadas através de análise uni e multivariada buscando identificar possíveis fatores de risco para a transmissão em cães da *L.(L.) chagasi* em Barra de Guaratiba. Considerou-se que as medidas de controle não constituíram uma variável já que são aplicadas de forma regular em toda a área. Foram examinados sorologicamente 365 cães - 73% da população canina estimada - pela Reação de Imunofluorescência Indireta(RIFI). Após o exame o proprietário respondeu algumas perguntas sobre o cão e sobre a visita de marsupiais ao peridomicílio. Neste momento, altitude da residência foi medida através de um altímetro e distância à borda da mata foi estimada. Armadilhas luminosas foram colocadas, durante 1 ano, em 5 pontos da área onde comprovadamente ocorreu transmissão natural. Vinte e nove por cento dos 31 gambás capturados na área apresentaram sorologia positiva para *L.(L.) chagasi*. Apesar da borrifação semestral com inseticida, de todos os domicílios, 26 exemplares de *Lu. longipalpis* foram encontrados nos pontos de coleta. A distância da residência à mata, a visita do gambá ao peridomicílio e a altitude da residência foram consideradas variáveis preditoras da infecção em cães pela *L.(L.) chagasi* em Barra de Guaratiba e nossos resultados demonstram a existência de um ciclo enzoótico silvestre no local e, embora nos faltem dados para incriminar o gambá (*D. marsupialis*), como reservatório primário, as evidências nos levam a sugerir fortemente que ele represente um papel importante na manutenção da *L.(L.) chagasi* no peridomicílio.

ABSTRACT

Barra de Guaratiba is a coastal area of Rio de Janeiro City where American Visceral Leishmaniasis (LVA) is endemic. The canine serum prevalence is 25% and eleven autochthonous human cases were notified during the study time. The current strategies for the disease control have not resulted in its eradication, probably because, in the area, there are some important factors in the *Leishmania (L.) chagasi* transmission, which were not taken into account. 365 dogs (73% of canine population) were examined by indirect immunofluorescent assay (RIFI). After examination the owners answer some questions about their dogs and about possible visits of marsupials to the yard. During this time the altitude was measured by an altimeter and the distance of the house to the border forest was estimated. Sand flies were captured by CDC (Center of Diseases Control) Light traps during an year in five different points of the area, where was natural transmission been happened. The distance of houses from the forest border, the altitude from the sea level, and the presence of opossums (*Didelphis marsupialis*) in the house-yards as well as the sex of dogs, and its restraint to the household, were assessed by univariate and multivariate analysis, to identify some of the possible risk factors for infection by *L.(L.) chagasi* among dogs in Barra de Guaratiba. Twenty nine percent of 31 captured opossum had positive serology to *L.(L.) chagasi* by indirect immunofluorescent antibody test (IFAT). Despite the insecticide spraying each six months 26 *Lutzomyia longipalpis* were found in two from five capture points. The distance of houses to the forest, the altitude of the residences and the visit of opossums in the yard were predictor variables of infection by *L.(L.) chagasi* among dogs in the area and our data showed the existence of a sylvatic enzootic cycle in Barra de Guaratiba and suggested that the opossum had an important role in the maintenance of *L.(L.) chagasi* in the peridomiciliary environment, although evidence was not strong enough to conclude that it was the primary reservoir of this parasite.

ABREVIATURAS

CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CDC	Center of Diseases Control
IFAT	Immunofluorescent antibody test
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação de Polimerase em Cadeia)
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
kDNA	Ácido Desoxirribonucleico do cinetoplasto
THIR	Reação de imuno hipersensibilidade tardia
IDRM	Intradermo Reaçãod e Montenegro
FNS	Fundação Nacional de Saúde

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Luiz Antonio Bastos Camacho por toda a paciência e discussão deste trabalho.

Ao Dr. Mauro Célio de Almeida Marzochi que além da orientação científica, me apoiou nesta caminhada.

À Dra. Ana Maria Jansen, mais que minha orientadora, pelos ensinamentos, pela amizade, pelo apoio e encorajamento em cada momento difícil.

A todos os colegas do laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, em especial à Samanta Xavier, pelos diagnósticos por imunofluorescência.

Ao mais novo amigo Adelzon Assis de Paula, pela força nos momentos finais deste trabalho.

À equipe de trabalho do CCZ, André Cota Pereira, Renato Pessoa de Araújo e André Correia pelas caminhadas sob o sol nas ladeiras de Barra de Guaratiba.

A Dra. Vanda Coutinho, pela ajuda na fase inicial dos trabalhos.

Ao Dr. Gustavo Aguiar e sua equipe, pelo apoio na identificação dos flebotomíneos.

Ao Dr. Octávio Fernandes e à Regina Helena, pelos diagnósticos por PCR.

Aos meus colegas do mestrado, Luciana Cavallini, Simone dos Santos, Álvaro Matida e Primo Feltres que se tornaram amigos, após tantas horas de discussões estatístico-epidemiológicas.

Ao Dr. Wilson Jacinto de Souza, pelos ensinamentos durante os trabalhos de campo.

A todos os professores do Curso de Mestrado em Saúde Pública por toda a dedicação.

A todos os meus amigos particulares, em especial Leda Magno de Carvalho, por todo o apoio.

Aos cães que padecem de leishmaniose visceral sem os quais seria impossível este estudo: a vocês dedico este trabalho.

Ao meu pai, que sempre está ao meu lado me estimulando;

À minha mãe, que lá no céu, me acompanha em cada etapa cumprida;

Aos meus filhos Bauer e Bruno, pelo carinho e estímulo;

À minha cadela Darsha, pela companhia silenciosa aos meus pés, nas madrugadas

e finalmente

a Deus, pela saúde e pela coragem durante os momentos difíceis.

INDICE

I - REVISÃO DE LITERATURA	
1.1 A DOENÇA.....	3
1.1.1 Histórico.....	5
1.1.2 Classificação.....	6
1.1.3 Epidemiologia	9
1.1.4 O diagnóstico.....	10
1.1.5 Medidas de Controle.....	12
1.2 O PARASITA	
1.2.1 Histórico	13
1.2.2 Taxonomia.....	15
1.2.3 Ciclo evolutivo.....	15
1.3 O VETOR	
1.3.1 Ecologia.....	16
1.3.2 Hábitos Alimentares.....	17
1.4 OS RESERVATÓRIOS	
1.4.1 Reservatórios Domésticos	
1.4.1.1 O homem.....	18
1.4.1.2 O Cão	
1.4.1.3 A doença.....	19
1.4.1.4 O tratamento.....	20
1.4.1.5 A Epidemiologia.....	21
1.4.2 Reservatórios Silvestres	
1.4.2.1 Canídeos Silvestres	23
1.4.2.2 Marsupiais	24
II-A QUESTÃO.....	27
III -OBJETIVOS.....	31
IV - MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 A ÁREA.....	33
4.2 POPULAÇÕES DE ESTUDO.	
4.2.1 Cães.....	35
4.2.2 Gambás (<i>Didelphis marsupialis</i>).	36
4.2.3 Flebotomíneos.....	37
4.2 OS TESTES	
4.2.1 Imunofluorescência indireta.....	39
4.2.2 Polimerase Chain Reaction.....	39
4.4. ANÁLISE DOS DADOS	
4.4.1 Variáveis analisadas (cães)	39
4.4.2 Variáveis analisadas (gambás)	40
4.4.3 Análise dos dados.....	40
V – RESULTADOS	
5.1 Os cães.....	43
5.2 Análise das variáveis.....	45
5.3 O vetor.....	49
5.4 Os gambás.....	51
VI – DISCUSSÃO.....	56
VII- CONCLUSÕES.....	64
VII - REFERÊNCIAS IBLOGRÁFICAS.....	65
VIII – ANEXOS.....	84

I - REVISÃO DE LITERATURA

1. A DOENÇA

As Leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903. Suas formas da doença estão relacionadas à espécie do parasita e diferem em distribuição geográfica, hospedeiros e vetores envolvidos, taxas de incidência e de mortalidade (Marzochi & Marsden,1991; Ashford,1992). Cada forma apresenta um perfil epidemiológico distinto. As formas tegumentares no Brasil, são determinadas por seis espécies, cinco do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) lansonii*, *L.(V.) naiffi*, *L.(V.) shawi*, *L.(L.) amazonensis*, a forma mucosa, pela *L.(V.) braziliensis* e eventualmente pela *L.(V.) guyanensis* e a forma visceral por única espécie, do subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 (Lainson & Shaw,1987; Marzochi & Marzochi,1994).

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença crônica, debilitante caracterizada pela infecção do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) pelo protozoário *L. (L.) chagasi*. A infecção é expressa por episódios febris associados a hepatoesplenomegalia grave, emagrecimento, anemia, micropoliadenia, podendo ocorrer manifestações intestinais e fenômenos hemorrágicos. A doença apresenta um caráter consuntivo que leva a um quadro de emagrecimento progressivo, edema, alterações na queda dos cabelos e outras manifestações associadas (Marzochi et al.,1981).

Estudos descrevem o envolvimento eventual da *L. (L.) chagasi* em lesões cutâneas com ou sem visceralização (Oliveira Netto et al.,1986; Vasconcellos et al.,1993).

Já é conhecida a relação da doença com a desnutrição. Autores relatam que a desnutrição é um importante fator para o desenvolvimento de doenças parasitárias, entre elas a LV (Harisson et al.,1986; Pearson et al,1992). Cerf et al.(1987) buscando a associação entre a desnutrição e a LV, através de um estudo prospectivo realizado no estado da Bahia,

demonstraram que o risco relativo de desenvolver a forma grave da LV era 8,7 vezes maior entre crianças com desnutrição grave a severa do que entre aquelas com um *status* nutricional considerado como normal. Apesar de não se determinar uma relação causal entre esses dois fatores, as evidências sugerem que a desnutrição venha resultar em uma resposta imune deficiente e predisponente. Respostas anormais aos testes intradérmicos de hipersensibilidade tardia (TIHR), são demonstradas em crianças desnutridas (Salimonu et al.,1982).

A relação da LV com a imunossupressão decorrente da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e de outras patologias já é bastante conhecida. Trata-se de uma doença oportunista comum entre pacientes imunossuprimidos de áreas endêmicas (Badaró et al.,1986; Altes et al.,1991; Gradoni et al.,1993). Montalbán et al. (1989), estudando o comportamento da LV entre pacientes imunodeprimidos pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), e por outras causas, observou algumas diferenças: pacientes portadores do HIV não apresentavam elevados títulos de anticorpos pela imunofluorescência durante as recidivas ou ainda no curso crônico da doença, enquanto os pacientes imunodeprimidos por outras causas, mantinham significantes títulos de anticorpos, o que poderia ser explicado pela disfunção dos linfócitos B e T nos portadores do HIV, que compromete a produção de anticorpos específicos. Outra diferença entre os dois grupos de imunossuprimidos é que dentre os pacientes não-HIV, em somente 10% a doença recidiva ou cronifica, enquanto que nos pacientes HIV as recidivas são bem mais frequentes (44%), seguidas da resistência do protozoário ao tratamento pelo antimonial pentavalente. As recidivas e a resistência à droga podem ser atribuídas aos mecanismos celulares de defesa já alterados pela infecção pelo HIV.

1.1 Histórico

A Leishmaniose visceral (L.V.) foi descrita na Grécia em 1835 quando então era denominada “ponos” ou “hapoplínakon”. Foi na Índia em 1869 que recebeu o nome “kala-jwar” que quer dizer febre negra ou “kala-azar” que significa pele negra em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (Marzochi et al., 1981).

Em 1900, William Leishman identificou um protozoário no baço de um soldado que havia vindo a óbito na Índia, em decorrência de uma febre local conhecida como “febre “Dum Dum” ou “Kala-azar”. Suas anotações não foram publicadas até 1903 quando Donovan encontrou o mesmo parasita em outro paciente. Ainda no mesmo ano, Laveran & Mesnil descreveram o protozoário com o nome de *Piroplasma donovani*. Leonard Rogers, em 1904, foi o primeiro a conseguir cultivar o parasita e observou que nas culturas ele era visto sob a forma flagelada. Patton, em 1907 observou as formas leishmanias (amastigotas) em monócitos e as formas leptomonas (promastigotas) no intestino de insetos que eram alimentados sobre pacientes com calazar (*in* Faust et al. 1974).

O primeiro caso no Brasil foi descrito por Migone em 1913. O paciente era um imigrante italiano que vivera muitos anos em Santos, S.P. e após viajar para Mato Grosso, adoeceu, tendo sido diagnosticada a doença no Paraguai (Alencar,1977). Foi Penna (1934), um patologista do Instituto Oswaldo Cruz, quem iniciou os estudos sobre a distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral nas Américas, quando comprovou parasitologicamente, 41 casos dentre as 40.000 viscerotomias examinadas para febre amarela provenientes de vários estados do Brasil.

Em 1953 surgiram numerosos casos da doença, principalmente no Ceará, o que levou à criação da “Campanha contra a Leishmaniose Visceral”. Foram Deane e Mangabeira que em 1954 incriminaram a *Lu. longipalpis* como responsável pela transmissão da *L. (L.) chagasi* e, a partir de 1957,

propuseram o uso do DDT como combate ao inseto vetor, numa tentativa de romper o ciclo da doença.

Em agosto de 1977 foi diagnosticado o primeiro caso autóctone de Leishmaniose Visceral no Rio de Janeiro. Era um homem, de 55 anos, residente na localidade de Rio de Prata, no bairro de Bangu, subúrbio da cidade (Sabroza et al.1978).

Atualmente a doença está instalada de forma endêmica em vários bairros cidade do Rio de Janeiro, entre eles Campo Grande, Realengo, Senador Camará (Marzochi et al.1985) e, a partir do início da década de 90, em Barra de Guaratiba.

1.2 Classificação

Com base no perfil clínico - epidemiológico da Leishmaniose Visceral (LV) Hommel (1978), a classifica em cinco tipos:

a) tipo indiano: antroponose determinada pela *L. donovani* e transmitida pelo *Phlebotomus argentipes*, encontrado no domicílio e peridomicílio. Caracteriza-se por surtos frequentes, alta taxa de mortalidade e por acometer crianças, adolescentes e adultos jovens. Ocorre no Afeganistão, Iraque, Irã, Jordânia, Israel, Líbano, Oman, Arábia Saudita, Síria, Yemen e Bengala (WHO,1996);

b) tipo africano: antroponose clínica e parasitologicamente semelhante ao tipo anterior, no que diz respeito à idade dos pacientes e o comportamento da doença na população. Esse tipo pode ser causado também pela *L. donovani* ou ainda pela *L infantum*. As espécies de flebotomos envolvidas na transmissão são o *P. orientalis*, *P. martini* e *P. celiae* e as áreas de transmissão neste caso são as florestas e os locais próximos a cupinzeiros. (WHO,1996);

c) tipo mediterrâneo: zooantroponose que acomete no peridomicílio principalmente o cão, e crianças com idade abaixo de 5 anos. O protozoário envolvido é a *L. infantum* que mantém também num ciclo silvestre entre chacais e raposas. O parasita é transmitido ao hospedeiro vertebrado por várias espécies de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* sendo a principal espécie, o *P. perniciosus*. A transmissão acontece em situações rurais. Ocorre no Mediterrâneo, Oriente Médio e Sul da Rússia (WHO,1996);

d) tipo chinês: outra zooantroponose rural onde a *L. infantum* circula entre cães, procionídeos e o homem (em sua maioria crianças), transmitida pelas espécies de flebótomo, *Phlebotomus chinensis*, *P. longiductus* (no ambiente peridoméstico) e o *P. major wui*. Ocorre no nordeste da China (WHO,1996);

e) tipo americano: antroponose em processo de urbanização. No Brasil casos da doença já são registrados na periferia de grandes cidades como Belo Horizonte, Teresina, São Luís, Fortaleza e Rio de Janeiro (Marzochi,1994; Tesh,1995). A *L. (L.) chagasi* acomete, em geral, crianças até 15 anos e é transmitida pela *Lutzomyia longipalpis*. Na Colômbia a *Lu. evansi* é considerada vetor secundário. No peridomicílio, o parasita circula entre cães, flebátomos e humanos enquanto na floresta raposas, flebátomos e marsupiais parecem estabelecer outro ciclo. Ocorre em vários países da América Central e do Sul (WHO,1996).

Embora o termo calazar (kala = negra; azar = pele) seja utilizado indiscriminadamente e considerado como sinônimo de Leishmaniose visceral, somente o tipo indiano provoca o escurecimento da pele.

Baseados nas manifestações clínicas e na evolução da doença a partir do momento e local da inoculação do parasita pelo vetor envolvido na transmissão, Marzochi & Marzochi (1994). propuseram a mais recente

classificação clínica das Leishmanioses. Dentro dela, a L.V. apresenta 5 formas clínicas:

I – Forma Inaparente

Caracteriza-se pela ausência de sinais e sintomas clínicos, presença de anticorpos anti - leishmania e teste de imuno hipersensibilidade tardia (TIHR) positivo. Esta forma pode estar relacionada com a fase inicial da doença, involução ou auto - resolução.

II- Forma Leve

Caracteriza-se pela ausência de sintomas ou, quando ocorrem, são difusos, dificilmente associados com a doença. Pode ocorrer uma discreta hepatoesplenomegalia. Esta forma pode evoluir para a forma moderada ou para a assintomática. O TIHR específico geralmente positivo e a sorologia também. Dificilmente é encontrado o parasita nos tecidos.

III - Forma Moderada

Caracterizada por uma história clínica de febre, diarreia ou ocasionalmente podendo ocorrer outras manifestações. Geralmente é observado um estado clínico normal, discreta ou moderada hepatoesplenomegalia, sorologia positiva e TIHR ocasionalmente positivo. Evidência do parasita na medula óssea e em outros órgãos.

IV – Forma grave

Geralmente associada a um diagnóstico tardio onde o paciente refere uma história clínica com meses de evolução. É observada baixa condição clínica, perda de peso, febre, palidez, diarreia, aumento do volume abdominal e outras manifestações. São encontradas hepatoesplenomegalia, hipoalbuminemia, alterações das funções hepáticas e renais. A progressão da doença leva à falência cardíaca, edema evoluindo para anasarca, caquexia, icterícia e infecções bacterianas secundárias. Os títulos dos anticorpos estão bastante elevados e o TIHR é negativo. A morte geralmente sobrevém de uma septicemia ou por hemorragia.

1.3 Epidemiologia

A Leishmaniose Visceral Americana (L.V.A.) se manifesta nas populações tropicais e subtropicais da América Latina sob forma endêmica. Os surtos são decorrentes de resposta imune precária por parte dos hospedeiros (Grimaldi & Tesh,1993) ou de situações eco – epidemiológicas que favoreçam o aumento da quantidade de vetores infectados (Tesh & Papaevangelou, 1977).

A epidemiologia da L.V.A. vem se alterando através do tempo. Inicialmente a doença mantinha um perfil rural, de transmissão peridomiciliar, onde as crianças eram as mais acometidas, daí denominada “calazar infantil”. Degradações ambientais, migrações de populações carentes para a periferia dos grandes centros, fixando-se em locais sem infra estrutura de saneamento básico e em promiscuidade com animais domésticos, contribuem para o processo de urbanização da doença. Tudo isso acrescido da adaptação de determinados flebotomíneos a ambientes alterados pelo homem (Gomes,1994). Aos poucos a doença veio adquirindo característica peri urbana e hoje se encontra em plena urbanização estando presente em bairros bastante urbanizados de grandes cidades, entre elas o Rio de Janeiro – RJ, Teresina - PI, São Luís - MA, Belo Horizonte e Montes Claros – MG.(Marzochi et al.,1994; Tesh,1995).

Atualmente a LVA no Brasil vem apresentando um caráter endêmico - epidêmico, mantendo uma média anual entre 3 a 4 mil casos novos. Tais casos distribuem-se de Roraima (foco recente) ao Paraná.

Em áreas de endemia antiga, são acometidas, em geral, crianças com idade inferior a dez anos ou eventualmente adultos portadores de outras patologias onde acontece a imunossupressão. Em áreas onde a endemia é

recente, no entanto, pode ser observada uma diferença menor na frequência do acometimento entre adultos e crianças. (Marzochi et al.,1985a) .

1.4 O diagnóstico

A suspeita clínica da LVA não se baseia somente na sintomatologia, uma vez que esta é pouco sugestiva e pode ser confundida com outras patologias tais como malária, esquistossomose hepatoesplênica, doença de Chagas, brucelose, febre tifóide e outras. Evidências de ordem epidemiológica como o caso ser procedente de área endêmica, características fisiográficas da região, tipo de inseto predominante no local, ou existência de cães suspeitos, são importantes para a caracterização do quadro clínico (Marzochi et al.,1981).

O diagnóstico definitivo da LVA se faz a partir da visualização da *L.(L.) chagasi* no material suspeito. O parasita pode ser demonstrado através de métodos direto ou indireto: no método direto o parasita é visualizado sob a forma amastigota em preparações microscópicas realizadas com fragmentos ou esfregaços de órgãos do SFM corados pelo Giemsa ou Leishman ou pela inoculação em hamster do material suspeito e posterior punção ou biópsia dos órgãos do SFM. Na forma promastigota, pode ser observado em culturas de material de punção ou biópsia de órgãos linfóides em meios próprios como Neal, Novy & Nicolle (NNN), Liver Infusion Triptose (LIT), Schneider, entre outros. Os métodos indiretos (sorologia) são utilizados para a confirmação da suspeita clínica. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) vem sendo usada como rotina (Marzochi et al.;1981, Dye et al.;1993) em inquéritos sorológicos em cães em áreas endêmicas. Estudos experimentais mostram que não existe diferença significativa entre as espécies *L.(L.) chagasi*, *L.(V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana* utilizadas como antígeno (Costa et al.,1991). Independente do antígeno empregado a reação fornece, também em cães, (Coutinho et al.,1985; Costa et al.1991,) resultado cruzado com outros tripanosomatídeos,

conforme ocorre na espécie humana (Camargo & Rebonato, 1969). No entanto, os títulos altos sugerem infecção por *L.(L.) chagasi* (Marzochi et al. 1981). O teste imunoenzimático Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) também tem sido amplamente utilizado em inquéritos. Alguns autores admitem que o teste apresente maior sensibilidade que a RIFI entretanto com menor especificidade (Mohamed et al.;1986)

A intradermorreação de Montenegro, reação de hipersensibilidade tardia, é bastante empregada no controle da cura da LVA (Marzochi et al,1995; Reed et al.,1996).

As provas moleculares de detecção e identificação das “leishmanias” vêm sendo amplamente empregadas no diagnóstico da doença e estudos taxonômicos (Cupollillo et al.1994; Degrave et al., 1994).

A partir do advento da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), a detecção do parasita em tecidos tornou-se sensível e eficaz. Rodgers et al. (1990) mostraram que a técnica de PCR é capaz de detectar o kDNA equivalente a um parasita. Num estudo experimental com 25 cães comprovadamente infectados para *Leishmania*, tanto por cultura como por inoculação em hamster e 35 animais controles, os autores comprovam 100% de sensibilidade e 100% de especificidade deste teste (Ashford et al.,1995). Outros autores, entretanto, afirmam que, este teste não garante 100% em sensibilidade e especificidade. A maior causa de falsos positivos (devido à alta sensibilidade) é a contaminação com outras amostras ou ainda com “amplicons” (produtos amplificados pós PCR). Resultados falso negativos são decorrentes da possível presença no material em teste de substâncias que podem inibir total ou parcialmente a reação de amplificação pelo DNA polimerase (Degrave et al,1994).

O sucesso do processo de hibridização na caracterização das espécies de *Leishmania* deve-se principalmente à correta seleção dos clones contendo numerosas seqüências repetidas e às provas de discriminação

entre os complexos Viannia e Leishmania. Essa discriminação requer a seleção de seqüências específicas de DNA recombinante (Barker,1989).

1.5 Medidas de controle

As medidas de controle da LVA preconizadas pela Organização Mundial de Saúde são: i) busca ativa de doentes e encaminhamento para diagnóstico e tratamento; ii) inquérito sorológico canino; iii) apreensão e eliminação sumária dos cães soropositivos; iv) borrifação sistemática de inseticida residual nos domicílios e peridomicílios e v) programas de educação comunitária (WHO,1996).

No Brasil, a Fundação Nacional de Saúde (FNS) é um dos órgãos do Ministério da Saúde responsáveis pelo Programa de Controle das Leishmanioses. É esta instituição que promove as ações de campo. Agentes da FNS são lotados nas áreas endêmicas onde trabalham em caráter permanente.

Uma vez detectado o paciente suspeito, seja por busca ativa ou pelo mesmo procurar o órgão de saúde local, este é encaminhado a uma unidade de saúde onde é coletado sangue para testes sorológicos. Estando o resultado sorológico positivo, o paciente é removido para uma unidade hospitalar de referência, onde há a confirmação do resultado sorológico através de pesquisa do parasita em material obtido por punção esplênica ou de medula óssea. Confirmada a infecção o paciente será tratado e após receber alta, deverá ser acompanhado pelo período de um ano.

Por ocasião do diagnóstico, os agentes de saúde retornam à residência do paciente e coletam sangue das pessoas lá residentes. É realizado também inquérito sorológico canino nos arredores do local onde o caso foi diagnosticado. Animais sororeagentes são removidos e sacrificados.

O controle dos cães nas áreas endêmicas costuma ser realizado de forma permanente. O sangue é colhido em papel de filtro através de uma pequena punção na orelha. O método mais utilizado nos inquéritos

sorológicos é a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Animais com título sorológico pela RIFI igual ou superior a 1:40 são considerados reagentes pela Fundação Nacional de Saúde – FNS.

Inseticidas residuais - geralmente piretróides foto estáveis - são borrifados nas paredes do domicílio (para reduzir as espécies endófilas), além de galinheiros, chiqueiros e estábulos.

Além destas medidas, programas educativos são mantidos nas áreas de transmissão. Profissionais de saúde treinados visitam escolas, associações de moradores, orientando a população sobre sintomas da doença e métodos de prevenção.

Apesar do grande esforço realizado na execução das medidas tradicionais de controle, não se consegue a erradicação da doença. Acreditamos que, além da falta de continuidade das ações, observada em algumas áreas, existam outras variáveis que não estão sendo consideradas no processo de transmissão do parasita e conseqüentemente, no planejamento das ações de controle da L.V.A.

2. O PARASITA

2.1 Histórico

A Leishmaniose Visceral (L.V.) no Mediterrâneo é causada pela *Leishmania (L.) infantum* e transmitida por algumas espécies do gênero *Phlebotomus* (W.H.O.1996). Na América Latina a doença recebe o nome de Leishmaniose Visceral Americana (L.V.A.) e é causada pela *L. (L.) chagasi* ou como era anteriormente denominada, *Leishmania donovani*. Tanto a *L. infantum* como a “antiga” *L. donovani* provocam patologia similar e são capazes de infectar várias espécies de animais de laboratório. Quando Cunha e Chagas, em 1937, falharam ao infectar animais com *L. donovani* isolada de casos de LV provenientes do estado do Pará, concluíram que se tratasse de uma nova espécie, que denominaram *Leishmania chagasi*. Em

1938, entretanto, Cunha conseguiu infectar hamsters, cães e macacos, verificando que as conclusões anteriores foram atribuídas a culturas não viáveis. Com base nas características bioquímicas das culturas das duas espécies, no ponto térmico de morte e no efeito lítico da bile sobre os dois parasitas, Senekjic (1944) reforça as idéias de Cunha, lançando a *L. (L.) chagasi* como sinônimo da *L. (L.) donovani*.

Posteriormente Cunha (1942), aprofundando seus estudos em sorologia, mostrou que os testes de absorção e aglutinação sugeriam que a *L. (L.) chagasi*, agente causador da LVA era idêntica à *L. infantum* do Mediterrâneo.

Existe ainda hoje, entre os pesquisadores, uma grande controvérsia em relação a essas duas espécies. Muitos acreditam que, apesar de nomes diferentes, esses dois protozoários sejam de fato uma só espécie (Grimaldi & Tesh, 1993; Cupolillo, 1994), enquanto outros consideram espécies distintas (Lainson & Shaw, 1979; Shaw, 1993). Embora não descartem a teoria de que a *L. infantum* possa ter alcançado as Américas através dos porões dos navios negreiros vindos da Europa, Lainson & Shaw (1979) observam que os escravos eram oriundos da costa oeste da África, onde a LV não existe. Mesmo que alguns desses homens tivessem sido capturados na costa leste, o perfil epidemiológico da LV africana é bastante distinto da LVA principalmente no que tange tanto à idade dos pacientes como à importância do cão como reservatório. Os mesmos pesquisadores argumentam que, quanto à hipótese de que os próprios colonizadores tenham trazido a *L. infantum* do Mediterrâneo, a taxa de infecção dos flebótomos pelo homem é bastante pobre. Pelo fato de serem péssimos reservatórios, seria pouco provável que os colonizadores tenham sido capazes de disseminar o parasita no Novo Mundo. Lainson (1989) sugere ainda que a doença tenha sido introduzida no Novo Mundo através dos cães que acompanhavam colonizadores europeus.

2.2 Taxonomia

Embora a primeira classificação taxonômica das leishmanias tenha sido realizada por Ross (1903), nova revisão e reagrupamento das espécies foi feita por Lainson e Shaw (1979).

Outra revisão foi proposta agrupando as espécies segundo padrões bioquímicos (Kreutzer et al,1987).

A posição sistemática da espécie *Leishmania chagasi* proposta por Levine et al.(1980) é a seguinte:

Reino: Protista (Haekel,1886)

Subreino: Protozoa (Goldfuss,1817)

Filo: Sarcomastigophora (Honiberg & Balamuth,1963)

Subfilo: Mastigophora (Diesing,1866)

Classe:Zoomastigophora (Calkins,1909)

Ordem: Kinetoplastida (VickKerman,1976)

Subordem:Trypanosomatina (Kent,1880)

Família: Trypanosomatidae (Grobben,1905)

Gênero: Leishmania (Ross,1903)

Subgênero: Leishmania (Saf'Janova1982)

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

2.3 Ciclo evolutivo

Durante o repasto sangüíneo sobre o hospedeiro infectado, são ingeridas formas amastigotas pela fêmea do flebotomíneo. Nas primeiras vinte e quatro horas as formas ingeridas, transformam-se em promastigotas, que se reproduzem rápida e intensamente através de divisão binária. Inicialmente, o sangue ingerido juntamente com as formas em divisão vão se localizar no intestino médio do inseto, protegidos pela matriz peritrófica onde permanecem durante 3 dias. Após esse tempo, ocorre a degeneração da

matriz peritrófica e as formas promastigotas migram para o segmento anterior do tubo digestivo onde sofrem mais divisões e diferenciação tornando-se infectantes (Marzochi et al.1981). Durante os próximos dias os parasitas migram para a região do esôfago, faringe e válvula estomodeal. A intensa multiplicação provoca uma obstrução mecânica, dificultando a ingestão de sangue pelo inseto (Lainson & Shaw, 1978). Após cada novo repasto sanguíneo o relaxamento dos músculos responsáveis pela sucção provoca o refluxo dos parasitas, infectando o novo hospedeiro.

Ao serem inoculadas as formas promastigotas, ainda no local de inoculação, são endocitadas pelos macrófagos. Dentro do macrófago, assumem a forma amastigota e, através de mecanismo de escape, passam a multiplicar-se por divisão binária até provocarem o rompimento da célula, caindo no espaço intercelular, vindo a serem endocitadas por novos macrófagos e células do Sistema Fagocítico Mononuclear (S.F.M.). Assim, os parasitas deixam a pele, sendo disseminados para o S.F.M., provocando então as lesões que vão caracterizar a doença.

3. O VETOR

3.1 Ecologia

Por ser obrigatória a passagem da *L. (L.) chagasi* por um hospedeiro invertebrado, no caso um flebótomo, é considerado um parasita digenético. “Flebótomo” é como são designados pequenos insetos alados da Ordem Diptera e da família Psychodidae. Em condições naturais a *L. (L.) chagasi* é transmitida ao hospedeiro vertebrado, pela inoculação das formas infectantes através picada da fêmea do flebótomo *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 infectada através de repasto sanguíneo anterior (Rey, 1991). As fêmeas adultas vivem em torno de vinte dias e somente elas são hematófagas. O sangue ingerido vai auxiliar na maturação dos ovários. Seus ovos são depositados em fendas, pedras, raízes tabulares e sobre substrato

orgânico com pouca umidade, onde ficam aderidos devido à substância viscosa que acompanha a desova (Rey,1991). A postura realiza-se 8 dias após o repasto sanguíneo. São encontrados no ambiente silvestre (Lainson et al.,1990) assim como no peridomicílio principalmente em abrigos de animais domésticos (Souza et al.,1981). Frequentam também o interior do domicílio.

Até pouco tempo, a *Lu. longipalpis* era a única espécie de flebotomíneo relacionada com a transmissão natural da *L. (L.) chagasi* no Brasil. Estudos recentes (Santos et al.,1998) porém, incriminaram também a *Lu. cruzi* como vetor do parasita em Corumbá (MS). Marzochi et al.(1994) sugeriram uma associação com a *Lu. intermedia* em áreas litorâneas do Município do Rio de Janeiro. Na Colômbia, a *Lu. evansi* já foi considerada vetor secundário na transmissão da doença (Travi et al.,1990).

Existe uma variação sazonal da densidade de *Lu. longipalpis*. Apesar da espécie ocorrer durante todo o ano, é mais abundante nos períodos de abril a junho e de outubro a dezembro (Sherlock,1996).

3.2 Hábitos alimentares

A *Lu. longipalpis* tem hábitos crepusculares e noturnos, podendo picar o homem tanto no domicílio como fora dele (Deane & Deane, 1962). Sua atividade começa logo ao entardecer, atingindo seu pico entre 21 e 23 horas e desaparece em torno das 5 horas da manhã. Dentro das residências, fêmeas podem ser encontradas mais tarde nas paredes sombrias dos quartos ou sobre quadros e frestas (Sherlock & Guitton,1969b). Em situação de laboratório, o inseto se alimenta a qualquer hora do dia (Sherlock & Sherlock,1961). Somente as fêmeas são hematófagas apesar de também alimentarem-se de sucos vegetais, como fazem regularmente os machos (Rey,1991).

Estudos demonstram a existência de uma substância (maxadila) na saliva da *Lu. longipalpis* que tem efeito inibidor da atividade do macrófago em apresentar o antígeno parasita às células T. Esse material salivar diminui a habilidade dessas células em fabricar o peróxido de hidrogênio em resposta a um estímulo do interferon gama. (Titus et al.,1988).

A fêmea de *Lu. longipalpis* é bastante eclética quanto às suas preferências alimentares. No domicílio e peridomicílio alimenta-se do homem, do cão, da galinha, de equídeos, de suínos e caprinos (Sherlock & Guitton,1969a).São geralmente encontradas em chiqueiros, galinheiros e estábulos(Souza et al.,1981). Como habita também o interior da floresta (Lainson et al.,1990), realiza seu repasto sangüíneo em marsupiais (Corredor et al.,1989, Travi,1996) e canídeos silvestres (Deane & Deane,1954a; Lainson et al.,1990) tornando possível a manutenção da *L. (L.) chagasi* através de um ciclo enzoótico.

4. OS RESERVATÓRIOS

4.1 Os Reservatórios domésticos

4.1.1 O homem

Deane & Deane (1954d) já salientavam a importância do homem, sintomático ou não como reservatório da *L. (L.) chagasi*. Apesar da escassez de protozoários na pele aparentemente normal do indivíduo doente, o casal de pesquisadores conseguiu infectar 15% dos flebótomos alimentados sobre os doentes. Posteriormente, Deane (1956) concluiu que, pela pouca quantidade de parasitas na pele, o homem não é um bom reservatório e raramente serviria de fonte de infecção para o flebótomo em comparação com os abundantes parasitas encontrados na pele dos cães e raposas. Em contrapartida, Badaró et al. (1986b) afirma que nas áreas endêmicas, entre os infectados, indivíduos assintomáticos são muito freqüentes e aponta uma

razão de seis indivíduos assintomáticos para um com sintomas. Em Barra de Guaratiba, o observado por Roçado (1997) foi uma proporção de 2,8% de indivíduos assintomáticos entre os 360 indivíduos examinados (aparentemente sadios), fato que confirma – como Deane propôs - que a importância da transmissão da LVA pelo homem é bastante reduzida.

4.1.2. O cão doméstico (*Canis familiaris*)

4.1.2.1. A doença

Há muitos anos Laveran (1917) já distinguia duas formas na evolução do calazar canino: uma forma aguda, levando o animal a óbito em poucos meses e outra forma latente, com duração aproximada de 2 anos, podendo evoluir para a cura.

Lanotte et al. (1979) realizando estudos imunoclínicos em cães de uma área endêmica na França para *L. infantum*, também observaram que a doença se manifestava de duas formas: a primeira (patente) que se caracterizava por animais com sintomatologia víscero - cutânea e alta taxa de anticorpos. A segunda forma (latente), quando os animais não apresentavam sintomas e a taxa de anticorpos era baixa. Este último tipo de manifestação ainda poderia apresentar dois desfechos distintos: a conversão do perfil assintomático em doença ou a evolução para a cura espontânea. A forma patente manifesta-se através de uma clínica bastante semelhante à humana, com febre irregular, anemia e emagrecimento progressivo chegando , na fase terminal, a uma caquexia intensa. Os sinais mais evidentes estão relacionados com o emagrecimento e as alterações cutâneas e de fâneros: alopecia focal ou generalizada, pequenas lesões crostosas, isoladas ou concêntricas, descamação e dermatite furfurácea que acompanham a depilação, alongamento das unhas (onicogrifose) e, eventualmente, queratite intersticial após episódios de conjuntivite (Alencar,1959; Lanotte et al.,1979, Marzochi et al.,1985b). Segundo Hommel

(1978) a depilação é explicada pela ação do parasita no folículo piloso ou devido a um distúrbio do metabolismo do ácido pantotênico, decorrente da lesão hepática, ou ainda, pela deposição dos imunocomplexos existentes na membrana basal da pele, induzindo um processo auto imune desencadeador da alopecia. O alongamento das unhas costuma ser explicado pelo estímulo do parasita na matriz ungueal (Letosquard & Donatien,1938). Entretanto, o estado de apatia em que o animal permanece durante a doença dificulta o desgaste natural das unhas (Marzochi et al.,1985b). A hepatoesplenomegalia e a adenopatia generalizada são conseqüentes do acometimento do SFM (Marzochi et al,1985b). De acordo com Adler (1964), o emagrecimento é atribuído ao desequilíbrio proteico que levaria a uma intensa albuminúria. Catarsini (1981), no entanto, explica este fenômeno pelo comprometimento da mucosa digestiva. A explicação para os outros sinais clínicos é menos conclusiva (Hommel,1978),

4.1.2.2 O tratamento

A tentativa de tratamento pelo antimonial pentavalente (Glucantime) no cão não mostra sucesso (Alencar,1959; Alvar et al.1994). Marzochi et al.,(1985b) estudaram 8 cães naturalmente infectados oriundos de um foco de LVA no Rio de Janeiro. Os autores submeteram os animais ao tratamento com a droga acima e observaram a manutenção dos anticorpos circulantes assim como o agravamento dos sintomas mesmo em animais assintomáticos. O mesmo foi constatado por Manciante et al.,(1988) que verificou que 90% dos animais assintomáticos tratados com este quimioterápico, ao fim do tratamento, tornou-se oligosintomático. O aumento da infectividade para o flebotomíneo algum tempo após o final do tratamento também foi constatada (Marzochi et al.,1985b, Gradoni et al.,1987). Baixas doses do medicamento ou ainda curso menor de tratamento podem levar à resistência do protozoário (Gramiccia et al. 1992). Medicamentos com outros

princípios ativos tais como os do grupo das diaminas aromáticas (Berenil) têm comprovada ação sobre outros protozoários tais como Babésias, Piroplasmas e Trypanosomas mas são utilizados com muita cautela devido às fortes reações adversas. Apesar de sua conhecida toxicidade esses medicamentos vêm sendo investigados quanto a sua eficácia nas leishmanioses. O efeito farmacológico desse agente é dado pela sua interação com o DNA (Portugal, 1994). O Alopurinol foi outra droga estudada que demonstrou a supressão dos sintomas clínicos sem no entanto ter conseguido a redução do nível de anticorpos circulantes (Liste & Gascon 1995). São ainda necessários maiores estudos no campo da terapêutica para que se consiga um medicamento que não somente livre o cão da doença porém o torne não-infectante para o flebotomíneo, desarticulando um elo na cadeia de transmissão.

4.1.2.3 Epidemiologia

O cão é considerado o mais importante reservatório do parasita no ambiente peridoméstico, uma vez que as espécies de canídeos selvagens incriminadas por Deane & Deane (1954) e Lainson et al (1990) detêm sua importância no ecótopo silvestre, não mantendo estreito contato com o peridomicílio.

Uma vez estabelecido que o cão é a principal fonte de infecção para o homem e agente de dispersão da doença, a Organização Mundial de Saúde preconiza seu sacrifício em áreas endêmicas, desde que neste se encontre parasito ou que seja sorologicamente positivo (WHO,1996).

A correlação entre a condição clínica do cão e sua infectividade vem sendo estudada há algum tempo. Deane & Deane (1955), no Ceará, encontraram dentre os cães assintomáticos, somente 8% portadores de formas amastigotas na pele. Vexenat et al. (1994) no Piauí, utilizando a prova Lmet DNA, encontraram mais de 30% dos cães assintomáticos com o

parasita na pele. Este fato demonstra que, com o advento de testes mais sensíveis a importância do cão como reservatório doméstico vem sendo reforçada. Molina et al.(1994) entretanto observaram que existe uma importante variação na porcentagem de insetos que naturalmente se alimentam sobre os cães estudados. Acreditam estes autores que algum fator desconhecido determine o grau de atração para o flebótomo, e que esta atração não está relacionada com o estado clínico.

Pinelli et al.(1994), estudando um grupo de cães da raça beagle infectados com *L. infantum* também observaram duas formas de reação: i) os animais que se mantiveram assintomáticos e ii) os animais que apresentaram manifestações clínicas da L.V. Para cada caso foram observadas respostas celular e humoral bastante distintas. No caso dos cães que permaneceram assintomáticos (considerados animais resistentes), uma forte resposta linfocitária proliferativa aos antígenos leishmaniais, sugeriam que, como no homem e no rato, a resposta é mediada por células T . No segundo caso (considerados animais suscetíveis), não houve proliferação de linfócitos *in vitro*, fato que também coincide com o homem e o rato (Haldar,1983). Pinelli et al. (1994) mostram ainda que, os cães resistentes produzem baixos títulos (igual ou menor que 1:80) pela RIFI enquanto os suscetíveis apresentam títulos elevados (1:320 ou mais). Neste estudo os autores identificam marcadores da progressão da doença e reforçam que a diversidade imunológica encontrada pode representar importante diferença em situação de campo. Acreditam que o seguimento desses animais nas áreas endêmicas podem elucidar importantes dúvidas sobre o comportamento da doença e suas implicações na epidemiologia da mesma.

Estudos ainda colocam em discussão a retirada dos cães no controle da doença (Evans et al., 1992; D'Oliveira Jr.et al. 1997). Dietze et al.(1997), estudaram o impacto da retirada dos cães no Espírito Santo sobre a transmissão da LVA. Num estudo prospectivo de intervenção, foram

escolhidas três cidades separadas através de barreira geográfica (montanhas), todas endêmicas para LVA. Em duas delas, após inquérito sorológico, promoveram a retirada de todos os cães soro reagentes. Na cidade controle, mantiveram-se todos os cães. Durante 12 meses as taxas de soropositividade humanas foram medidas pelo teste Dot-Elisa e aumentaram de 14% para 54% na cidade controle e de 15% para 54% nas cidades sob intervenção. Paranhos Silva et al.(1998), estudando, numa coorte de cães, o efeito da migração sobre a incidência da LVA no estado da Bahia, demonstraram que apesar de terem sido eliminados todos os cães soropositivos da área de estudo, o número de notificações da doença em humanos nos anos seguintes foi 5, 25, 123 e 142. Estes estudos vêm demonstrando, que o critério de eliminação do cão necessita ser reavaliado .

4.2 Reservatórios silvestres

4.2.1 Canídeos silvestres

A *L. infantum* assim como a *L. (L.) chagasi* têm a capacidade de infectar e produzir doença em canídeos, sejam eles domésticos ou silvestres. Deane & Deane (1954a) demonstraram essa capacidade ao encontrarem o parasita em cães e nas raposas da espécie *Lycalopex vetulus* (Carnivora, Canidae) tanto sadios como doentes. Tal fato não aconteceu, entretanto quando Lainson & Shaw (1969), encontraram formas amastigotas do protozoário *Leishmania donovani* nos rins na espécie *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) na Amazônia. Numerosos exemplares foram examinados posteriormente pelos pesquisadores em 1987 e 1990 sem que nenhum demonstrasse qualquer sinal da doença, fato que poderia sugerir, a existência de algum fator que viesse a interferir na capacidade de transformar a infecção em doença ou ainda sugerir com esta espécie de canídeo, uma relação parasita-hospedeiro bem sucedida.

Alguns autores (Courtenay et al.,1996) entretanto, questionam a incriminação da espécie *Lucalopex vetulus* como reservatório da *Leishmania chagasi*. Acreditam eles, que Deane e Alencar equivocaram-se na classificação do canídeo infectado, tendo o parasita sido encontrado, na verdade, na espécie *Cerdocyon thous*.

4.2.2 Marsupiais

Marsupiais vêm sendo encontrados infectados por várias espécies de protozoários flagelados, sendo que os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são os mais relevantes em Saúde Pública (Sherlock,1984;Travi et al.,1994).

Em nosso estudo, temos especial interesse na espécie *Didelphis marsupialis* (Marsupialia, Didelphidae) que é a espécie de ocorrência na cidade do Rio de Janeiro e freqüentemente vem sendo apontada como passível de infecção pela *L. (L.) chagasi* (Corredor et al., 1989; Travi et al., 1994; Travi et al.1996)

Estes animais costumam ser encontrados com facilidade em florestas alteradas pela ação antrópica. São vistos com freqüência nos quintais das residências situadas nas bordas das matas visitando galinheiros e latas de lixo em busca de alimento. Apresentam hábitos crepusculares e noturnos. Escondem-se em ocos de árvores onde passam o dia dormindo. Apesar de nômades, seu *home range* fica em torno de 2,5 Km (Novak,1991). Seu comportamento sinantrópico e o reduzido *home range* tornam possível o compartilhamento dos vetores e parasitas, com o homem e o cão (Travi et al.,1994). Estudos colocam estes animais na lista de preferências alimentares tanto pela *Lu. longipalpis*, no Brasil (Sherlock et al.,1984) assim como pela *Lu. evansi* na Colômbia (Travi et al., 1994).

Gambás infectados, assim como os cães podem apresentar duas formas da doença: uma sub clínica ou inaparente, com apenas discreta alterações inflamatórias no fígado, baço e linfonodos, perceptíveis somente

pela histopatologia e outra forma grave, onde são encontrados macrófagos repletos de parasitas na pele e órgãos linfóides, necrose esplênica e esteatose hepática (Travi et al,1998b).

II- A QUESTÃO

2.1 O INÍCIO

Em agosto de 1995 , um animal da raça dobermann de nome RAMBO, domiciliado em Barra de Guaratiba, foi atendido no Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman com sinais de emagrecimento contínuo sem causa definida. Observou-se ainda anemia, dermatite furfurácea, abdômem distendido e onicogribose. Suspeitou-se de leishmaniose visceral e o título de 1:640 pela RIFI confirmou a suspeita clínica. Como preconizado pela Organização Mundial de Saúde, foi então recomendada a eutanásia. Na necrópsia foi observada hepatoesplenomegalia além de enfartamento ganglionar. Foram encontradas formas amastigotas nos esfregaços de fígado, baço, linfonodos e medula.

Outro animal da mesma raça, oriundo do mesmo endereço, porém sem qualquer sintomatologia, também foi submetido a exame sorológico pela RIFI, tendo igualmente apresentado título de 1:640. Necropsiado, foram encontradas lesões similares e além de formas amastigotas nos esfregaços de fragmentos de fígado, baço, linfonodo e medula.

O relato clínico acompanhado dos laudos sorológicos e de necrópsia foram enviados ao Centro de Controle de Zoonoses, outro órgão da Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro, do qual este autor faz parte. Foi solicitado o comparecimento de uma equipe, sob responsabilidade do autor, ao local para realização de um diagnóstico epidemiológico. Foram coletadas amostras de sangue de cinquenta cães residentes nas proximidades do caso inicial e foi observada uma proporção de 30% sororeagentes, fato que

alertou para a gravidade da situação e levou à investigação mais profunda da transmissão em Barra de Guaratiba.

Os animais soropositivos foram retirados e sacrificados sendo a Fundação Nacional de Saúde (FNS) notificada para que procedesse a borrifação da área com inseticida. A medida que era ampliado o raio das coletas, a proporção de animais soropositivos se mantinha elevada, o que despertou o interesse para o estudo daquele local.

A FNS - órgão oficial no combate da doença - trabalha de forma permanente, promovendo exame sorológico canino, borrifando semestralmente os domicílios e peridomicílios e ministrando palestras educativas sobre a L.V.A. Todos os moradores contatados durante nosso trabalho haviam sido alertados sobre a transmissão, sintomas e como evitar a doença. Talvez por esta razão em nenhum momento tivemos recusa ao solicitarmos o exame do cão.

Nosso trabalho, pelo Centro de Controle de Zoonoses, resumia-se em promover um estudo sorológico nos cães da área. Uma equipe do Instituto Oswaldo Cruz, que trabalhava em colaboração, examinava as pessoas residentes nas casas onde eram encontrados cães sorologicamente positivos. Os moradores eram examinados clínica e sorologicamente pela RIFI além de serem submetidos ao teste cutâneo de sensibilidade tardia (Teste de Montenegro).

Durante um ano, realizamos capturas semanais de flebotomíneos, em cinco locais selecionados. O critério de seleção foi o peridomicílio de residências onde haviam sido diagnosticados casos humanos ou onde havia pelo menos três caninos soropositivos.

Assim sendo, considerando:

- i) a alta soroprevalência canina em Barra de Guaratiba apesar do trabalho constante da FNS na área;

- ii) os onze casos humanos autóctones que ocorreram durante o período de estudo;
- iii) a existência na área de marsupiais que freqüentemente visitam os quintais das residências;
- iv) as recentes descrições na literatura, que marsupiais da família Didelphidae, em especial a espécie *Didelphis marsupialis*, como potenciais reservatórios de *L. (L.) chagasi* ;
- v) os poucos estudos de campo realizados em área endêmica de LVA com foco neste marsupial;

resolvemos investigar alguns fatores que poderiam contribuir para a infecção pela *L.(L.) chagasi* no cão, em Barra de Guaratiba.

III- OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar algumas variáveis relacionadas com o ciclo enzoótico da transmissão da *L. (L.) chagasi* no peridomicílio, em Barra de Guaratiba – Rio de Janeiro, RJ.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) determinar a soroprevalência nos cães em Barra de Guaratiba;
- ii) determinar a frequência de *Lu.longipalpis* nos locais onde há suspeita de ocorrência de transmissão;
- iii) determinar a frequência de marsupiais (*Didelphis marsupialis*) infectados dentre os capturados na área de estudo, a partir da sorologia e confirmação pelo teste de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).
- iv) identificar possíveis fatores de risco para infecção em cães pela *L.(L.) chagasi* na área de estudo, através da análise de

algumas variáveis, buscando um modelo que melhor represente a condição enzoótica em Barra de Guaratiba.

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. A ÁREA

Barra de Guaratiba é uma região litorânea da cidade do Rio de Janeiro, que compreende a encosta do Maciço da Pedra Branca. Está situada entre as coordenadas 43°32'44" e 43°33'55" de longitude leste e 23°00'44" e 23°04'35" de latitude sul. O clima é quente e úmido, com um índice pluviométrico anual em torno de 1400 mm e umidade relativa média igual a 75%.

O bairro apresenta uma área de mata que recobre a montanha e se estende, em determinados locais, até o litoral. (ANEXOS 2 e 3)

Nesta floresta, recortada pela plantação de bananeiras e por caminhos que levam a residências bastante escondidas, podem ser observadas, com facilidade, algumas espécies de animais silvestres como gambás, roedores silvestres e bandos de primatas do gênero *Callithrix*, que visitam os quintais das residências em busca de alimento.

No litoral, a região ainda apresenta uma parte de mangue, com sua vegetação e fauna características, que acompanha a maior parte da estrada que corta o bairro. O manguezal vai aos poucos se misturando com o ambiente de restinga ao aproximar-se da Restinga da Marambaia, região de propriedade das forças armadas.

Por ser região litorânea, a população se divide em dois tipos: a residente e a veranista. A população veranista reside em geral nas ruas próximas à praia, onde existe saneamento básico, e o tipo de residência sugere que seus moradores, na maioria, pertencem à classe média alta.

Estas casas, de modo geral, permanecem fechadas durante a semana. Poucas delas mantêm cães.

A população residente, que está em torno de 4000 pessoas (IBGE,1996), distribui-se por toda a área, residindo em locais com ou sem saneamento básico, apesar de o bairro ter sido considerado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) como totalmente urbanizado. São em geral pessoas de baixa escolaridade que sobrevivem da pesca, do cultivo da banana ou dos diversos restaurantes localizados na estrada principal, famosos por seus pratos a base de peixe.

Barra de Guaratiba é uma região onde a transmissão da LVA, embora recente, parece ocorrer de forma endêmica. Durante os três anos de estudo, onze casos humanos autóctones foram notificados. A frequência dos casos humanos se mantém entre 1-2 casos/ano a não ser em 1995 quando ocorreram 3 casos e 7 em 1996. Em 1997, novamente um caso somente foi notificado, o mesmo acontecendo em 1998 (fora já do tempo da coleta de dados para o presente estudo). Não devemos subestimar entretanto os casos assintomáticos da doença. Autores estimam que para cada caso grave da doença ocorrem 6 casos assintomáticos (Badaró et al.,1986b). Roçado (1997) relatou que, entre 360 pessoas examinadas em Barra de Guaratiba, 16 apresentavam teste de hipersensibilidade cutânea (Reação de Montenegro) positivo. Dentre estas, seis mostraram cicatrizes provocadas pela forma tegumentar da doença. As 10 pessoas restantes não apresentavam cicatrizes, logo o resultado positivo do teste deveu-se provavelmente a um contato anterior com a *L.(L.) chagasi* através de uma forma auto resolutive ou inaparente da LVA, e, o fato de jamais terem deixado a área, conforme relato dos próprios pacientes (Roçado,1997), sugere que, em Barra de Guaratiba também existem casos humanos assintomáticos da doença.

As residências em Barra de Guaratiba mostram-se distribuídas em uma estreita faixa entre o mar e a montanha. Muitos domicílios encontram-se localizados em pequenas ruas que cortam a encosta, alguns a uma altitude por vezes superior a 250 metros acima do nível do mar.

4.2 POPULAÇÕES DE ESTUDO

4.2.1 CÃES

Pelo fato de permanecerem mais tempo na parte externa do domicílio e, por consequência, ficarem mais expostos aos flebotomíneos, os cães foram utilizados como marcadores dos locais onde ocorre a transmissão.

A população canina em Barra de Guaratiba foi estimada pelos funcionários da Fundação Nacional de Saúde que trabalham na região, em 500 animais. Este número coincide com a população alvo da área na Campanha de Vacinação contra Raiva Animal - 1998, promovida pela Secretaria Municipal de Saúde da Cidade do Rio de Janeiro.

A busca da LVA na população canina foi realizada a partir dos primeiros casos caninos notificados, seguindo a estrada principal (Estrada da Barra de Guaratiba) em direção à entrada e ao final da área. Ao encontrarmos uma rua transversal, esta era percorrida casa-a-casa, em sua totalidade.

Somente em caso de notificação de caso humano, a equipe retornava a um local onde os cães já haviam sido examinados. Assim sendo a distribuição dos animais examinados por ano correspondeu a uma determinada região percorrida dentro da área (ANEXO 5).

Foram excluídos do exame cães com idade inferior a três meses pela dificuldade de manejo em condições de campo. Residências onde existiam cães em que o proprietário não se encontrava no momento da visita, tinham o endereço anotado para retorno da equipe.

O sangue dos cães foi obtido por punção da veia tibial dorsal ou da radial. Após a coleta do sangue, o proprietário respondeu um breve questionário com dados sobre sexo, idade e grau de confinamento do cão e a presença de animais silvestres no local (ANEXO 1). Naquele momento foi estimada a distância da residência à borda da mata e medida sua altitude em relação ao nível do mar através de altímetro marca Gischard.

O sangue, acondicionado em caixa térmica, foi levado ao laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ onde foi centrifugado para a separação do soro e guardado em *freezer* a 20⁰C negativos até o exame pela RIFI. Os resultados eram notificados à FNS .

4.2.2 GAMBÁS (*Didelphis marsupialis*)

Os animais foram capturados, tanto no peridomicílio como no interior da mata, com armadilhas tipo “arapuca”, colocadas em vários pontos da área. No peridomicílio as armadilhas foram colocadas, próximas às latas de lixo ou aos galinheiros. Na mata, foram deixadas em locais próximos a grutas ou troncos. Antes de serem armadas, frutas foram esfregadas nas armadilhas. Como iscas, foram usadas frutas bem maduras ou pasta de amendoim. Ao chegar da área de estudo, com ou sem animais capturados, todas as armadilhas foram lavadas com água e sabão e secas ao sol.

Uma vez capturados, os animais foram trazidos para a Fundação Oswaldo Cruz onde eram mantidos em biotério. Lá receberam uma numeração e ficha técnica correspondente, com dados do animal e do local de captura.

Após anestesia com Cloridrato de Ketamina 25 mg/kg foi coletado sangue por punção da veia femural interna, para hemocultivo em meio bifásico NNN (Nicolle McNeal & Novy) com 10% de sangue acrescido de LIT (Liver Infusion Triptose) com 20% de soro fetal bovino. O material também foi utilizado para sorologia para *L. (L.) chagasi* e *Trypanosoma cruzi* pela RIFI

além de hemocultivo para *T. cruzi*. Pelo menos dois hemocultivos foram realizados em cada animal e o acompanhamento destes foi por exames quinzenais durante dois meses.

Todos os animais soropositivos foram necropsiados. Foram feitos esfregaços de fígado, baço, medula, linfonodo e pele. Macerados desses órgãos foram semeados em meio de cultura NNN e LIT e examinados semanalmente por um mês. O mesmo material foi coletado de 5 gambás soropositivos e 3 animais - controle para o teste de PCR (Frohman,1988).

4.2.3. FLEBOTOMÍNEOS

Armadilhas luminosas do tipo CDC (Center of Diseases Control) foram colocadas no peridomicílio das residências, semanalmente, durante um ano em cinco pontos da área, considerados de risco. Foram considerados de risco aqueles locais onde houve notificação de casos humanos e/ou caninos.

As armadilhas eram armadas à tarde e recolhidas no dia seguinte pela manhã. Os insetos capturados foram encaminhados ao Laboratório de Diptera – Phlebotominae, do Departamento de Entomologia do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, para identificação, pela equipe do Dr. Gustavo Aguiar.

Os locais de captura passam a ser descritos:

PONTO 1 : A residência fica localizada na entrada da área de estudo a uma altitude de 180 metros. A casa fica inserida na mata. Quatro dos seis cães residentes tiveram sorologia positiva. Um caso humano ocorreu na residência localizada em frente. Entremeada à mata, observa-se uma extensa plantação de bananeiras. Foram capturados três gambás no peridomicílio.

PONTO 2 : A residência está situada aproximadamente no centro da área de estudo a uma altitude de 100 metros. Sete cães soro positivos e um caso humano na própria residência. A casa encontra-se a uma distância da

mata de aproximadamente 100 metros. Não foi capturado gambá no peridomicílio, entretanto foram capturados cinco exemplares na mata próxima.

PONTO 3: Residência situada em um condomínio de classe média alta, localizada a uma altitude de 150 metros. Cinco dos oito cães examinados neste condomínio encontravam-se soropositivos, inclusive os dois da residência onde foram colocadas as armadilhas. A casa encontra-se a menos de 50 metros da mata. No peridomicílio são observadas grandes rochas e, cortando a mata, uma plantação de bananeiras. Foram capturados três gambás no peridomicílio.

PONTO 4: Residência situada a uma altitude de 170 metros, distando 50 metros da mata. Seis cães soropositivos entre as casas mais próximas, incluindo dois na própria. Residência rústica, com galinheiro. Foram capturados cinco gambás no peridomicílio .

PONTO 5: Residência a uma altitude de 150 metros e distanciando cerca de 80 metros da mata. Todos os quatro cães foram soropositivos. Foram notificados um caso humano a aproximadamente 130 metros rua abaixo e outro residente a aproximadamente 500 metros rua acima. Não foram capturados gambás no peridomicílio porém cinco na mata próxima.

4.3 OS TESTES

4.3.1 REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

A reação foi basicamente processada de acordo com descrição de Camargo & Rebonato (1969). Para a sorologia dos gambás foi acrescentado um anticorpo intermediário Ig total de coelho anti-Ig de gambá, conforme Jansen et al.(1985). Os conjugados fluoresceinados foram adquiridos comercialmente (Sigma Co.). Como antígeno foram utilizadas formas promastigotas de *L. chagasi*. (cepa Kelly, gentilmente cedida pelo Dr. Reginaldo Brazil) e formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa G-49, isolada de um gambá capturado em Miguel Pereira, RJ em 1984. Soros de gambás

infectados experimentalmente foram utilizado como padrão positivo e soros de animais nascidos criados em cativeiro como padrão negativo.

Padrões positivos e negativos para a sorologia dos cães cães foram gentilmente cedidos pela Dra. Vanda Coutinho do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsmann.

Foram considerados sorologicamente positivos os cães com título igual ou superior a 1:80. para o antígeno de *L. chagasi*

Foram considerados sorologicamente positivos para *L. chagasi* os marsupiais que:

1. apresentaram título sorológico de pela RIFI 1:40 ou mais ao antígeno de *L. chagasi* desde que a sorologia para *T. cruzi* seja negativa, ratificada pelo hemocultivo;
2. apresentarem títulos sorológicos iguais ou maiores que 1:160 ao antígeno de *L. chagasi* mesmo com a sorologia positiva para *T. cruzi* ratificada pelo hemocultivo.

4.3.2 REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

A extração do DNA do material suspeito assim como a reação de PCR foram realizadas no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, pela equipe do Dr. Octávio Fernandes .

4.4 ANÁLISE DOS DADOS

4.4.1 VARIÁVEIS ANALISADAS (CÃES)

As seguintes variáveis foram selecionadas em função da infecção no cão (iii, iv), do local da infecção (presença do vetor) (i, ii, v) e da presença de um possível reservatório silvestre (vii) A variável sexo foi selecionada no intuito de verificar se, no cão, a infecção se comporta de maneira diferente quanto a este aspecto.

- i) Distância da residência à mata: (*maior ou menor que 100 metros*)
- ii) Localização da residência quanto à altitude: (*maior ou menor que 100 metros*)
- iii) Título sorológico: (*categórica, ordinal em 8 níveis - <1:40 (representada por 0), 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560*)
- iv) Soropositividade: (*positivo/ negativo*)
- v) Confinamento: (*Sim / Não*)
- vi) Sexo: (*Macho / Fêmea*)
- vii) Visita do gambá ao peridomicílio: (*Sim / Não*)

4.4.2 VARIÁVEIS ANALISADAS (GAMBÁS)

Estas variáveis foram selecionadas em função da infecção no gambá (ii) e do seu local de captura (i).

- i) Local de captura: (*peridomicílio / mata*)
- ii) Soropositividade: (*Sim / Não*)

4.4.3 BANCO DE DADOS

Durante o estudo, oito cães foram examinados mais de uma vez em função da volta da equipe a um determinado local face à notificação de caso humano. Entretanto, em somente um caso, ocorreu soroconversão. Foi considerado, para o estudo, o último resultado.

Apesar do questionário (ANEXO 1) apresentar várias opções de espécies que poderiam frequentar o peridomicílio, não haveria tempo para um estudo da fauna sinantrópica de Barra de Guaratiba. Optamos pela entrada no estudo somente do gambá uma vez que a literatura cita a

ocorrência do parasita nesta espécie e por ser o animal silvestre mais frequente nos quintais das residências (52%).

Os dados foram analisados segundo técnicas de análise uni, bi e multivariada, com o auxílio do software SPSS for Windows, versão 7.0 (Norusis, 1994).

A distribuição de cada variável na população de estudo foi representada através de gráficos de frequência e tabelas.

Foram medidas as associações entre a infecção do cão pela *L.(L.) chagasi*, manifestada através da soropositividade, e as variáveis selecionadas. Para isso utilizamos a razão de chances ou *odds ratio* (O.R.), obtida pelo quociente das chances de infecção entre os expostos e não expostos a um determinado efeito (no caso uma das outras variáveis em estudo). O resultado obtido nos revela a força da associação entre essas variáveis. O teste de significância estatística que acompanha o resultado é o Qui - quadrado (χ^2), que opera com frequências esperadas e observadas, dentro de um nível de confiança (N.C.) pré-estabelecido. Neste estudo adotamos o limite convencional de 95%.

A partir dos resultados obtidos na análise bivariada construímos um modelo multivariado para ajuste da associação das diversas variáveis estudadas com a infecção dos cães pela *L.(L.) chagasi* em Barra de Guaratiba. Para isso lançamos mão da regressão logística, tendo como variável dependente a soropositividade dos cães e variáveis independentes a distância da residência à mata, a presença de marsupiais no peridomicílio, a altitude da residência em relação ao nível do mar, e o confinamento do cão ao quintal das residências e o sexo dos cães.

Confundimentos e/ou interações foram procurados através da análise dos coeficiente de regressão e das razões de verossimilhança no momento da inclusão de uma nova variável. A ordem de introdução de cada variável no

modelo obedeceu ao critério de maior força de associação na análise bivariada.

V - RESULTADOS

5.1 CÃES

TABELA 1: Distribuição dos caninos examinados em Barra de Guaratiba – RJ, 1995-1998 em relação às variáveis em estudo.

	1995 (%)	1996 (%)	1997/98 (%)	total
SOROLOGIA (RIFI*)				
Positivos	25 (16,2)	21 (21,9)	48 (41,7)	94 (25,8)
Negativos	129 (83,8)	75 (78,1)	67 (58,3)	271 (74,2)
Total (100%)	154	96	115	365
CONFINAMENTO				
confinados	58 (37,6)	56 (58,3)	60 (52,2)	174 (47,7)
não confinados	96 (62,4)	40 (41,7)	55 (47,8)	191 (52,3)
Total (100%)	154	96	115	365
SEXO				
machos	85 (55,2)	54 (56,2)	61 (53,0)	200 (54,8)
fêmeas	69 (44,8)	42 (43,8)	54 (47,0)	165 (45,2)
Total (100%)	154	96	115	365
ALTITUDE				
0 – 100 m	112 (73,2)	51 (53,1)	61 (53,5)	224 (61,7)
+ de 100 m	41 (26,8)	45 (46,9)	53 (46,5)	139 (38,3)
Total (100%)	153	96	114	363
DISTÂNCIA DA MATA				
0 – 100 m	101 (65,6)	25 (26,1)	87 (77,7)	213 (58,4)
+ DE 100 m	53 (34,4)	71 (73,9)	25 (22,3)	149 (41,6)
Total (100%)	154	96	112	362
MARSUPIAIS				
Ausentes	72 (46,8)	60 (62,5)	43 (37,4)	175 (47,9)

Presentes	82 (53,7)	36 (37,5)	72 (62,6)	190 (52,1)
Total (100%)	154	96	115	365

* Reação de Imunofluorescência Indireta

Foram examinados 365 cães durante o tempo de estudo (ANEXO 4). Não houve recusas mas em determinados locais não foi possível estimar a distância da mata e não foi medida a altitude.

A distribuição das características estudadas variou de acordo com a área percorrida (Tabela 1). Os cães examinados em 1995 habitavam residências predominantemente localizadas a menos de 100 m da mata (65,6%) e em altitude inferior a 100 m (73,2%). Em grande parte eram animais não confinados (62,4%) Foi observada uma predominância de machos (55,2%) . A presença de marsupiais no peridomicílio foi relatada por praticamente metade dos proprietários (53,7%). Em 1996, a área percorrida apresentava (73,9%) residências localizadas a mais de 100 m da mata, com baixa frequência de marsupiais (37,5%) no peridomicílio, sendo 58,3% dos cães confinados aos quintais.

Observou-se a predominância de cães machos em todos os períodos/áreas. As residências mostraram-se semelhantemente distribuídas quanto à variável altitude. No ano de 1997 e nos três primeiros meses de 1998, examinamos uma região onde 77,7% das residências eram localizadas a menos de 100 m. da mata, sendo a visita de marsupiais ao peridomicílio relatada por 62,6% dos proprietários de cães. O confinamento dos animais assim como a altitude não mostraram diferença importante.

Dentre os animais com sorologia positiva (Figura 1), notamos que a maioria deles (49%) apresentou-se nas faixas de 1:80 e 1:160. Vale a pena ressaltar que somente 6% dos cães positivos apresentou título igual ou maior que 1:1280.

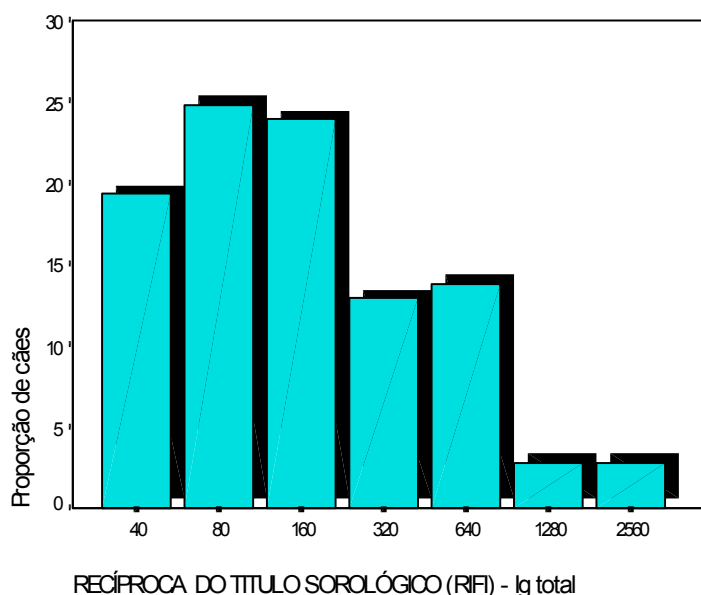


FIGURA 1: Distribuição percentual dos títulos pela Reação de Imunofluorescência Indireta, entre os cães positivos residentes em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ.

5.2 Análise das variáveis

Procurando evitar um possível viés de classificação, as variáveis sob estudo foram analisadas, sendo os cães considerados positivos (infectados), segundo três pontos de corte: aqueles cujo título sorológico pela RIFI fosse $\geq 1:40$ ou $\geq 1:80$ ou ainda $\geq 1:160$. (Tabela 2)

TABELA 2: Associação entre a soropositividade pela RIFI para LVA em cães de Barra de Guaratiba, RJ, e as variáveis em estudo, segundo os diferentes critérios para a soropositividade.

	1:40 (IC*)	1:80 (IC)	1:160 (IC)
DISTÂNCIA DA MATA	3,20 (1,92-5,34) p=0,000	3,49 (1,99-6,11) p= 0,000	2,74 (1,47-5,10) p= 0,000
CONFINAMENTO	0,88 (0,56-1,38) p= 0,572	1,25 (0,77-1,98) p= 0,361	0,93 (0,63-1,60) p= 0,787
SEXO	0,84 (0,53-1,33) p=0,536	0,82 (0,51-1,31) p= 0,399	0,82 (0,48-1,84) p= 0,472
ALTITUDE	1,23 (0,78-1,96) p= 0,804	1,70 (1,05-2,74) p= 0,029	1,59 (0,92-2,75) p= 0,094
GAMBÁ	2,64 (1,64-4,24) p=0,000	2,61 (1,59-4,31) p= 0,000	3,14 (1,72-5,71) p=0,000

IC = Intervalo de Confiança

A variável *altitude* apresentou uma associação não significativa com a soropositividade ao considerarmos como positivos cães com título igual ou maior que 1:40. Ao tomarmos o valor de 1:80 a mesma passa a apresentar uma associação forte e significativa. Ao elevarmos ainda o ponto de corte para 1:160, a associação permanece mas perde a significância estatística (NC:95%, $p=0,09$).

A variável *visita do gambá* apresentou uma associação forte e significativa seja qual fosse o limite considerado para a *soropositividade*.

Observamos que ocorreu uma pequena alteração na magnitude da associação entre a *distância da mata* e a *soropositividade* ao alterarmos os pontos de corte.

Num segundo passo, comparamos os resultados das associações das mesmas variáveis considerando os três pontos de corte, e verificamos que a diferença entre elas não se mostrou estatisticamente significativa para o nível de confiança arbitrado. Procurando então, atribuir ao estudo uma especificidade maior sem prejuízo da sensibilidade, passamos a considerar como positivos cães com título sorológico igual ou maior que 1:80.

TABELA 3: Distribuição dos cães segundo o confinamento ao quintal da residência e a soropositividade pela RIFI em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, R.J., 1995-1998.

CONFINAMENTO	SOROLOGIA		
	Positiva (%)	Negativa (%)	Total (%)
Não confinado	53 (53,4)	138 (50,9)	191 (52,2)
Confinado	41 (46,6)	133 (49,1)	174 (47,8)
Total	94 (100,0)	271 (100,0)	365 (100,0)

O R* = 1,25 (IC: 0,77 –2,00) $p=0,361$

*O R = Razão de Chances (*Odds ratio*)

As variáveis *confinamento* e *sexo* mostraram, em relação à *soropositividade*, (Tabelas 3 e 4) uma associação fraca e sem significância estatística para o nível de confiança de 95%.

TABELA 4: Distribuição dos cães segundo o sexo e a soropositividade pela RIFI em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, R.J.,1995-1998.

SEXO	SOROLOGIA		
	Positiva (%)	Negativa (%)	Total (%)
Macho	48 (51,1)	152 (56,1)	200 (54,8)
Fêmea	46 (48,9)	119 (43,9)	165 (43,2)
Total	94 (100,0)	271 (100,0)	365 (100,0)

O. R. = 0,82 (IC: 0,51 – 1,31) p= 0,399

TABELA 5: Distribuição dos cães segundo a altitude das residências e a soropositividade pela RIFI em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, R.J.,1995-1998.

ALTITUDE	SOROLOGIA		
	Positiva (%)	Negativa(%)	Total (%)
Maior que 100 m	44 (47,8)	95 (35,1)	139(38,3)
Menor que 100m	48 (52,2)	176 (69,9)	224 (61,7)
Total	92 (100,0)	271 (100,0)	363 (100)

O.R.=1,70 (IC:1,05 – 2,74); p= 0,029

A análise da variável altitude demonstrou que o risco de infecção pela *L.(L.) chagasi* é 1,7 vezes maior para quem reside em local alto do que para aqueles que moram a nível do mar (Tabela 5).

TABELA 6: Distribuição dos cães segundo a *distância da residência à borda da mata e a soropositividade pela RIFI em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, R.J., 1995-1998.*

DISTANCIA DA MATA	SOROLOGIA		
	Positiva (%)	Negativa (%)	Total (%)
Menor que 100 m	72 (79,1)	141 (52,0)	213 (56,8)
Maior que 100 m	19 (20,9)	130 (48,0)	149 (41,2)
Total	91 (100,0)	271 (100,0)	362 (100,0)

O.R.= 3,49 (IC: 1,99 – 6,11) p= 0,000

Os dados da Tabela 6 revelam que em Barra de Guaratiba, morar a menos de 100 metros da borda da mata representa um risco de infecção em cães pela *L.(L.) chagasi* 3,5 vezes maior que morar a 100 metros ou mais.

Residências nas quais o proprietário relata presença de marsupiais no peridomicílio (Tabela 7) também apresentam um risco de infecção em cães pelo protozoário, 2,6 vezes maior do que aquelas que não são visitadas por estes animais.

TABELA 7: Distribuição dos cães segundo a visita de gambá (*D. marsupialis*) no peridomicílio e a soropositividade em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, R.J.

MARSUPIAIS	SOROLOGIA		
	Positiva (%)	Negativa (%)	Total (%)
Presente	65 (69,1)	125 (46,1)	190 (52,1)
Ausente	29 (30,9)	146 (53,9)	175 (47,9)
Total	94 (100,0)	271 (100,0)	365 (100)

O.R. = 2,61 (IC:1,59 – 4,31) p= 0,000

As variáveis *sexo* e *confinamento*, além de apresentarem na análise bivariada, as associações fracas e sem significância estatística, não apresentaram, na análise multivariada, razões de verossimilhança que justificassem suas inclusões no modelo logístico. Assim sendo, entraram no modelo final as variáveis *distância da mata*, *visita de gambás* e *altitude*.

A variável *visita do gambá* apresentou-se como um confundidor em relação à variável *distância da mata*. Observe-se que o relato da visita do marsupial ao quintal é significativamente mais frequente nas residências próximas à mata (Tabela 9). A *altitude* interagiu com a variável *presença de gambá*, apresentando-se como um modificador do efeito.

As variáveis *distância da mata*, *altitude* e *presença de marsupiais* no peridomicílio foram consideradas preditoras da infecção pela *L.(L.) chagasi* em Barra de Guaratiba conforme o modelo final (Tabela 8).

TABELA 8: Razão de Chances bruta e ajustada das variáveis consideradas preditoras da infecção pela *L.(L.) chagasi* em cães em Barra de Guaratiba.

	ODDS RATIO	ODDS RATIO
	BRUTO (p)	AJUSTADO (p)
DISTÂNCIA DA MATA (<100m)	3,49 (0,000)	2,59 (0,021)
DISTÂNCIA DA MATA (≥100m) ¹	1	
MARSUPIAIS (em altitude < 100m)	1,79 (0,007)	0,92 (0,869)
MARSUPIAIS (em altitude ≥ 100m)	4,51 (0,000)	4,79 (0,010)

TABELA 9 – Relação entre a localização das residências estudadas em Barra de Guaratiba e o relato da presença de gambás ao peridomicílio

MARSUPIAIS	Presentes (%)	Ausentes (%)	Total (%)
RESIDÊNCIAS (0-100 m)	171 (80,3)	42 (19,7)	213 (100)
RESIDÊNCIAS (≥ 100m)	19 (12,8)	129 (87,2)	148 (100)

$$\chi^2 = 159,32$$

$$P = 0,000$$

5.3 VETOR

As espécies de flebotomíneos capturadas em Barra de Guaratiba durante um ano de estudo estão relacionadas na Tabela 10. Apesar da área ser endêmica para LVA, e as armadilhas terem sido colocadas em locais de altitude superior a 100 metros, note-se a alta frequência relativa da *Lu. intermedia*

TABELA 10: Número absoluto e relativo de flebotomíneos capturados em Barra de Guaratiba (abril/97 a março/98) no peridomicílio de residências localizadas a altitude superior a 100 metros e próximas da borda da mata.

<i>Espécie</i>	<i>Total</i>	<i>%</i>
<i>Lu. intermedia</i>	160	39.7
<i>Lu. migonei</i>	122	30.3
<i>Lu. edwardsi</i>	38	9.4
<i>Lu. schreiberi</i>	28	6.9
<i>Lu. longipalpis</i>	26	6.4
<i>B. guimaraensi</i>	18	4.5
<i>Lu. quinquefer</i>	9	2.2
<i>Lu. whitmani</i>	2	0.5
<i>Total</i>	403	100

Lu. = Lutzomyia

B. = Brumptomyia

Observe-se que, apesar dos domicílios receberem borrifação semestral – conforme relato dos moradores - foram encontradas várias

espécies de flebotomíneos, inclusive 26 exemplares de *Lu. longipalpis*, nos quintais de duas das cinco residências onde foram colocadas as armadilhas (Figura 2).

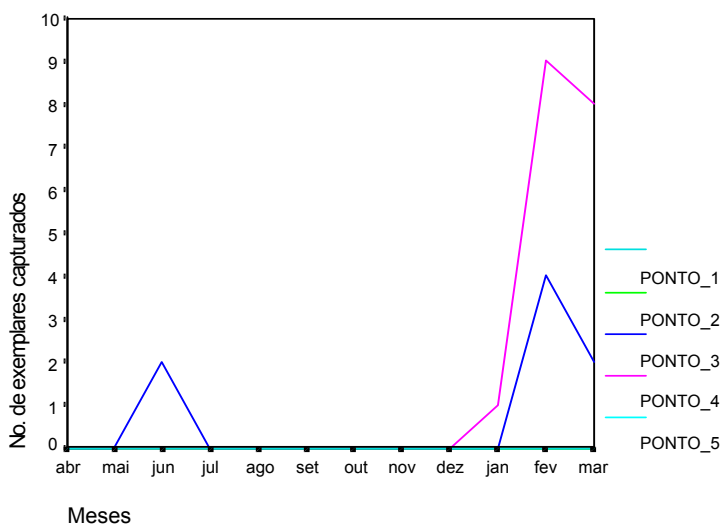


FIGURA 2: Frequencia mensal de *Lutzomyia longipalpis* por cada ponto de captura em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, R.J.

5.4 GAMBÁS

Foram examinados 31 gambás (*D. marsupialis*) de diferentes idades e ambos os sexos, capturados tanto no interior da mata como no peridomicílio (quintal das residências).

Não foram encontradas formas amastigotas nos *imprints* dos órgãos dos marsupiais necropsiados. As culturas de macerado de tecido também foram negativas. Após inoculação de macerado de fígado e baço de um gambá com sorologia de 1:640 (gambá n^o 808) em dois hamsters, foi então possível a visualização das formas amastigotas no interior de macrófagos no fígado, baço e medula óssea do roedor.

TABELA 11: Distribuição dos gambás (*D. marsupialis*) soropositivos quanto ao local de captura (mata / peridomicílio), em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ.

LOCAL	SOROLOGIA		
	Positiva	Negativa	Total
Peridomicílio (%)	3 (33,3)	6 (66,7)	9 (100,0)

Mata (%)	6 (27,3)	16 (72,7)	22 (100,0)
Total (%)	9 (29,0)	22 (71,0)	31 (100,0)

Teste exato de Fisher, p= 0,582

Tabela12: Resultados da sorologia por RIFI para L.(L.) chagasi e Trypanosoma cruzi e hemocultivo nos gambás capturados em Barra de Guaratiba.

No.	Local de Captura	Título L.(L.) chagasi	Título T. cruzi	Hemocultivo (T. cruzi)	
742	M	neg	1:80	+ (5/7)	
743	M	neg	1:160	+ (2/4)	
744	M	1:320	neg	- (0/5)	
745	M	neg	neg	- (0/5)	
746	M	neg	neg	- (0/5)	
747	M	neg	neg	- (0/4)	
748	M	neg	1:320	+ (4/4)	
749	M	neg	1:80	+ (5/5)	
750	M	neg	1:40	+ (3/3)	
751	M	1:40	neg	- (0/3)	752
	M	NR	1:80	- (0/3)	
753	M	neg	1:80	+ (5/5)	
754	M	1:1280	1:160	+ (2/5)	
755	M	neg	1:80	+ (1/3)	
756	M	neg	1:80	+ (2/3)	
757	PD	1:160	neg	- (0/3)	758
	PD	neg	neg	- (0/3)	759
PD	neg	neg	- (0/3)	760	PD
	neg	1:80	+ (2/2)		
761	PD	1:40	1:320	+ (2/2)	
762	PD	NR	1:160	+ (1/1)	
801	PD	1:80	NR	- (0/2)	802
	PD	1:640	1:640	+ (1/2)	
803	PD	neg	1:20	+ (2/2)	
804	M	1:40	neg	- (0/2)	805
	M	neg	neg	- (0/2)	806
M	neg	neg	- (0/2)	807	M
	1:40	1:80	+ (1/1)		
808	M	1:640	1:640	+ (1/1)	
809	M	1:80	neg	- (0/2)	810
	M	neg	1:80	+ (2/2)	

M = mata

PD = peridomicílio

Foram considerados positivos pela sorologia os gambás: 744, 751, 754, 757, 801, 802, 804, 808 e 809. Sorologia mista foi encontrada em três animais, (754, 802 e 808) como pode ser observado pelo título sorológico igual ou maior que 1:320 (Tabela 12) para *L. chagasi* e para *T. cruzi* (Figura 3). A infecção por *T. cruzi* foi comprovada nestes animais pelo isolamento e caracterização do parasita.

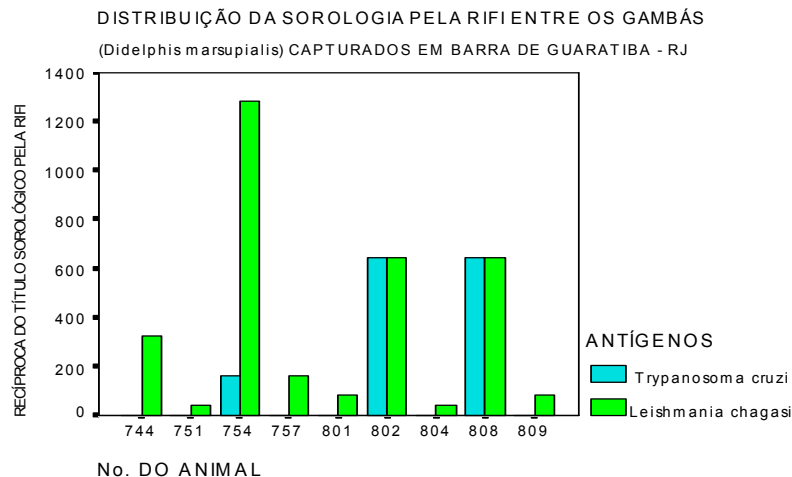


Figura 3: Distribuição do título sorológico pela RIFI para *L.(L.) chagasi* dos gambás (*D. marsupialis*) capturados em Barra de Guaratiba, quanto ao local de captura.

Não houve correlação estatisticamente significativa entre o *local de captura* e a *soropositividade* para *L chagasi* ($p= 0,528$; teste exato de Fisher).

Amostras de tecidos (baço, fígado, medula, linfonodo e pele) de oito gambás com diferentes títulos pela RIFI tanto para *L.(L.) chagasi* como para *T. cruzi* foram submetidas ao PCR. O resultado encontra-se na tabela 13.

O material será posteriormente submetido à hibridização.

Tabela 13: Resultados dos gambás (*D. marsupialis*) capturados em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, cujo material foi submetido à Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

GAMBÁ	Sorologia		Hemocultivo		PCR			
	<i>L. chagasi</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i>	Baço	Fígado	Medula	Pele	Linfonodo
746	neg	neg	- (0/5)	neg	neg	neg	neg	ns
757	1:160	neg	- (0/3)	pos	pos	pos	pos	ns*
801	1:80	neg	- (0/2)	neg	neg	neg	ns	neg
803	neg	1:20	+ (2/2)	neg	neg	neg	neg	neg
804	1:40	neg	- (0/2)	neg	neg	neg	neg	neg
806	neg	neg	- (0/2)	neg	neg	neg	neg	neg
808	1:640	1:640	+ (2/2)	pos	pos	pos	ns	pos
809	1:80	neg	- (0/2)	pos	pos	pos	pos	pos

* ns: órgão não submetido ao exame

Os resultados pelo PCR apontaram a presença de DNA de *Leishmania sp* no material examinado dos gambás 757, 808 e 809, todos soropositivos pela RIFI, assim como comprovou ausência de DNA no material dos gambás 746 e 806, ambos soronegativos pela RIFI. O PCR não detectou a presença de DNA nos animais 801 e 804 que apresentaram título pela RIFI de 1:80 e 1:40, respectivamente.

VI - DISCUSSÃO

Algumas limitações ocorreram durante o estudo: o fato, por exemplo, da amostra de cães examinada não ter seguido uma técnica de amostragem pré delineada poderá incorrer em viés, entretanto, o estudo na área, assim como a coleta de dados, iniciaram-se anteriormente ao pensamento de um trabalho acadêmico. Acreditamos que essa limitação tenha sido minimizada pela proporção de animais examinados - 73% da população canina estimada - , uma vez que não houve perdas e que o restante dos cães se encontrava distribuído por toda a área.

Outra limitação do estudo estaria num possível viés de classificação, ao estimarmos a distância da residência à borda da mata. Acreditamos que o erro nesta estimativa não ultrapasse os 15%, o que não chegaria a fazer uma diferença substancial no limite entre os dois grupos distintos (perto e longe da mata). Ao fixarmos o ponto de corte em 100 metros, tanto para a distância da mata como para a altitude, sabemos que os padrões biológicos não são matematicamente fixos e obviamente existem flebótomos a menos de 100 m de altitude, assim como a mais de 100 metros de distância da mata embora os cães, nestas condições tenham sido considerados não expostos. Assim sendo, teria ocorrido um erro não diferencial, o que levaria a uma subestimação da magnitude da associação encontrada.

Foram examinados sorologicamente, pela RIFI, 365 cães, dos quais 109 apresentaram título igual ou maior que 1:40. Se fossemos considerar estes animais como positivos, conforme a FNS e vários autores (Coutinho et al.,1985; Evans et al.1990; Evans et al.1992;), teríamos uma soroprevalência de 29,8% .

Essa prevalência elevada poderia sugerir reação cruzada com outros tripanosomatídeos como demonstram Camargo & Rebonato, (1969) no homem e Costa et al.(1991) no cão. Apesar de não existirem casos

notificados (humanos ou caninos) de *T. cruzi* em Barra de Guaratiba, uma amostra de 50 soros de cães do estudo, selecionada aleatoriamente, foi testada pela RIFI contra os antígenos de *T. cruzi* e novamente de *L.(L.) chagasi*. (dados não publicados). Os títulos encontrados nas amostras de soro frente ao antígeno de *L.(L.) chagasi* foram sempre maiores do que quando submetidas ao antígeno de *T. cruzi*.

Do momento em que consideramos como cães positivos, aqueles cujo título sorológico pela RIFI foi igual ou maior que 1:80 e que, com este procedimento tenhamos diminuído ainda mais a chance de algum falso positivo, o impacto sobre a soroprevalência não foi muito grande. A soroprevalência nos cães de Barra de Guaratiba permaneceu elevada (25,8%), de forma semelhante a outros locais hiperendêmicos como Jequié, na Bahia que apresenta uma soroprevalência canina de 23,5% (Paranhos Silva et al.,1998), ou como na cidade de Itapipoca, no Ceará, com 39% (Evans et al.1992),

Os valores das soroprevalências caninas parciais (Tabela 1) correspondem cada um a uma parte da área percorrida (Anexo 5). No último ano observou-se uma soroprevalência mais elevada. Acreditamos que tal fato deva-se ao perfil ecológico do local percorrido e não a uma elevação da incidência da doença no local. Tal afirmação justifica-se por fatos que podem ser considerados como marcadores da transmissão: i) a notificação dos casos humanos na área, durante os anos de estudo; ii) a região percorrida durante o ano de 1997-98 foi predominantemente aquela de onde é procedente a maioria dos casos humanos notificados na área (8 dos 11 casos), o que sugere que, por Barra de Guaratiba ser uma região onde ocorre uma diversidade de ambientes, a diferença nas soroprevalências deve ser resultante de determinados fatores presentes em maior ou menor intensidade nos diferentes ambientes percorridos. Evans et al. (1992) na região de Itapipoca, no Ceará, observaram algo semelhante ao depararem

com uma soroprevalência canina de 50% na região montanhosa, 56% no sopé da montanha, contra 39% nas regiões da caatinga e da cidade.

Entre as medidas de controle da LVA incluiu-se o inquérito sorológico dos cães com a retirada dos animais soro reagentes. No Rio de Janeiro o teste sorológico utilizado pela FNS é a RIFI e cão com título igual ou superior a 1:40 é considerado reagente e conseqüentemente retirado da área e sacrificado. Apesar destes esforços dos órgãos de controle, a LVA não consegue ser erradicada porque provavelmente existem outros fatores que não estão sendo considerados na estratégia de controle da doença. O fato de Barra de Guaratiba apresentar uma soroprevalência canina elevada apesar de ser um local cuja frequência de casos humanos se mantém reduzida (não considerando-se os surtos em 1996 e 1998) sugere que a importância do cão como reservatório neste local deve ser reavaliada, uma vez que, como demonstram Abranches et al.(1991), Evans et al.(1992) Dye (1996), Dietze et al. (1997) e Paranhos-Silva et al.(1998), em diversos locais estudados, o impacto da retirada dos cães positivos, não foi relevante.

Observou-se ainda que 68% dos cães soro reagentes, apresentou título entre 1:40 e 1:160 (Figura 1). Sabendo-se que o cão é eliminado por ser fonte de infecção para o flebotomíneo, alguns pontos devem ser considerados: i) títulos sorológicos vêm sendo linearmente relacionados com a carga parasitária (Dye et al.,1993). Necrópsias de cães de Barra de Guaratiba (estudos preliminares) vêm confirmando esta relação linear, sugerindo que o conceito de “saco de amastigotas”, como são frequentemente referidos os cães infectados, não se aplica, pelo menos, em Barra de Guaratiba; ii) há muito vêm sendo observadas subpopulações de cães resistentes ao parasita, capazes de controlar a infecção (Rioux et al. 1972, Lanotte et al., 1979), sendo que, estudos demonstram que cães suscetíveis tendem a desenvolver altos títulos enquanto que os resistentes geralmente não ultrapassam 1:320 (Pinelli et al.,1993). Além do mais, a

retirada sumária de cães baseada somente em título sorológico pela RIFI a partir de 1:40 incorre em várias questões: i) na chance de serem retirados animais infectados com outros tripanosomatídeos; ii) no fato de serem retirados animais resistentes, que poderão vir a ser substituídos por outros suscetíveis, fato que poderá resultar em aumento dos casos da doença; iii) no cão deixar de atuar como uma barreira biológica. Em razão de seus hábitos alimentares ecléticos, o vetor alimenta-se no cão por encontrá-lo mais exposto, na parte externa do domicílio. Se o cão for retirado, o flebotomíneo tenderá a buscar o homem para realizar seu repasto sanguíneo. Esta talvez seja uma explicação para o fato ocorrido em Jequié (BA): após a eliminação de 15% da população canina na cidade entre 1992 e 1996, a notificação de casos humanos foi de 8,25, 123 e 142 casos, respectivamente, nos últimos 4 anos (Paranhos Silva, 1998 et al.) .

Apesar de, em Barra de Guaratiba, não virem sendo notificados casos humanos ou caninos de LTA, a espécie de flebotomíneo predominante em altitude superior a 100 metros foi a *Lu. intermedia* seguida da *Lu. migonei*, (Tabela 10). Este achado demonstra que o perfil de distribuição destes insetos, em altitude, no litoral, difere do encontrado por Souza et al. (1981) e Aguiar et al. (1996) em encostas continentais. Nossos resultados entretanto vêm confirmar o encontrado por Gomes (1994) que afirma ser a *Lu. intermedia* a espécie mais frequente nas regiões onde ocorre ação antrópica.

O *confinamento* dos cães, tanto na análise bivariada (Tabela 3) como na multivariada, não pareceu influenciar a infecção pela *L.(L.) chagasi* , ou seja, o risco de infecção na residência não difere do risco de frequentar a rua ou a mata. Isto demonstra que o cão também é infectado sem sair dos quintais das residências.

Na espécie humana autores relatam a predominância da infecção pela *L.(L.) chagasi* no sexo masculino (Alencar, 1978; Marzochi et al., 1994).

A não associação do sexo com a infecção pelo parasita (Tabela 4), demonstra que, no cão, a infecção se comporta igualmente entre machos e fêmeas.

A variável *altitude* na análise bivariada (Tabela 5) mostrou um risco de infecção pela *L.(L.) chagasi* 1,7 vezes maior para cães que residem a uma altitude superior a 100 metros do que para aqueles residentes a nível do mar. Controlada pelas outras variáveis entretanto (Tabela 8), mostrou-se como um modificador de efeito em relação à variável *visita do gambá*. Esta última em altitude superior a 100 metros, controlada pelo efeito da *distância da mata*, oferece um risco 4,8 vezes maior do que a nível do mar. Não foi possível avaliar a presença de interação entre as variáveis *altitude* e *distância da mata*, uma vez que na tentativa de estratificação apareceram *caselas vazias*.

Nossos resultados sugerem fortemente a manutenção da *L.(L.) chagasi* através de um ciclo enzoótico silvestre, uma vez que, a associação entre a *distância da mata* e a infecção nos cães pela *L (L.) chagasi*, controlada pelas outras variáveis (Tabela 8), nos aponta um risco 2,6 vezes maior para os residentes próximo à floresta. O efeito que a mata exerce sobre a transmissão do parasita aos cães traduz-se na manutenção de vetores infectados, uma vez que o peridomicílio é borrifado semestralmente. Este dado, adicionado ao fato de que as residências e quintais são borrifados semestralmente, nos permite especular que a população de flebotomíneos que sai da mata, livre da ação do inseticida e já possivelmente infectada em reservatórios silvestres, atinge inicialmente os cães dos domicílios mais próximos à borda da floresta. Nossa hipótese é reforçada pelas idéias de Sherlock et al. (1984), Lainson et al. (1990), Tesh (1995) e Travi et al. (1994).

O risco de infecção pela *L.(L.) chagasi*, encontrado na análise bivariada, 2,5 vezes maior em cães de residências visitadas por gambás

(Tabela 7) e 4,8 vezes maior, uma vez associado à *altitude* e controlado pelo efeito da *distância da mata* (Tabela 8). Este fato, além de reforçar a proposta da enzootia silvestre, é uma evidência em favor do envolvimento deste marsupial na infecção dos cães em Barra de Guaratiba. Vários autores reforçam cada vez mais a importância deste marsupial como potencial reservatório do parasita (Sherlock et al.,1984;Travi et al.,1994, Tesh et al.,1995, Travi et al.,1998a). Na análise multivariada, a variável *distância da mata* apresentou-se como um confundidor em relação à variável *visita do gambá*. Observou-se que quanto mais próxima a residência da margem da floresta, mais chance de visita deste marsupial (Tabela 9) e, do momento que este esteja infectado, maior a chance de infecção pelo flebótomo e consequentemente, para o cão.

A visualização das formas amastigotas diretamente nos *imprints* de vísceras dos gambás de Barra de Guaratiba com sorologia positiva não foi possível, como aconteceu com Sherlock (1984) e Travi et al. (1998b). Após várias tentativas de visualização e isolamento do parasita diretamente das vísceras do marsupial, optou-se, pela inoculação de macerado de baço e fígado no hamster (*Mesocricetus auratus*, Rodentia, Cricetidae) , a partir da qual as amastigotas foram encontradas nos tecidos do SFM do roedor (Anexo 6).

Numa análise qualitativa dos resultados dos gambás submetidos à sorologia pela RIFI e ao PCR (Tabela 13), os testes foram compatíveis em situações extremas, ou seja, PCR negativo na ausência de título e PCR positivo em presença de títulos elevados de anticorpos (IgG). Não temos subsídios para a interpretação dos resultados intermediários. O que é de extrema importância no contexto deste estudo é a constatação do DNA de *Leishmania* no material examinado (principalmente na pele) dos gambás. O encontro de animais positivos, associado à situação endêmica para LVA que a região apresenta, nos leva a reforçar a proposta da existência um ciclo

enzoótico silvestre e que o *D. marsupialis* se comporte como um mantenedor do parasita naquele local.

O encontro de vinte e seis exemplares da espécie de *Lu. longipalpis* no peridomicílio (Figura 3 e Tabela 10), numa área que vem sendo periodicamente borrifada pode sugerir, entre outras causas, o início de um processo adaptativo da espécie ao inseticida que poderia estar perdendo a ação residual ou ainda, a possível migração ou transporte de exemplares destes insetos oriundos do interior da floresta onde a borrifação não alcança, para o peridomicílio. A partir dos resultados deste estudos, outra hipótese a ser levantada para sugerir a dinâmica da infecção neste local seria a população de *Lu. longipalpis* existente no peridomicílio, remanescente ou não dos programas de borrifação, entrar em contato com gambás infectados, no momento de sua visita ao galinheiro ou às latas de lixo no quintal das residências, infectando-se e disseminando a *L.(L.) chagasi* entre os cães, reservatórios do parasita no ciclo doméstico de transmissão.

A condição enzoótica encontrada por nós deve ser considerada como um fator relevante na epidemiologia da LVA em Barra de Guaratiba, dado que, na grande maioria das residências visitadas por nossa equipe, existe o relato da visita de marsupiais ao peridomicílio.

Nossos resultados apontam para a necessidade de estudos mais profundos sobre a interação do gambá com a *L.(L.) chagasi*. Um maior conhecimento da ecologia e da dinâmica populacional deste marsupial torna-se fundamental uma vez que, além de um mantenedor da *L.(L.) chagasi*, é um reconhecido reservatório do *T. cruzi*, mantendo os dois ciclos de multiplicação (intra e extra celular) destes parasitas. A descrição do ciclo multiplicação extracelular do *T. cruzi* na glândula de cheiro deste marsupial (Deane et al., 1986) poderia eventualmente explicar os surtos circunscritos de Doença de Chagas descritos no Pará e Rio Grande do Sul.

VII - CONCLUSÕES

Face ao exposto, concluímos que:

1. O critério de retirada do cão com base apenas no título sorológico pela RIFI de 1:40 deve ser reavaliado;
2. Situações enzoóticas distintas podem ocorrer em um mesmo ecossistema, devendo ser consideradas, diagnosticadas e avaliadas suas importâncias para que sejam tratadas de forma diferenciada;
3. A proximidade da mata, a altitude das residências e a visita de gambás ao peridomicílio podem ser assumidas como fatores de risco para infecção pela *L.(L.) chagasi* em Barra de Guaratiba;
4. Demonstramos a existência de um ciclo enzoótico silvestre em Barra de Guaratiba onde o *D. marsupialis* mantém o parasita;
5. Novos estudos devem ser desenvolvidos no sentido de se identificarem os mecanismos de circulação do parasita, seja por vetores ou outros meios, buscando-se determinar o papel deste marsupial na epidemiologia da LVA em Barra de Guaratiba.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES,P.; SILVA-PEREIRA,M.C.D.; CONCEIÇÃO –SILVA,F.M.; SANTOS-GOMES,G.M. & JANS,J.G.1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *Journal of Parasitology*,77: 557-561.
- ADLER,S., 1964 Leishmania. In: *Advances in Parasitology*. New York, Academic Press, 1964, vol. 2.
- AGUIAR,G.M.; MEDEIROS,W.S.; DeMARCO,T.S.; SANTOS,S.C.; GAMBARDELLA,S. 1996. Ecologia dos flebotomíneos da Serra de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. I –A fauna flebotomínica e prevalência pelo local e tipo de captura (Diptera Psychodidae, Phlebotomine). *Cadernos de Saúde Pública* 12 (2) 195-206.
- AGUIAR,G.M.; MEDEIROS,W.S.; SANTOS,T.G.; KLEIN,A.F.L. & FERREIRA,V.A. 1993. Ecology of sandflies in a recent focus of cutaneous leishmaniasis in Paraty, litoral of Rio de Janeiro State. (Diptera Psychodidae, Phlebotomine) *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88: 339-340.
- ALENCAR,J.E.,1959 *Calazar canino: Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil*. Fortaleza, Imprensa Oficial. (Tese da Universidade Federal do Ceará.)
- ALENCAR, J.E., 1977 / 78. Leishmaniose Visceral no Brasil. *Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará*. 17/18: 129-148.

- ALEXANDER, J.E. & RUSSEL, D.G., 1985. Parasite antigens, their role in protection, diagnosis and scape. The leishmaniasis. *Current Tropical Microbiology and Immunology*. 120:43-67.
- ALTES, J.; SALAS, A; RIERA, M.; UDINA, M.; GALMES, A.; BALANZAT, J. BALLESTEROS, A.; BUIADES, J.; SALVA, F. & VAILALONGA, C. 1991. Visceral Leishmaniasis: another H.I.V. associated opportunistic infection? Report of eight cases and review of literature. *AIDS*(5): 201-207.
- ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRÉS, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZALES, F.; SAN ANDRÉS, M.D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; SANIZ, A. & ESCACENA, C. 1994. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow up after chemotherapy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 88(4): 371-378.
- ASHFORD, R.W.; DESJEUX, P.; DERAADT, R.P., 1992. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today*, 8:103-104.
- ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK, I. EULALIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER Jr. R.H.; BADARÓ, R. & DAVID J.R. 1995. Comparison of the Polimerase Chain Reaction and Serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53 (3):251-255.
- BADARÓ, R.; ROCHA, H.; CARVALHO, E.M. QUEIROZ, A .C. & JONES, T.C., 1986a. *Leishmania donovani*: an opportunistic infection associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *Lancet* ii: 647-649.
- BADARÓ, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R. & JOHNSON, W.D.J. 1986b. New

- perspectives on a sub clinical form of visceral leishmaniasis. *Journal of infectious diseases*,156:1003-1011.
- BAKER,J.R.,1963. Speculations on the evolution of the family Trypanosomatidae Doflein,1901. *Experimental Parasitology*. 13:219-233.
- BARKER,D.C.1989. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology* 99 (sup.) S125-S149.
- BATES,P.A.1994. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology*, 108:1-9.
- BRAY,R.S.1987. Zoonosis and leishmaniasis. Hart,D.T. ed. *Leishmaniasis: Current Status and New Strategies for Control*. New York, Plenum Press 57-60.
- CAMARGO, M. E. & REBONATO, C. 1969 Cross reactivity in immunofluorescence for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 18:500-505.
- CATARSINI,O.1981. Epidemiologia e manifestazione cliniche della leishmaniosi del cane. *Revista Parasitologica*, 44: 83-87.
- CERF, B.J.; JONES, T.C.; BADARÓ,R.; SAMPAIO,D.; TEIXEIRA, R. & JOHNSON, W.D. JR.1987 Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *Journal of Infectuous Diseases*, 156:1030-1033.
- CORREDOR,A.; GALLEGO, J.F.; YOUNG, D.G.; TESH, R.B.; MORALES, A.; CARRASQUILLA, C.F.; KREUTZER, R.D.; BOSHELL, J.; PALAU, M.T.; CACERES, E. & PELAEZ, D.,1989. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40 (5): 480-486.
- COSTA, C.H.N.; PEREIRA, H.F.; ARAÚJO, M.V.1990. Epidemia de Leishmaniose no Estado do Piauí, Brasil. 1980-1986. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, 24:361-372.

- COSTA,A.C.; GENARO,O.; LANA,M.; MAGALHÃES,P.A.; DIAS,M.; MICHALICK,S.M.M.; MELO, M.N.; COSTA, R.T.; MAGALHÃES-ROCHA,N.; MAYRINK,W. 1991. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 24 (1) 21-25.
- COURTNA,Y, O.; SANTANA, E. W.; JOHNSON, P. J.; VASCONCELOS, I. A. B.; & VASCONCELOS, A. W. 1996. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90: 498-502.
- COUTINHO, S. G.; NUNES, M. P.; MARZOCHI, M. C. A. & TRAMONTANO, N. C. 1985. A survey for cutaneous and visceral leishmaniasis among 1.342 dogs from areas in Rio de Janeiro where the human disease occurs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 80:17-22.
- CUNHA,A.M.,1942. A soroaglutinação das leishmanias. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 37:35-37.
- CUNHA, A. M. & CHAGAS, E.1937. Nova espécie de protozoário do Gênero *Leishmania* patogênico para o homem (nota prévia).*O Hospital* vol. XI (2): 5-9.
- CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G. Jr.; MOMEN, H. 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50:296-311.

- DEANE, L.M. & DEANE, M.P.,1954a. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *Hospital*, 45 (4): 419-421.
- DEANE, L.M. & DEANE, M.P.,1954b Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em caso humano de leishmaniose visceral . *Hospital* 46:487-489.
- DEANE, L.M. & DEANE, M.P.,1955. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatório da *L. donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. *Hospital* 48: 61-70.
- DEANE, L.M. & DEANE, M.P.,1962. Visceral Leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo* 4(3):198-212.
- DEANE, M.P., LENZI, H.L.; JANSEN, A.M.,1986. Double developmental cycle of *Trypanosoma cruzi* in the opossum. *Parasitology Today* 2:13-18.
- DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M. & LOPES, U. 1994. Use of Molecular probes and PCR for detection and typing of Leishmania – a mini review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89 (3): 463-469.
- DIETZE ,R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A & COREY, R., 1997. Effect of Eliminating Seropositives Canines on transmittion of Visceral Leishmaniasis in Brasil. *Clinical Infectious Diseases* 25: 1240-1242.
- D'OLIVEIRA JR.,A .; COSTA, S.R.M.; BARBOSA, A.B.B.; ORGE, M.G. & CARVALHO,E.,1997. Assymptomatic *Leishmania chagasi* infection in Relatives Neighbors of Patients with Visceral Leishmaniasis. *Memórias do Instituo Oswaldo Cruz* 92 (1): 15-20.

- DYE,C.,1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 55: 125-130
- DYE,C.; VIDOR,E. & DERREURE,J.1993.Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiology and Infection* 103: 647-656.
- EPERON,S & MCMARON-PRATT,D.,1989. Extracellular amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *Leishmania braziliensis*. II Stage and species-specific monoclonal antibodies. *Journal of Protozoology* 36 (3): 510-518.
- EVANS,G.T.; VASCONCELOS,I.A.B.; LIMA,J.W.O.; TEIXEIRA,J.M.; McAULLIFE,I.T.; LOPES,U.G.; PEARSON,R.D. & VASCONCELOS, A.W.1990. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brasil: Assessment of serodiagnostic methods. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene* 42 (2) 118-123.
- EVANS,G.T.; TEIXEIRA,J.M.; Mc.AULIFFE,I.T.; VASCONCELOS, I.A.B.; SOUZA,A.Q.; LIMA,J.W.O. & PEARSON, R.D.1992. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Northwest of Brazil. *Journal of Infectious Diseases* 166:1124-32.
- FAUST,E.C.; RUSSEL,P.F. & JUNG,R.C.,1974. Craig & Faust (ed.) *Parasitologia Clínica*. Ed. Salvat S.A. México 888p.
- FROHMAN,M.A.; DUSH,M.K. & MARTIN,G.R.,1988. Rapid production of full length cDNA from rare transcripts. Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primers. *Proceedings National Academy of Sciences (USA)* 85: 8998-9002.
- GRADONI,L.; MAROLI,M.; GRAMMIOCIA,M; MANCIANTI,F.,1987. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Medicine Veterinary Entomology*, 1:988-942.

- GRADONI, L.; SCALONE, A .; GRAMICIA, M.,1993. HIV-Leishmania co-infections in Italy: serological data as a indication of the sequence of aquisition of two infections. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 87:94-96.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, I. & ORSINI,S.,1992. Decreased sensivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isoled from dogs after several courses of drug treatment. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 86:613-620.
- GRIMALDI,G.JR.; KREUTZER,R.D.; HASIGUCHI,Y.; GOMEZ,E.A .; MIMORY,T. & TESH,R.B.,1992. Description of *Leishmania equatoriensis* sp. n. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87:221-228.
- GRIMALDI,G.JR. & TESH,R.B.1993. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and Implications for Future Research. *Clinical Microbiology Reviews* , 7: 230-250.
- GOMES,A.C. 1994. Sand fly vectorial ecology in the sate of São Paulo. *Memórias do Instituto do Instituto Oswaldo Cruz*,89 (3):457-460.
- GOMES,A.C.; OTTATI,S.M.; SHAW,J.J.; LAINSON,R.; YAMAMOTO,Y. 1989. Active transmission of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra do Mar forest, São Paulo, Brazil. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83:193.
- GUIMARÃES, M.C.S.; CELESTE,B.J.; FRANCO,E.L.; CUCÉ,E.L. & BELDA,W.Jr. 1989. Evaluation of serological diagnosis indices of mucocutaneous leishmaniasis: immunofluorescent tests and enzyme-linked immunoassays for IgG, IgM and IgA antibodies. *Bulletin of World Health Organization*, 67(6):643-648.

- HALDAR, J.P.; GHOSE, S.; SAHA K.C & GHOSE A.C., 1983. Cell mediated immune response in Indian Kala-azar and post Kala-azar dermal leishmaniasis. *Infection and Immunity* 42: 702-707.
- HARRISON, L.H.; NAIDER, T.G.; DREW, J.S.; DE ALENCAR J.E. & PEARSON, R.D., 1986. Reciprocal relationships between undernutrition and parasitic disease visceral leishmaniasis. *Review of Infectious Diseases*. 8:447-453.
- HOMMEL, M. 1978 The genus Leishmania. Biology of the parasite and clinical aspects. *Bulletin du Institute Pasteur, Paris* 75: 5-102.
- HOSMER, D.W. & LEMESHOW, S. 1989 *Applied Logistic Regression*. John Willey and Sons 1^a ed. New York
- JANSEN, A.M.; MORIEARTY, P.L.; GALVÃO-CASTRO, B. & DEANE, M.P., 1985. *Trypanosoma cruzi* in opossum: an indirect fluorescent antibody test for the diagnosis and follow up of natural infection and experimental infections. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 79 (4): 474-477.
- JERONIMO, S.M.B.; OLIVEIRA, R.M.; MAKAY, S.; COSTA, R.M. SWEET, J.; NASCIMENTO, E.T.; JERIGAN, J.; PEARSON, R.D. 1994 An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88:386-388.
- JOHNSON, R.N.; YOUNG, D.G.; BUTLER, J.F. & BOGAERT-DIAZ, H., 1992. Possible determination of the vector and reservoir of leishmaniasis in Dominican Republic. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46 (3) 282-287.

- KREUTZER,R.D.; CORREDOR, A .;GRIMALDI, G.JR.;GROGL,M.; ROWTON, E.D.; YOUNG,D.G.; MORALES, A .; MACMAHON-PRATT,D.; GUZMAN,A .& TESH, R.B. 1991. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp.n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) a new parasite infecting humans, animals and phlebotomine and flies in Colombia and Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 662-675.
- KREUTZER, R.D.; SOURATY, N. & SEMKO, M.E.,1987. Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.36:22-32.
- LAINSON,R.,1989. Demographic changes and their influence on the epidemiology of American leishmaniasis. Service MW, (Ed.) *Demographic and Vector-Borne Diseases*. Boca Raton, FL; CRC Press, 85-106.
- LAINSON,R.; DYE, C.; SHAW, J.J.; MACDONALD, D.W.; COURTENAY, D.O.; SOUZA,A.A. & SILVEIRA,F.T.1990. Amazonian Visceral Leishmaniasis distribution of the vetor *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relations to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85:135-137.
- LAINSON, R.; F SHAW, J.J. & LUIS,Z.C.,1969. Leishmaniasis in Brazil, IV – The Fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para Sate, Brazil. *Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 63: 741-745.
- LAINSON,R. & SHAW,J.J.,1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. Review articles: parasitology supplement. *Nature* ,237 (22): 595-600.

- LAINSON R & SHAW,J.J.,1979. *The role of animals in the epidemiology of the South American leishmaniasis*. In W.H.R. Lumsden & D.A. Evans (Ed.) *Biology of the Kinetoplastida*, vol.2. Academic Press Ltd, London.
- LAINSON,R. & SHAW,J.J.1987. Evolution, classification and geographical distribution In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol 1 Biology and Epidemiology* Petter, W. and Killick-Kendrick,R. (Eds.) Academic Press.
- LANOTTE,G.; RIOUX,J.A.; PERIERES,J. & VOLLHARDT,Y.,1979. Écologie des leishmanioses dans le sud de France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Élaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Annales de Parasitologie*, 54:277-295.
- LAVERAN,A.,1917.*Leishmanioses. Kala-Azar, Bouton d'orient, Leishmaniose Américaine*. Masson et Cie., (ed), Paris, 521p.
- LERGER,L.,1904. Sur les affinité de l'Herpetomonas subulata et la phylogénie des trypanosomes. *Comptes rendues Habd Sceances et Memoire de la Société de Biologie* 56:605-607.
- LESTOQUARD,F. & DONATIEN,A.,1938. Parasitisme de la matrice unguéale dans la leishmaniose générale du chien. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 31: 483-487.
- LISTE,F.& GASCON,M.,1995. Allopurinol in the treatment of canine visceral leishmaniasis. *The Veterinary Record*, 1: 23-24,1995.
- LOOKER,D.L.; MARTINEZ,S.; HORTAN,J.M. & MARR, J.J.,1986. Growth of *Leishmania donovani* amastigotes in the continuous human macrophage cell line U937: studies of the drug efficacy and metabolism. *Journal of Infectuous Diseases* 154:323-327.

- MANCIANTE,F.; GRAMICCIA,M.; GRADONI,L.& PIERI,S.,1988. Studies on canine Leishmaniasis control. 1- Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82:566-567.
- MARTINEZ,S.; LOOKER,D.L. & MARR,J.J.,1988. A tissue culture system for the growth kinetics and drug sensitivities. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 38: 304-307.
- MARZOCHI,M.C.A.,1994. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 23 (2): 82-84.
- MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; AMENDOEIRA,M.R., 1981. Leishmaniose Visceral (Calazar). *Jornal Brasileiro de Medicina*. 41 (5): 61-84.
- MARZOCHI,M.C.A.; COUTINHO,S.G.; SOUZA,W.J.; GRIMALDI, G. Jr.; MOMEN,H.; PACHECO,R.S.; SABROZA,P.C.; SOUZA,M.A.; RANGEL,F.B. & TRAMONTANO, N.,1985. Canine Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80: 349-357.
- MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI,K.B.F.,1994. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil- Emerging Anthroponosis and Possibilities of their Control. *Cadernos de Saúde Pública* 10(2): 359-378
- MARZOCHI,M.C.A.; SABROZA,P.C.; TOLEDO,L.M.; MARZOCHI, K.B.F. & RANGEL,F.F.,1985a. Leishmaniose Visceral na Cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pública, R.J.* 1: 5.
- MARZOCHI,M.C.A.; COUTINHO,S.G. SABROZA,P.C. SOUZA,M.A.; SOUZA,P.P.;TOLEDO,L.M.; RANGEL,F.B.,1985b. Leishmaniose

- Visceral Canina no Rio de Janeiro – Brasil. *Cad. de Saúde Pública*, R.J. 1 (4) 432-446.
- MARZOCHI,M.C.A. & MARSDEN,P.P.,1991. Ecologia e Controle de Vetores – Leishmanioses. in: *Encontro Nacional sobre Saúde e Meio Ambiente (Fiocruz)* , Rio de Janeiro: pp. 31-36.
- MARZOCHI,M.C.A. ; MARZOCHI, K.B.F. & CARVALHO, R.W. 1994. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitology Today* 10: 37-40.
- MOLINA,R.; AMELA,C.; NIETO,J.;SAN ANDRÉS,M.; GONZALEZ,F.; CASTILLO,J.A.; LUCIENTES,J.; ALVAR,J.1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*,88: 491-493.
- MOMEN,H.; GRIMALDI,G.Jr.; DEANE,L.M.,1987. *Leishmania infantum*, the aetiologic agent of American Visceral Leishmaniasis (AVL). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82: 447-448.
- MONTALBÁN,C.; MARTINEZ-FERNANDEZ,R.; CALLEJA,J.L.; GARCIA-DIAZ,J.D.; RUBIO,R.; DRONDA,F.; MORENO,S.; YEBRA,M.; BARROS,C.; COBO,J.; MARTINEZ,M.C.; RUIZ,F. & COSTA,J.R., 1989.Visceral Leishmaniasis (kala-azar) as na opportunistic infection in patients with human immunodeficiency virus in Spain. *Review of Infectious Diseases*. 11:655-660.
- NOWAK,R.M.; PARADISO,J.L., eds.1991. *Walker's Mammals of the World. Marsupialia*. Volume I Fifth edition. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press. 10 – 113.
- OLIVEIRA-NETTO,M.P.; GRIMALDI,G.JR.; MOMEN,H.; PACHECO, R.S.; MARZOCHI,M.C.A .& MCMAHON-PRATT,D.,1986. Active cutaneous leishmaniasis in Brazil induced by *Leishmania donovani* chagasi. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81: 303-309.

- PARANHOS-SILVA,M.; NASCIMENTO,E.G.; MELRO,M.C.B.F.;OLIVEIRA, G.C.S.; DOS SANTOS,W.L.C.; PONTES-DECARVALHO, L.C.& OLIVEIRA–DOS-SANTOS,A.J. 1998. Cohort study on canine emigration and Leishmania infection in na endemic area for visceral leishmaniasis. Implications for disease control. *Acta tropica* 69: 75-83.
- PEARSON,R.D.; COX, G.; JERONIMO,S.M.B.; CASCATRANE,J. DREW, J.S.; EVANS,T. & ALENCAR,J.E.,1992. Visceral Leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47 (1): 8-15.
- PENNA,H.A.,1934. Leishmaniose Visceral no Brasil. *Brasil Médico*,18: 940-950.
- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.;BERNADINA,W.; DEL REAL, G.; RUIEMBER G,J.,1994. Cellular and Humoral Immune Response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, 62: 229-235.
- PORTUGAL,J.,1994. Berenil acts as poison of eukaryotic topoimerase II. *FEBS Letters*, 344:136-138
- POZIO,E.; GRADONI,L.; BETTINI,S.; GRAMMIFICIA,M.,1981. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Tropica* 38:383-393.
- RANGEL,E.F.; SOUZA,N.A.; WERMELINGER,E.D.; AZEVEDO,A.C.R.; BARBOSA,A. & ANDRADE,C.A. 1986. Flebótomos em Vargem Grande, Foco de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 81(3): 347-349.

- RASSAN,M.B.& AI-MUDHAFFAR,S.A. 1980. Comparative diagnosis study of kala azar. *American Journal of Tropical Medical Parasitology* , 74: 283-287.
- REED,S.G.; BADARÓ,R.; MANSUR,H.; CARVALHO,E.M.; LOURENÇO, R.; LISBOA,A.; TEIXEIRA,R.; JOHSON,W.D. & JONES,T.C. 1986. Selection of a skin test antigens for american visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35 (1):79-85.
- REY,L .*Parasitologia*.1991.*Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África*. 2^a edição. Ed. Guanabara Koogan S.A . 731p.
- RIOUX,J.A; LANOTTE,G.; CROSET,H.; DEDET,J.P.,1972. Écologie des leishmanioses dans le sud de France. II. Pouvoir infestant comparé des diverses formes de leishmaniose canine vis-a-vis de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir,1921. *Annales de Parasitologie Hummaine et Comparée* 47:413-419.
- RIOUX,J.A; LANOTTE,G.; SERRES,E.; PRATLONG,F.; BASTIEN,P.& PERIERES,J.,1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Hummaine Comparée* 65: 111-125.
- RODGERS,M.R.; POPPER,J.M. & WIRTH,D.F.,1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 71: 267-275.
- ROÇADO,A.L.C. (1997) Leishmaniose Visceral em Humanos e Caninos na Região de Guaratiba, Rio de Janeiro. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Dissertação de Mestrado.
- SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A. & MARZOCHI, M.C.A. (1978) In XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e II Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, João Pessoa - PB.

- SALIMONU,L.S.; OJO-AMAIZE,E.; WILLIAMS,A.I.O.; JOHNSON, A.O.K.
COOKE,A.R.; ADEKUNLE,F.A.; ALM,G.V.; WIGZELL, H.;1982.
Depressed natural killer cell activity in children with protein-calorie
malnutrition. *Clinical, immunology and Immunopathology* 24:1-7.
- SANTOS 1998. *Medical Veterinarian Entomology* 12: 315-317
- SENEKJIE,C.M.,1944. American Visceral Leishmaniasis. The etiological
agent. *Journal of Parasitology* 30:303-308.
- SEYDI-RASHTI, M.A .& NADIN, A., 1975. Re-establishment of cutaneous
leishmaniasis after cessation of anti malaria spraying. *Tropical
Geographic Medicine* 27:79-82.
- SHAW,J.J.,1993. *Taxonomy of Genus Leishmania. Present and future
trends and their implications*. In Sinval P. Brandão-Filho (ed.)
Research and Control of Leishmaniasis in Brazil. Proceedings of a
workshop held in Recife, Brazil, 324p.
- SHERLOCK,I.A.,1996. Ecological Interactions of the visceral leishmaniasis
in the Sate of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*,
91:671-683.SHERLOCK,I.A.,1997. *Interações Ecológicas da
Leishmaniose Visceral no Estado da Bahia, Brasil*. Fundação
Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Salvador,
Bahia, 22p. Tese.
- SHERLOCK, I.A.; MIRANDA, J.C.; SADIGURSKY,M. & GRIMALDI Jr. G.
1984. Natural infection in the opossum *Didelphis albiventris*
(Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brasil.
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 79: 515.

- SHERLOCK, I.A. & GUITTON, N. 1969a. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia III Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 21: 541-548.
- SHERLOCK, I.A. & GUITTON, N. 1969b. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia IV Variação horária e estacional do *Phlebotomus longipalpis*. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 21: 715-728.
- SHERLOCK, I.A. & SHERLOCK, V.A., 1961. Sobre a infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* pela *Leishmania donovani*. *Revista Brasileira de Biologia* 21:409-418.
- SOUZA, M.A.; SABROZA, P.C.; MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S. 1981. Leishmaniose Visceral no Rio de Janeiro. 1-Flebotomíneos da área de procedência de caso humano autóctone. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* ,76 (2): 161-168.
- TITUS, R.G. & RIBEIRO, J.M.C. 1988. Salivary gland lysates from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239: 1306-1308
- TESH, R.B., 1995. Control of zoonotic Leishmaniasis: is it time to change strategies? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 52(3):287-292.
- TESH, R.B.; PAPA-EVANGELOU, G., 1977. Effect of insecticide spraying for malaria control on the incidence of sandfly fever in Athens, Greece. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 26: 163-166.
- TOLEZANO, J.E.; MACORIS, S.A. & DINIS, J.M.P., 1980. Modificação na epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Vale da Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 40:49-54.

- TRAVI, B.L.; JARAMILLO,C.D.; MONTOYA,J.; SEGURA,I.; ZEA,A.; GONÇALVES,A .& VELLEZ,I.D., 1994 *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50 (5): 557-565.
- TRAVI,B.L.; MONTOYA,J.; GALEGO,J.; JARAMILLO,C.; LLANO,R.& VELEZ,I.D.1996. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera, Psychodidae), vector of visceral leishmaniasis in northern Colombia. *Journal of Medical Entomology*. 33 : 27.
- TRAVI,B.L.; OZORIO,Y.; GUARÍN,N. & CADENA,H. 1998a. *Leishmania (L.) chagasi*: Clinical and Parasitological Observations in Experimental infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World Visceral Leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 88:73-75.
- TRAVI,B.; OZORIO,Y., BECERRA,M.T.; ADLER,G.H. 1998b. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 92:275-278.
- TRAVI, B.L.; VÉLEZ, I.D.; BRUTUS,L.; SEGURA,I.; JARAMILLO, C.D.; MONTOYA, J.,1990.*Lutzomyia evansi* an alternative vector of *Leishmania chagasi* in Colombian focus of Visceral Leishmaniasis. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84: 676-677.
- VAN EYS, G.J.J.M.; SCHOONE,G.J.; KROON,N.C.M. & EBELING,S.B.,1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular Biochemical Parasitology*. 51:133-142.
- VASCONCELOS,I.A.; SOUZA, A.O.; VASCONCELOS, A .M.;DIOGENES, M.J.; MOMEN,H.; GRIMALDI.JR.G.; MENEZES,D.B. & SLEIGH,

A.C.,1993. Cutaneous parasitism by *Leishmania chagasi* during South America Visceral Leishmaniasis. *Boullletin de la Societé de Pathologies Éxotiques*, 86 (2): 101-105.

VEXENAT,J.A.; FONSECA DE CASTRO,J.A. CAVALCANTE,R.; TAVARES,J.P.; SILVA,M.R.E.; BATISTA,W.H.; FURTADO CAMPOS,J.H.; HOWARD,M.K.; FRAM,I; McNERNEY,R.; WILSON,S. & MILLES,M.A.1994. Visceral Leishmaniasis in Teresina, State of Piauí, Brazil. Preliminary Observations on the Detection and transmissibility of Canine and Sandflies Infections. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89(2):131-135.

WHO,1996. World Health Organization *Manual on Visceral Leishmaniasis Control*. Division of Control of Tropical Diseases, Geneve.

ANEXO 1

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA – ENSP
PROJETO BARRA DE GUARATIBA

Data
Coleta no.

Canino

DADOS DO CANINO

Nome	Raça	Sexo	Idade	Morador <input type="checkbox"/>
Proprietário _____				Visitante <input type="checkbox"/>
Endereço _____				
Onde passa o dia? () casa / () quintal / () rua / () mata				
Qual a alimentação? () comida de panela / () ração / () caça				
5) Animal com sintomatologia sugestiva? () sim / () não				
6) Qual? _____				
Observações que se julgarem importantes:				

DADOS DA RESIDÊNCIA

1) Muro: () sim / () não
2) Altitude (m.): () 0- 50 / () 50-100 / () + de 100

3) Animais silvestres visitam o quintal da residência? () sim / () não

4) Quais? 4.1 rato do mato ()

4.3 – mico ()

4.2 gambá ()

4.4–outro() Qual ? _____

RESULTADO DA SOROLOGIA