



# UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA

**Estudo da seroprevalência de Anticorpos Anti-  
*Leishmania* spp. numa população que coabita com  
canídeos com leishmaniose**

Maria João Dinis da Fonseca

IV Edição do Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes

Lisboa, 2009



# UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA

**Estudo da seroprevalência de Anticorpos Anti-  
*Leishmania* spp. numa população que coabita com  
canídeos com leishmaniose**

Maria João Dinis da Fonseca

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Emília Valadas e co-orientada pela Doutora Helena Ângelo

O conteúdo da presente dissertação é da exclusiva responsabilidade da autora, assim sendo a Faculdade de Medicina de Lisboa está excluída de responsabilidade nos conteúdos apresentados.

IV Edição do Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes

Lisboa, 2009<sup>i</sup>

## RESUMO

A leishmaniose visceral tem apresentado mudanças consideráveis no seu padrão de transmissão continuando a ser considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma doença de categoria 1, o que significa uma doença emergente e não controlada.

Em Portugal, a prevalência de leishmaniose no cão tem vindo a aumentar, tendência que se manifesta igualmente em medicina humana ainda que com números completamente díspares entre Homem e cão. Mas, o facto de a doença ter baixa prevalência no Homem, não invalida a importância de estudos serológicos na população assintomática.

A questão da segurança da coabitação com cães com leishmaniose é frequentemente equacionada na prática clínica. A eliminação dos reservatórios caninos constitui uma das ferramentas preconizadas pela OMS. No entanto, na maioria dos casos, esta medida tem-se revelado infrutífera, para além de ser controversa do ponto de vista ético, como é reconhecido pela própria OMS.

Pretendeu-se com este estudo epidemiológico comparar a seroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania infantum* numa população de 50 proprietários de cães com leishmaniose em comparação com 50 proprietários de cães sem leishmaniose. Os resultados obtidos com a técnica de Imunofluorescência Indirecta (IFI) apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as duas populações podendo levar à conclusão que o convívio com um cão doente é um factor de risco. No entanto, estes resultados não foram comprovados pela técnica de Immunoblot, o que, por um lado permite concluir a ausência de especificidade da IFI em populações assintomáticas e por outro concluir que a posse de cão doente não é, com base neste estudo, um factor de risco. Este estudo contribui para uma melhor caracterização serológica da população Portuguesa face à

leishmaniose e permite ao clínico responder de forma mais sustentada à questão da segurança da convivência com animais com leishmaniose.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Leishmaniose visceral, cão, Homem, coabitação, seroprevalência.

## **ABSTRACT**

Visceral leishmaniasis has presented considerable changes in its pattern of transmission and is still classified by the World Health Organization (WHO) as a category 1 disease, in other words, “emerging and uncontrolled”.

In Portugal, leishmaniasis in dogs has been increasing, something that also occurs in human medicine, but the statistics between man and dog are quite different. However, the fact that the disease does not prevail in man does not invalidate the importance of serological studies in the asymptomatic population.

The concern over safety in what pertains to cohabitation with dogs carrying leishmaniasis is frequently raised in clinical practice. The elimination of the canine reservoirs has been adopted by the WHO. Nevertheless, in the majority of the cases, this measure has become ineffective and controversial in an ethical point of view, as it has been recognized by the WHO.

The purpose of this epidemiological study is to compare the seroprevalence of *anti-Leishmania infantum* antibodies in a population of 50 dogs owners infected with leishmaniasis and 50 dog owners without leishmaniasis. The results obtained with Indirect Immunofluorescence (IIF) present significant statistical differences between the two case studies leading to the conclusion that cohabitation with an infected dog is a risk factor. However, these results have not been acknowledged by

Immunoblot (IB) which, on the one hand, concludes the lack of specificity of IIF in asymptomatic populations and, on the other, that having a sick dog is not, according to this study, a risk factor. This study contributes to the serological characterization of the Portuguese population concerning leishmaniasis and it also allows the health professional to sustainably respond to the matter of safety in living with animals infected with leishmaniasis.

#### **KEYWORDS**

Visceral leishmaniasis, dog, Man, cohabitation, seroprevalence.

**"On making smear preparation from the spleen pulp, I was struck by the curious appearance, among the spleen cells and red corpuscles of enormous numbers of small round or oval bodies 2 to 3 mm diameter, which corresponded to nothing I had previously met or had seen figured or described"**

**William Leishman, British Medical Journal, 1903**

**"Structurally, protozoa are equivalent to a single animal cell; functionally, they are equivalent to a whole animal."**

**J. Baker, Manson's Tropical Diseases, 2005**

**"The *L. infantum* genome is 32,134,935 bp in size, with a karyotype of 36 chromosomes. The G+C content is 59,3%."**

**C. S. Peacock, Nature Genetics, 2007**

**"The host-parasite relationship can be thought of as a delicate balance which may easily be tipped in favour of one part or the other."**

**J. Baker, Manson's Tropical Diseases, 2005**

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Doutora Emília Valadas por estar sempre disponível e por todos os conselhos.

À Doutora Helena Ângelo por me ter aberto as portas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

Às técnicas da secção de parasitologia do INSRJ pela ajuda na realização do trabalho laboratorial, muito especialmente à Sr<sup>a</sup> D. Idalina Ferreira.

A todos os proprietários de cães que gentilmente colaboraram comigo.

À minha família pela ajuda, em especial aos meus filhos, com o desejo que herdem a vontade de querer saber sempre mais.

## ÍNDICE

<i>Lista de abreviaturas e siglas</i> .....	0
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	2
<b>2.1 - Definição</b> .....	2
<b>2.2 - História</b> .....	3
<b>2.3 - Epidemiologia</b> .....	4
2.3.1 - Características dos vectores e reservatórios .....	6
2.3.2 - A questão da co-infecção <i>Leishmania</i> /VIH.....	9
2.3.3 - Outras vias de transmissão .....	11
<b>2.4 - Classificação</b> .....	12
<b>2.5 - Apresentação clínica da leishmaniose visceral por <i>L. infantum</i></b> .....	16
2.5.1 - Apresentação clínica da leishmaniose humana.....	16
2.5.2 - Apresentação clínica da leishmaniose canina.....	18
<b>2.6 - Situação epidemiológica em Portugal</b> .....	18
2.6.1 - Situação do cão e outros reservatórios em Portugal.....	22
<b>2.7 - Diagnóstico</b> .....	25
2.7.1 - Resposta imunitária e os diferentes testes .....	25
2.7.2 - Teste de Montenegro .....	26
2.7.3 - Testes Serológicos .....	27
2.7.3.1 - O método de ELISA e Técnicas de Aglutinação.....	28
2.7.4.2 - O método de Imunofluorescência Indirecta .....	28
2.7.4.3 - O método de <i>Immunoblot</i> .....	29
2.7.5 - A PCR.....	29
<b>2.8 - Estudos em população assintomática</b> .....	30
<b>2.9 - Tratamento</b> .....	32
<b>2.10 - Prevenção</b> .....	32
2.10.1 - Controlo dos reservatórios e dos vectores .....	32
2.10.2 - Vacinas .....	34
<b>3 - OBJECTIVOS</b> .....	35
<b>4 - MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
4.1 - Obtenção das amostras.....	38
4.2 – Processamento das amostras.....	38
<b>5 - RESULTADOS</b> .....	39
<b>5.1 – Caracterização das populações</b> .....	41
5.1.1 – Caracterização da População Alvo e da População Controlo .....	41
5.1.2 – Caracterização da população canina com leishmaniose .....	45
<b>5.2 – Apresentação de resultados</b> .....	47
<b>6 – DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>6.1 – Análise da metodologia</b> .....	52
6.1.1 – A amostra .....	52
6.1.2 – O uso de papel de filtro .....	53
6.1.3 – A escolha dos testes de diagnóstico: IFI e IB .....	54
<b>6.2 – Comparação com outros estudos</b> .....	55

6.3 – Limitações e necessidades .....	57
7 - <i>CONCLUSÃO</i> .....	57
8 – <i>PROJECTOS FUTUROS</i> .....	59
8 - <i>BIBLIOGRAFIA</i> .....	60
<i>ANEXOS</i> .....	72
ANEXO N°1 – Consentimento livre e informado.....	73
ANEXO N° 2 – Folha para recolha de dados .....	74
ANEXO N° 3 – Folheto informativo sobre leishmaniose .....	77

## **Lista de abreviaturas e siglas**

Ac – Anticorpo  
ADN – Ácido Desoxirribonucleico  
Ag – Antigénio  
CI – Critério de Inclusão  
DAT – Direct Agglutination Test  
DDT – Dicloro-Difenil-Tricloroetano  
ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay  
IB – Immunoblot  
IFI – Imunofluorescência Indirecta  
LC – Leishmaniose Cutânea  
LCD – Leishmaniose Cutânea Disseminada  
LMC – Leishmaniose Mucocutânea  
LV – Leishmaniose Visceral  
NCCLS – National Committee on Clinical Laboratory Standards  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PA – População Alvo  
PC – População Controlo  
PBS – Phosphate Buffered Saline  
PCR – Polymerase Chain Reaction  
SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida  
SMF – Sistema Mononuclear Fagocitário  
TAAE – Terapêutica Antiretrovívica de Alta Eficácia  
TM – Teste de Montenegro  
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

# 1 - INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma zoonose endémica em Portugal, sendo o cão o principal reservatório. Nos últimos anos, os médicos veterinários têm tratado um número crescente de cães com a doença. Actualmente, a terapêutica possibilita a cura clínica do cão e a sua permanência no núcleo familiar. Contudo, não está definido o risco de transmissão da doença aos proprietários. Dada a relação de estreita proximidade com o animal é fundamental conhecer este risco, principalmente, no caso de o núcleo familiar integrar crianças ou indivíduos imunocomprometidos. Os estudos que pretendem avaliar esta problemática são escassos e nenhum se centra na questão da convivência com o cão doente. O aumento verificado em medicina veterinária, não se verifica em medicina Humana, onde embora exista sub-notificação, há cerca de 20 casos por ano de leishmaniose visceral no país. Perceber o porque da disparidade da prevalência da doença entre o Homem e o cão é uma das questões mais pertinente em torno desta zoonose. Embora os números indiquem que a prevalência da doença no Homem em Portugal não constitua um grave problema, pouco se sabe da prevalência de infectados assintomáticos, cujo conhecimento é importante quer em termos epidemiológicos quer em termos clínicos

Este estudo, que consistiu numa análise comparativa de dois grupos de proprietários de cães, para avaliar a variável posse de um cão doente, pretende ser um contributo para o conhecimento da epidemiologia desta zoonose emergente e tem como principal objectivo avaliar se a proximidade física com o cão com leishmaniose se associa a uma maior probabilidade de o proprietário do cão ser infectado por flebótomo.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão bibliográfica aborda com maior detalhe a leishmaniose visceral causada por *L. infantum*, por ser a forma endémica em Portugal (embora não a única, como será referido).

### 2.1 - Definição

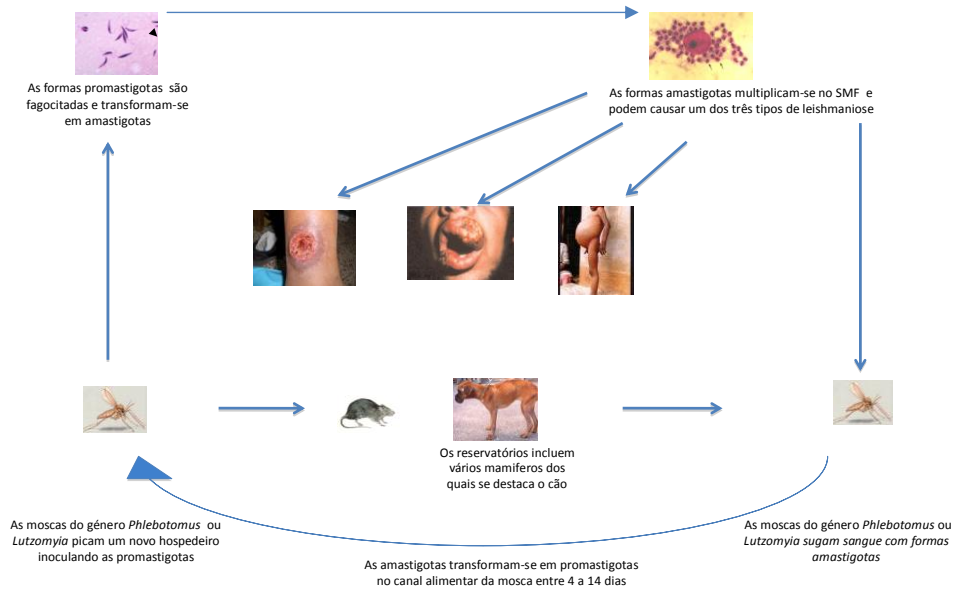
A leishmaniose é uma zoonose causada por um parasita protozoário do género *Leishmania*, que é transmitido pela picada de uma “mosca da areia” do género *Phlebotomus* (no velho mundo) e do género *Lutzomyia* (no novo mundo). *Leishmania* é um protozoário dimórfico que, na sua forma amastigota, é parasita intracelular do sistema mononuclear fagocitário dos vertebrados e, na sua forma promastigota, existe no canal alimentar do insecto vector (e em meio de cultura). Apresenta, portanto, um ciclo de vida digenético. A transmissão do parasita é realizada pelo insecto fêmea que é hematófago.

As doenças causadas pelas várias espécies de *Leishmania* têm características clínicas e epidemiológicas diversas e são designadas por leishmanioses. Além do Homem, a doença pode afectar cães, raposas, gatos, chacais, roedores e outros animais.

No Homem há três formas de doença:

- leishmaniose cutânea (LC) (com a variedade cutânea disseminada (LCD) e cutânea recidivante) – após a picada do insecto forma-se uma lesão ulcerada, tipicamente localizada numa área exposta (face ou membros);
- leishmaniose mucocutânea (LMC) ou espúndia (designada por alguns autores de leishmaniose das mucosas (1)) – há disseminação do parasita a partir da lesão cutânea inicial através da mucosa oral e/ou nasal provocando úlceras que podem causar perfuração da mucosa e desfiguração facial;

- leishmaniose visceral (LV) (com a variante leishmaniose dérmica pós kala-azar) –  
o parasita concentra-se no baço, fígado e medula óssea.



**Figura 1**– Ciclo de vida da *Leishmania* spp. (adaptado de ref.(1))

## 2.2 - História

O primeiro registo de leishmaniose é atribuído à civilização pré-inca do Perú e do Equador (400-900 dC) e é relativo à LMC. Desenhadas em peças de cerâmica, realizadas por esta civilização, observam-se figuras com narizes mutilados, característicos da leishmaniose mucocutânea Americana. Em 1885, Cunningham descreveu o parasita em lesões cutâneas (2) e, no ano de 1903, foi feita a primeira publicação de envolvimento visceral, por William Leishman que observou, na autópsia de um soldado inglês que tinha estado na Índia, o parasita no baço (3). Em 1908, Charles Nicolle demonstrou o papel do cão como hospedeiro

intermediário mas, só em 1942, é definitivamente demonstrada a transmissão ao Homem, pela picada de flebótomo, fechando o ciclo desta zoonose. Desde então, tem sido estudado com detalhe o ciclo da doença. Actualmente, a etiologia da doença está definida mas há desafios que permanecem por resolver, tais como: compreender melhor a complexidade da resposta imunitária, obter um meio de diagnóstico rápido e de custo acessível, dispor de um tratamento mais eficaz e de medidas profilácticas, nomeadamente, desenvolver uma vacina humana, à semelhança do que já existe no Brasil, desde 2004, para a população canina (4).

Nas duas últimas décadas têm-se verificado um aumento da incidência e da expansão geográfica da leishmaniose gerando, em muitos países, um problema de saúde pública emergente ou re-emergente. Este aumento deve-se, essencialmente, a quatro factores:

- interrupção das campanhas antimaláricas;
- alterações demográficas e ecológicas de que é exemplo o sobreaquecimento global. A década de 90 do século passado foi a mais quente de sempre e, o ano de 1998, o ano mais quente de que há registo (Organização Mundial de Saúde(OMS));
- ineficácia ou ausência de planos de controlo;
- infecção por vírus da imunodeficiência humana (VIH).

### **2.3 - Epidemiologia**

As leishmanioses são endémicas em 88 países espalhados pelo mundo (66 do novo mundo e 22 do velho mundo) e estão presentes em todos os continentes excepto na Austrália e na Antárctica (figuras 2 e 3). Desses 88 países só 16 são industrializados e os 72 em vias de desenvolvimento incluem 13 países considerados dos mais pobres do mundo. A prevalência é de 12 a 14 milhões de

doentes e a incidência é de dois milhões de novos casos/ano, dos quais, um quarto são de leishmaniose visceral e os restantes três quartos de leishmaniose cutânea. A mortalidade é, oficialmente, calculada em 59.000 casos/ano (60% dos casos no sexo masculino). A OMS estima que 350 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença. As leishmanioses, particularmente a LV, é uma das sete endemias mundiais de prioridade absoluta da OMS. A seguir à malária e à filariose linfática é a doença transmitida por um vector mais importante a nível mundial. Embora de carácter endémico, pode assumir características epidémicas como aconteceu nos anos 90, no Sul do Sudão, onde se estima que tenham morrido 100.000 pessoas com LV (mais do que na guerra civil) e no estado de Bihar, na Índia, onde, desde 1993, 250.000 pessoas contraíram a doença (5).

Importa realçar que, a nível mundial se reconhece que o número de casos da doença é muito superior ao notificado, sendo ainda maior o número de infectados assintomáticos. Esta situação é explicada pelo facto de a doença só ser de notificação obrigatória em 33 países (incluindo Portugal) dos 88 em que é endémica e pelo facto de ser uma zoonose negligenciada e associada à pobreza (6).



**Figura 2 – Distribuição da leishmaniose visceral no Mundo**

Ocorre em 65 países, 90% dos casos de leishmaniose ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil, nos três primeiros casos associados a *L. donovani* e no Brasil e Sudão a *L. chagasi* (adaptado de ref.1)



**Figura 3 – Distribuição da leishmaniose cutânea no Mundo**

Ocorre em 82 países, 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem em sete países:

Afganistão, Algéria, Brasil, Irão, Perú, Arábia Saudita e Síria (adaptado de ref.1)

### **2.3.1 - Características dos vectores e reservatórios**

O conhecimento do ciclo evolutivo, nomeadamente no que respeita às características ecológicas e comportamentais dos vectores e dos reservatórios, é crucial no combate à doença. Para um melhor enquadramento da questão da segurança da convivência com os reservatórios infectados/doentes, que é colocada nesta dissertação, é importante conhecer algumas das características dos vectores:

- os flebótomos são insectos muito pequenos (1,5 a 3,5 mm de comprimento) o que condiciona a acção da maioria das redes;
- são activos do pôr-do-sol ao amanhecer, preferencialmente crepusculares. Quando não activos, procuram locais frescos, húmidos e escuros. Os locais de descanso incluem caves, fissuras no solo, buracos nas árvores e locais com

animais como por exemplo estábulos ou coelheiras. Estes biótopos, se forem ricos em matéria orgânica e em humidade, também servem para a ovopostura;

- são maus voadores mas, em determinadas condições relacionadas com o vento, podem dispersar-se até 2,2 Km. Ventos suaves ajudam à detecção do odor do hospedeiro/reservatório mas, ventos de 1,5 m/s, já inibem o voo;

- preferem picar perto do sítio de repouso/reprodução;

- independentemente de serem exofágicos/endofágicos, têm fototropismo positivo o que faz com que à noite piquem dentro de casa;

- *Phelebotomus ariasi* e *Phelebotomus perniciosus* são os vectores comprovados de leishmaniose em Portugal (tabela 1). *P. ariasi* tem preferência por zonas mais húmidas, como o Alto Douro e *P. perniciosus*, o mais frequente em Portugal, por zonas mais áridas. Ambos são zoo-antropofílicos mas preferencialmente zoofílicos o que pode ajudar a explicar a disparidade de prevalência da doença entre o cão e o Homem (7).

**Tabela 1 – Características de *P. perniciosus* e de *P. ariasi*.**

Espécie	Tropismo	Filia	Fagia	Concordância	Fototropismo
<i>P.perniciosus</i>	Zoo-antropofílico	Endofílico* Exofílico	Exofágico Endofágico	Concordante	Positivo
<i>P. ariasi</i>	Zoo-antropofílico	Exofílico	Endofágico Exofágico*	Concordante	Muito forte

\*indica prioridade

- cerca de quatro a dez dias após terem picado um hospedeiro ou reservatório que esteja infectado, ou doente, ficam com capacidade para infectar um novo hospedeiro/reservatório. A fêmea, uma vez infectada, permanece o resto da vida infectada. A fêmea vive cerca de um mês e, durante esse tempo, realiza cerca de quatro ovoposturas necessitando, para cada uma, de uma refeição de sangue

(gonotrófico concordante). O risco epidemiológico das espécies concordantes é menor do que o das espécies discordantes como, por exemplo, *P. papatasi* que tem que picar de dois em dois dias.

- na saliva destes insectos existem substâncias que causam vasodilatação, inibem a hemostase local e inibem a acção dos macrófagos o que torna a picada mais eficaz. Este facto é relevante quer quando esta transmissão é comparada com a transmissão por via artificial quer na investigação de vacinas;

- um dado curioso é o facto dos flebótomos que estão infectados com leishmanias alterarem o seu comportamento e sugarem sangue com maior frequência do que os que não estão infectados (5, 7).

Apesar de existirem leishmanias (*L. donovani*, *L. archibaldi*, *L. tropica*, *L. killicki*) com transmissão predominantemente antroponótica (embora potencialmente patogénicas para outros animais (6)), na maioria dos casos existem reservatórios que asseguram a manutenção da doença na natureza. Os reservatórios são animais domésticos ou silvestres e, em casos particulares, o Homem (como no caso da leishmaniose cutânea pós kala-azar). Desconhece-se na população humana quer a real incidência de portadores assintomáticos quer o significado do seu papel na epidemiologia da doença. Esta questão é um dos factores a ter em conta quando se discute a eficácia da eliminação dos cães infectados/doentes, como é sustentado por alguns estudos (8-10).

De todos os reservatórios conhecidos o cão é o mais importante. Entre os 88 países onde a leishmaniose humana está presente, há 50 países com casos de leishmaniose canina. Esta associação afecta principalmente o Brasil, a China e a orla Mediterrânica. A elevada prevalência e incidência desta zoonose nos cães,

levanta importantes questões de saúde pública, nomeadamente no que respeita à segurança de coabitar com canídeo(s) doente(s).

A infectividade dos cães parasitados com *Leishmania*, assintomáticos e sintomáticos, é alta como provam estudos que usaram xenodiagnóstico para avaliar este importante parâmetro epidemiológico (11). Cerca de dois meses após ser infectado por flebótomo, o cão tem a capacidade de infectar 10% dos flebótomos. Esta percentagem sobe para 60% quatro meses após a picada, com o início dos primeiros sintomas e a paralela descida dos linfócitos T CD4+. Tanto no Homem como no cão a capacidade infectiva está inversamente relacionada com a contagem de linfócitos T CD4+.

Os cães, uma vez tratados, podem, em 70% dos casos, ser considerados clinicamente curados (11), contudo só em 20% dos casos há cura parasitológica. Os restantes cães, apesar de assintomáticos, permanecem infectados e, em cerca de 20 a 30% dos casos, podem infectar os flebótomos (11). No entanto, são os cães com parasitas na pele mas assintomáticos e os cães doentes não tratados que constituem, provavelmente, os reservatórios mais importantes da doença (11, 12). Este facto é de enorme importância epidemiológica e é uma das razões pela qual o sacrifício sistemático de cães doentes não se traduz na diminuição da incidência da doença (8). No caso do Homem, os infectados assintomáticos têm menor capacidade para transmitir a doença que os indivíduos com doença declarada (13).

### **2.3.2 - A questão da co-infecção *Leishmania*/VIH**

No início da década de 90 do século passado, as autoridades internacionais reconheceram a gravidade do problema da co-infecção *Leishmania*/VIH, até porque a co-infecção modificou as características epidemiológicas da

leishmaniose. A LV comporta-se como infecção oportunista em doentes infectados por VIH e, como tal, há autores que defendem que deve ser considerada e implementada a sua inclusão nos critérios diagnósticos da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). Na Europa, a LV é a terceira doença parasitária oportunista mais frequente, a seguir à toxoplasmose e à criptosporidiose (14-16). Nas áreas onde a LV é endémica, os doentes com SIDA têm uma probabilidade 100 a 1000 vezes maior de contrair a doença comparativamente a doentes sem SIDA. Actualmente, segundo dados da OMS, esta co-infecção atinge 35 países. Até 2001, foram reportados 1911 casos nos países do sudoeste da Europa que incluem 159 (8,3%) casos ocorridos em Portugal (16). No entanto, o impacto desta co-infecção está seguramente sub-estimado pois o facto de não ser uma doença definidora de SIDA condiciona a sua sub-notificação (14). Por outro lado, há autores que alertam para o eventual sub-diagnóstico de leishmaniose na população com infecção por VIH nomeadamente, no que diz respeito a formas de apresentação clínica atípica (10, 14-17).

Na co-infecção *Leishmania*/VIH deve ser diferenciada a infecção primária por *Leishmania*, favorecida pela imunossupressão, da reactivação, em que a leishmaniose é reactivada pela depleção imunológica associada à infecção por VIH (17). Ambas as situações exercem um efeito cumulativo na imunossupressão dos indivíduos afectados. A contagem de linfocitos T CD4+ é, geralmente, inferior a 50 células/mm<sup>3</sup> e quase sempre inferior a 200 células/mm<sup>3</sup> (3). Curiosamente, estes dados da bibliografia internacional não se verificaram num estudo realizado em Portugal (14), em que 88% dos co-infectados tinham contagens inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup>, (dos quais apenas 10% tinham contagens inferiores a 50 células/mm<sup>3</sup>), 10% entre 200 e 500 T CD4+ e os restantes 2% apresentavam mais de 500 células/mm<sup>3</sup>.

A co-infecção *Leishmania*/VIH acelera o curso clínico das duas infecções e evidencia o papel dos linfócitos T CD4+ no controlo das infecções intracelulares. Os indivíduos com maior grau de imunodepressão têm maior disseminação visceral do parasita, resposta menos favorável à terapêutica e maior taxa de recidivas.

No fim dos anos 90, com a introdução da terapêutica anti-retrovírica de alta eficácia (TAAE), houve uma diminuição marcada dos casos notificados e do número de recidivas. Contudo, há vários factores que fazem com que esta questão permaneça actual e que obrigam a manter a vigilância desta co-infecção (6):

- o problema das resistências aos antirretrovíricos;
- o facto de na África subsariana, onde a infecção VIH é mais prevalente e a leishmaniose endémica, ser mais difícil o acesso à TAAE;
- o fenómeno da urbanização da leishmaniose e da ruralização de VIH;

É importante realçar que a questão da imunossupressão não se prende só com a infecção por VIH. É cada vez maior o número de doentes oncológicos e doentes transplantados sujeitos a terapêutica imunossupressora.

### **2.3.3 - Outras vias de transmissão**

A leishmaniose por *L. infantum* é uma zoonose transmitida por flebótomos contudo, em determinadas circunstâncias, pode haver transmissão sem a participação do insecto vector, como nos casos associados à partilha de seringas entre toxicod dependentes (18). Este último caso representa um ciclo antroponótico artificial, visto que as seringas substituem os flebótomos, sendo a metaciclo genese desnecessária uma vez que ocorre transmissão das formas amastigotas, funcionando o Homem como reservatório (14). Este tipo de transmissão também está documentado em Portugal (19).

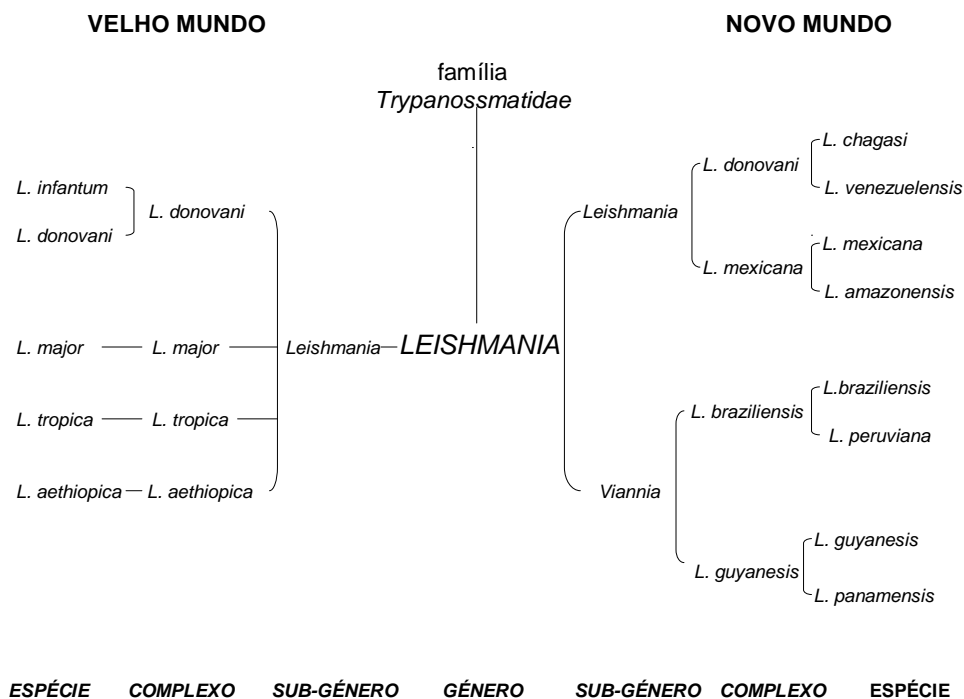
A transmissão por transfusões de sangue está bem documentada (20, 21-24). Os portadores assintomáticos de *L. infantum*, que têm baixa concentração do parasita no sangue, só são detectados se o rastreio desta doença for realizado por rotina, antes de cada dádiva de sangue. Também há casos publicados de doentes transplantados que desenvolvem leishmaniose, não por reactivação de infecção latente, mas devido ao transplante de órgão com a doença (25). Estes factos justificam, segundo alguns autores, que em zonas endémicas seja feito o rastreio, não só em dadores de sangue, mas também em dadores de órgãos. Existem também casos publicados de transmissão vertical (26, 27), por via directa pessoa a pessoa (27), por acidentes de laboratório (1, 27) e relatos pouco credíveis de transmissão por via sexual (27). No entanto, todas estas vias permanecem excepcionais.

Nos cães, para além da transmissão por flebótomo, também está documentada a transmissão por transfusões de sangue e por via vertical. A transmissão por outros insectos hematófagos necessita de maior investigação, não estando provada, até à presente data. Tal como no Homem, estas vias permanecem excepcionais.

## **2.4 - Classificação**

A necessidade de diferenciar e caracterizar as populações dos parasitas, para estabelecer melhor o diagnóstico, tratamento, prognóstico, controlo e influência que a variação intra-específica pode ter na epidemiologia da doença, deu lugar a que se desenvolvessem métodos de caracterização, extrínsecos e intrínsecos. A taxonomia deste protozoário é controversa e reflecte a diversidade de critérios que têm sido usados ao longo dos anos. Inicialmente, a classificação era feita com base em caracteres extrínsecos, como a apresentação clínica e a distribuição geográfica. Actualmente, os critérios são bioquímicos e genéticos e os grupos

taxonómicos já não coincidem com as entidades clínicas (3). A classificação aceite pela OMS e considerada “gold standard” baseia-se na electroforese das isoenzimas (figura 4). A estirpe existente em Portugal é *L. infantum* que também pode ser encontrada na restante orla Mediterrânica, Médio Oriente, África e China. Esta estirpe tem, segundo estudos bioquímicos, muitas características idênticas à estirpe *L. chagasi* que existe na América do Sul. Considera-se a hipótese desta estirpe ter sido levada para o Novo mundo pelos cães dos primeiros colonos (1, 14).



**Figura 4** – Classificação taxonómica baseada em características isoenzimáticas do parasita do género *Leishmania* (adaptado de ref. (2))

A diversidade de apresentações clínicas da leishmaniose resulta da variedade de espécies de *Leishmania* e do tipo de resposta imunitária do hospedeiro. Embora determinadas espécies de *Leishmania* tendam a causar um tipo específico de

doença é frequente poderem causar outra apresentação (3) o que torna as classificações difíceis (tabela 2). Por exemplo *L. infantum* – existente em Portugal é, habitualmente viscerotrópica mas pode causar lesões cutâneas e mucocutâneas (28). Os soldados americanos que estiveram na operação “Tempestade no Deserto” ilustram outro exemplo, pois apesar de infectados por *L. tropica* - uma espécie classicamente associada a lesões cutâneas – contraíram LV. A resposta imunitária do hospedeiro também influencia o quadro clínico, como exemplificado pelo zimodeme MON-29 e MON-24 de *L. infantum* que nos indivíduos imunocompetentes provocam lesões cutâneas (estirpes preferencialmente dermatrópicas) e nos co-infectados por VIH causam lesões viscerais (29).

**Tabela 2 - Classificação das leishmanioses (entidades nosogeográficas)** (adaptado de ref. 30).

Entidade clínica	Distribuição geográfica	Principais reservatórios	Principais vetores
<b>Leishmaniose Visceral</b>			
*Kala-azar clássica do Velho Mundo <i>L. donovani</i>	Bangladesh, China, Índia, Nepal, Paquistão	Homem	<i>Phlebotomus argentipes</i>
<i>L. tropica</i> (rara)	África subsariana, Este de África, Índia, Israel, Quênia, Arábia Saudita	Roedores, cão, Homem (?)	<i>P. orientalis, P. martini</i>
* <i>L. visceral</i> infantil <i>L. infantum</i>	Litoral Mediterrânico Ásia Central, China, Médio Oriente	Cão, raposa Raposa, chacal, cão	<i>P. perniciosus, P. ariasi</i> <i>P. caucasicus, P. ariasi</i>
* <i>L. visceral</i> americana <i>L. chagasi</i>	América do Sul e Central	Cão, raposa, opossum	<i>Lutzomyia longipaldis</i>
* <i>L. visceral</i> atípica <i>L. tropica</i>  <i>L. amazonensis</i>	Índia, Israel, Quênia, A. Saudita  Brasil	Roedores	
<b>L. pós kala-azar</b> <i>L. donovani</i>	Bangladesh, Índia, Nepal, Etiópia, Quênia, Sudão		
<b>L. cutânea</b>			
<b>*Velho Mundo</b>			
<i>L. tropica</i>	Litoral Mediterrânico, Médio Oriente, Sudoeste Asiático	Cão, Homem	<i>P. sergenti</i>
<i>L. major</i>	Ásia Central, Médio Oriente, Sudoeste Asiático, África subsariana	Roedores	<i>P. papatasi, P. dubosqi</i>
<i>L. aethiopica</i>	Etiópia, Quênia	Hirax	<i>P. longipes, P. pedifer</i>
<i>L. infantum</i> (rara)	Ásia Central, Irão, litoral Mediterrânico		
<b>*Novo Mundo</b>			
<i>L. mexicana</i> <i>L. guyanensis</i>	América Central, México, Texas Brasil, Colômbia, Guiné francesa, Guiana, Suriname	Roedores Preguiça, papa-formigas	<i>L. olmeca</i> <i>L. umbratilis</i>
<i>L. amazonensis</i>	Bacia Amazónia	Roedores, marsupiais	<i>L. flaviscutellata</i> <i>L. peruensis, L. verrucarrum</i> <i>L. olmeca bicolor</i>
<i>L. peruviana</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. braziliensis</i>	Perú, Argentina Venezuela Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Paraguai, Perú, Venezuela	Cão Roedores	<i>L. wellcomei</i>
<i>L. panamensis</i> <i>L. chagasi</i>	Costa Rica, Colômbia, Panamá Honduras, Costa Rica	Preguiça, cão	<i>L. trapidoi</i>
<b>L. mucocutânea ("Espúndia")</b>			
<i>L. braziliensis</i>	Argentina, Brasil, Bolívia, Equador, Paraguai, Perú		
<i>L. panamensis</i> (rara) <i>L. guyanensis</i> (rara) <i>L. major, L. aethiopica</i> (rara)	Colômbia Colômbia, Brasil Sudão		
<b>L. cutânea difusa</b>			
<i>L. aethiopica</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. amanzonensis</i>	Etiópia, Quênia, Namíbia, Yemén, Venezuela Rep. Dominicana, México, Texas Bacia da Amazónia	Hirax, rato Roedores Roedores Roedores	<i>L. christophei</i>
<b>L. recidivante</b>			
<i>L. tropica</i>	Médio Oriente		<i>P. sergenti, P. papatasi</i>

## **2.5 - Apresentação clínica da leishmaniose visceral por *L. infantum***

A infecção por *L. infantum* pode desencadear três tipos de resposta no organismo:

- reacção local com destruição do parasita fagocitado;
- interacção parasita-hospedeiro com fagocitose por histiocitos e persistência do parasita no organismo de forma latente por tempo indeterminado;
- fagocitose e multiplicação dos parasitas dentro de macrófagos com disseminação para o sistema mononuclear fagocitário (SMF). Neste caso e dependendo dos factores de risco associados (nomeadamente o estado nutricional), pode causar várias manifestações de doença: desde formas oligossintomáticas (sub-clínicas) até à doença declarada (6, 30, 31).

Uma vez que o estudo realizado no âmbito desta tese é feito em população aparentemente saudável serão aqui privilegiadas as apresentações assintomáticas e oligossintomáticas. Esta última é caracterizada pela presença de sintomas inespecíficos, tais como febrícula, tosse seca, diarreia, sudorese, fadiga persistente, associados a discreta organomegalia. Nas duas situações, se houver supressão imunológica do hospedeiro, a doença manifesta-se (3). Os infectados assintomáticos constituem um dilema terapêutico, tanto na medicina humana como na medicina veterinária. Alguns autores defendem o tratamento destes casos, desde que se verifiquem títulos positivos ou *border-line*, com confirmação parasitológica (5, 11).

### **2.5.1 - Apresentação clínica da leishmaniose humana**

A leishmaniose visceral tem um período de incubação médio no Homem de dois a seis meses, mas pode variar de dez dias até dez anos. As manifestações clínicas podem ter início súbito ou serem de aparecimento progressivo e consistem em febre irregular de longa duração, emagrecimento acentuado, exuberante hepatoesplenomegalia, anemia, leucopénia, trombocitopénia e

hipergamaglobulinemia (sobretudo à custa de aumento da imunoglobulina G). Há doentes, principalmente na Índia, que desenvolvem hiperpigmentação da pele da face, mãos, pés e abdómen. Estas características estão na base do nome dado à doença - kala-azar - que significa “febre negra” em hindi (3). Em Portugal, embora afecte adultos, atinge sobretudo as crianças e, cerca de 90% destas crianças, têm idade inferior a cinco anos. Quando detectada e tratada precocemente tem prognóstico favorável mas pode ser fatal se não for tratada. Nos indivíduos com LV a infecção secundária mais frequente é a pneumonia bacteriana que também constitui a principal causa de óbito.

Nos indivíduos com co-infecção *Leishmania*/VIH, as apresentações atípicas são mais frequentes, existindo relatos de biopsias com amastigotas no pulmão, pleura e aparelho digestivo (1).

Uma vez que estudos epidemiológicos realizados em população humana saudável, demonstraram haver formas assintomáticas e oligossintomáticas de leishmaniose, esta doença deve ser excluída nos indivíduos com sintomatologia inespecífica residentes em zonas endémicas ou em viajantes a zonas endémicas de leishmaniose (1-3, 32).

Em Portugal há duas apresentações no imunocompetente: a LV e a LC. Como referido em 2.5, embora *L. infantum* seja preferencialmente viscerotrópica também pode provocar lesões cutâneas (2, 29). Nos últimos anos tem vindo a aumentar o número de casos de LC, sobretudo em crianças (28). No imunocomprometido, também existem duas apresentações, a LV e a leishmaniose viscerocutânea. Embora na Europa *L. infantum* também esteja associada a casos de LMC em indivíduos imunocomprometidos não há registo destes casos em Portugal (16).

### **2.5.2 - Apresentação clínica da leishmaniose canina**

No cão, a leishmaniose pode ter três tipos de apresentações – a cutânea, a visceral e a mista (designada leishmaniose viscerocutânea). Estas apresentações ocorrem após um período de incubação que varia de seis meses a vários anos.

A apresentação cutânea caracteriza-se por quadros queratoseborreicos, formas ulcerativas, formas nodulares e/ou erupções pápulo-pustulosas. Também se verificam lesões de onicogriposis e hiperqueratose nasal. Cerca de 20 dias após inoculação pelo flebótomo pode surgir, no local de mordedura, uma lesão eritemo-escamosa que progride para úlcero-crostosa, denominada “cancro de inoculação” e que se pode comparar às lesões designadas de “botão do Oriente” da LC humana. Cerca de 25% dos cães com esta apresentação não fazem seroconversão.

A apresentação visceral manifesta-se por emagrecimento, astenia, atrofia muscular, principalmente facial (originando o que se denomina de “cabeça de velha”), anemia, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia e epistáxis. Também se verificam alterações oculares, digestivas e renais.

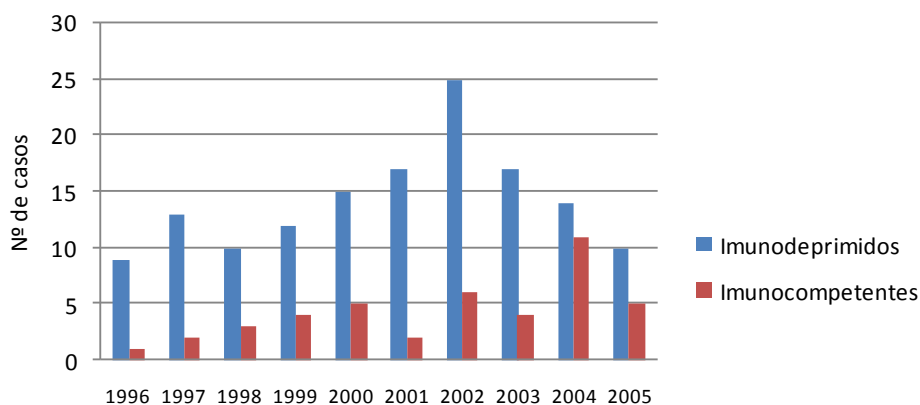
O prognóstico depende muito do estadio em que a doença é diagnosticada e, em particular, da existência, ou não, de insuficiência renal associada. Actualmente, os proprietários dos cães são mais vigilantes (embora o grau de desconhecimento da doença ainda seja elevado (33)) e a classe veterinária está muito sensibilizada para a doença, o que faz com que o diagnóstico seja realizado cada vez mais precocemente e, conseqüentemente, o prognóstico seja melhor.

### **2.6 - Situação epidemiológica em Portugal**

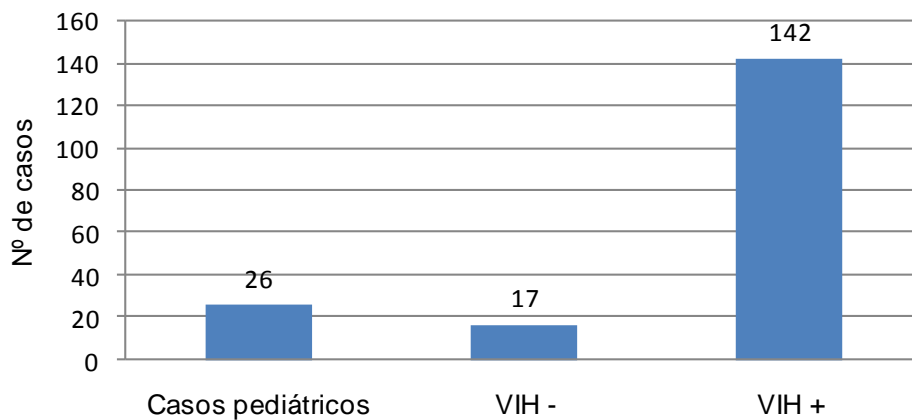
A LV foi pela primeira vez descrita em Portugal, em 1910, por Alvares numa criança em Lisboa e, em 1911, é realizado o primeiro estudo em cães por Silva e

Alvares (34, 35). Em 1943 é descrito por Tavares o primeiro caso de LC em Portugal (36).

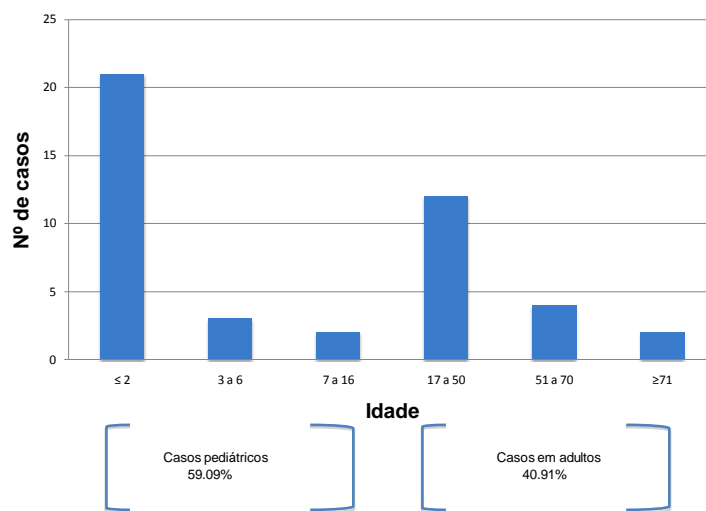
A leishmaniose é endémica em Portugal, causada por *L. infantum*, transmitida por flebótomos (*Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi*) e tem no cão o seu principal reservatório (7, 12). Embora classicamente definida em Portugal como uma doença rural, está a tornar-se mais prevalente nas regiões urbanas e peri-urbanas (12, 39). Desde 1950 que é uma doença notificável, mas a sub-notificação é marcada (entre 2001-2006 foram notificados 63 casos mas só no Instituto de Higiene e Medicina Tropical foram diagnosticados 115 casos (29)). De 1996 a 2005 foram notificados em Portugal 185 casos (142 em imunodeprimidos e 43 em imunocompetentes, sendo que dos 43, mais de metade eram crianças com idade inferior a cinco anos). A doença é mais prevalente no sexo masculino (3:1). As figuras 5, 6 e 7 ilustram a distribuição dos casos em Portugal entre 1996 e 2005, segundo dados da Direcção Geral de Saúde.



**Figura 5** - Casos de leishmaniose visceral por ano em Portugal (dados da Direcção Geral de Saúde)



**Figura 6** - Casos de leishmaniose visceral em Portugal de 1996 a 2005 (n= 185) (dados da Direcção Geral de Saúde)



**Figura 7** - Casos de leishmaniose visceral em Portugal em imunocompetentes (1996-2005) (dados da Direcção Geral de Saúde)

Em Portugal estão descritos seis zimodemes (conjunto de isolados com o mesmo perfil isoenzimático), o que contrasta com o elevado polimorfismo enzimático em Espanha (5, 29). O MON-1 é o mais frequente (97%) em Portugal, à semelhança

de outros países da orla Mediterrânica (29). Quer o zimodeme MON-1 quer o MON-29 estão documentados em LV e LC, colocando a questão do tropismo de *L. infantum*, para os tecidos cutâneos ou para os órgãos internos, que pode depender do poder patogénico da estirpe parasitária e/ou da genética e do estágio imunitário do hospedeiro (28). Apesar da diversidade de zimodemes encontrada nos imunocomprometidos ser superior à dos imunocompetentes, o MON-1 também é o zimodeme mais frequente neste grupo.

A via artificial de transmissão de leishmaniose pode ser responsável pela introdução de novas estirpes, nomeadamente, de *L. donovani* MON-18, conforme foi demonstrado num Português toxicodependente co-infectado por VIH (17, 19).

Em 2006 foram relatados por Ravel *et al.*, em Portugal, dois casos de híbridos entre *L. infantum* e *L. major* (37). Este facto introduz dados novos, quer a nível de apresentação clínica, quer na resistência à terapêutica.

Constituem áreas endémicas a área metropolitana de Lisboa, a península de Setúbal, o município rural de Alijó (Alto-Douro) e o Algarve. Segundo dados de um estudo epidemiológico realizado em 1994 (40) o distrito de Évora também deve ser considerado um foco endémico mas apenas em cães. Nesse mesmo estudo verificou-se uma maior incidência de *P. sergenti* em comparação com *P. perniciosus* e *P. ariasi*, o que contrasta com outros ensaios realizados no Alto Douro, Lisboa e Algarve (7, 29). Contudo, o papel de *P. sergenti* como vector não foi esclarecido.

Com o propósito de expandir o estudo da situação epidemiológica desta zoonose, foi criado, em Setembro de 2008, um observatório nacional de leishmaniose denominado ONLEISH ([www.onleish.org](http://www.onleish.org)).

### **2.6.1 - Situação do cão e outros reservatórios em Portugal**

O cão é o principal reservatório do ciclo doméstico da LV causada por *L. infantum*, tanto no Novo Mundo (onde é denominada *L. chagasi*), como no Velho Mundo. Os inquéritos epidemiológicos realizados em cães, em Portugal, indicam uma prevalência na ordem dos 4% a 21%, semelhante á de outros países mediterrânicos. Contudo, diversos autores alertam para a probabilidade de ser mais elevada a percentagem de cães portadores assintomáticos. Diversos estudos epidemiológicos, realizados em Espanha, apontam para uma seropositividade da ordem dos 50 a 60% em populações de cães assintomáticos. Um outro estudo realizado em Madrid, por Miró *et al.*, entre 1996 e 2006, numa população de cães errantes, apurou que 80% dos cães assintomáticos eram seropositivos (47). Com a associação de técnicas serológicas e moleculares, a prevalência registada nos estudos epidemiológicos realizados em canídeos tem sido significativamente mais elevada (6).

Em Portugal, o zimodeme mais frequente no cão é o MON-1 (29). Está descrito um caso de zimodeme MON-98 num cão no Alto Douro, por Cardoso em 2002, que até essa ocorrência se julgava restrito ao Egipto (38). São necessários mais estudos em cães, vectores e pessoas, para melhor caracterizar os zimodemes existentes em Portugal.

Para a profilaxia da doença existem no mercado diversos replentes para o flebótomo. Não existe vacina disponível em Portugal.

A tabela 3 resume a situação da leishmaniose canina em Portugal.

**Tabela 3 – Sumário da situação em Portugal a nível veterinário.**

	<b>Situação actual</b>	<b>Ref.</b>	<b>Necessidades</b>
<b>Números</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Lisboa e Setúbal em 1983, n=572, prevalência de 5,5-11,5%</li> <li>→ Lisboa em 1987, n=1899, prevalência de 7,5-8,8%</li> <li>→ Évora em 1995, n=3614, prevalência de 3,9%</li> <li>→ Faro em 1995, n=300, prevalência de 7%</li> <li>→ Lisboa em 2002-2003, n=1030, prevalência de 18,9-21%</li> <li>→ Bragança em 2002-2006, n=2436, prevalência de 4,8%</li> <li>→ Alijó (Alto Douro) em 2004, n=1540, prevalência de 18,7%</li> <li>→ Peso da Régua (Alto Douro) em 2004, n=294, prevalência de 20,4 %</li> <li>→ Vila Franca de Xira em 2007, n=128, prevalência de 50%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(39)</li> <li>(41)</li> <li>(40)</li> <li>(42)</li> <li>(12)</li> <li>(43)</li> <li>(44)</li> <li>(45)</li> <li>(46)</li> </ul>	São necessários mais estudos epidemiológicos em cães, em gatos e na população silvestre
<b>Controlo dos vectores</b>	Falta de informação dos proprietários de cães	(33)	É necessário informar a população, sobretudo aquela que contacta com cães, sobre o ciclo evolutivo da doença e divulgar os métodos de controlo das moscas e a aplicação sistemática de produtos insecticidas nos cães
<b>Prevenção</b>	Vacina não disponível		Não está prevista a sua introdução no mercado português
<b>Diagnóstico</b>	Fácil acesso ao diagnóstico parasitológico e serológico nos cães		É necessário padronizar critérios de diagnóstico
<b>Tratamentos registados em Portugal para uso no cão</b>	<p>Antimoniato de meglumina (Glucantime, Merial®)</p> <p>Miltefosine (Milteforan, Virbac®)</p> <p>Nota: a utilização concomitante de alopurinol com estes fármacos está largamente difundida e é suportada por vários estudos, no entanto este fármaco não está registado para este propósito.</p>		<p>São necessários:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) protocolos terapêuticos</li> <li>b) estudos que comparem a eficácia dos dois fármacos licenciados</li> <li>c) estudos sobre resistências em Portugal</li> </ul>

Estudos realizados em Portugal sugerem que a raposa (*Vulpes vulpes*) é, a seguir ao cão, o reservatório mais importante de leishmaniose (48, 49). Num estudo realizado por Abranches *et al.*, em 1984, na região da Arrábida, onde a leishmaniose é endémica, a prevalência encontrada nas raposas foi de 5,6%, em contraste com a prevalência de 0% em Alcácer do Sal onde a doença é muito rara. Estes estudos apontam para a raposa como um provável reservatório silvestre. Recentemente, um estudo realizado em Espanha, sugere a existência de um ciclo silvestre independente do ciclo doméstico (50).

O papel do gato como reservatório permanece controverso. É conhecido que os gatos domésticos estão infectados por *Leishmania* (podendo ou não desenvolver doença), que albergam o parasita e que são atractivos como refeição de sangue para alguns flebótomos. No entanto, permanece por esclarecer qual é exactamente o seu papel como reservatório. O elevado número de gatos vadios, a elevada prevalência de sintomatologia cutânea nesta espécie e a questão da co-infecção por vírus da imunodeficiência felina e/ou vírus da leucemia felina, tão frequentes nestas colónias, faz com que este assunto mereça mais estudos epidemiológicos (51, 52). Dados recentes de um estudo realizado numa população de gatos vadios, em Lisboa, mostraram que 30% destes animais apresentavam resultado positivo para leishmania por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) o que ressalta a importância desta espécie como potencial reservatório (53).

Estão documentadas infecções acidentais no cavalo, nalguns países incluindo Portugal (54).

Sabe-se que determinadas raças de cães têm maior sensibilidade à doença e, outras raças, como o Podengo Ibicenco (raça autóctone de Ibiza), apresentam uma enorme resistência. Também em Portugal há estudos que apontam para a resistência das raças autóctones (43).

## 2.7 - Diagnóstico

### 2.7.1 - Resposta imunitária e os diferentes testes

O método de diagnóstico seleccionado para leishmaniose tem que ser adequado ao tipo de resposta imunitária que se suspeita estar em curso.

Assim, se o hospedeiro desencadeia uma resposta preferencialmente do tipo Th1, os macrófagos activados têm grande capacidade de destruir leishmanias do foco inflamatório no ponto de inoculação, com resolução do processo. Por outro lado, se a resposta é preferencialmente do tipo Th2, as leishmanias escapam do ponto de inoculação e são levadas pelos macrófagos para todo o organismo, colonizando preferencialmente os órgãos do SMF. As formas amastigotas desaparecem do ponto de inoculação, bem como a reacção inflamatória (55).

Em resumo na LC a resposta celular está exacerbada e ausente a resposta humoral, ao contrário do que acontece na LV, estando a LMC situada entre ambas (tabela 4). Ou seja, a resposta imunitária protectora para leishmaniose é do tipo celular. Os altos títulos de Ac detectados na LV não são eficazes na defesa contra o parasita.

**Tabela 4** - Resumo do tipo de resposta imunitária para *L. infantum*.

Quadro clínico e resposta imunitária	Sensibilidade cutânea	Anticorpos	Parasitas nas lesões	Tendência para a cura
LV (Th2)	Ausente	Abundantes	Abundantes	Raro
LC (Th1)	Presente	Ausentes	Presentes	Sim

Na Tabela 5 estão resumidos os diferentes métodos de diagnóstico. Serão detalhados os utilizados no rastreio da população assintomática para melhor enquadramento do estudo realizado.

**Tabela 5 – Sumário dos métodos de diagnóstico para leishmaniose**

Leishmaniose visceral
<p><b>ISOLAMENTO</b>  ⇒ Directo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Coloração: Giemsa, Imunoperoxidase, Ac monoclonais</li> <li>• Cultura (em meio Novy, Nicolle e McNeal (NNN) ou meio de cultura líquido suplementado com soro fetal bovino)</li> <li>• Animais de laboratório</li> </ul> <p>⇒ Indirecto:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hibridação em nitrocelulose com sondas de ADN (ácido desoxirribonucleico)</li> <li>• PCR</li> </ul> <p><b>IMUNODIAGNÓSTICO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Imunofluorescência indirecta</li> <li>• ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>); ELISA com antígenos (Ag) recombinantes</li> <li>• Contra-electroforese</li> <li>• <i>Immunoblot</i> (IB)</li> <li>• Técnicas de Aglutinação (hemoaglutinação indirecta, aglutinação em látex e aglutinação directa (DAT))</li> <li>• Pesquisa de Ag na urina</li> </ul>
Leishmaniose cutânea
<p><b>ISOLAMENTO</b>  ⇒ Directo e Indirecto (idêntico ao da LV)</p> <p><b>IMUNODIAGNÓSTICO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacção intradérmica de Montenegro</li> </ul>

### 2.7.2 - Teste de Montenegro

A intradermoreacção, idealizada por Montenegro, em 1926 e aqui designada teste de Montenegro (TM), avalia a reacção de hipersensibilidade tardia à injeção intradérmica de uma suspensão de promastigotas mortas. A sua leitura é realizada às 48-72 horas. A positividade do teste indica que o indivíduo já foi sensibilizado, mas não necessariamente que seja portador da doença. O teste é habitualmente positivo na LC localizada e na LMC, e negativo na LCD. Na LV o teste é negativo no início da doença mas torna-se positivo meses após a cura clínica. Resumidamente, o teste é positivo nas formas crónicas e sempre que haja envolvimento das mucosas e é negativo nas fases iniciais da doença e nas formas

disseminadas (56). Este teste é útil em estudos epidemiológicos para detectar infecções assintomáticas. É possível que haja reacções cruzadas com tuberculose, infecções fúngicas sistémicas, lepra, epiteloma maligno e *larva migrans* (2, 5).

Apesar de um TM positivo estar correlacionado com resistência à doença (2), a imunidade celular não é inteiramente benéfica, conforme se infere dos seguintes dados:

- na LMC, a reacção ao TM é tanto maior quanto maior a lesão das mucosas;
- existem estudos que revelam que populações assintomáticas com TM positivos (21, 57-60) têm PCR positiva no sangue, o que prova que a resposta celular consegue controlar a doença mas não tem capacidade para eliminar o parasita da circulação.

### **2.7.3 - Testes Serológicos**

Relativamente aos testes serológicos para diagnóstico de leishmaniose há que ter em conta vários factos:

- a presença de Ac específicos não está necessariamente associada a uma doença activa podendo revelar uma infecção assintomática ou oligossintomática;
- após tratamento, os títulos de Ac podem permanecer elevados durante anos após a cura clínica - cerca de cinco anos segundo alguns autores (61). Admite-se que esta persistência esteja associada a infecção latente e que possa servir de indicador para uma futura recidiva (56). Na literatura estão descritos vários casos de reactivação de leishmaniose após imunossupressão induzida por fármacos, nomeadamente, no contexto de transplante de órgãos (30);
- indivíduos imunodeprimidos podem ter doença activa e serologia negativa;
- dependendo do Ag usado pode haver reacções cruzadas com Ac para a malária, tripanosomose, micobacterioses e esquistossomose (3);

- a sensibilidade e especificidade dos testes têm que estar padronizadas para cada estirpe de *Leishmania* e para cada laboratório, além de terem que ser adequadas à população alvo desses mesmos testes. A especificidade dos testes serológicos para detecção de Ac depende fundamentalmente do Ag usado e da sensibilidade do método propriamente dito.

Um dos testes seleccionados para avaliar uma população assintomática, isto é, potencialmente infectada mas com uma resposta imunitária eficaz, é o TM; no entanto, a logística inerente ao procedimento torna este teste pouco prático no terreno. O IB é o método serológico mais sensível e específico em população assintomática contudo tem a desvantagem de ser dispendioso inviabilizando a sua utilização em estudos epidemiológicos. Neste contexto são utilizados outros métodos serológicos nomeadamente IFI, ELISA e DAT.

#### **2.7.3.1 - O método de ELISA e Técnicas de Aglutinação**

Estas técnicas embora muito utilizadas em estudos epidemiológicos em população assintomática, têm menor sensibilidade e especificidade, comparativamente ao TM.

#### **2.7.4.2 - O método de Imunofluorescência Indirecta**

A Imunofluorescência indirecta é considerada pela OMS a técnica de referência (53) e é, habitualmente, a técnica serológica utilizada na prática clínica, com um título de corte em geral de 1/80. Em população assintomática, em que deve ser usado um título de corte mais baixo, esta técnica tem baixa sensibilidade e baixa especificidade. Um estudo espanhol demonstrou que títulos de 1/20 cursavam com parasitemia e que deviam ser valorizados em indivíduos assintomáticos (58),

contudo, o título de corte mais baixo tem a desvantagem de ter mais falsos positivos.

#### **2.7.4.3 - O método de *Immunoblot***

É a técnica serológica que tem maior sensibilidade e especificidade para detectar Ac (74, 75), nomeadamente Ac específicos para as fracções antigénicas 14 e 16 Kda. Por estes motivos, é a técnica de eleição para indivíduos assintomáticos ou com resposta imunitária comprometida, tais como os indivíduos imunodeprimidos ou crianças de tenra idade.

Na população assintomática, este método tem cerca de 80% de concordância com o TM (5, 64). A sua grande desvantagem é o elevado custo.

#### **2.7.5 - A PCR**

A PCR quantitativa tem sido utilizada na prática clínica e na realização de estudos epidemiológicos. Na clínica, é uma ferramenta preciosa para ajudar a diferenciar a infecção assintomática da doença e para detectar precocemente possíveis reactivações em doentes de risco. A sua utilização em estudos epidemiológicos, conjuntamente com os métodos serológicos tradicionais, permite aferir a sensibilidade e especificidade desses testes. Também tem sido usada para avaliar o risco de transmissão da infecção por transfusão sanguínea. No entanto, apesar da elevada sensibilidade e especificidade deste método ocorrem falsos negativos, sobretudo em amostras de sangue (devido à natureza críptica desta infecção) pelo que, o seu resultado, deve ser interpretado em conjugação com outras técnicas diagnósticas.

## **2.8 - Estudos em população assintomática**

A natureza críptica da infecção dificulta a determinação do nível exacto de endemicidade (48).

A seroprevalência, em população assintomática, varia de 10%, em zonas de baixa a moderada endemicidade, até 30%, em focos de alta endemicidade ou em contactos próximos com doentes (65). Segundo dados de um estudo realizado no Brasil (32) calcula-se que haja 18 infectados assintomáticos por cada doente mas, segundo outro estudo, em Espanha, este número será superior (58). Assume particular importância a eleição do melhor método de diagnóstico para a realização de estudos epidemiológicos na população assintomática. Este objectivo constitui uma das prioridades secundárias da OMS em relação à leishmaniose (62).

Na tabela 6 estão resumidos os principais estudos epidemiológicos em população assintomática realizados em zonas onde a LV - causada por *L. infantum* ou por *L. chagasi* - é endémica. São referenciados os testes utilizados e as principais conclusões.

São necessários mais estudos prospectivos para se perceber o que se passa na população assintomática seropositiva, quantos se traduzem em cura, quantos permanecem infecções crípticas e quantos se convertem em doença. Até à presente data, os estudos prospectivos são escassos e com resultados que vão desde 20% a 70% de indivíduos que se tornam doentes (32, 66).

**Tabela 6 –** Resumo dos resultados das publicações que abordam a temática da infecção por *Leishmania* em população assintomática.

País-Ano (referência)	População alvo	Teste de diagnóstico usado	Conclusões principais
Brasil-1986 (32) *	Crianças saudáveis mas com serologia positiva, n=86	ELISA	17,4% desenvolveram a doença 15,1% desenvolveram a doença após período de forma sub-clínica 23,3% curaram 44,2% curaram após forma sub-clínica
Portugal-1994 (40)	Crianças, n=885	DAT (0% P)	Conclui que a LV na população canina é endêmica, no distrito de Évora
Himalaias-1995 (61)	População de zonas endêmicas, n=1938	TM (24,7% P) ELISA (5,5% P) DAT (2,8% P)	Há um “cluster” de coabitantes com TM P mas com testes serológicos negativos e sem doença
Espanha-1996 (67)	População “geral”, n=4825	ELISA (4,9% P)	
Brasil-1996 (68)	n=1681 cães	ELISA (23,5% P)	Não se verificou nenhum tipo de associação entre cães seropositivos e doentes humanos
Brasil-1997 (20)	Dadores de sangue e hemodialisados politransfundidos, n=1500	ELISA (0-37% P)	Conclui que os dadores devem ser rastreados em zonas endêmicas
Portugal-1998 (69)	População “geral”, n=40	IB, 0% P	Conclui que o IB é sensível e específico para o diagnóstico de LV em imunocomprometidos
França-1999 (21)	Dadores de sangue n=565	IB (13,4% P) PCR (1,6% P)	Conclui que deve ser ponderado rastreio do sangue de dadores
Brasil-2000 (23)	Dadores de sangue n=41	ELISA (51% P) PCR (12% P)	Conclui que em zonas endêmicas deve ser realizado rastreio do sangue de dadores
Brasil-2000 (70) *	Crianças, n=784	ELISA (22,5% P)	Ressalta a importância das formas sub-clínicas e oligossintomáticas
Espanha-2003 (59)	Dadores de sangue, n=656	ELISA (n=656; 2,4% P) IB (n=656; 7,6% P) TM (n=67; 22,3% P) PCR (n=122; 22,1% P)	Conclui que os dadores de sangue devem ser rastreados
Espanha-2004 (58)	Indivíduos com risco de adquirir infecções transmitidas por via parentérica, n=170	TM PCR IFI (30% → 1/20, 26% → 1/40; 44% → N)	População assintomática e com títulos baixos na IFI tem PCR positiva
Itália-2005 (24)	Dadores de sangue, n=500	ELISA (0%P)	Conclui ser muito baixa a probabilidade de uma transfusão sanguínea transmitir leishmaniose
Espanha-2008 (60)	Dadores de sangue n=1437	IB 3,1% TM 11% PCR 6%	Conclui que os dadores de sangue devem ser rastreados

N: resultados negativos; P: resultados positivos; n: número da amostra; \*: estudo com valor prospectivo

## **2.9 - Tratamento**

Está fora do âmbito desta tese a descrição dos diferentes tratamentos para a leishmaniose. Contudo, a autora não pode deixar de referir duas questões importantes no contexto epidemiológico:

- a necessidade de ponderar quimioprofilaxia (14) para evitar recidivas. O uso de agentes profiláticos não é consensual nem está estabelecido qual é o melhor esquema profilático;
- as crescentes resistências ao tratamento - na Índia há cerca de 60% de resistência aos antimoniais (62). Esta questão é pertinente para a medicina veterinária que utiliza os mesmos fármacos que a medicina humana, podendo o tratamento sistemático dos cães estar a contribuir para essas resistências.

## **2.10 - Prevenção**

A diversidade epidemiológica e clínica dificultam o controlo da doença e impossibilitam o uso de uma só medida.

Até ao presente momento, não há vacina disponível para o Homem, pelo que as recomendações da OMS para esta luta passam pela adopção de medidas específicas adaptadas a cada situação epidemiológica e que devem englobar as seguintes vertentes: controlo de vectores e reservatórios, educação sanitária, detecção e notificação de doentes e portadores, tratamento precoce dos doentes, caracterização de factores de risco e assim que possível, e quando se justifique, profilaxia com vacinas. É da máxima importância nesta luta manter um bom nível de vigilância epidemiológica e divulgar esses dados.

### **2.10.1 - Controlo dos reservatórios e dos vectores**

Estudos epidemiológicos em que foi utilizado o método de xenodiagnóstico demonstraram que a infectividade dos cães parasitados por leishmanias é elevada,

quer sejam sintomáticos ou assintomáticos. Comparativamente ao Homem, o cão tem maior capacidade infectiva para o flebótomo. À semelhança do que acontece com o Homem, a infectividade no cão aumenta com a diminuição da contagem de linfócitos T CD4+. Esses mesmos estudos demonstraram que, após os cães iniciarem o tratamento com compostos antimoniais e mantendo tratamento com alopurinol, a transmissão para o flebótomo é impedida (4, 11, 71).

Modelos matemáticos provam que a melhor medida em termos de relação eficácia/custo para o controlo da leishmaniose visceral zoonótica é a utilização de insecticidas, nas suas distintas apresentações, sempre que se tratar de um foco com flebótomos de hábitos domésticos/peridomésticos. Em segundo lugar, as medidas mais adequadas para reduzir a incidência humana são as vacinas dirigidas a pessoas e a cães e o combate à desnutrição infantil. A medida menos vantajosa, segundo esses mesmos modelos matemáticos, é o sacrifício de cães infectados. No entanto, o controlo da leishmaniose canina com o objectivo final de reduzir o número de casos de leishmaniose humana, roda sempre em torno do sacrifício dos cães (8). Com excepção da China, onde quer a leishmaniose humana quer a canina se conseguiram erradicar mediante a combinação de insecticidas intradomiciliários e abate de todos os cães seropositivos, os resultados das campanhas que prevêm o abate de cães têm sido insatisfatórios (9). As razões pelas quais o abate dos cães seropositivos não se tem revelado eficaz são as seguintes:

- existência de reservatórios silvestres;
- o facto dos cães assintomáticos não serem rastreados. Os infectados assintomáticos são provavelmente mais eficazes a transmitir a doença que animais doentes submetidos a tratamento (5, 71);

- existência de uma população considerável de cães errantes que fogem a qualquer plano de controlo;
- a técnica mais usada no rastreio de cães - a IFI - tem segundo alguns autores, baixa sensibilidade;
- o possível papel do Homem como reservatório (9);
- o tempo que medeia entre a recolha da amostra e o abate do cão.

No que respeita ao controlo do vector, a utilização de redes impregnadas com insecticida é um dos métodos mais eficazes para prevenir doenças transmitidas por vectores (55, 62), sobretudo quando se trata de vectores endofágicos. Embora esteja documentada resistência ao dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), os flebótomos permanecem sensíveis aos insecticidas mais vulgarmente utilizados. Há estudos de campo que demonstram que o uso de insecticidas nos cães diminui a incidência da doença (72).

Independentemente do tipo de estratégia adoptada para esta ser bem sucedida é essencial a participação activa da população. No caso da LV, em Portugal, onde o principal reservatório é o cão, as medidas adoptadas para o controlo da leishmaniose têm que ter em conta que existe uma população considerável de cães errantes e de cães que, embora com proprietário, não têm assistência veterinária.

### **2.10.2 - Vacinas**

A OMS considera a leishmaniose a segunda doença causada por protozoários mais importante a nível mundial e uma das mais negligenciadas. Segundo esta organização, é urgente definir tratamentos de primeira linha e realizar quimioprofilaxia secundária (14).

Actualmente, a sequenciação do genoma de *L. major* Friedlin, *L. infantum* e *L. braziliensis* está completa. A identificação do genoma do parasita nomeadamente dos genes que determinam a sua virulência, é fundamental para o desenvolvimento de novas terapêuticas e de vacinas. Avizinha-se uma vacina de 3ª geração de ADN, que é estável, de conservação fácil e pouco onerosa (10, 22). Há evidências experimentais que sugerem a existência de factores genéticos que determinam a susceptibilidade à infecção (30, 55, 66). O conhecimento desta susceptibilidade genética irá permitir a vacinação selectiva.

Estudos de campo, realizados no Brasil, após vacinação da população canina apresentaram resultados satisfatórios. Faltam contudo estudos que comprovem que os animais vacinados não são infecciosos para o vector, questão que tem sido muito polémica.

### **3 - OBJECTIVOS**

O presente estudo teve como objectivo principal avaliar se a coabitação com um cão com leishmaniose aumenta a probabilidade do Homem coabitante ser infectado por flebótomo. Como objectivos secundários pretendeu avaliar a seroprevalência de Ac anti-*Leishmania* numa população assintomática de 100 indivíduos moradores no distrito de Lisboa e caracterizar, do ponto de vista epidemiológico, a população do estudo.

Foi também caracterizada a população de cães doentes quanto ao sexo, idade, raça, habitat e utilização de um desparasitante externo com espectro anti-flebótomos.

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo transversal realizado de Setembro a Novembro de 2007. A população alvo (PA) foi constituída por indivíduos que coabitavam com cão com leishmaniose sendo a população controlo (PC) constituída por indivíduos que coabitavam com cães não infectados. Os ficheiros foram obtidos a partir do arquivo de clientes do Hospital Veterinário do Restelo, Lisboa. Após consentimento livre e informado, e preenchimento de um breve questionário (anexo nº 1 e nº2), foi realizada a recolha de sangue, por picada do dedo indicador esquerdo e o sangue colhido para um papel de filtro (“903 Protein Saver Card”, Whatman®, Reino Unido).

Nas amostras de sangue obtidas foi feita pesquisa de Ac anti-*Leishmania* por IFI tendo sido também realizada a técnica de IB.

O projecto foi autorizado pelas comissões de ética da Faculdade de Medicina de Lisboa e do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

Os critérios de inclusão (CI) para a PA foram:

- viver no distrito de Lisboa há pelo menos cinco anos;
- coabitar com um cão com o diagnóstico de leishmaniose realizado nesse hospital e submetido a tratamento. Por coabitar entende-se a posse do cão dentro da habitação e/ou no seu exterior (com uma área inferior a 100 m<sup>2</sup>). A distância inferior a 100 m<sup>2</sup> foi escolhida com base na distância média percorrida pelos vectores (66). O diagnóstico de leishmaniose no cão foi realizado com base no exame clínico associado a serologia positiva para leishmaniose pela técnica de IFI (consideram-se positivos os títulos  $\geq 1/80$ ). O critério clínico usado foi a existência de três dos seguintes sinais clínicos:
  - linfadenomegalia;
  - hipertrofia ungueal;

- atrofia dos crotófitas;
- hepatoesplenomegalia;
- anemia (confirmada analiticamente);
- insuficiência renal (confirmada analiticamente);
- epistáxis;
- seborreia;
- uveíte;
- emagrecimento.

Os CI para a população controlo foram:

- viver no distrito de Lisboa há, pelo menos, cinco anos;
- coabitar com um cão não infectado. Por coabitar entende-se a posse do cão dentro da habitação e/ou no seu exterior (com uma área inferior a 100 m<sup>2</sup>). Considerou-se cão não infectado o cão assintomático, com avaliação analítica de rotina que incluiu bioquímica sanguínea, hemograma e urianálise sem alterações, e com serologia para leishmaniose negativa pela técnica de IFI.

Após consulta do processo clínico do animal foram compilados os dados necessários para caracterizar a população de cães relativamente ao sexo, raça, idade, hábitos relevantes como o tempo de permanência no exterior, uso de insecticidas e ano de diagnóstico da doença. Os dados para caracterizar a PA e a PC e que não constavam da ficha clínica do cão, foram obtidos mediante um questionário sumário (anexo nº2). O questionário visou obter informação relativa à idade, sexo, raça, escolaridade, hábitos relacionados com permanência no exterior (por exemplo, actividade cinegética), doenças crónicas concomitantes, história de febre prolongada de origem desconhecida e/ou a existência de uma lesão

característica de LC (“Botão do Oriente”), viagens a países endémicos para LV (nomeadamente Brasil, Índia, Médio Oriente e países Africanos) e antecedentes de transfusão de sangue.

Junto com o documento do consentimento livre e informado foi fornecido um folheto informativo sobre leishmaniose (anexo nº 3).

A análise estatística dos dados foi feita com recurso ao programa SPSS.

#### **4.1 - Obtenção das amostras**

A amostra foi recolhida por punção da polpa digital do dedo indicador esquerdo, e o sangue recolhido directamente para meio círculo do papel de filtro. Seguidamente, o papel foi colocado dentro de um tubo de plástico, devidamente identificado, que se deixou aberto e em local apropriado de forma a secar à sombra e à temperatura ambiente. É importante evitar o contacto entre papéis para impedir o risco de contaminação entre as amostras. Após 24 horas, os tubos foram fechados e refrigerados a 4<sup>o</sup> C, onde permaneceram não mais do que 30 dias até serem processados.

#### **4.2 – Processamento das amostras**

O cálculo do volume de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) usado para eluir o sangue presente no papel de filtro, de modo a obter a eluição pretendida, é uma etapa crítica. Neste estudo o procedimento foi o seguinte:

i) num tubo ependorf colocou-se meio círculo de papel (equivalente a 40 µl de sangue) em 198 µl de PBS, obtendo-se assim uma eluição de 1/10 que se deixou repousar durante a noite a 4<sup>o</sup>C. Esta é a eluição esperada tendo como referência um hematócrito médio de 45%;

ii) no dia seguinte, após a amostra ter sido agitada durante um minuto, retiraram-se 50 µl de amostra para 50 µl de PBS, de modo a obter uma eluição de 1/20 e assim sucessivamente até uma eluição 1/80. O restante eluato a 1/10 foi conservado refrigerado, no máximo, até 24 horas para, posterior realização do IB.

Nos eluatos obtidos (1/20, 1/40 e 1/80), foi feita IFI segundo a técnica *in house* realizada no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa (procedimento 124/D e 515/D), que utiliza promastigotas como substância antigénica. O cut-off desta técnica no referido laboratório é de 1/80, sendo o habitual iniciar as diluições em 1/40. Dado o facto de a população deste estudo ser assintomática, os títulos de Ac, em caso de infecção, podem ser muito baixos, fez com que se começasse com titulações de 1/20.

Em 48 dos eluatos conservados no frigorífico foram realizados testes de IB com os kits comerciais “LES-WB24G”, dos laboratórios “LD-BIO Diagnostics”, França. O procedimento seguido foi o descrito pelo representante com a diferença de se ter utilizado, em vez de soro, uma eluição de 1/10. O critério de escolha das amostras em que se realizou IB foi o de permanecerem positivas na titulação 1/40. Foram seleccionados 23 eluatos com estas características na população com cão doente e para perfazer 24 foi aleatoriamente escolhido mais um eluato. Na PC foram seleccionados os 13 eluatos positivos a 1/40 e para perfazer as 24 amostras foi necessário incluir mais 11 eluatos aleatoriamente escolhidos.

## 5 - RESULTADOS

A análise dos resultados mostra que os proprietários de cães doentes têm maior prevalência de Ac anti-*Leishmania* por técnica de IFI, quando se considera o *cutoff*

de 1/20 e de 1/40, que os proprietários de cães sem doença. Esta diferença foi estatisticamente significativa.

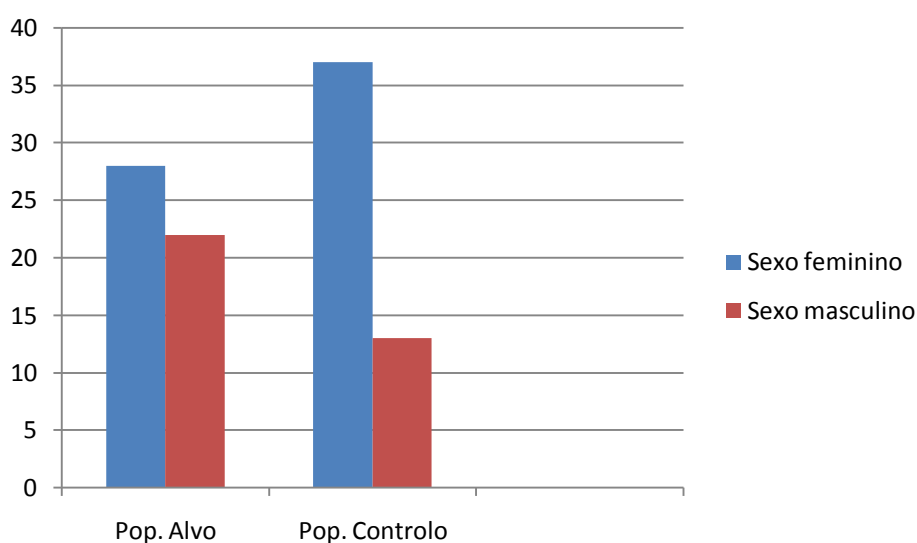
Nenhuma das outras variáveis analisadas – sexo, idade, hábitos de exterior, escolaridade e viagens – demonstrou correlação significativa com os resultados da IFI. A variável raça não foi analisada porque a totalidade da população estudada era de raça caucasiana. Outra variável que se pretendia analisar era a existência de doença crónica, no entanto, tal não foi possível porque apenas quatro das 100 pessoas inquiridas responderam afirmativamente; duas infectadas por VIH com história de hábitos de toxicofilia, uma pessoa com doença de Cronh e outra com asma. Estes quatro indivíduos pertenciam todos à PA e tiveram análises negativas quer na IFI, quer no IB. Não se verificou qualquer tipo de associação entre os resultados da IFI e a pertença ao mesmo núcleo habitacional, sendo que dos 100 inquiridos, 37 pertenciam a 13 núcleos (entendendo-se por núcleo habitacional a coabitação na mesma residência com ou sem laços familiares).

O facto de nenhum dos resultados positivos por IFI ter sido confirmado por IB permite concluir que a IFI não é suficientemente específica para ser realizada em estudos epidemiológicos em população assintomática. Ao contrário do que é descrito por outros autores (58) diluições baixas aumentam os falsos positivos e esse procedimento não deve ser realizado em detrimento de técnicas mais específicas. O facto de em ambas as populações os IB terem sido todos negativos está de acordo com um estudo realizado em 1998 em Portugal que avaliou a prevalência de Ac anti-*Leishmania* spp. em 40 indivíduos saudáveis obtendo 100% de resultados negativos (69).

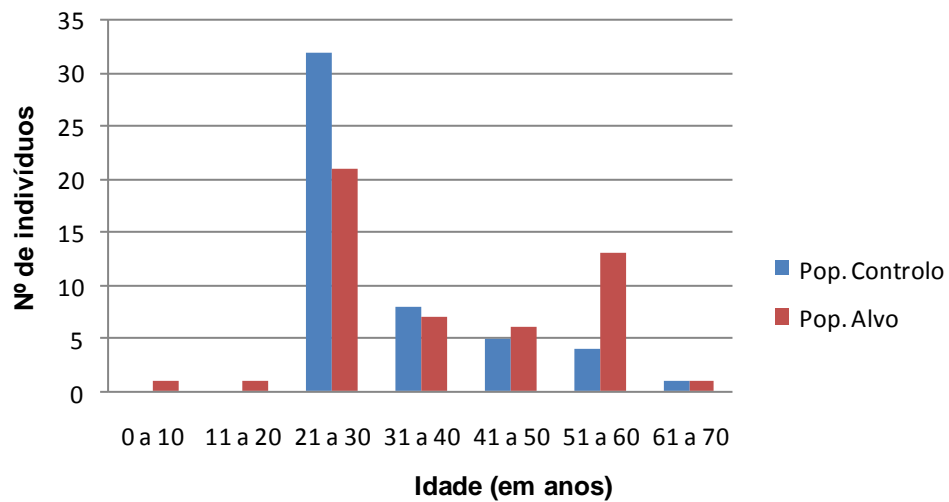
## 5.1 – Caracterização das populações

### 5.1.1 – Caracterização da População Alvo e da População Controlo

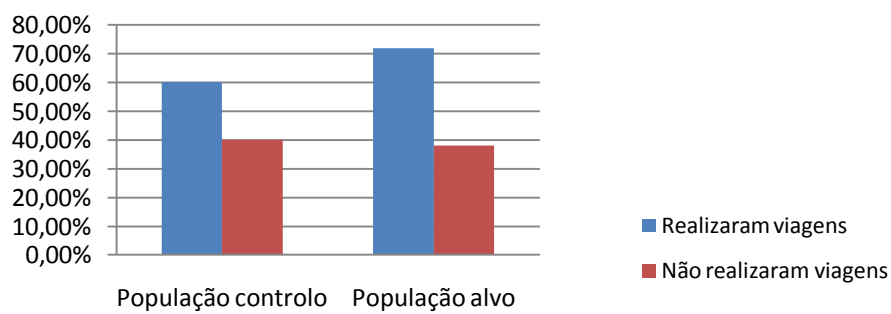
Nas figuras seguintes são caracterizadas as duas populações (PA e PC) quanto ao sexo, idade, viagens a países endémicos, hábitos de exterior, escolaridade e adicionalmente para a PA, analisou-se ano de diagnóstico da doença no cão.



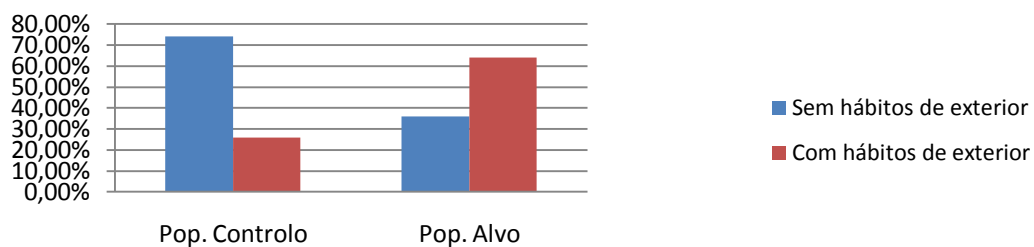
**Figura 8** – Distribuição da variável amostral sexo por população



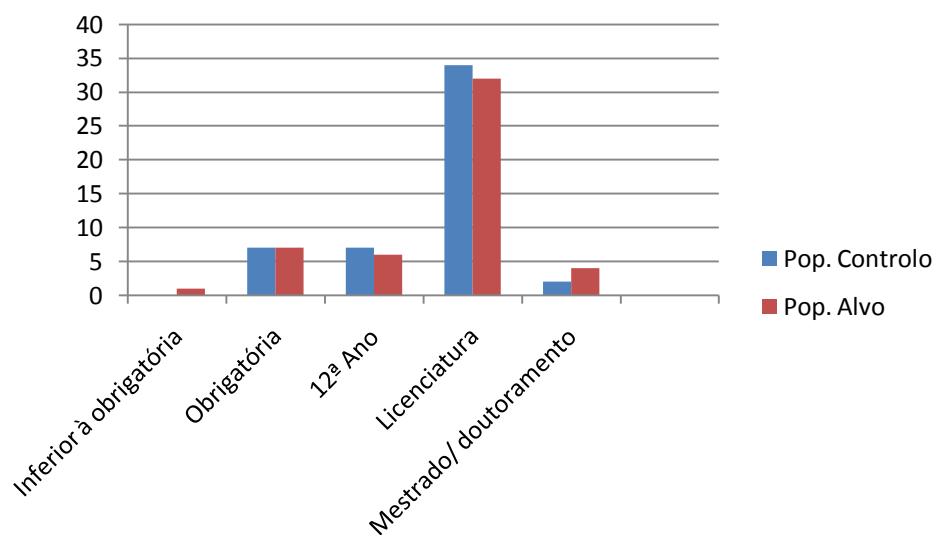
**Figura 9** - Distribuição da variável amostral idade...



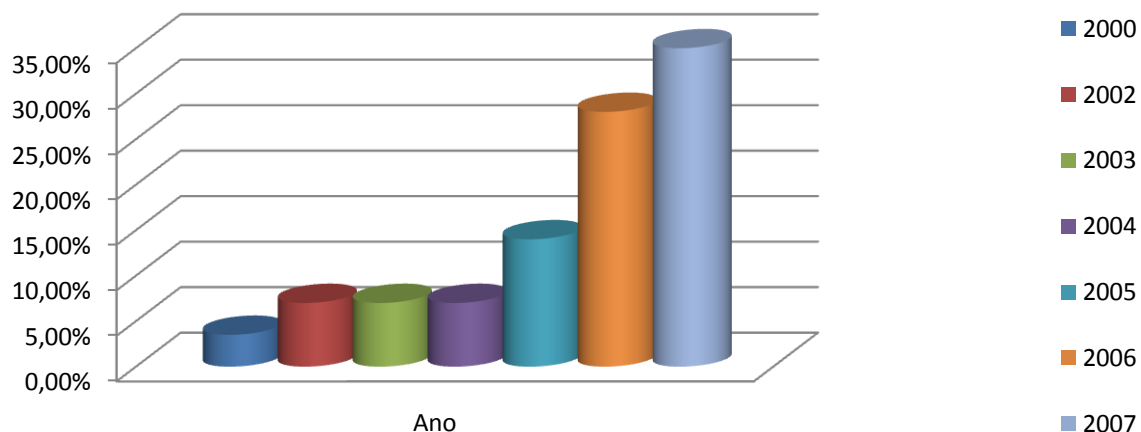
**Figura 10** - Distribuição gráfica da variável amostral *viagens* por população



**Figura 11** – Distribuição gráfica da variável amostral *hábitos de exterior* por população



**Fig 12** – Distribuição gráfica da variável amostral *escolaridade* por população



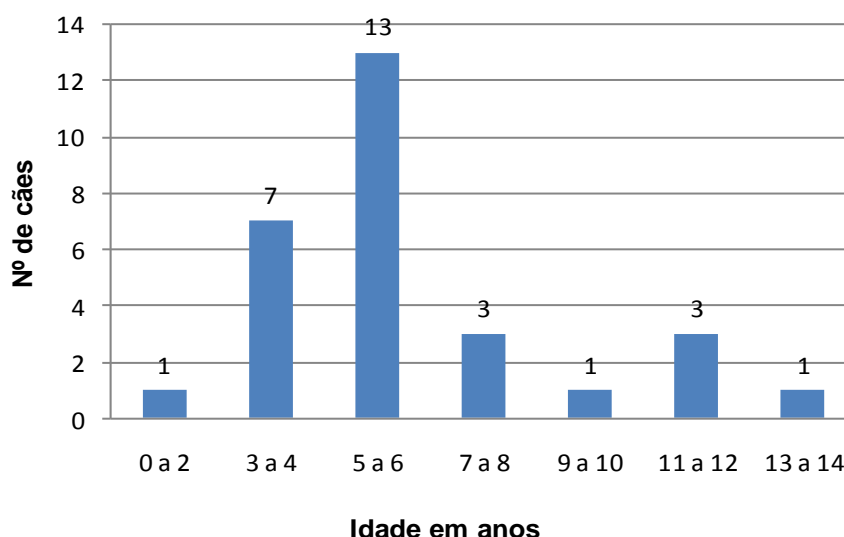
**Figura 13** – Distribuição gráfica da variável amostral *ano de diagnóstico da doença no cão* (aplicável à população alvo)

Da análise das figuras 9 e 11 destacam-se duas impressões. A primeira é que na PA, e ao contrário do que se regista na PC, predominam os indivíduos com hábitos de exterior. Entendeu-se por hábitos de exterior a prática corrente de jardinagem, passeios com frequência a pé ou de bicicleta, realização de desporto ao ar livre (incluindo caça) e mais de 60 minutos de passeio diário com cão, sendo este o item mais vezes referido na PA (cerca de 80% dos hábitos de exterior). A segunda impressão é o facto da média de idades da PA ser superior à da PC, o que pode ser explicado pela menor adesão às medidas profilácticas por parte da população mais velha. Da análise da figura 13, importa referir que o facto da grande maioria dos cães, cerca de 65%, ter a doença diagnosticada nos últimos dois anos apenas deve ser interpretada, pelo facto dos cães aos quais a doença foi mais recentemente diagnosticada, irem mais frequentemente ao Hospital e como tal ser mais fácil o contacto com os seus proprietários.

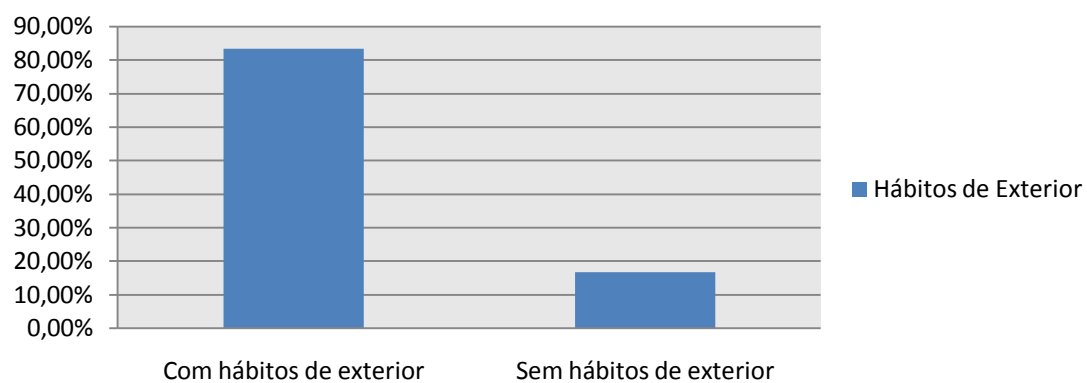
### 5.1.2 – Caracterização da população canina com leishmaniose

A população canina das 50 pessoas da PA, foi constituída por 29 cães, pois existem núcleos familiares a quem é associado o mesmo cão. É de registar que entre os 29 canídeos da PA, nenhum era de raça portuguesa, o que sugere a possibilidade das raças autóctones terem maior resistência à doença, tal como se verificou noutros estudos recentemente realizados em Portugal (43, 46). Nenhum destes cães colocava com regularidade um desparasitante externo com eficácia anti-flébotomos e, a grande maioria (83,3%), tinha por habitat o exterior da habitação, dados que estão de acordo com a literatura (11). A distribuição do sexo e da idade também esteve de acordo com a literatura, ou seja a maior prevalência foi entre os 3 e os 7 anos (75%), e a doença foi mais prevalente no sexo masculino (86,7%).

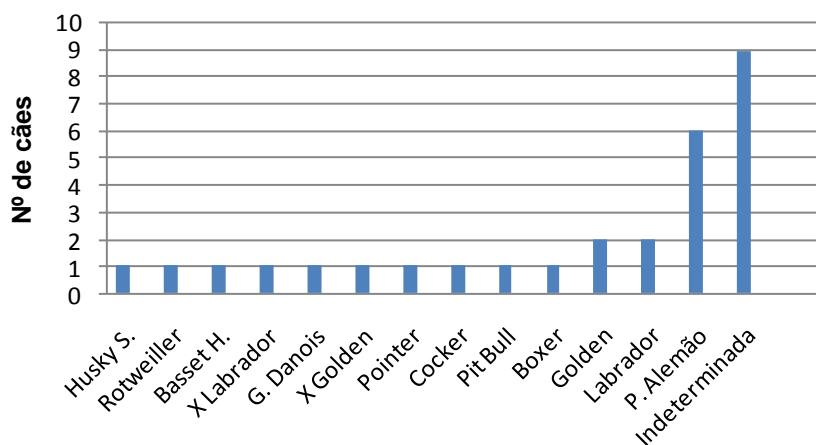
As figuras que se seguem ilustram a caracterização da população canina quanto ao sexo, idade, habitat e raça.



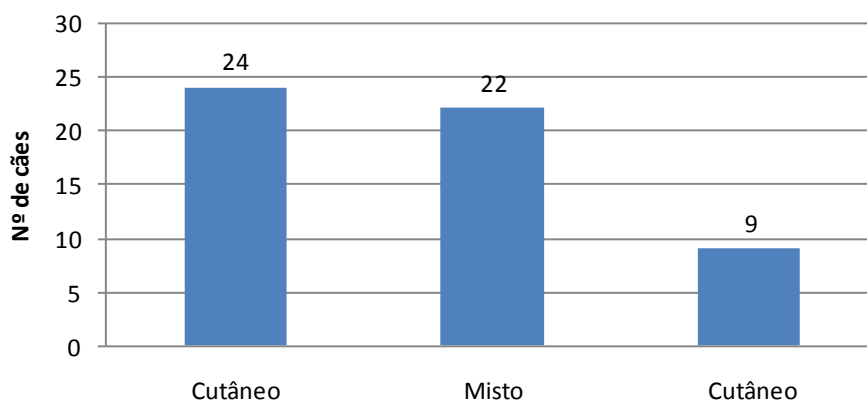
**Figura 15** – Distribuição gráfica da variável amostral *idade* da população canina



**Figura 16** – Distribuição gráfica da variável amostral *hábitos de exterior* da população canina



**Figura 17** - Distribuição da variável *raça* da população canina



**Figura 18** - Distribuição gráfica do tipo de quadro clínico apresentado

## **5.2 – Apresentação de resultados**

Relativamente aos resultados obtidos na IFI na diluição 1/20 verificou-se que, na PC (n=50), 56% (n=28) dos resultados foram negativos e 44% (n=22) foram positivos, enquanto na PA (n=50), 26% (n=13) dos resultados foram negativos e 74% (n=37) foram positivos. No que concerne aos resultados obtidos na IFI na diluição 1/40 verificou-se que, na PC, 74% (n=37) dos resultados foram negativos e 26% (n=13) foram positivos, enquanto na PA 54% (n=27) dos resultados foram negativos e 46% (n=23) foram positivos. Relativamente aos resultados obtidos na IFI na diluição 1/80 verificou-se que, na PC, 100% (n=50) dos resultados foram negativos, enquanto na PA 96% (n=48) dos resultados foram negativos e 4% (n=2) foram positivos. No que respeita aos resultados obtidos por IB verificou-se que quer na PC quer na PA todos os resultados foram negativos (tabela 7).

**TABELA 7 – Distribuição dos resultados da IFI e do IB por população estudada**

<b>Teste</b>	<b>Tipo de População</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
<b>IFI 1/20</b>	<b>Controlo (n=50)</b>	56% (n=28)	44% (n=22)
	<b>Alvo (n=50)</b>	26% (n=13)	74% (n=37)
<b>IFI 1/40</b>	<b>Controlo (n=50)</b>	74% (n=37)	26% (n=13)
	<b>Alvo (n=50)</b>	54% (n=27)	46% (n=23)
<b>IFI 1/80</b>	<b>Controlo (n=50)</b>	100% (n=50)	0% (n=50)
	<b>Alvo (n=50)</b>	96% (n=48)	4% (n=2)
<b>IB</b>	<b>Controlo (n=50)</b>	100% (n=50)	0% (n=0)
	<b>Alvo (n=50)</b>	100% (n=50)	0% (n=0)

De forma a determinar se as variáveis amostrais, nomeadamente as viagens, o sexo, a idade, os hábitos de exterior e o ano de diagnóstico de doença no cão constituiram factores de risco relativamente aos resultados obtidos na IFI a 1/20 e a 1/40, foi feita uma análise correlacional entre estas variáveis e os resultados da IFI a 1/20 e a 1/40, de modo a determinar possíveis relações. Os resultados desta análise são apresentados na tabela 8.

**TABELA 8 – Correlação entre as variáveis amostrais e os testes IFI 1/20 e 1/40**

Variáveis	IFI	
	1/20	1/40
Viagens	-,045	,033
Exterior	,018	-,092
Sexo	,015	,105
Idade	,020	,035
Ano de Diagnóstico	-,022	-,126

Conforme está explicitado na tabela 8 não se encontrou nenhuma correlação significativa entre as variáveis amostrais e os resultados obtidos na IFI a 1/20 e a 1/40. Este facto é indicador de que as variáveis amostrais estudadas não são factores de risco, considerando os resultados obtidos pelas IFI 1/20 e 1/40.

Relativamente à análise de possíveis relações, ou concordância, entre os resultados da IFI e do IB procedeu-se também a uma análise correlacional entre estes testes (tabela 9).

**TABELA 9 – Correlação entre os testes IFI a 1/20, 1/40, 1/80 e IB**

Testes	IFI			IB
	1/20	1/40	1/80	IB
IFI 1/20		,583***	,119	
IFI 1/40			,190	
IFI 1/80				
IB				

Nota: \*\*\* $p \leq .001$ ; \*\* $p \leq .01$ ; \* $p < .05$

A análise da correlação entre a IFI e o IB mostrou que a IFI a 1/20 se correlaciona, positivamente, com um nível de significância alto, com a IFI 1/40 ( $r=0,583$ ;  $p\leq 0,001$ ), o que significa que, quando a IFI a 1/20 aumenta, a IFI a 1/40 também aumenta, ou seja, quando o teste de IFI a 1/20 é positivo a IFI a 1/40 também tende a ser positiva. Não se verificaram quaisquer correlações com o teste IB porque os resultados obtidos no teste IB foram todos negativos, o que nos indica que não existem quaisquer relações nem concordância entre os resultados dos testes IFI a 1/20 e 1/40 relativamente ao teste IB.

Para determinar se os resultados obtidos por IFI a 1/20 e 1/40 nas duas populações tinham diferenças estatisticamente significativas procedeu-se a uma análise de variância (tabela 10).

**TABELA 10** – Média, desvio padrão e análise de variância da IFI a 1/20 e a 1/40 nas duas populações

<b>Teste</b>	<b>População Controlo (Média – DP)</b>	<b>População Alvo (Média – DP)</b>	<b>F</b>	<b>Valor de p</b>
<b>IFI 1/20</b>	0,44 ± 0,501	0,74 ± 0,443	10,050	0,002
<b>IFI 1/40</b>	0,26 ± 0,443	0,46 ± 0,503	4,446	0,038

A análise dos resultados da tabela 10, mostrou que a média da IFI a 1/20 para a PC foi de 0,44 e apresentou um desvio padrão de 0,501 e a média para a PA foi de 0,74 com um desvio padrão de 0,443. Na análise de variância colocaram-se as hipóteses:

H0 - “Não existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos diferentes grupos”

H1 – “Existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos diferentes grupos”.

Na análise de variância da IFI a 1/20 entre as duas populações, o valores encontrados de F e p foram respectivamente  $F=10,050$  e  $p=0,002$ . Estes valores permitiram rejeitar a hipótese nula e concluir que existe diferença estatisticamente significativa entre as médias dos dois grupos, para um nível de significância de 1%. Relativamente ao resultado da IFI a 1/40, a PC apresentou uma média de 0,26 e um desvio padrão de 0,443, enquanto a PA apresentou uma média de 0,46 e um desvio padrão de 0,503. Na análise de variância da IFI a 1/40 entre as duas populações, o valores encontrados foram  $F=4,446$  e  $p=0,038$ , o que permitiu rejeitar a hipótese nula e concluir que existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos dois grupos, para um nível de significância de 5%. A análise de variância mostrou que, a diferença de resultados da IFI a 1/20 e 1/40, entre a PA e a PC tinham significado estatístico.

## **6 – DISCUSSÃO**

Neste estudo a percentagem de Ac anti-*Leishmania* detectados por IFI foi superior nos indivíduos que coabitavam com cão com leishmaniose (74% de positivos a 1/20 e 46% a 1/40), em relação aos indivíduos que coabitavam com cão não doente (44% de positivos a 1/20 e 26% a 1/40). Este dado poderia levar erradamente à conclusão de que a posse de cão constitui um factor de risco para se ser infectado. Contudo estes resultados não foram confirmados no IB, pois nenhum dos resultados positivos na IFI quer da PA quer da PC foi confirmado no IB. A análise da totalidade dos dados permite concluir que o convívio com cão com leishmaniose não é um factor de risco para o indivíduo ser infectado pelo

flebótomo. Na opinião da autora há duas explicações possíveis para esta conclusão:

1- a população de cães com leishmaniose incluída neste estudo era constituída por cães em tratamento num hospital veterinário. Na maior parte dos casos, o diagnóstico e a instauração da respectiva terapêutica foi célere em relação aos primeiros sintomas. Este facto faz destes canídeos reservatórios de menor importância epidemiológica, este dado tem que ser valorizado;

2- o flebótomo tem preferência zoofílica funcionando o cão como um ecrã protector.

Outra conclusão que pode ser retirada deste estudo diz respeito à ausência de especificidade da IFI em títulos baixos. A IFI tem sido largamente usada em estudos epidemiológicos pelos seus baixos custos e por ser uma técnica de eleição em indivíduos doentes, no entanto, em população assintomática deve ser abandonada em detrimento de técnicas mais sensíveis e mais específicas com o IB e a PCR.

## **6.1 – Análise da metodologia**

### **6.1.1 – A amostra**

Não é conhecida a percentagem de indivíduos infectados assintomáticos em Portugal e em particular no distrito de Lisboa. Como tal, é difícil determinar qual é o tamanho adequado da amostra para analisar a variável “coabitação com cão doente”. Em Espanha, os estudos realizados em população assintomática (58-60, 67), apontam para seroprevalências de 2,4 a 22,3%. Com base nestes números para ter significado estatístico a amostra do presente estudo teria que incluir pelo menos 100 indivíduos.

### 6.1.2 – O uso de papel de filtro

Após Stapp e Berks em 1948 terem preconizado o uso do papel de filtro para colheita de amostras de sangue tem sido crescente a sua utilização com esta finalidade. Esta nova abordagem para obter amostras sanguíneas revelou as seguintes vantagens relativamente à punção venosa:

- volume reduzido de sangue;
- as amostras podem ser obtidas por punção dérmica (no lóbulo da orelha, polpa digital ou calcanhar). Como é um procedimento menos invasivo é melhor aceite pela população;
- não é necessária separação de soro;
- não exige consumíveis como seringas, tubos, centrífuga, caixas térmicas etc.;
- não é necessária refrigeração, o que facilita o armazenamento e transporte das amostras e diminui os custos de logística.

Actualmente, o papel de filtro tem o mesmo nível de precisão e reprodutibilidade dos meios convencionais. É utilizado principalmente em rastreios a recém-nascidos e em estudos epidemiológicos. Os papéis comercializados para o efeito são padronizados pelo NCCLS (*National Committee on Clinical Laboratory Standards* – [www.nccls.org](http://www.nccls.org)) e permitem uma correlação precisa entre a área de papel e o volume de sangue (79). A primeira utilização deste procedimento para o diagnóstico serológico de leishmaniose foi realizada em 1958, por Pelegrino & Brener. Após este ensaio foram realizados diversos estudos sobre leishmaniose em que o diagnóstico, quer por serológica quer por técnicas de biologia molecular, foi efectuado em sangue colhido em papel de filtro (61). Em Portugal também há experiência na realização da PCR, para identificação de *Leishmania*, em sangue colhido em papel de filtro, num estudo realizado por Campino *et al* em 2000 (69).

Para o diagnóstico serológico feito em amostras de sangue colhidas para papel de filtro ser válido, devem ser observados os seguintes critérios:

- a estabilidade dos Ac no papel deve estar assegurada. Factores externos designadamente altas temperaturas e a humidade degradam os Ac e favorecerem a contaminação fúngica. Recomenda-se por isso o armazenamento sob refrigeração com agentes dessecantes como a sílica-gel de preferência por períodos inferiores a 30 dias;
- a eluição tem que estar padronizada e tem que haver equivalência entre o eluato e o soro.

No contexto em que este estudo decorreu o uso de papel de filtro revelou-se a melhor opção, sobretudo por ter facilitado a colheita de sangue e ter sido bem aceite pelos proprietários dos cães.

### **6.1.3 – A escolha dos testes de diagnóstico: IFI e IB**

De acordo com o previamente exposto o TM seria o teste de eleição para este estudo, no entanto o facto de este decorrer num hospital veterinário inviabilizou a sua execução. A PCR seria também um teste opcional para este estudo, no entanto a natureza críptica desta infecção pode levar a falsos negativos, sobretudo em amostras de sangue, como foi referido anteriormente. A PCR seria sem dúvida um teste de eleição em população assintomática se se pretendesse avaliar o risco de transmissão parentérica desta infecção. Para além disto, em população assintomática, é controverso que a PCR seja mais sensível e específica que o IB (21, 59, 60).

Pelos motivos explanados optou-se por efectuar IFI a toda a população do estudo. Por motivos económicos só foi possível realizar simultaneamente IB a 48% da população, segundo critério posteriormente discriminado.

## **6.2 – Comparação com outros estudos**

Em 1912, em Alger, é pela primeira vez equacionado o facto da convivência com animais com leishmaniose constituir um factor de risco para a transmissão da doença, a propósito da infecção simultânea de uma pessoa, um cão e um gato. Os estudos que se prendem com a questão da segurança da convivência com animais doentes bem como com pessoas doentes são escassos. Alguns dos estudos que abordam a questão da coabitação com pessoas com LV concluem que este é um factor de risco, o que se pode dever a factores genéticos ou ao facto da transmissão ter um padrão peridomiciliar (56). No que respeita à convivência com cães doentes os resultados dos estudos são controversos, pois nenhum tem como principal objectivo comparar duas populações idênticas em que a variável cão doente seja analisada.

A tabela 11 resume os estudos mais relevantes relativos à coabitação quer com cães, quer com pessoas doentes. De todos estes estudos o mais relevante na análise da variável “coabitação com cão doente”, como factor de risco, é um estudo, de 2002, realizado no Iraque, que conclui que a incidência da doença nas crianças aumenta quando existem cães na habitação. No entanto, neste estudo, é tida em conta a presença de cão, independentemente do seu estado sanitário e, não são tidas em conta outras variáveis que podem comprometer a análise, nomeadamente, o facto da posse de cão poder estar associada a outras actividades como pastoreio, como aliás é reconhecido pelos autores do estudo. Por outro lado, não é explicitado neste estudo se as crianças com serologia positiva pertencem ao mesmo núcleo familiar, podendo deste modo haver outros factores a ter em conta nomeadamente genéticos.

**Tabela 11 - Resumo das publicações que abordam a questão da coabitação**

País-ano (ref.) Amostra	Objectivos/conclusões	Comentários
Honduras – 1983 (73) n= 218 coabitantes n= 170 controlos n= 279 cães	Avaliar o risco de conviver com cão com IFI positiva para leishmaniose  Conclui que não há risco	Os critérios de inclusão estão mal definidos
Brasil – 1995 (74) n=243	Conclui que o convívio com cão seropositivo não está associado a um aumento significativo de TM positivo	
Brasil – 1996 (68) n=1681 cães	Tentar correlacionar casos humanos com casos em cães	Não conseguiu estabelecer correlação
Brasil – 1997 (66) n=135, população familiar ou que vive na proximidade de pessoas doentes	Apesar de haver um padrão familiar de doença, a % de casos positivos por ELISA e por TM nos familiares é semelhante à % registada nos vizinhos	Não compara os resultados dos dois métodos usados
Brasil - 1994-1997 (75) n=158 pessoas; n=11048 cães seropositivos	Conclui que há correlação entre os casos humanos e caninos	Sem tratamento estatístico dos mapas Não permite testar se é o cão o factor de risco ou se são os coabitantes humanos, pois há um claro “clustering” dos casos humanos
Brasil - 1999 (76) n=119 núcleos familiares	Conclui que a coabitação com cão não é um factor de risco	O critério de inclusão dos indivíduos foi clínico o que inviabiliza a avaliação da prevalência de infecção Foram incluídos todos os cães independentemente da serologia ou da situação clínica
Iraque – 2002 (51) n= 3872 crianças n= 199 cães	Avaliar o risco de conviver com cães Conclui que a prevalência de infecção na população humana aumenta com a taxa de cães existentes, considerando a posse de cão um factor de risco	Não avalia se os cães estão ou não infectados/doentes Não descreve outras variáveis como hábitos de exterior e doenças concomitantes Apenas utiliza DAT
Brasil - 2002, estudo em 2 tempos (o 2º após 7 meses) (77) n1= 639 n2= 572	Estudo prospectivo que analisa várias variáveis. Os dados relativos à variável “presença de cão” não são conclusivos, podendo inclusivé esta presença ter efeito protector Conclui que a coabitação com pessoa com LV é um factor de risco	Compara ELISA com TM. Comprova a baixa especificidade da ELISA na população assintomática
Turquia – 2006 (78) n=47 indivíduos que coabitam com indivíduos doentes	Conclui que os coabitantes de indivíduos com LV devem ser rastreados	

O facto de neste estudo todos os IB realizados terem sido negativos, está de acordo com outro estudo, também realizado em Lisboa (69), e indicia que a seroprevalência da infecção na população assintomática é baixa. Porém este facto não invalida a necessidade de serem realizados estudos para avaliar a parasitemia em indivíduos assintomáticos, pois pode haver parasitemia sem seroconversão e como tal risco de transmissão do parasita por transfusão de sangue ou por transplante de órgãos.

### **6.3 – Limitações e necessidades**

Este estudo teve algumas limitações. A principal limitação prendeu-se com o facto de a colheita de sangue ter sido realizada em circunstâncias particulares. O único propósito da colheita era a participação neste estudo o que condicionou o tamanho da população estudada. Como a colheita foi realizada num hospital veterinário o único método viável neste contexto e aceite pelos participantes, foi a recolha de sangue por picada digital para papel de filtro, o que limitou o volume da amostra. A falta de apoios financeiros impossibilitou que fosse realizada a técnica de IB a toda a população estudada.

O risco da convivência com canídeos com leishmaniose deve ser reavaliado em estudos com amostras maiores, onde para além do diagnóstico serológico seja realizada pesquisa de parasitemia no indivíduo e no cão. Só desta forma se pode avaliar com rigor a função do cão como possível ecrã protector. Segundo outra perspectiva são também necessários estudos com amostras significativas de indivíduos com leishmaniose para definir a percentagem daqueles que coabitam com cães infectados/doentes. A variável “coabitação com cão doente” é futuramente melhor analisada se existirem mais dados sobre a população assintomática em Portugal.

No momento actual com os dados disponíveis pode afirmar-se que cães doentes podem ser mantidos no núcleo familiar desde que submetidos a tratamento leishmanicida, vigilância veterinária regular e tratamento profiláctico anti-flebótomos.

## **7 - CONCLUSÃO**

A leishmaniose constitui uma ameaça a nível mundial e dada a sua complexidade, nomeadamente do ponto de vista epidemiológico, deve ser abordada por uma equipa multidisciplinar constituída por médicos, veterinários, biólogos,

protozoologistas, entologistas, imunologistas e epidemiologistas.

Paradoxalmente, nos países mais desenvolvidos, onde a prevalência da doença é baixa, não constitui uma prioridade das autoridades sanitárias e, nos países onde é um grave problema de saúde pública, há outras prioridades a gerir.

Em 2004, a OMS, após reunião do grupo científico para a leishmaniose (62), estabeleceu que a leishmaniose deve permanecer doença de categoria 1 (emergente e não controlada) e estabeleceu como prioridades primárias até 2009:

- validação das ferramentas existentes para controlo da doença através de uma rede global de centros clínicos;
- investigação no terreno para assegurar a implementação de estratégias de controlo;
- o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, novas terapêuticas e vacinas, como base nos recentes conhecimentos, nomeadamente, os que se prendem com a descoberta do genoma do parasita;
- a investigação da patogénese da doença, nomeadamente dos factores que condicionam a resistência à doença.

Este trabalho deve ser multidisciplinar e transversal aos países onde a doença é endémica.

É expectável que a vacina seja uma realidade a curto prazo. Actualmente, o controlo da doença passa pela resolução de dificuldades como a co-infecção por VIH, a resistência aos leishmanicidas, a alteração das características epidemiológicas dos vectores, a diversidade de reservatórios e a maior proximidade de muitos deles ao Homem.

Pretendeu-se, com este estudo, contribuir para o esclarecimento sobre o risco da convivência com o cão com leishmaniose submetido a tratamento e caracterizar esta zoonose na população humana assintomática de Lisboa. De acordo com os

dado obtidos a coabitação com cão com leishmaniose submetido a tratamento não constitui um factor de risco para o indivíduo ser infectado por flebótomo. Este facto reforça a necessidade de realizar um diagnóstico precoce e uma terapêutica eficaz aos animais doentes.

## **8 – PROJECTOS FUTUROS**

No sentido de prosseguir a linha de orientação desta tese seria interessante a realização de outros estudos:

- estudo realizado em população assintomática que não coabita com cão, em comparação com uma população que coabite com cão saudável, para avaliar a função do cão como ecrã protector;
- determinar a prevalência da infecção entre os coabitantes (familiares ou não) e vizinhos dos indivíduos com doença declarada nos últimos anos no distrito de Lisboa.

É também importante realizar mais estudos relativos ao papel de outros reservatórios particularmente o papel do gato. A autora tem em curso um estudo cujo objectivo é avaliar a prevalência de leishmaniose em gatos de rua através de punção esplénica, biopsia de pele e serologia. Todos estes procedimentos são realizados aquando da esterilização com a finalidade de controlar a população errante.

“O Homem é feito de tal maneira que só se consegue descontraír de um tipo de ocupação agarrando outra.”

Anatole France, 1905

## **8 - BIBLIOGRAFIA**

- 1.** Jerónimo S, Sousa A, Pearson R. Leishmaniasis. Em: Richard L Guerrant, David Walker, Peter Weller (eds). Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, PA Churchill Livingstone, 2006:1095-113.
- 2.** Magill AJ. Leishmaniasis. Em: Hunter GW, Strickland GT, eds. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. 8<sup>th</sup> ed. The W. B. Saunders Philadelphia, 2000:665-87.
- 3.** Garcia LS. Leishmaniasis. Diagnostic Medical Parasitology. 4<sup>th</sup> ed. ASM Press Washington DC, 2001:205-34.
- 4.** Parra E, Cabrera G, Santos F, Souza L, Palatnik-de-Sousa C, Menz I. Safety trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. Vaccine 2007; 25:2180-6.
- 5.** Ezquerro JP. Las leishmaniasis: de la biología al control. Em: Laboratorios Intervet S. A. (eds). Las leishmaniasis: de la biología al control. 2<sup>nd</sup> ed. Gráficas Verona Salamanca, 2001.
- 6.** Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. Int J Parasitol 2005; 35:1169-80.

7. Alves-Pires C. Os flebótomos (Diptera, Psychodidae) dos focos zoonóticos de leishmanioses em Portugal, 2000. Tese de doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
8. Courtenay O, Rupert Q, Garcez L, Shaw J, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral Leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 2002; 186:1314-20.
9. Dietze R, Barros G, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis* 1997; 25:1240-2.
10. Costa N, B Gomes, Silva B, *et al.* Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis* 2000; 182:997-1000.
11. Corrales G, Moreno R. Leishmaniose canina: manejo clínico y situación actual en Espanha. In: Bayer Health Care eds. Graficas SYL, 2006.
12. Cortes S, Afonso M, Alves-Pires C, Campino L. Stray dogs in urban areas, Portugal. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(9):1431-2.
13. Murray W, Berman J, Davies C, Saraiva N. Advances in Leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366:1561-77.

- 14.** Marques N, Cabral S, Sá R, *et al.* A. leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana, na era da terapêutica anti-retrovírica de alta eficácia. *Acta Médica Portuguesa* 2007; 291-8.
- 15.** Alvar J, Canavante B, Solar G, *et al.* *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(2): 298-319.
- 16.** Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:334-59.
- 17.** Campino L, Santos-Gomes GM, Pratlong F, Antunes F, Maurício I, Dedet JP, Abranches P. HIV/*Leishmania* co-infections in Portugal: diagnosis and isoenzyme characterization of *Leishmania*. *Ann trop Med Parasitol* 1997; 91:433-6.
- 18.** Cruz I, Morales M, Noguer I, Rodríguez A, Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 2002; 359:1124-5.
- 19.** Campino L, Santos-Gomes G, Pratlong F, Dedet JP, Abranches P. The isolation of *Leishmania donovani* MON-18 from an AIDS patient in Portugal: possible needle transmission. *Parasite* 1994; 1:391-2.
- 20.** Luz KG, Silva V, Gomes E, *et al.* Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57:168-71.

- 21.** Fichoux Y, Quaranta JF, Aueuvre J, *et al.* Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1953-7.
- 22.** Kedzierski L, Zhu Y, Handman E. *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology* 2006;133:87-112.
- 23.** Otero A, Silva V, Luz K, Palatnik M, Pirmez C, Fernandes O, Sousa C. Short Report: Occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. *Am J Med Hyg* 2000; 62(1):128-31.
- 24.** Colomba C, Saporito L, Polara V, Barone T, Corrao A, Titone L. Serological screening for *Leishmania infantum* in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Sicily, Italy). *Transfus Apher Sci* 2005; 33(3):311-4.
- 25.** Martin-Davila P, Fortun J, Lopez-Velez R, *et al.* Transmission of tropical and geographically restricted infections during solid-organ transplantation. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:60-96.
- 26.** Filho F, Uehara S, Senefonte F, Lopes A, Duarte G, Beiryte P. Leishmaniose visceral e gestação: relato de um caso. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005; 27: 92-7.
- 27.** Singh S. New developments in diagnosis of Leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123:311-30.

- 28.** Campino L, Bajanca, Franca I, Pratlong F, Dedet JP, Fiadeiro T. Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania infantum* zimodeme MON-1 em Portugal. Acta Médica Portuguesa 2005; 18:475-78.
- 29.** Campino L, Pratlong F, Abranches P, *et al.* Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. Trop Med Int Health 2006; 11:1708-14.
- 30.** Badaró R, Duarte M. Leishmaniose Visceral (Calazar). Em: Roberto Focaccia, eds. Tratado de infecciologia. 2<sup>nd</sup> ed. São Paulo SP Atheneu, 2005:1559-88.
- 31.** Cerf B, Jones T, Badaro R, Sampaio D, Teixeira R, Johnson WD. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. J Inf Dis 1987; 156:1030-3.
- 32.** Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J Infect Dis 1986; 154:1003-11.
- 33.** Neves R, Cardoso L, Afonso M, Campino L. Leishmaniose canina em Portugal continental: o que sabem os proprietários de cães acerca desta zoonose parasitaria. Vet Med 2007; 52:47-54.
- 34.** Álvares P. Um caso de kala-azar infantil em Lisboa. Medicina Contemporânea 1910; 13:90-1.
- 35.** Álvares D & Pereira. Sobre a frequência do kala-azar nos cães em Lisboa. Medicina Contemporânea 1911; 14:97.

- 36.** Tavares A. Leishmaniose cutânea autóctone. Imprensa Médica 1943; 9:129-31.
- 37.** Ravel C, Cortes S, Pratlong F, Mario F, Dedet JP, Campino L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. Int J Parasitol 2006; 36:1383-8.
- 38.** Cardoso L, Santos H, Cordeiro S, Pratlong F, Dedet JP, Rodrigues M. *Leishmania infantum* MON-98: infection in a dog from Alto Douro, Portugal. Acta Trop 2002; 83:83-5.
- 39.** Abranches P, Lopes F, Silva F, Ribeiro M, Pires C. Kala-azar in Portugal III. Results of a survey on canine leishmaniasis performed in the Lisbon region. Comparison of urban and rural zones. Ann Parasitol Hum Comp 1983; 58(4):307-15.
- 40.** Semião-Santos S, Harith A, Ferreira E, Pires C, Sousa C, Gusmão R. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. Parasitol Res 1995; 81(3):235-9.
- 41.** Abranches P, Pires A, Conceição-Silva F, Silva-Pereira M, Gomes G. O kala-azar em Portugal VI: Inquérito epidemiológico realizado na região metropolitana de Lisboa: interpretação da estrutura e dinâmica do foco endémico. J Cienc Med 1987; 151:364-79.

42. Campino L, Riça-Capela M, Mauricio I, Ozensoy S, Abranches P. O kala-azar em Portugal IX. A região do Algarve: inquerito epidemiológico sobre o reservatório canino no concelho de Loulé. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* 1995; 18:189-94.
43. Lopes D, Rodrigues F. Leishmaniose – estudo clínico no Nordeste Transmontano. Comunicação livre no 17º Congresso Nacional da APMVEAC, 2008.
44. Cardoso L, Rodrigues M, Santos H et al. Sero-epidemiology study of canine *Leishmania spp.* infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Vet Parasitol* 2004; 121(1-2):21-32.
45. Cardoso L, Schallig HD, Neto F, Kroon N, Rodrigues M. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and the fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop* 2004; 91(2):95-100.
46. Faria T, Fonseca I, Afonso F. Estudo sero-epidemiológico da infecção por *Leishmania* em cães e gatos no município de Vila Franca de Xira utilizando o teste de IFI. Comunicação livre no 17º Congresso Nacional da APMVEAC, 2008.
47. Miró G, Montoya A, Mateo M et al. A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Parasitology Research* 2007; 101:253-7.

- 48.** Semião-Santos S, Abranches P, Silva-Pereira M, Santos-Gomes G, Fernandes J, Vetter J. Reliability of serological methods for detection of leishmaniasis in Portuguese domestic and wild reservoirs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91(6):747-50.
- 49.** Abranches P, Conceição S, Ribeiro M, Lopes F, Gomes LT. Kala-azar in Portugal-IV. The wild reservoir: the isolation of a *Leishmania* from a fox. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77:420-1.
- 50.** Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga E, *et al.* Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 2008; 155:198-203.
- 51.** Gavgani A, Mohite H, Edrissian G, Mohebalí M, Davies C. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67(5):511-5.
- 52.** Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortez A, Iniesta L, *et al.* Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76(4):676-80.
- 53.** Maia C, Nunes M, Campino L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Diseases* 2008; 8(4): 555-60.
- 54.** Rolão N, Martins MJ, João A, Campino L. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite* 2005; 12:183-6.

- 55.** Roberts M. Current understanding on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull* 2006; 75,76:115-30.
- 56.** Werneck L, Costa H, Walker M, David R, Wand M, Maguire H. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol Infect* 2007; 135:195-201.
- 57.** Costa C, Stewart J, Gomes R, *et al.* Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66:334-7.
- 58.** Martín-Sánchez J, Pineda J, Morillas-Márquez, García-García J, Acedo C, Macías J. Detection of *Leishmania infantum* Kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70(5):545-8.
- 59.** Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portus M. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98:102-10.
- 60.** Riera C, Fisa R, López-Chejade P, *et al.* Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion* 2008; 48 (7):1383-9.

- 61.** Rab M, Evans D. *Leishmania infantum* in the Himalayas. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995; 89:27-32.
- 62.** Scientific Working Group (SWG), Report of the SWG meeting on Leishmaniasis; Geneva, Switzerland, 2004:1-143.
- 63.** Mary C, Lamoroux D, Dunan S, Quilici M. Western Blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-KD and 16- KD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. Am J Trop Med Hyg 1992; 47(6):764-71.
- 64.** Marty P, Lelièvre A, Quaranta J, Rahal A, Gari-Toussaint M, Le Fichoux Y. Use of Leishmanin skin test and Western Blot for epidemiological studies in visceral leishmaniasis areas. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88(6):658-9.
- 65.** Chappuis F, Sundar S, Hailu A, *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis treatment and control? Nature Reviews Microbiology 2007; 5:873-82.
- 66.** Júnior A, Costa S, Orge M, Carvalho E. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbours of patients with visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1997; 92(1):15-20.
- 67.** Garrote J, Gutiérrez M, Izquierdo R, *et al.* Seroepidemiologic study of *Leishmania infantum* infection in Castilla-Leon, Spain. Am J. Trop Med Hyg 2004; 71(4):403-6.

- 68.** Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi G, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg 1996, 55(1):39-44.
- 69.** Gomes G, Pereira S, Campino L, Araújo M, Abranches P. Performance of Immunoblotting in diagnosis of visceral leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus-*Leishmania* spp. coinfecting patients. J Clin Microbiol 2000; 38(1):175-8.
- 70.** Gama M, Costa J, Gomes C, Corbett C. Subclinical form of the American Leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(8):889-93.
- 71.** Molina R, Amela C, Nieto J, *et al.* Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Trans R Soc Med Hyg 1994; 88:491-3.
- 72.** Reithinger R, Coleman P, Alexander B, Vieira E, Assis G, Davies C. Are insecticide-impregnated dog collars feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? Int J Parasitol 2004; 34: 55-62.
- 73.** Navin T, Sierra M, Custodio R, Steurer F, Porter C, Ruebush T. Epidemiologic study of visceral leishmaniasis in Honduras, 1975-1983. Am J Trop Med Hyg 1985; 34(6): 1069-75.

- 74.** Cunha S, Freire M, Eulalio C, *et al.* Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89:155-8.
- 75.** Oliveira C, Assunção R, Reis I, Proietti F. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1994-1997. *Cad Saúde Pública* 2001;17(5):1231-9.
- 76.** Costa C, Pereira H, Pereira F, Tavares J, Araújo M, Gonçalves M. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93:464.
- 77.** Caldas A, Costa J, Silva A, Vinhas V, Barral A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in North-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96:21-8.
- 78.** Sakru N, Toz S, Korkmaz M, Kavakli T, Alkan M, Ozbel Y. The infection risk of visceral leishmaniasis among household members of active patients. *Parasitol Int* 2006; 55(2):131-3
- 79.** Mei J, Alexander J, Adam B, Hannon W. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nut* 2001; 131:1631-6.

## **ANEXOS**

# ANEXO Nº1 – Consentimento livre e informado

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO

**Título do trabalho:** “Estudo da seroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* numa população que coabita com canídeos com leishmaniose.”

**Investigadora:** Dr.<sup>a</sup> Maria João Dinis da Fonseca **Orientadora:** Doutora Helena Ângelo

**Natureza do trabalho e participantes:** o trabalho tem como finalidade estudar a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* numa população constituída por 50 donos de cães com leishmaniose, em comparação com igual número de pessoas com cão sem leishmaniose.

**Envolvimento na investigação:** este estudo irá permitir avaliar a percentagem de pessoas que apresenta anticorpos para a leishmaniose, e perceber se o facto de coabitar com um cão com leishmaniose aumenta ou não a probabilidade de ser infectado por flebótomo que transmite a doença. A colheita consistirá na recolha de uma gota de sangue obtida por picada do dedo indicador esquerdo. Esta amostra será analisada posteriormente. Todo o material utilizado na recolha é descartável e individual.

**Confidencialidade:** todas as informações recolhidas neste estudo são estritamente confidenciais.

**Benefícios:** Esperamos recolher informações importantes sobre a epidemiologia da leishmaniose, na zona de Lisboa, nomeadamente na sua vertente zoonótica. A investigadora compromete-se a divulgar os resultados, mantendo a confidencialidade dos intervenientes. Após estes esclarecimentos, e se estiver de acordo em participar do estudo por favor preencha e assine.

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e informada, manifesto o meu consentimento para participar no estudo

\_\_\_\_\_  
Nome do Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

\_\_\_\_\_  
Nome do Tutor do Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Tutor do Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Investigadora

**Se considerar útil pedir mais informações pode fazê-lo através dos seguintes contactos:**

**Investigadora:** Dr.<sup>a</sup> Maria João Dinis da Fonseca - 936955915 - [dinisdafonseca@yahoo.es](mailto:dinisdafonseca@yahoo.es)

**Orientadora:** Doutora Helena Ângelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

## ANEXO Nº 2 – Folha para recolha de dados

FOLHA DE RECOLHA DE DADOS (para a população alvo: PA)

NÚMERO DO PROCESSO	/PA	RESULTADO
--------------------	-----	-----------

Sexo: F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>	Idade:	Raça:
Código postal: -		

Escolaridade <obrigatória <input type="checkbox"/> obrigatória <input type="checkbox"/> 12º ano <input type="checkbox"/> licenciatura <input type="checkbox"/> mestrado/doutoramento <input type="checkbox"/>
---

Hábitos relacionados com permanência no exterior:

Desporto ao ar livre não  sim , \_\_\_\_\_

Jardinagem não  sim , \_\_\_\_\_

Passeios com frequência a pé/bicicleta não  sim , \_\_\_\_\_

Tempo aproximado de passeio com o cão/dia 30 min , 60 min , 2 horas ,  
+3 horas , \_\_\_\_\_

Viagens nos últimos 5 anos a países endémicos não  sim , \_\_\_\_\_  
(Brasil, Médio Oriente, Índia, Países africanos)

Resposta facultativa:

Apresenta alguma doença crónica não  sim , \_\_\_\_\_

Lembra-se de sofrer uma lesão semelhante à da fotografia? não  sim , \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Lembra-se de algum episódio de febre prolongada de origem desconhecida?  
não  sim , \_\_\_\_\_

É dador de sangue? não  sim , Já fez transfusão de sangue? não  sim   
\_\_\_\_\_

Dados relativos ao cão

Raça: \_\_\_\_\_ Sexo: F  M  Idade: \_\_\_\_\_

Local habitual de permanência: exterior , interior , misto , \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Coloca habitualmente um desparasitante externo? não , sim , Qual? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Data de diagnóstico da doença: \_\_\_\_\_  
Resultado laboratorial: \_\_\_\_\_

Sinais clínicos observados: linfadenomegalia , hipertrofia ungueal , atrofia dos crotofitas , uveíte ,  
hepatoesplenomegalia , anemia , insuficiência renal , epistaxis , seborreia , emagrecimento ,  
outros

FOLHA DE RECOLHA DE DADOS (para a população controlo: PC)

NÚMERO DO PROCESSO	/PC	RESULTADO
--------------------	-----	-----------

Sexo: F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>	Idade:	Raça:
Código postal: -		

Escolaridade <obrigatória <input type="checkbox"/> obrigatória <input type="checkbox"/> 12º ano <input type="checkbox"/> licenciatura <input type="checkbox"/> mestrado/doutoramento <input type="checkbox"/>
---

Hábitos relacionados com permanência no exterior:
Desporto ao ar livre não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> , _____
Jardinagem não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> , _____
Passeios com frequência a pé/bicicleta não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> , _____
Tempo aproximado de passeio com o cão/dia 30 min <input type="checkbox"/> , 60 min <input type="checkbox"/> , 2 horas <input type="checkbox"/> , +3 horas <input type="checkbox"/> , _____
Viagens nos últimos 5 anos a países endémicos não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> , _____ (Brasil, Médio Oriente, Índia, Países africanos)

Resposta facultativa:
Apresenta alguma doença crónica não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> , _____
Lembra-se de sofrer uma lesão semelhante às das fotografias? não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> , _____ _____
Lembra-se de algum episódio de febre prolongada de origem desconhecida? não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> , _____
É dador de sangue? não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> , Já fez transfusão de sangue? não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> _____

Dados relativos ao cão
Raça: _____, Sexo: F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> Idade: _____
Local habitual de permanência: exterior <input type="checkbox"/> , interior <input type="checkbox"/> , misto <input type="checkbox"/> , _____ _____
Coloca habitualmente um desparasitante externo? não <input type="checkbox"/> , sim <input type="checkbox"/> , Qual? _____ _____
Data de despiste da doença: _____



Fotografias utilizadas para ilustrar lesões de LC

### **ANEXO Nº 3 – Folheto informativo sobre leishmaniose**

A leishmaniose é uma doença causada por um parasita, mais precisamente por um protozoário chamado *Leishmania*. Trata-se de uma zoonose (doença transmissível entre o Homem e animais) que afecta com frequência os nossos cães. A leishmaniose existe em 88 países, e tem uma incidência de 2 milhões de novos casos/ano. Em Portugal o panorama da doença na Medicina Veterinária é muito distinto do da Medicina Humana. Na Medicina Humana foram notificados 185 casos nos últimos 10 anos. Apesar de se saber ser notificada é considerada uma doença rara que atinge sobretudo crianças e pessoas com depressão do sistema imunitário, como seja o caso de pessoas submetidas a quimioterápicos.

Pelo contrário em Medicina Veterinária é uma doença muito frequente que afecta cães de todas as raças e idades. Não é possível saber o número de casos a nível nacional porque o sistema de notificação é deficiente, contudo só neste Hospital desde Agosto de 2002 até Dezembro de 2007 foram diagnosticados 1200 casos.

A leishmaniose é transmitida por uma mosca de pequenas dimensões, falando-se por isso na gíria da doença do mosquito. O cão é infectado quando é picado por uma mosca que previamente picou um outro cão infectado. Uma vez picado, o cão ou fica doente, com períodos de incubação que vão de poucas semanas a anos, ou o seu sistema imunitário consegue evitar o desenvolvimento da doença, podendo no entanto ficar portador do parasita. Esta dualidade infecção/doença é complexa e por vezes o veterinário é confrontado com questões de difícil resposta, como por exemplo se devem os animais infectados ser tratados na ausência de sintomatologia. Obviamente que o propósito deste folheto não é responder a este tipo de questões que devem ser analisadas e discutidas caso a caso.

As manifestações mais frequentes da doença nos cães são perda de peso, anemia, distúrbios de coagulação como epistaxis (perda de sangue nasal) e mau estado de pelo.

Os animais doentes têm prognóstico reservado se não forem tratados. Actualmente graças ao melhor conhecimento da doença, são cada vez mais os animais que atingem a cura clínica.

Nesta, como em todas as doenças, é melhor prevenir. Enquanto no nosso país não estiver disponível a vacina resta-nos colocar coleiras e/ou *spot-on* (pipetas) com acção repelente para a mosca. Se esta medida não resultar apostar no diagnóstico precoce e instituir o melhor tratamento para cada animal.

Queremos que os clientes do Hospital Veterinário do Restelo estejam esclarecidos sobre esta zoonose. Estou pessoalmente empenhada nesta tarefa e disponível para qualquer esclarecimento adicional.

*Maria João Dinis da Fonseca*  
dinisdafonseca@yahoo.es<sup>1</sup>

---

i

---

1