

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Debora Marcolino Silva

Fatores de risco para leishmaniose visceral canina: um estudo de coorte em área endêmica do Distrito Federal.

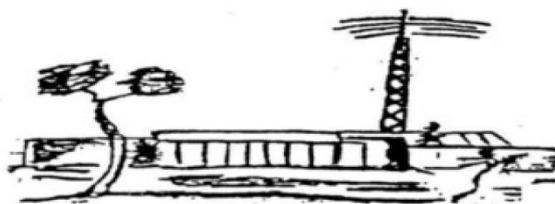
Brasília

2019

Fatores de risco para leishmaniose visceral canina: um estudo de coorte em área endêmica do Distrito Federal.

Debora Marcolino Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília para a obtenção do título de mestre em Medicina Tropical, na área de concentração: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Professor Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero



Brasília

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SSI586f Silva, Debora Marcolino
Fatores de risco para leishmaniose visceral canina: um estudo de coorte em área endêmica do Distrito Federal. / Debora Marcolino Silva; orientador Gustavo Adolfo Adolfo Sierra Romero. -- Brasília, 2019.
100 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina Tropical) -- Universidade de Brasília, 2019.

1. leishmaniose visceral canina. 2. fatores de risco. 3. estudo de coorte. 4. Leishmania infantum. 5. PCR em tempo real. I. Adolfo Sierra Romero, Gustavo Adolfo, orient. II. Título.

Data da Defesa

16 de agosto de 2019

Banca Examinadora

Professor Doutor Gustavo Adolfo Sierra Romero (Presidente)

Universidade de Brasília

Doutora Rafaella Albuquerque e Silva (Membro)

Ministério da Saúde

Doutor Vinícius Silva Belo (Membro)

Universidade Federal de São João del-Rei

Doutor Henry Maia Peixoto (Suplente)

Universidade de Brasília

Agradecimentos

Se tem uma coisa que eu nunca poderei me queixar foi de não ter tido ajuda para fazer este trabalho. Onde eu procurasse sempre fui abençoada de encontrar colaboradores e amigos, sem os quais jamais teria conseguido concluir esse projeto. Então, são muitas pessoas para agradecer e eu tentarei ser sucinta, mas acredite, cada menção aqui merece muito mais do que algumas linhas de agradecimento.

Agradeço a Ana Izabel, se eu pude chegar até aqui foi porque ela iniciou tudo e deixou o caminho preparado para mim. Agradeço ao prof. Gustavo por ter sido um excelente orientador, muito obrigada por todo o conhecimento compartilhado e por sempre conseguir encaixar meus problemas na sua agenda apertada. E claro, agradeço à Ana Cláudia e Ana Paula não só por todo o apoio técnico ao projeto (que não foi pouca coisa), mas por todas as horas de conversas e risos que tornaram todo o trabalho tão mais leve.

Agradeço à minha equipe de coleta a campo, a cada um de vocês que contribuíram como puderam nesses anos. Em especial agradeço ao Barbosa, Cleonice, Lívia e Paulo sem vocês não sei o que seria de mim, simples assim. Na chuva, no sol, quando a kombi atolava, quando os cachorros fugiam, independentemente, lá estavam vocês me ajudando nos sábados.

Agradeço aos professores do programa de pós-graduação do NMT, à equipe do Laboratório de Dermatologicologia (FM-UNB), à equipe do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas (FM-UNB) e à equipe do laboratório de leishmaniose da DIVAL-DF, como esse projeto teria sido difícil sem vocês.

Agradeço à minha família, amigos e namorado, o apoio de vocês foi fundamental. Agradeço a todas as famílias e cachorros que permitiram esse estudo.

Eu só tenho a agradecer, obrigada a todos!

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência de características biológicas, ambientais e de cuidados com os cães da amostra estudada.....	49
Tabela 2 – Estimativas de prevalência e IC 95% para os testes moleculares e sorológicos.....	51
Tabela 3 – Descrição das características dos cães elegíveis para a coorte (N=162), censurados antes do primeiro acompanhamento (N=56) e participantes da coorte (N=100).....	52
Tabela 4 – <i>Hazard ratios</i> obtidos por meio do modelo de Cox univariado com desvio padrão robusto ajustado para 116 <i>clusters</i> , referentes as residências.....	57
Tabela 5 – Modelo de Cox multivariado para fatores de risco da infecção por <i>Leishmania</i> em cães obtido por seleção <i>backward</i>	58
Tabela 6 – Valores dos critérios de informação para os modelos de Cox multivariados gerados pela seleção <i>backward</i>	60
Tabela 7 – Modelo de Cox hierárquico para infecção por <i>Leishmania</i> : covariáveis do contexto socioeconômico (Bloco 1).....	60
Tabela 8 – Modelo de Cox hierárquico para infecção por <i>Leishmania</i> : covariáveis de cuidado com os cães (Bloco 2).....	61
Tabela 9 – Modelo de Cox hierárquico para infecção por <i>Leishmania</i> : covariáveis ambientais (Bloco 3).....	61
Tabela 10 – Modelo de Cox hierárquico para infecção por <i>Leishmania</i> : covariáveis biológicas (Bloco 4).....	61
Tabela 11 – Modelo de Cox hierárquico para infecção por <i>Leishmania</i> : modelo final.....	62

Tabela 12 – Critérios de informação dos modelos de Cox multivariados gerados pela seleção hierárquica em blocos.....	62
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Disposição geográfica dos setores censitários correspondentes as comunidades de Serra Azul (em amarelo) e Vila Rabelo (em azul), Sobradinho II, DF, 2019.....	35
Figura 2 – Arcabouço do modelo hierárquico teórico para a seleção de variáveis de risco para infecção por <i>Leishmania</i> em cães.....	44
Figura 3 – Disposição geográfica das casas pertencentes a linha de base do estudo de coorte. Circunscrita em amarelo a localidade de Serra Azul e em azul, a localidade de Vila Rabelo, Sobradinho II, DF, 2016 a 2018.....	45
Figura 4 – <i>Boxplot</i> do escore socioeconômico separado por localidade (A) e tabela de conversão de escore socioeconômico em estrato e renda domiciliar média (B).....	47
Figura 5 – Rua típica em Serra Azul (A), rua típica em Vila Rabelo (B) e casas construídas em uma encosta na Vila Rabelo (C).....	47
Figura 6 – <i>Boxplot</i> para escore clínico sugestivo de LVC. Mediana= 1 e intervalo interquartil= 3.....	50
Figura 7 – Diagrama de venn de todas as amostras classificadas como positivas pelos diferentes testes diagnósticos utilizados.....	51
Figura 8 – Quadro com o momento de entrada e contribuição de tempo em risco dos 162 cães elegíveis.....	54

Figura 9 – Fluxograma de desfechos e censuras durante o andamento da coorte para estimar a incidência de leishmaniose canina em área endêmica do Distrito Federal. 2016-2018.....55

Figura 10 – Gráfico de sobrevivência até a infecção por *Leishmania* numa coorte de cães acompanhada em área endêmica do Distrito Federal. 2016-2018.....56

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Protocolo de amplificação da qPCR para *Leishmania*.....40

Quadro 2 – Descrição das variáveis categóricas conforme foram utilizadas na análise.....41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIC	Critério de informação de Aikake (Akaike information criterion)
BIC	Critério de bayesiano de Schwarz (Bayesian information criterion)
DAT	Teste de aglutinação direta (<i>Direct Agglutination test</i>)
DF	Distrito federal
DIVAL-DF	Diretoria de Vigilância Ambiental do Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
EIE	Ensaio imunoenzimático (ELISA)
EIE-LIMP	Ensaio imunoenzimático para diagnóstico de LVC <i>in house</i> com antígenos de <i>L. Infantum</i>
EIE-LVC	Ensaio imunoenzimático para diagnóstico de LVC (Biomanguinhos)
HR	<i>Hazard ratio</i>
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
LT	Leishmaniose tegumentar humana
LV	Leishmaniose visceral humana
LVC	Leishmaniose visceral canina

OR	Razão de chances (<i>odds ratio</i>)
PCLV	Programa de Controle da Leishmaniose Visceral
PCRc	Reação em cadeia da polimerase convencional
PCR-RFLP	PCR associada a análise de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
qPCR	PCR quantitativa (PCR em tempo-real)
TR-DPP	O teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso para diagnóstico de LVC (Biomanguinhos)

FINANCIAMENTO

Edital FAP/DF: 03/2015 Processo 193.000.867/2015

CNPq: 142247/2015-4

PROAP/CAPES/UNB

Bolsa de demanda social da CAPES/UnB

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Aspectos gerais da leishmaniose visceral humana e de seu ciclo epidemiológico em centros urbanos do Brasil	18
1.2. A situação epidemiológica e da leishmaniose visceral no Brasil e no Distrito Federal	20
1.3. A Leishmaniose visceral canina: descrição, importância a saúde pública e medidas de controle	22
1.4. DIAGNÓSTICO DA LVC	25
1.5. Fatores de associação e risco para a LVC	29
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	33
4. MÉTODOS	33
4.1. População em estudo	34
4.2. Construção do estudo de coorte	35
4.2.1. Cálculo da amostra	35
4.2.2. Amostragem	36
4.3. Definição de desfecho	37
4.4. Coleta de informações e amostras biológicas	37
4.5. Testes sorológicos para LVC	38
4.6. Extração de DNA e controle de qualidade do método molecular 38	
4.7. qPCR	39
4.8. Estratégias de análise	40
5. RESULTADOS	45
5.1. Tamanho da amostra na linha de base e intervenções na população em estudo	45
5.2. Descrição de características dos proprietários e residências	46

5.3. Descrição da amostra na linha de base	48
5.4. Resultados laboratoriais e estimativa da prevalência	50
5.5. Estudo de coorte e estimativa da incidência.....	52
5.6. Estudo de fatores de risco.....	56
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
Apêndice I: Questionário sobre condição socioeconômica, conhecimento sobre a LV, cuidados com o cão e características do ambiente domiciliar ...	92
Apêndice II: Ficha de avaliação clínica.....	94
Apêndice III: Padronização da reação de qPCR.....	95
Anexo I: Certificado CEUA	99
Anexo II: Instruções para preenchimento do questionário socioeconômico, retiradas do Critério Brasil 2016, ABEP.	100

RESUMO

SILVA, D.M. Fatores de risco para leishmaniose visceral canina: um estudo de coorte em área endêmica do Distrito Federal. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical, Área de Concentração em Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília 2019.

O controle da leishmaniose visceral canina (LVC), zoonose de caráter crônico e fatal, tem se provado um verdadeiro desafio. As medidas adotadas atualmente não parecem ser suficientes para reduzir a propagação da doença. Para que novas alternativas sejam elaboradas precisamos entender quais fatores influenciam a ocorrência da LVC e são passíveis de intervenção. O presente estudo trata-se de uma coorte aberta prospectiva para identificar fatores de risco para a LVC em localidade endêmica do DF. De junho de 2016 a dezembro de 2018, foram coletadas amostras de sangue periférico canino e informações sobre a condição socioeconômica dos donos, do ambiente do domicílio, de cuidados com cão e de suas características biológicas. Foi utilizado uma combinação dos testes ensaio imunoenzimático (EIE-LVC, Biomanguinhos), o teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso (TR-DPP, Biomanguinhos) e PCR em tempo real do sangue total para identificação dos animais infectados. Os cães da linha de base (n=248) eram predominantemente assintomáticos ou oligossintomáticos. A prevalência na linha de base foi 27,52% (IC 95%: 22,19 a 33,34) para infecção por *Leishmania*. Da linha de base 162 cães estavam negativos nos três exames e poderiam, por tanto, participar do estudo de coorte. No total, 106 tiveram alguma contribuição em tempo na coorte, com um tempo médio de acompanhamento de 10,7 meses. A incidência estimada foi 1,91 casos por 100 cães-mês (IC 95% 1,33 a 2,75). Para a seleção de fatores de risco primeiro foram realizadas análises

univariadas de todas as variáveis e as com $p\text{-valor} \leq 0,25$ seguiram para as próximas análises. Para a análise multivariada foram utilizado dois métodos distintos para seleção de variáveis com $p\text{-valor} \leq 0,1$ no modelo de Cox: o método *backward* e o modelo hierárquico. Pelo método *backward* o maior poder aquisitivo (HR 1,04; $p=0,007$) e o uso de repelentes em cães (HR 0,20; $p= 0,095$) foram selecionados enquanto que pelo método hierárquico a presença de aves (HR 0,41; $p=0,07$) e o maior poder aquisitivo (HR 1,03; $p=0,065$) ficaram no modelo final. Os resultados refletem o desafio de se encontrar variáveis susceptíveis de intervenção. O achado de repelentes tópicos como fator protetor está de acordo com o otimismo das pesquisas recentes sobre o uso dessa medida para a prevenção da LVC.

Palavras chave: leishmaniose visceral canina, fatores de risco, estudo de coorte, *Leishmania infantum*, PCR em tempo real

ABSTRACT

SILVA, D.M. Risk factor for canine visceral leishmaniasis: a cohort study in an endemic area of Federal District, Brazil.. Dissertation (Masters degree in Tropical Medicine, Concentration Area in Biology of Infectious and Parasitic Diseases) – Postgraduation Program in Tropical Medicine. University of Brasília, Brasília, 2019.

The control of canine visceral leishmaniasis (CVL), a chronic fatal zoonosis, has been a true challenge. The measures currently adopted do not seem to be enough to reduce the disease propagation. In order to elaborate new alternatives we need to understand which factors influence the occurrence of CVL and may be intervened. Our objective is to identify risk factors for CVL by a prospective open cohort study. From July 2016 to December 2018 samples of canine peripheric blood and information regarding the socioeconomic condition of the owners, the house ambient, the dog care practices and the biological characteristics of the dog. A combination of an enzyme linked immunosorbent assay (EIE-LVC, Biomanguinhos), a dual-path platform chromatographic immunoassay (TR-DPP, Biomanguinhos) and a real time PCR assay of blood samples was used to identify infected animals. The baseline (n=248) was composed mainly of asymptomatic and oligosymptomatic dogs. The baseline prevalence of *Leishmania* infection was 27.52% (95%CI: 22.19 to 33.34). On the baseline, 162 dogs were negative by the three tests executed, and therefore could take part on the cohort. At total 106 dogs had time contribution to the cohort study, with a mean follow up period of 10.7 months. The estimated incidence was 1.91 cases per 100 dog-months (95%CI 1.33 to 2.75). In order to select risk factors, univariate analysis were performed and all variables with p-value ≤ 0.25 proceeded to the next analysis. Two distinct methods were used to perform the multivariate analysis by Cox models with selection at a p-value ≤ 0.1 : the backward model and the hierarchical model. By the backward

method a greater acquisitive power (HR 1.04; p=0.007) and the use of repellents (HR 0.20; p= 0,095) on dogs were selected, as for the hierarchical model the presence of birds (HR 0.41; p=0.07) and a greater a acquisitive power (HR 1.03; p=0.065) were selected. This results reflects the challenges of finding an intervenable variable. The use of topical repellents as a protective factor is in line with recent researches optimism about the use of this measure to CVL prevention.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, risk factors, cohort study, *Leishmania infantum*, real time PCR

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da leishmaniose visceral humana e de seu ciclo epidemiológico em centros urbanos do Brasil

As leishmanioses são doenças causadas pelo parasitismo de protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* (*Trypanosomatida: Trypanosomatidae*). As espécies integrantes do subgênero *L. (Sauroleishmania)* são parasitas de répteis, enquanto que as espécies dos subgêneros *L. (Viannia)*, *L. (Leishmania)* e *L. (Mundinia)* parasitam mamíferos (ESPINOSA et al., 2018). Das espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos, 17 espécies causam doença em humanos (STEVERDING, 2017).

As leishmanioses são classificadas de acordo com suas manifestações clínicas e agente etiológico em tegumentar (LT) e visceral (LV). Tanto a LT e a LV ocorrem de forma autóctone no Brasil (LAINSON, 2010). A leishmaniose tegumentar compreende as formas cutânea e mucosa da doença e está relacionada à infecção por diversas espécies dos subgêneros *Viannia*, *Leishmania* e *Mundinia* (STEVERDING, 2017).

A leishmaniose visceral é a forma mais letal da doença, causada pela infecção por *L. (Leishmania) infantum* ou *L. (Leishmania) donovani* (GUERIN et al., 2002). A LV é uma doença de curso crônico caracterizada por quadros de febre, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, leucopenia, trombocitopenia e hipergamaglobulinemia (MURRAY et al., 2005). Esta doença atinge em especial crianças, idosos e pessoas imunodeficientes, resulta em morte se não tratada, com relato de letalidade de 10 a 20% (ALVAR et al., 2012).

No Brasil o agente etiológico da LV é a *L. infantum* e esta é transmitida mais comumente pelo vetor *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) (RANGEL et al., 2018) e em algumas localidades pela *Lu. Cruzi* (OLIVEIRA DOS SANTOS et al., 2003) e *Lu. migonei* (DE CARVALHO et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2016; SILVA et al., 2014). As fêmeas de *Lu.*

longipalpis fazem hematofagia em diversas espécies, que incluem aves, cães, humanos, roedores, gado, cavalos e gambás (MISSAWA; LOROSA; DIAS, 2008). O grau de preferência alimentar entre animais varia entre os estudos, sendo galinhas (SANT'ANNA et al., 2008), cães (CAMARGO-NEVES; RODAS; GOMES, 2007), humanos (DE OLIVEIRA et al., 2008) e tatus (MACEDO-SILVA et al., 2014) já relatados como principal fonte alimentar do flebotomíneo.

O habitat da *Lu. longipalpis* era primariamente silvestre, porém com o crescimento urbano e a ocupação humana em áreas de vegetação nativa, essa se adaptou para o ambiente peridomiciliar (LAINSON; RANGEL, 2005). Este flebotomíneo pode ser encontrado em quintais, galinheiros, chiqueiros e canis, notavelmente quando existe a presença de matéria orgânica abundante e umidade, pois essas condições são favoráveis para sua reprodução (SANTINI et al., 2015).

As fêmeas de flebotomíneos adquirem as formas amastigotas de *L. infantum* ao realizarem o repasto sanguíneo em um hospedeiro. No intestino do flebotomíneo, as formas amastigotas de *L. infantum* se transformam nas formas promastigotas procíclicas, que se proliferam e se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas (CHAPPUIS et al., 2007). Os promastigotas metacíclicos são a forma infectiva e são regurgitados pelo vetor durante o repasto sanguíneo (KAYE; SCOTT, 2011).

Uma vez dentro do hospedeiro veterbrado, os promastigotas metacíclicos são fagocitados por macrófagos e células dendríticas da derme, onde eles se tornam as formas aflageladas amastigotas (KAYE; SCOTT, 2011). As formas amastigotas então se replicam até romperem a célula hospedeira para infectarem outras células fagocíticas e se replicarem. Os amastigotas se disseminam pelo sistema vascular e linfático eventualmente se estabelecendo em linfonodos, medula óssea, fígado e baço (CHAPPUIS et al., 2007).

A infecção pode resultar em cura, infecção assintomática ou progressão para LV a depender principalmente do padrão de resposta imune desenvolvido pelo hospedeiro (RODRIGUES et al., 2016; STANLEY;

ENGWERDA, 2007). Um padrão de resposta imune tipo 1 é considerado protetor e resulta na ativação de macrófagos infectados para destruir as formas intracelulares amastigotas (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Por outro lado, um padrão de resposta regulatório com a produção de interleucina 10 está relacionado com persistência e proliferação do parasito, aumento da titulação de anticorpos, exaustão de células T, perda da arquitetura de tecidos linfoides e resposta humoral deficiente (NYLÉN; SACKS, 2007; RODRIGUES et al., 2016).

Humanos são considerados hospedeiros acidentais da *L. infantum* e o principal hospedeiro responsável pela manutenção de sua transmissão em meio urbano é o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) (QUINNELL; COURTENAY, 2009). Outros mamíferos hospedeiros, como cachorro-domato (*Cerdocyon thous*), gambás (*Didelphis spp*), gato doméstico (*Felis catus*), rato-preto (*Rattus rattus*) já foram identificados mas sua importância nos ciclos silvestre e urbano ainda precisa ser elucidada (MAIA; DANTAS-TORRES; CAMPINO, 2018).

1.2. A situação epidemiológica e da leishmaniose visceral no Brasil e no Distrito Federal

A LV foi descrita pela primeira vez em humanos em 1936 no Brasil. As pessoas acometidas pela LV eram predominantemente de áreas rurais, mas a partir de 1981 essa percepção mudou com o registro dos primeiros casos de uma epidemia em Teresina, importante centro urbano da região Nordeste (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990; HARHAY et al., 2011). Com a adaptação do vetor ao peridomicílio e tendo o cão como reservatório, a *L. infantum* usufruiu das condições necessárias para a expansão de sua transmissão em diversas cidades brasileiras (CONTI et al., 2016; WERNECK, 2008).

Em resposta ao crescimento da LV, o Ministério da Saúde desenvolveu Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV). Este possui como principais pilares o diagnóstico e tratamento de casos humanos, controle de vetores, controle do reservatório canino e educação em saúde (COSTA;

VIEIRA, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Das abordagens citadas a que encontra maiores críticas é o controle do reservatório canino.

A vigilância epidemiológica canina é feita por meio de inquéritos sorológicos e a eutanásia de cães com sorologia positiva. Esta medida tem sido extensamente questionada devido a (1) baixa sensibilidade dos testes diagnósticos que permitem a permanência de cães infectados na população (DE MENDONÇA et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2019), (2) reposição de cães susceptíveis após a retirada de animais infectados (MOREIRA et al., 2004; NUNES et al., 2008), (3) demora entre o diagnóstico do cão e sua retirada, (4) baixa aceitação popular (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006) e (5) baixa eficiência dessa medida em modelos teóricos (COSTA et al., 2013; COURTENAY et al., 2002; DYE, 1996).

Apesar dos esforços para controle da LV, essa se encontra em expansão no território nacional com novas localidades se tornando autóctones (NARCISO et al., 2019). Este foi o caso do Distrito Federal (DF) uma região antes livre da doença e que, atualmente, é considerada uma região endêmica (CARRANZA-TAMAYO et al., 2010).

Segundo Carranza-Tamayo et al. (2010), casos de LV já haviam sido registrados em humanos no DF desde o ano de 1983, mas estes eram de pessoas de estados vizinhos. Do período de 2005 a 2010, os autores levantaram casos suspeitos e buscaram confirmar a autocnia deles. Foram confirmados 21 casos autóctones, sendo doze em crianças e em nove adultos. A maioria dos casos apresentaram cura ao final no tratamento, porém houve a ocorrência de três óbitos devido a LV.

No DF um dos órgãos responsáveis pela vigilância epidemiológica é a Diretoria de Vigilância Ambiental (DIVAL-DF) e apesar da implementação do PCLV, casos humanos continuam ocorrendo. Do ano de 2010 a 2017, 126 casos de LV foram notificados e desses 26 foram confirmados autóctones (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

1.3. A Leishmaniose visceral canina: características, importância para a saúde pública e medidas de controle.

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença debilitante e fatal para os cães. Os sinais clínicos da LVC são inespecíficos e incluem linfadenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, dermatites, alopecia, onicogribose, poliúria, hiperqueratose de trufa e coxins, blefarite, conjuntivite, uveíte, ceratite, emagrecimento, diarreia, anemia, polidipsia, claudicação e atrofia muscular (BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Em cães a presença exacerbada de sinais clínicos está associada a titulações elevada de anticorpos (ABRANCHES et al., 1991; MARTÍNEZ-MORENO et al., 1995; PINELLI et al., 1994). Assim como em humanos (MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018), titulação elevada ocorre como consequência ao desenvolvimento de um padrão de resposta imune não protetor, que permite a proliferação dos parasitos (BARBIÉRI, 2006). Por tanto, via de regra manifestações clínicas abundantes estão relacionadas com alta titulação de anticorpos e com a alta carga parasitária (COURTENAY et al., 2002; RANGEL et al., 2018; REIS et al., 2009).

A maioria dos cães infectados pela *L. infantum* são assintomáticos (MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018) e mesmo com a ausência de sintomas, o que indicaria baixa carga parasitária, cães assintomáticos tem potencial de transmissão de *L. infantum* ao vetor competente e por isso também podem ser responsáveis pela manutenção do ciclo urbano da LV (LAURENTI et al., 2013; MICHALSKY et al., 2007).

A LVC além de um importante problema de saúde dos cães também tem implicações para a saúde humana. O cão tem importante participação no ciclo urbano da LV, pois são susceptíveis a infecção, apresentam intenso parasitismo cutâneo o qual facilita a disseminação do protozoário, estão em proximidade com humanos, estão em grande quantidade em cidades e mesmo cães assintomáticos são capazes de transmissão, o que contribui para a propagação da *L. infantum* de forma silenciosa (DANTAS-TORRES, 2007). Ademais, a presença de cães na residência é um fator de risco para a infecção em humanos. (BELO et al., 2013a)

Todavia, a natureza da relação entre leishmaniose humana e canina ainda precisa ser esclarecida. Os cães são considerados o principal reservatório em meio urbano, mas não o único, roedores e outros animais sinantrópicos podem ser reservatórios de importância (QUINNELL; COURTENAY, 2009). Apesar de existirem evidências de que alta prevalência na população canina prediz um aumento da incidência de casos humanos (WERNECK et al., 2007), essa pode ser uma relação de interdependência com o vetor e não de causa e consequência (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011).

Independente de como os casos humanos e caninos se realmente se relacionam, intervenções realizadas na população canina contribuem na redução de casos humanos (COSTA et al., 2013; COURTENAY et al., 2002; SEVÁ et al., 2016). Das possibilidades de medidas de controle, a eutanásia de cães sororreagentes, a vacinação, o uso de coleiras impregnadas com deltametrina e o tratamento dos cães são as mais debatidas atualmente (DANTAS-TORRES et al., 2019).

Sobre a eutanásia, não existe consenso se a retirada de cães sororreagentes da população reduz a incidência em humanos (ASHFORD et al., 1998; COSTA; TAPETY; WERNECK, 2007; DIETZE et al., 2007; NUNES et al., 2010; PARANHOS-SILVA et al., 1998) e de forma geral os estudos indicam que essa é uma medida de baixa efetividade (COSTA; VIEIRA, 2001). Mesmo quando realizada com condições otimizadas de diagnóstico, maior cobertura e retirada dos cães não houve impacto significativo na incidência da infecção canina (MOREIRA et al., 2004).

Atualmente no Brasil apenas uma vacina tem venda permitida, a LeishTec®, a qual é baseada no antígeno A2 de leishmania. A LeishTec® foi avaliada em um ensaio randomizado com eficácia de 58,1% (IC 95%: 26,0 a 76,3%), o padrão ouro utilizado no ensaio foi composto por testes parasitológicos e xenodiagnóstico (REGINA-SILVA et al., 2016). Para cães com titulação anti-A2 após a vacinação, a eficácia foi de 80,8% (IC 95%: 37,6 a 94,1%)(REGINA-SILVA et al., 2016). Em outro estudo, 42% dos cães vacinados pela LeishTec® não adquiriram proteção a longo prazo, mas

demoraram mais tempo para apresentar a infecção que cães não vacinados (GRIMALDI et al., 2017). A vacinação pela LeishTec® além apresentar problemas em sua performance, apresenta um protocolo vacinal de difícil implementação em larga escala, com três doses iniciais espaçadas por 21 dias e reforço anual (SOLANO-GALLEGO et al., 2017).

Devido às limitações da implementação da vacinação e da eutanásia, novas alternativas estão sendo pesquisadas para uso na população canina. Dentre elas a mais promissora é o uso de coleiras impregnadas com deltametrina.

O uso tópico de piretroides na forma de produtos *spot-on* ou coleiras impregnadas funciona por repelir e matar os flebotômíneos que tentam se alimentar nos cães (FERROGLIO; POGGI; TRISCIUOGLIO, 2008). Estudos sobre o uso de coleiras impregnadas com deltametrina tem relatado excelentes resultados para a redução da incidência de LV em humanos e cães (COURA-VITAL et al., 2018; COURTENAY et al., 2019; FERROGLIO; POGGI; TRISCIUOGLIO, 2008; KAZIMOTO et al., 2018; MAROLI et al., 2001). Um efeito de diminuição da abundância de vetores também foi relatado com o uso das coleiras (SILVA et al., 2018). As coleiras podem ser utilizadas tanto por cães não infectados e infectados, mas tem limitações práticas devido à perda de coleiras e a reposição dessas quando o princípio ativo expira (DANTAS-TORRES et al., 2019).

No Brasil o tratamento de animais para leishmaniose com drogas de uso humano é proibido. Como não haviam alternativas disponíveis no mercado para o tratamento canino a opção fornecida aos donos era a eutanásia do animal. Mas no ano de 2016, por meio de uma nota técnica interministerial, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e o Ministério da Saúde autorizaram o registro do produto Milteforan™ (miltefosine) da empresa Virbac criando uma alternativa para os proprietários.

Não há evidências de que o tratamento com Milteforan™ promova uma cura parasitológica dos cães, de fato recaídas clínicas são comuns, mas o medicamento diminui a carga parasitária e poderia, por tanto, diminuir o potencial de transmissão dos cães infectados (FARCA et al., 2012; TRAVI et

al., 2018). O tratamento diminui os sintomas da LVC e provoca frequentemente problema renais nos pacientes (REGUERA et al., 2016). Outra limitação do tratamento é o custo financeiro, não só pelo preço do fármaco, mas por todo o custo de consultas e exames desses cães ao longo de suas vidas (DANTAS-TORRES et al., 2019). O tratamento não substitui o uso de outras medidas protetoras e o uso de repelentes tópicos é recomendado para cães em tratamento (DANTAS-TORRES et al., 2019).

1.4. DIAGNÓSTICO DA LVC

O diagnóstico da infecção por *L. infantum* pode ser realizado tanto para a comprovação de uma suspeita clínica de um paciente canino ou para a vigilância epidemiológica em uma população de cães. Existem diferentes tipos de testes que podem ser empregados para o diagnóstico, testes parasitológicos, sorológicos, moleculares, xenodiagnóstico e cultura microbiana (MAIA & CAMPINO, 2008).

O xenodiagnóstico e teste parasitológico são métodos de baixa sensibilidade enquanto que a cultura de parasitos apresenta alta sensibilidade se feita com protocolos otimizados (ALLAHVERDIYEV et al., 2005; MAIA & CAMPINO, 2008). O teste parasitológico é rotineiramente empregado na clínica médica veterinária para diagnosticar infecção por *L. infantum* enquanto o xenodiagnóstico e crescimento de cultura microbiana são mais comuns na pesquisa científica (BARROUIN-MELO et al., 2006; MAIA & CAMPINO, 2008). O uso desses testes para estudos populacionais é de difícil implementação devido a coleta invasiva de amostras ou por serem laboriosos e requererem uma estrutura laboratorial complexa (MAIA & CAMPINO, 2008).

O foco atual do desenvolvimento de novas tecnologias para o diagnóstico da LVC está voltado para testes sorológicos e moleculares (GOMES et al., 2008). Estes possuem alta sensibilidade e podem ser empregados com maior facilidade para amostras numerosas. Os testes

sorológicos são baseados na identificação de anticorpos anti-leishmania em sangue ou soro de cães, enquanto que os moleculares são baseados na identificação do DNA do parasito em diversos tecidos. Os testes sorológicos mais comumente empregados são a imunofluorescência indireta (IFI), o ensaio imunoenzimático (EIE), o teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso (TR-DPP) e o teste de aglutinação direta (DAT) (GOMES et al., 2008). Quanto aos testes moleculares, a reação em cadeia da polimerase convencional (PCRc) e a PCR quantitativa (qPCR) costumam ser os métodos de escolha para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* (GOMES et al., 2008; MAIA & CAMPINO, 2008).

A IFI consiste na aplicação de múltiplas diluições de soro do cão em lâminas fixadas previamente com o parasito íntegro. Se o cão apresentar anticorpos anti-*Leishmania* estes se ligarão fortemente aos parasitas na lâmina e ao conjugado fluorescente. O conjugado permite que a ligação possa ser visualizada em microscópio de fluorescência. Até o ano de 2012, o RIFI era utilizado como teste de triagem pelo governo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Eram considerados positivos cães com titulação maior ou igual a 1:40 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A sensibilidade e especificidade da RIFI é estimada respectivamente em 88% (IC 95% 85%–91%) e 63% (IC 95% 61% a 65%) (PEIXOTO, DE OLIVEIRA & ROMERO, 2015).

O TR-DPP produzido por Bio-Manguinhos, Fiocruz, é atualmente o *kit* autorizado para triagem no diagnóstico de LVC por órgãos governamentais no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). O TR-DPP é baseado em uma proteína sintética recombinante (fusão dos antígenos K9, K26, K39 de *Leishmania*) (SCHUBACH, FIGUEIREDO & ROMERO, 2014). O resultado do teste aparece na forma duas listras vermelhas, uma é o controle e a outra é relativa a sororreatividade da amostra. O cão é considerado positivo quando há o aparecimento das duas listras. O TR-DPP possui as vantagens de ser um teste rápido, de fácil realização e fácil interpretação dos resultados, podendo ser utilizado em amostras de sangue ou soro. Sua sensibilidade é

estimada em 83% (IC_{95%} 78% a 88%) e especificidade em 73% (IC_{95%} 70% a 75%) (PEIXOTO, DE OLIVEIRA & ROMERO, 2015).

O EIE é baseado na reação entre antígenos adsorvidos em microplacas e anticorpos presentes no soro do cão. Um espectrofotômetro produz o resultado por meio de um índice de densidade óptica. O EIE produzido pela Bio-Manguinhos, Fiocruz, (EIE-LVC) é o teste confirmatório feito após o diagnóstico positivo pelo TR- DPP. O EIE-LVC é baseado no antígeno bruto de *L. major* (ARRUDA et al., 2013) e apresenta desempenho inferior a alternativas mais refinadas com o uso de antígenos recombinantes (PORROZZI et al., 2007). A sensibilidade do EIE com antígenos brutos é estimada em 89% (IC_{95%} 87% a 91%) e a especificidade em 87% (IC_{95%} 86% a 88%) (PEIXOTO, DE OLIVEIRA & ROMERO, 2015).

O DAT por sua vez é baseado na aglutinação dos antígenos de leishmania brutos pelos anticorpos anti-leishmania presentes no soro do cão. Em um estudo mais recente, um protótipo foi criado (DAT-canis) com o uso do antígeno de *L. infantum*, ao invés do antígeno de *L. donovani* utilizado até então (DA SILVA et al., 2006; OSKAM et al., 1996), e o uso de Nacetyl-cysteine e ureia no diluente. O DAT-canis apresentou valores preliminares de sensibilidade em 97,1% (IC 95%: 83,0 a 99,8%) e especificidade em 97% (IC 95%: 88,5 a 99,5%), mas estudos precisam ser feitos para estimação de sua acurácia em diversos cenários (OLIVEIRA et al., 2016).

Os testes sorológicos são de forma geral mais práticos para uso em grandes populações. O TR-DPP, por exemplo, pode ser utilizado a campo e o DAT e o EIE permitem a avaliação de um número elevado de amostras em pouco tempo (TRAVI et al., 2018). Como desvantagens os testes sorológicos tem baixo desempenho para a detecção de infecção em cães assintomáticos o que implica numa retirada parcial da população canina infectada pelos órgãos de vigilância, promovendo a manutenção da doença nas localidades (LOPES et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2019). De fato, existe evidencia de que cães soronegativos nos testes TR-DPP e EIE-LVC tem potencial de transmissão do parasito ao vetor (DE MENDONÇA et al., 2017).

Os testes moleculares apresentam sensibilidade e especificidade maior do que os testes sorológicos, sendo a qPCR considerada mais sensível que a PCRc (GOMES et al., 2008; MAIA & CAMPINO, 2008). Tanto a PCRc quanto a qPCR estão fundamentadas na amplificação do DNA do parasito e detecção do DNA gerado. A sequência de DNA amplificada é definida pelos *primers* utilizados, os quais são responsáveis em grande parte pela sensibilidade e especificidade do método. Para a identificação de parasitos do gênero *Leishmania*, primers com alvo no gene de múltiplas cópias do DNA do kinetoplasto são frequentemente empregados por aumentarem a sensibilidade do método justamente por terem alvo em uma sequência de DNA abundante no parasito (BENSOUSSAN et al., 2006; MOHAMMADIHA et al., 2013).

O protocolo de qPCR se diferencia da PCRc no uso de fluoróforos que se ligam ao DNA amplificado e emitem luminosidade captada pela máquina. Isto permite a quantificação do DNA gerado para estimação da quantidade de DNA que originalmente a amostra possuía. Por isso, a qPCR permite inferências sobre a carga parasitária original.

A PCR é mais laboriosa do que a qPCR, pois para verificar a amplificação ocorrida na PCR é preciso realizar uma eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. No protocolo de qPCR a amplificação é detectada em todos os ciclos e mostrada pelo equipamento na forma de gráficos, permitindo que se acompanhe os resultados durante o procedimento. Por isso a qPCR é também conhecida como PCR em tempo real.

A escolha do tecido que será submetido a extração de DNA tem grande impacto para a sensibilidade da qPCR. Diversos estudos relatam órgãos linfoides como o tecido de eleição, especialmente o baço, linfonodos e medula óssea (ALMEIDA et al., 2013; MAIA et al., 2009; MIRÓ et al., 2008; NUNES et al., 2018; SOLCÀ et al., 2014). O uso sangue total resulta em uma menor sensibilidade em comparação com os tecidos linfoides (LOMBARDO et al., 2012; MIRÓ et al., 2008; NUNES et al., 2018; SOLCÀ et al., 2014). O uso *swabs* de conjuntiva está sendo estudado como alternativa ao uso de tecidos mais invasivos e apresenta resultados variados, por vezes

tendo sensibilidade melhor do que os tecidos linfoides e por vezes pior do que o sangue (LOMBARDO et al., 2012; SOLCÀ et al., 2014; STRAUSS-AYALI et al., 2004).

A falta de padronização dos protocolos moleculares são o grande obstáculo para seu uso generalizado, especialmente com relação a qPCR (ROMERO & BOELAERT, 2010). Ambas as técnicas precisam de profissionais altamente qualificados para sua execução, são laboriosas e a qPCR, em especial, é bastante onerosa.

1.5. Fatores de associação e risco para a LVC

Para entendermos melhor a dinâmica da infecção por *L. infantum* na população humana, se faz necessário que entendamos também como essa se comporta quanto ao reservatório canino. A identificação de variáveis de associação e risco em cães é fundamental para que se possa realizar uma estratégia de controle efetiva.

Coura-Vital et al. (2013a) acompanharam uma coorte de 455 cães, originários de um estudo de prevalência prévio (COURA-VITAL et al., 2011), de Belo Horizonte, MG, por 26 meses. Foram realizados testes sorológicos em três momentos distintos com uso do EIE-LVC e de um EIE-LIMP, produzido com antígenos de *L. infantum* em seu próprio laboratório. Para o cálculo das *hazard ratios* (HR) foram utilizados dois modelos de Cox tempo dependentes, um para cada teste diagnóstico.

O critério de seleção foi resultado negativo nos dois EIEs. No modelo do EIE-LVC pelo curto (HR 1,9; IC95% 1,1 a 3,4), presença de folhas secas na casa (HR 2,8; IC95% 1,6 a 5,0), presença de esterco (HR 3,5; IC95% 1,3 – 9,7) foram fatores de risco significantes para a soroconversão em cães.

Curiosamente o modelo do diagnóstico por EIE-LIMP não selecionou nenhuma destas variáveis, mas sim variáveis diferentes. Dormir solto no quintal (HR 2,1; IC95% 1,1 a 4,1), presença de sintomas (HR 2,0; IC95% 1,1 a 3,9) e resultado positivo na PCR com enzima de restrição (HR 1,5; 1,4 a

3,9) foram fatores de risco selecionados por esse modelo. O uso de sprays inseticidas em casa se mostrou um fator de proteção (HR 0,5; IC95% 0,3 a 0,8) também segundo o modelo com o diagnóstico pelo EIE-LIMP.

As covariáveis relativas a origem do animal, a presença do cão predominantemente no quintal, consultas no veterinário, tipo de piso e presença de quintal não foram consideradas estatisticamente significativas.

As perdas na coorte foram compensadas na primeira avaliação, e não foram seletivas entre os grupos. A taxa de incidência dos cães foi de 6.5/1000 cães-meses para o EIE-LVC e 11.2/1000 cães-meses para o EIE-LIMP. O autor não explora as possíveis causas de porquê as variáveis que se mostraram de risco ou proteção em uma coorte (EIE-LVC) não apresentaram o mesmo resultado na outra formada pela mesma amostra (EIE-LIMP).

Em outro estudo, Coura-Vital et al. (2013b) acompanharam 282 cães, provenientes do mesmo estudo de prevalência citado antes (COURA-VITAL et al., 2011), por 26 meses utilizando como diagnóstico a PCR com enzimas de restrição (PCR-RFLP) e o modelo de Cox para cálculo das HRs. Nesta abordagem as variáveis presença de casos prévios de LVC no domicílio (HR 1,4; IC95% 1,1 a 1,8) e paredes sem revestimento (HR 3,6; IC95 1,6 a 8,1) foram fatores de risco.

Os fatores referentes à visualização do vetor no domicílio, coleta de lixo, presença de árvores no quintal, tamanho do pelo do cão, liberdade de acesso à rua e exames prévios para LVC não foram identificadas como relevantes para o modelo. A incidência foi estimada em 5,8/100 cães-meses (IC 95% 5,1 a 6,5).

Moreira et al (2003) estudaram uma coorte censitária com 447 cães de um bairro de Jequié, BA, realizando o diagnóstico também por meio de um EIE de antígenos de *L. infantum*. O estudo durou 32 meses e acompanhou os cães negativos no EIE por uma média de 1,5 anos, repetindo o teste em intervalos de 8 meses.

Pelo curto (HR 9,4; IC95% 4,3 a 20,7), criação de galinhas (HR 3,3; IC95% 1,4 a 7,7) e outros animais de fazenda (HR 2,6; IC95% 1,1 a 6,6)

foram fatores de risco significantes para estes cães. A incidência para o bairro foi 11.8/100 cães-anos. Neste estudo ocorreu perda de informação seletiva de animais que estariam em grupos de risco, como por exemplo, animais que convivem com animais de fazenda, mas mesmo assim foi possível detectar este como fator de risco.

Lopes et al (2016) acompanhou uma coorte de 595 cães de Belo Horizonte, MG, realizando diagnóstico de RIFI a cada 6 meses por um período de 1 ano. Com um modelo de regressão logística concluiu que as covariáveis idade maior que quatro anos (OR 0,5; IC95% 0,3 a 0,8), porte grande (OR 1,6; 95% 1,1 a 2,3) e o indicador composto por tratamento de esgoto, água e renda mensal superior a um salário mínimo (OR 0,5; IC95% 0,3 a 0,8) apresentaram efeitos significativos para o risco de soroconversão. A covariável limpeza diária do peridomicílio, com um p-valor 0,065 (OR 0,711; IC95% 0,5 a 1,0), apresentou valores perto do limite de seleção e foi incluída no modelo pela sua plausibilidade biológica.

Estudos longitudinais em cães como o de Coura-Vital et al. (2013a), Coura-Vital et al. (2013b), Moreira et al. (2003) e Lopes et al. (2016) são escassos na literatura, pois são de difícil execução e onerosos. Todavia, esses estudos são o método mais indicado para a identificação de fatores de risco e, conseqüentemente, são necessários para a elaboração de medidas de prevenção da LVC. Apesar da carência na literatura científica de estudos de fatores de risco longitudinais em cães, existe um número considerável de estudos de associação transversais que contribuem para o entendimento da epidemiologia da LVC.

Em uma meta-análise realizada em Belo et al. (2013), 31 estudos transversais foram analisados, dois ecológicos e três coortes. As variáveis sem raça definida, pelo curto, maior liberdade dos cães quanto ao peridomicílio e presença de áreas verdes perto a casa foram fatores de associados de forma significativa. Outras variáveis como presença de galinhas, sexo masculino e idade maior que 2 anos apresentaram efeito, mas não a significância estatística estipulada ($p \leq 0,05$).

Os autores indicam que a maioria dos estudos não apresentou o motivo das recusas dos donos, o que impossibilita análise de vieses de seleção. Também constatam que dos estudos realizados, 14 foram feitos com a RIFI, método que possui baixa acurácia se comparado com outras técnicas sorológicas. Além disso, indicam que apenas seis dos estudos apresentaram controle para variáveis confundidoras e apenas dois estudos apresentavam a metodologia da regressão utilizada de forma clara.

Como recomendações os autores da meta-análise indicam a elaboração de mais estudos que incluam variáveis socioeconômicas, abundância de flebotomíneos, ocorrência de casos anteriores de LVC no domicílio, presença de ectoparasitas e presença de outros animais no domicílio. O autor enfatiza ainda a necessidade de mais estudos ecológicos e de coorte, especialmente em áreas ainda não estudadas.

2. JUSTIFICATIVA

A LV é uma doença de manifestação grave, potencialmente fatal, de relevância a saúde pública. O cão doméstico atua como principal reservatório nos centros urbanos e por isso o conhecimento da epidemiologia da infecção nos cães é necessário para o entendimento da epidemiologia da doença em humanos.

Estudos sobre a identificação dos fatores de risco nesses animais são fundamentais para o direcionamento de estratégias de controle e prevenção mais eficientes, as quais são bem-vindas, dado o baixo desempenho das medidas adotadas atualmente.

Na literatura científica, existe uma carência de estudos longitudinais que avaliam variáveis de risco na LVC e, mesmo em estudos transversais, ainda existem inconsistências e lacunas quanto as variáveis associadas, especialmente a variáveis socioeconômicas e ambientais.

Ao nosso conhecimento, nenhum estudo deste tipo ainda foi realizado nas localidades endêmicas do Distrito Federal, o que contribuiria não só para construção do conhecimento de maneira geral, mas também diretamente para o serviço de vigilância local, que se beneficiaria de dados que refletem de forma mais precisa a realidade da região.

Por fim, estudos de fatores de risco para LVC são de importância não só a saúde humana, mas também a saúde animal. Esse entendimento é primário para que possamos criar estratégias para proteger os cães, evitando seu adoecimento e morte pela enfermidade ou pelas próprias políticas públicas.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Identificar fatores de risco para a leishmaniose visceral canina em localidade endêmica do DF.

Objetivos específicos:

- Descrever características da amostra na linha de base;
- Estimar a prevalência da infecção;
- Estimar a incidência da infecção;
- Estimar a sobrevivência dos cães até a infecção;
- Identificar fatores de risco por meio de modelo explicativo.

4. MÉTODOS

O presente estudo trata-se de uma coorte aberta concorrente para a identificação de fatores de risco para a LVC. O acompanhamento de cães

das localidades de Serra Azul e Vila Rabelo foi iniciado em junho de 2016 e finalizou em dezembro de 2018, com visitas de 6 em 6 meses para identificar a ocorrência da infecção por *Leishmania* e para coletar informações sobre os cães, donos e o ambiente em que vivem os cães. O estudo foi aprovado na Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UnB sob o número UnBDoc 11253/2015 (Apêndice I)

4.1. População em estudo

Para a realização deste estudo escolheu-se a região administrativa (RA) de Sobradinho II, uma das RAs do Distrito Federal, localizada na região Centro-Oeste do Brasil. Estima-se que Sobradinho II tenha uma população urbana de 100.775 habitantes com renda média familiar mensal de R\$ 5.764,50 (CODEPLAN, 2016). A região é considerada endêmica para LV, seu primeiro caso em humanos foi diagnosticado em 2005 (CARRANZA-TAMAYO et al., 2010) e as últimas ocorrências comprovadamente autóctones aconteceram em 2012 (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE, 2012).

Para nossa análise de fatores de risco, duas localidades foram escolhidas devido ao histórico de enzootia e registro de caso humano autóctone: Serra Azul e Vila Rabelo. Ambas as localidades são geograficamente próximas, separadas apenas por uma área verde de aproximadamente um quilômetro quadrado. As comunidades são notavelmente heterogêneas quanto ao perfil socioeconômico de seus habitantes. Juntas elas compreendem 14 setores censitários conforme ilustrados pela Figura 1, com um total de 9.688 habitantes de acordo com o censo demográfico de 2010 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2018).

A população em estudo foi composta por cães com proprietários residentes nesses 14 setores censitários. A população canina em estudo foi estimada como 1/4 da população humana (ALVES et al., 2005), totalizando uma estimativa de 2.422 cães residentes nas comunidades.



Figura 1 – Disposição geográfica dos setores censitários correspondentes as comunidades de Serra Azul (em amarelo) e Vila Rabelo (em azul), Sobradinho II, DF, 2019.

4.2. Construção do estudo de coorte

4.2.1. Cálculo da amostra

Parte dos cães da linha de base (117 cães) foram avaliados em um estudo de prevalência da LVC, realizado na região de Sobradinho II e Fercal (TEIXEIRA, 2019). O processo de amostragem foi desenvolvido para atingir um número de cães suficiente para alcançar os objetivos considerando a inclusão desses 117 cães.

Estimou-se um número amostral para diversas variáveis com base nos resultados do estudo de prevalência da LVC realizado na Fercal, uma outra região administrativa do DF com características similares às de Sobradinho II. Escolheu-se a variável de interesse com menor proporção de indivíduos expostos, no caso os extratos socioeconômicos mais baixos. O software utilizado para o cálculo foi a calculadora estatística para estudos de coorte

do Epiinfo versão 7.2.1, com as seguintes definições: IC de 95%, poder de 80%, razão não exposto/exposto de 5,34 (proveniente do estudo de prevalência), porcentagem de desfecho no grupo não exposto de 8,13% (proveniente do estudo de prevalência) e razão de risco igual a 3. O tamanho amostral obtido foi de 214 cães. Considerando um adicional de 10% de perdas a amostra final foi estimada em 235 cães.

Ao realizar o cálculo do tamanho amostral para a estimativa de incidência, com frequência esperada de 10%, margem de erro de 5% e efeito de desenho de 1.5 e IC: 95%, obteve-se um tamanho amostral de 197 cães. Como o cálculo amostral para a estimativa de incidência foi menor do que o necessário para o estudo de fatores de risco, adotou-se o maior tamanho amostral de 235 cães como meta.

4.2.2. Amostragem

A amostragem foi realizada de forma consecutiva, em todas as ruas das localidades com a intenção de incluir duas casas por rua. Em cada rua, iniciou-se por um dos extremos, inquirindo sequencialmente de casa em casa até encontrar um proprietário que aceitasse participar do estudo. Uma vez que os dados foram coletados para essa residência, repetiu-se o processo na mesma rua, mas iniciando a partir do outro extremo. Quando houve sucesso em incluir duas casas por rua ou quando se esgotaram as casas da rua, passou-se para a próxima rua. Em cada casa foram incluídos no estudo todos os cães elegíveis presentes no momento da abordagem inicial.

4.2.2.1. Critérios de inclusão

Para um cão ser incluído na pesquisa o proprietário deveria assinar o termo consentimento livre esclarecido e residir no lote amostrado. Para ser elegível para o estudo de coorte, o cão deveria estar negativo para infecção

por *Leishmania* em todos os três testes diagnósticos executados, a saber: DPP, EIE-LVC e qPCR em amostras de sangue venoso periférico.

4.2.2.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos do projeto cães agressivos com o proprietário, sendo de difícil contenção; animais nos quais houve coleta de material biológico insuficiente e animais menores de 4 meses de idade.

4.3. Definição de desfecho

Considerou-se que o animal estava infectado por *Leishmania* quando este era positivo na qPCR do sangue periférico ou positivo em ambos os testes sorológicos TR-DPP e EIE-LVC.

4.4. Coleta de informações e amostras biológicas

No primeiro contato com os donos foi obtida a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e foi aplicado o questionário sobre condição socioeconômica; conhecimento sobre a LV; cuidados com o cão e sobre o ambiente em que o cão habitava (Apêndice I e Anexo II). O estado de saúde e características biológicas dos cães foram aferidos por meio de um exame clínico direcionado (Apêndice II).

As seguintes informações foram obtidas por meio de questionamento aos donos: escore socioeconômico, conhecimento sobre leishmaniose, tipo de inseticida usado na residência, tipo de alimentação oferecida ao cão, quais vacinas foram aplicadas, como era o acesso do cão a ambientes externos, onde o cão dormia, qual repelente era utilizado no cão, quantidade de visitas ao veterinário, emagrecimento do cão nos últimos meses e idade do cão.

A equipe de pesquisa aferiu diretamente as seguintes características: sexo do cão, escore clínico do cão, presença de ectoparasitos e tamanho e cor da pelagem. Verificou-se também o tipo de quintal que a casa possuía e a presença de telas nas janelas.

No exame clínico direcionado foram registradas alterações da pele, olhos, membros, alterações na locomoção, tamanho de órgãos linfoides e fígado. A pontuação atribuída aos cães foi resultante da quantidade de sinais clínicos que o cão apresentava de acordo com o instrumento descrito no Apêndice II.

Para os exames sorológicos e moleculares coletou-se o sangue total, por punção da veia cefálica ou jugular em tubos com e sem EDTA. As amostras de sangue coletadas em tubo com EDTA foram armazenadas em freezer -20°C no Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília (LabLeish-NMT-UnB). Das amostras de sangue coletadas em tubos sem EDTA obteve-se o soro que foi aliquoteado e armazenado em freezer -20°C do mesmo laboratório.

4.5. Testes sorológicos para LVC

As amostras de soro coletadas foram transportadas em caixas de transporte refrigeradas para o diagnóstico sorológico da LVC por meio dos kits *Teste Rápido Dual Patch Platform* Biomanguinhos (TR-DPP) e Ensaio Imunoenzimático Biomanguinhos (EIE-LVC) conforme as instruções dos fabricantes. O diagnóstico sorológico foi realizado pela Diretoria de Vigilância Ambiental do DF (DIVAL-DF), por um técnico qualificado que desconhecia as informações clínicas e ambientais dos animais no momento de realização dos testes. As informações dos cães foram registradas no banco de dados da DIVAL-DF para fins de vigilância epidemiológica. O resultado dos testes foi informado aos donos respectivos e disponibilizado por e-mail ou entregue impresso quando requisitado.

4.6. Extração de DNA e controle de qualidade do método molecular

A extração de DNA foi realizada com o kit de extração comercial *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI, Estados Unidos da América) utilizando-se 300µL de amostra de sangue total. Para verificar a integridade do DNA extraído todas as amostras foram submetidas a PCR convencional para o gene de β -actina. Os primers utilizados foram o β -actin

sense (5'-ATCTGGCACCCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3') e *β-actin anti-sense* (5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'). A reação foi montada com um volume final de 10 μ L, com as seguintes concentrações de reagentes: 0,2mM de MgCl₂, 2U de Taq, 0,2mM de dNTPs, 0,5 μ M de cada primer, 2 μ L do tampão 5X, 1,24 μ L de H₂O miliQ e 1,2 μ L de DNA. O protocolo de amplificação foi: 95°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido por uma extensão final de 72°C por 5min. A amplificação foi visualizada por meio da formação de bandas de aproximadamente 800pb em eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Amostras negativas foram processadas novamente em uma reação de 25 μ L nas mesmas condições descritas. Amostras que permaneceram sem amplificação foram consideradas impróprias para análise e excluídas da qPCR.

4.7. qPCR

Para a padronização do método foram extraídos por meio do kit de extração de DNA comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega) 1mL de cultura de *Leishmania infantum* (MCER/BR/79/M6445), 1mL de cultura de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e 1mL de cultura de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904), todas com aproximadamente 10⁷ promastigotas/mL. O DNA extraído foi quantificado espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare). Após a quantificação de DNA foram feitas diluições seriadas em fator de dez das amostras de DNA de cultura e então foram submetidas ao protocolo de qPCR em duplicatas. As curvas de eficiência e o valor de R² foram calculadas pelo software do QuantStudio® 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®).

O protocolo de qPCR foi baseado em *SYBR Green* e com uso de *primers* para a região conservada dos minicírculos de DNA do cinetoplasto de *Leishmania* (5'-GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC-3') e (5'-GGG

GTA GGG GCG TTC TGC GAA-3') (PITA-PEREIRA et al., 2012). A reação foi montada com um volume final de 15 μ L, com as seguintes concentrações de reagentes: 0,2 μ M de cada primer, 7,5 μ L de Master Mix PowerUP SYBR Green (Applied Biosystems), 3,9 μ L de H₂O miliQ e 3,0 μ L de DNA. O termociclador utilizado foi o QuantStudio® 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) e o protocolo de amplificação foi conforme o Quadro 1.

Quadro 1 – Protocolo de amplificação da qPCR para *Leishmania*

<i>Hold</i>		PCR			<i>Melt</i>		
50°C	95°C	95°C	57°C	72°C	95°C	55°C	95°C
2 min	12 min	15s	15s	1min	15s	1min	0,01s
		X 45					

Uma vez padronizada a reação de qPCR as amostras de DNA extraídas do sangue total dos cães foram processadas em placas contendo diluições da cultura de *L. infantum* como controle positivo e H₂O miliQ como controle negativo. Foram consideradas positivas amostras que apresentaram amplificação significativa (Ct) antes do ciclo 40 e que apresentaram curva de dissociação em temperaturas similares as curvas dos controles. As configurações para definição do Ct adotadas foram definidas automaticamente pelo software.

Para avaliação da reprodutibilidade dos resultados das reações de qPCR foram repetidas as reações para 200 amostras em placas diferentes e foi calculada a estatística kappa. A definição desse tamanho amostral está descrita no Apêndice III.

4.8. Estratégias de análise

Foram realizadas descrições tendo como unidade de análise a residência e o cão. Para as residências foram descritas a quantidade média

de cães por casa; o escore socioeconômico dos proprietários; o conhecimento prévio dos proprietários sobre leishmaniose, o uso de tela em janelas e aplicação de inseticidas no ambiente, a criação de galinhas no lote e a visita da vigilância ambiental pela DIVAL-DF.

Utilizando-se como unidade de análise o cão foram descritas as características na linha de base da coorte incluindo as características dos animais, do ambiente em que viviam e do escore socioeconômico de seus donos. As informações coletadas nos questionários que eram de natureza discreta foram selecionadas e resumidas em variáveis binárias (Quadro 2). As variáveis idade, escore socioeconômico e escore clínico foram tratadas como variáveis contínuas.

Os dados referentes à presença de matéria orgânica no quintal e emagrecimento do animal relatado pelo dono foram obtidos de forma imprecisa e, por isso, excluídos da análise.

Quadro 2 – Descrição das variáveis categóricas conforme foram utilizadas na análise.

Variável	Categorias	Descrição
Localidade	Serra Azul ou Vila Rabelo	Em qual comunidade o cão reside
Sexo	Macho ou fêmea	Qual o sexo do cão
Pelo curto	Sim ou não	Se o cão possui pelo curto ao invés de médio ou longo
Pelo claro	Sim ou não	Se o cão possui pelo claro ao invés de mesclado ou escuro
Vacina LVC	Sim ou não	Se o cão possuiu ao menos uma dose da vacina para LVC
Vacina múltipla	Sim ou não	Se o cão possui ao menos uma dose de vacina múltipla
Alimentação	Ração ou sobras	Se o cão é alimentado com ração ou sobras de comida
Consultas no último ano	Sim ou não	Se o cão foi ao veterinário ao menos uma vez no último ano
Ectoparasitos	Sim ou não	Se o cão apresentava pulgas ou carrapatos em sua pelagem.

Repelente no cão	Sim ou não	Se o dono aplica produtos <i>spot-on</i> no cão ou faz uso de coleiras repelentes
Acesso livre ao meio externo	Sim ou não	Se o cão é tem acesso livre a ambientes externos como quintal e rua
Dorme fora de casa	Sim ou não	Se o cão dorme solto no quintal ou em canil
Outros cães no lote	Sim ou não	Se existem outros cães no mesmo lote
Aves no lote	Sim ou não	Se existem galinhas no lote
Quintal pavimentado	Sim ou não	Se o quintal é completamente pavimentado ao invés de ter grama ou terra
Janelas teladas	Sim ou não	Se as janelas da casa possuem tela para mosquitos.
Inseticidas no ambiente	Sim ou não	Se o dono faz uso de inseticidas para baratas, repelentes em spray ou elétricos no lote.

A estimativa de prevalência da infecção por *Leishmania* na população canina e intervalos e confiança a 95% foi obtida de forma exata (intervalo de Clopper-Pearson).

Para a descrição de como foi composta a amostra do estudo de coorte ao longo do tempo foi elaborado um quadro explicativo com entradas e saídas dos cães da coorte e um fluxograma com as censuras e desfechos ocorridos durante o período de acompanhamento. A estimativa de sobrevida até a infecção por *Leishmania* foi obtida por meio do método de Kaplan-Meier.

A estimativa da densidade de incidência da infecção por *Leishmania* foi calculada com o intervalo de confiança de 95%.

Com o objetivo de construir um modelo explicativo para a infecção na região, inicialmente foi utilizado o modelo de Cox univariado com desvio padrão robusto (considerando a presença de *clusters* em casas) e o método de Efron para lidar com empates. As variáveis que apresentaram um *hazard*

ratio com p-valor menor ou igual a 0,250 foram selecionadas para a próxima etapa de análise.

Em seguida foram construídos dois modelos multivariados de regressão com métodos distintos, um utilizando a seleção de covariáveis por método *backward* e outro por meio de um modelo hierárquico teórico. Em ambos os métodos utilizou-se o modelo de Cox multivariado com desvio padrão robusto (considerando a presença de *clusters* em casas) e método de Efron para lidar com empates. Na análise multivariada foram incluídos os cães que continham informações para todas as variáveis sob análise.

A seleção *backward* iniciou-se com todas as variáveis selecionadas pelos modelos univariados e as variáveis com maior p-valor foram retiradas sucessivamente, uma por vez, até restar no modelo variáveis com *harzard ratios* com um p-valor menor ou igual a 0,10.

A seleção por modelo hierárquico foi realizada em blocos nos quais grupos de variáveis de um mesmo contexto entraram conjuntamente nas análises (Figura 2). Neste tipo de modelo, os blocos mais distantes na explicação causal do desfecho são avaliados primeiro e as variáveis com significância relevante são incluídas nos blocos seguintes, para que estes sejam ajustados por elas, e assim sucessivamente. No final das análises obtém-se um modelo em que constam todas as variáveis com significância relevante em cada um dos blocos. Os *harzard ratios* e seus respectivos p-valores foram apresentados conforme o novo modelo criado e conforme obtidos em seu bloco de origem (VICTORA et al., 1997). Para a seleção das variáveis significativas nos blocos foi especificado um p-valor menor ou igual a 0,10.

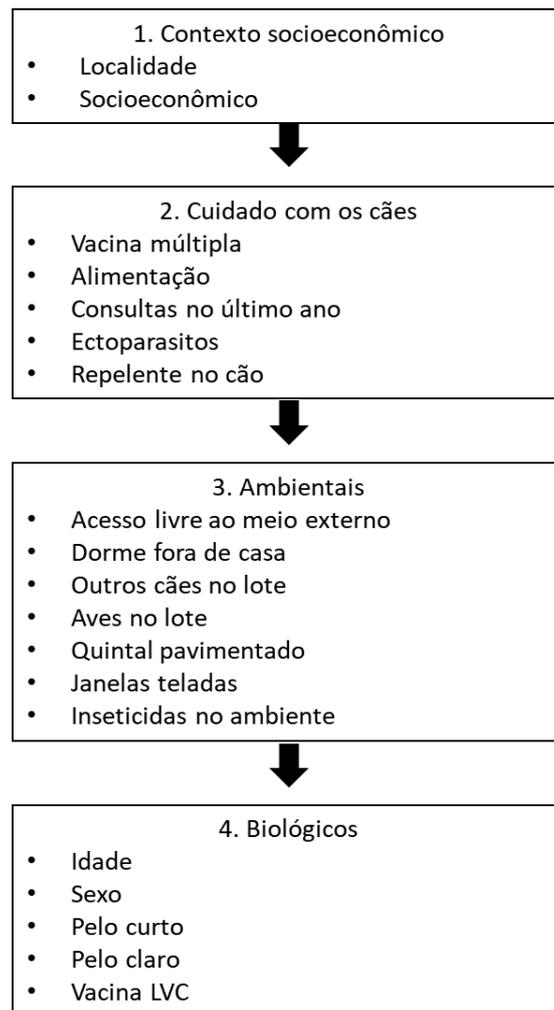


Figura 2 – Arcabouço do modelo hierárquico teórico para a seleção de variáveis de risco para infecção por *Leishmania* em cães.

As informações sobre conhecimento prévio sobre LV, visita da vigilância ambiental e escore clínico não participaram das explorações de fatores de risco, pois costumam ser consequência do desfecho e por isso pouco explicativas.

Para cada modelo gerado foram calculados os critérios de informação de Akaike (AIC) e Bayesiano (BIC), os quais expressam quanta informação foi perdida pelo modelo criado. A suposição de riscos proporcionais,

necessária ao modelo de Cox, foi avaliada através da análise dos resíduos de Schoenfeld nos modelos finais.

Todas as análises foram realizadas usando o programa Stata® versão 15.1.

5. RESULTADOS

5.1. Tamanho da amostra na linha de base e intervenções na população em estudo

De junho de 2016 a março de 2018 foram incluídos na amostra 260 cães referentes a 166 residências. Desse total, 248 cães residentes em 159 casas foram efetivamente incluídos na linha de base e 12 cães foram excluídos por apresentarem material biológico de qualidade inadequada para as análises laboratoriais. As 159 residências participantes do estudo estão distribuídas nas localidades conforme a Figura 3.

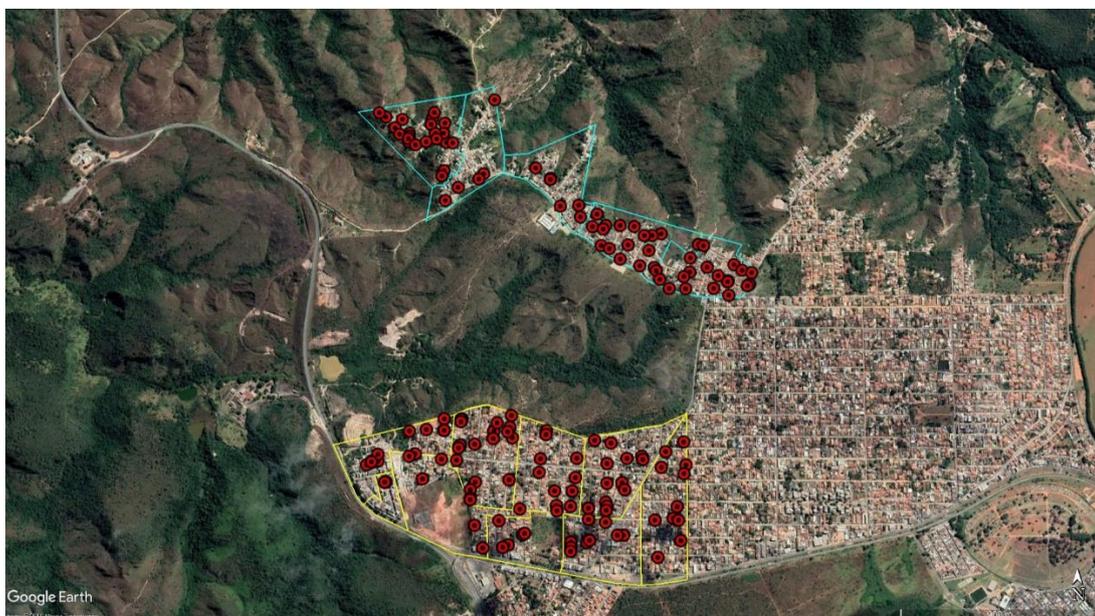


Figura 3 – Disposição geográfica das casas pertencentes a linha de base do estudo de coorte. Circunscrita em amarelo a localidade de Serra Azul e em azul, a localidade de Vila Rabelo, Sobradinho II, DF, 2016 a 2018.

O recrutamento dos cães da localidade de Serra Azul iniciou em 2016 e o dos cães da Vila Rabelo foi realizada a partir de junho de 2017. Entre junho e julho de 2017 a DIVAL-DF conduziu um ensaio na comunidade de Vila Rabelo para avaliar a viabilidade de uma campanha de vacinação para LVC. Ao todo, na região de Vila Rabelo, 913 cães foram vacinados com pelo menos uma dose da vacina Leish-Tec®, desses 300 (32,9%) receberam duas doses da vacina e apenas 223 completaram as três doses recomendadas (24,4%). Em Serra Azul, apenas oito cães foram vacinados e desses três completaram o esquema vacinal. De janeiro de 2016 a dezembro de 2018 apenas cinco cães foram recolhidos pela DIVAL na área em estudo, três no Serra Azul e dois na Vila Rabelo.

5.2. Descrição de características dos proprietários e residências

Das 159 casas incluídas no estudo, 88 eram do Serra Azul e 71 da Vila Rabelo. As residências apresentaram em média 1,56 cães, 105 casas possuíam apenas um cão, 36 casas possuíam dois cães e 18 casas possuíam três cães ou mais.

A média de pontuação no escore socioeconômico foi de 29,6 pontos (próximo ao limite entre estratos B2 e C1), indicando uma renda domiciliar mensal média estimada entre R\$ 2.705,00 e R\$ 4.852,00. Moradores do Serra Azul possuíam uma média de 34,4 pontos (IC 95%: 32,18 a 36,59), a qual foi significativamente maior do que a dos moradores da Vila Rabelo com média de 23,6 pontos (IC 95%: 21,53 a 25,63). Aproximadamente três quartos das famílias amostradas no Serra Azul pertenciam aos estratos A e B, enquanto apenas um quarto das famílias na Vila Rabelo pertenciam a esses estratos socioeconômicos mais altos (Figura 4).

As residências em sua maioria eram abastecidas pela rede geral de fornecimento de água. Apenas três famílias da Vila Rabelo e duas de Serra Azul relataram ter o abastecimento por meio de poço. Na localidade de Serra Azul todas as ruas eram asfaltadas enquanto que na Vila Rabelo das 71

casas amostradas 31 (43,7%) estavam situadas em ruas de terra ou brita (Figura 5 A e B). Diferentemente do Serra Azul, a Vila Rabelo possui grave problema de ocupação desordenada, moradores que moram na periferia vivem em condição de risco de deslizamento de terra devido à inclinação do terreno e das enxurradas frequentes (Figura 5 C).

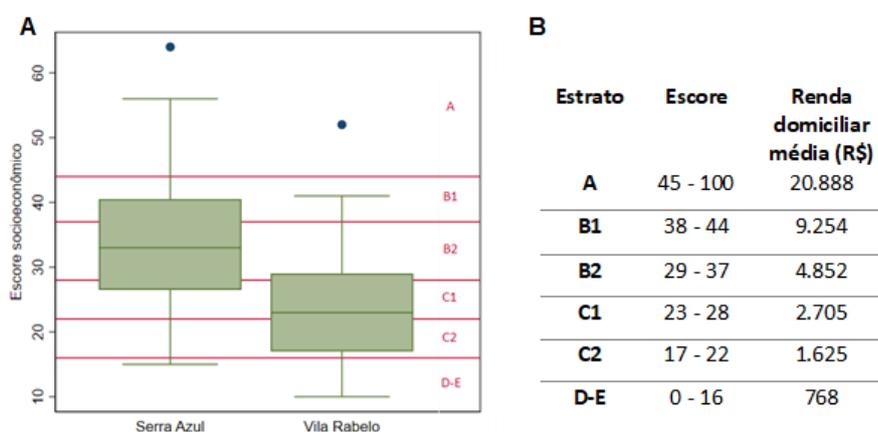


Figura 4 – *Boxplot* do escore socioeconômico separado por localidade (A) e tabela de conversão de escore socioeconômico em estrato e renda domiciliar média (B).



Fonte figura 3 C: <http://g1.globo.com/distrito-federal/videos/t/todos-os-videos/v/redacao-movel-mostra-o-perigo-de-viver-na-beira-de-uma-grande-erosao-na-vila-rabelo/6290432/>

Figura 5 – Rua típica em Serra Azul (A), rua típica em Vila Rabelo (B) e casas construídas em uma encosta na Vila Rabelo (C).

A maioria dos proprietários entrevistados alegaram conhecer os termos “leishmaniose” e “calazar”, apenas 17 de 159 proprietários de cães (10,69%) ignoravam os termos. A forma de transmissão da leishmaniose era desconhecida por 91 (57,2%) dos donos entrevistados e os sintomas da leishmaniose visceral em humanos eram desconhecidos por 132 proprietários (83,0%). A vacina para leishmaniose canina era desconhecida de 82 donos (51,6%), 53 (60,2%) residentes na localidade de Serra Azul e 29 (40,9%) na Vila Rabelo. Apenas 21 (13,2%) dos donos reconheciam que a LVC é uma doença crônica, sem cura comprovada.

Em 30 casas da Vila Rabelo e 37 casas do Serra Azul os proprietários relataram que receberam anteriormente visitas da DIVAL-DF para investigações ambientais. Ou seja, 67/159 casas (42,14%) já foram alvo da vigilância epidemiológica pela DIVAL-DF.

Cento e quatorze (71,7%) proprietários declararam usar inseticidas no ambiente domiciliar. Já o uso de telas mosquiteiras nas janelas foi constatado relatado em apenas 12 casas (7,55%).

Das casas visitadas, 108 (67,9%) possuíam quintais com a presença de terra ou grama. Foram encontradas galinhas em 38 casas (24,9%).

5.3. Descrição da amostra na linha de base

Dos 248 cães que compuseram a amostra, 148 (59,68%) residiam no Serra Azul e 100 (40,32%) na Vila Rabelo. A média de idade foi de 4,2 anos (4 meses a 16 anos), a idade de 10 cães não foi registrada. A proporção de machos e fêmeas na amostra foi equilibrada, com 121 machos (48,79%) e 127 fêmeas (52,21%). As proporções de características biológicas dos cães, do ambiente que frequentavam e de atitudes relativas a cuidados com os cães estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Frequência de características biológicas, ambientais e de cuidados com os cães da amostra estudada (N=248).

Características	Sim		Não		Ignorado	
	N	%	N	%	N	%
Pelo claro	69	27,82	179	72,18	-	-
Pelo curto	153	61,69	95	38,31	-	-
Ectoparasitos	95	38,31	119	47,98	34	13,71
Outros cães no lote	163	65,73	85	34,27	-	-
Aves no lote	69	27,82	179	72,18	-	-
Quintal pavimentado	72	29,03	176	70,97	-	-
Inseticidas no ambiente	173	69,76	75	30,24	-	-
Alimentação por ração	120	48,39	128	51,61	-	-
Vacina múltipla	157	63,31	91	36,69	-	-
Vacina LVC	40	16,13	208	83,87	-	-
Acesso livre ao meio externo	147	59,27	101	40,73	-	-
Dorme fora de casa	55	22,18	193	77,82	-	-
Uso de repelente no cão	44	17,74	204	82,26	-	-
Consultas no último ano	62	25,00	186	75,00	-	-

Os 248 cães apresentaram uma média de escore clínico de 2,16 pontos (0 a 17 pontos). Considerando que a pontuação de um cão com todos os sintomas em gravidade máxima poderia ser de 46 pontos, os cães amostrados apresentaram poucos sintomas de LVC (Figura 6). Ao classificar os cães de pontuação menor ou igual a 1 como assintomáticos, 134 cães (54,03%) foram considerados assintomáticos.

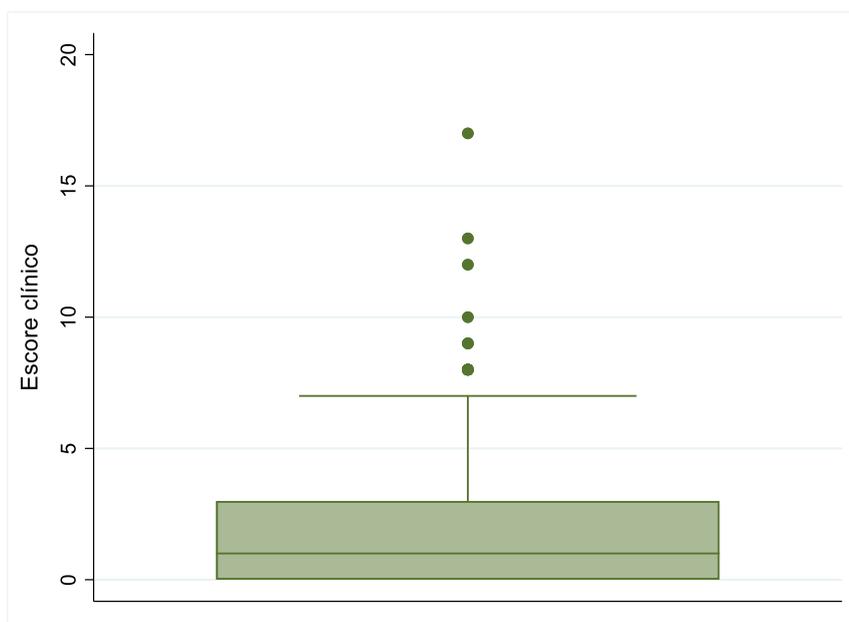


Figura 6 - *Boxplot* para escore clínico sugestivo de LVC. Mediana= 1 e intervalo interquartil= 3.

5.4. Resultados laboratoriais e estimativa da prevalência

Conforme mencionado acima 248/260 cães tiveram amostras adequadas para a avaliação do desfecho. Os 12 cães excluídos apresentaram amostras impróprias para a análise molecular por não amplificarem o gene de β -actina na PCR convencional. Os cães referentes a essas amostras foram excluídos do estudo. Por tanto, na linha de base foram avaliados 248 cães.

O diagnóstico molecular dos 248 cães pela técnica de qPCR identificou 67 como infectados por *Leishmania* spp. A reação foi padronizada com um $R^2=0,997$ eficiência 98,415% e considerada de reprodutibilidade moderada a boa com $\kappa= 0,6623$, IC 95% (0,53 a 0,79) e $\kappa_{max} = 0,95559$. Mais informações sobre a padronização da qPCR estão descritas no Apêndice III.

O TR-DPP identificou 18 cães como positivos e o EIE-LVC 14 cães como positivos. Em série, os testes sorológicos identificaram cinco cães como soro reagentes, destes, apenas um não foi identificado como infectado pela qPCR. (Figura 7).

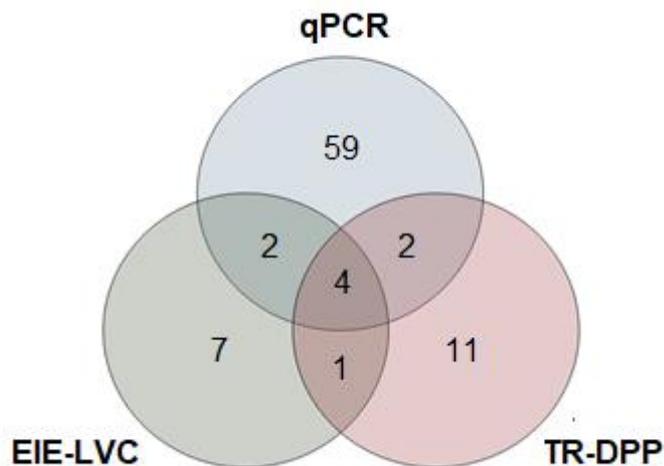


Figura 7 – Diagrama de venn de todas as amostras classificadas como positivas pelos diferentes testes diagnósticos utilizados. Do total de 248 amostras, 86 foram classificadas como positivas em pelo menos um teste diagnóstico.

Agregando os classificados como positivos no diagnóstico molecular e no diagnóstico sorológico em série, o diagnóstico combinado classificou 68 cães como positivos.

A prevalência estimada de infecção pelo diagnóstico combinado na linha de base foi 27,52% (IC 95%: 22,19 a 33,34). Estimativas de prevalência para diferentes critérios de classificação estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Estimativas de prevalência de acordo com os diferentes métodos diagnósticos moleculares e sorológicos.

Teste diagnóstico	No. de positivos n=248	Prevalência (IC 95%)
TR-DPP	18	7,26% (4,61 a 11,26)
EIE-LVC	14	5,65% (3,36 a 9,34)
qPCR	67	27,02% (21,82 a 32,93)
TR-DPP e EIE-LVC em série	5	2,02% (0,84 a 4,78)
Diagnóstico combinado*	68	27,42% (22,19 a 33,34)

*Resultado positivo na qPCR ou positivo em ambos os testes sorológicos.

5.5. Estudo de coorte e estimativa da incidência

Do total de 248 cães da amostra, 86 foram positivos em pelo menos um teste diagnóstico e não foram elegíveis para participar no estudo de coorte, o qual foi composto pelos 162 cães negativos nos três testes diagnósticos. Dos 162 cães, 106 tiveram contribuição em tempo na coorte visto que 56 cães foram censurados antes do primeiro retorno e não contribuíram para o tempo em risco observado.

As características dos grupos de cães elegíveis para a coorte, dos cães sem contribuição de tempo de observação e dos cães que foram observados pelo menos por seis meses estão descritas na Tabela 3. As perdas que ocorreram entre linha de base e o primeiro acompanhamento não foram seletivas em relação à grande maioria das variáveis observadas, com exceção da variável “outros cães no lote” ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Descrição das características dos cães elegíveis para a coorte (N=162), censurados antes do primeiro acompanhamento (N=56) e participantes da coorte (N=106).

Variáveis discretas	Elegíveis N (%)	Censurados N (%)	Coorte N (%)
Localidade			
Serra Azul	82 (50,62)	38 (67,86)	44 (41,51)
Vila Rabelo	80 (49,38)	18 (32,14)	62 (58,49)
Sexo			
Macho	75 (46,30)	21 (37,50)	54 (50,94)
Fêmea	87 (53,70)	35 (62,50)	52 (49,06)
Pelo curto			
Sim	94 (58,02)	35 (62,50)	59 (55,66)
Não	68 (41,98)	21 (37,50)	47 (44,34)
Pelo claro			
Sim	42 (25,93)	15 (26,79)	27 (25,47)
Não	120 (74,07)	41 (73,21)	79 (74,53)
Vacina LVC			
Sim	33 (20,37)	8 (14,29)	25 (23,58)
Não	129 (79,63)	48 (85,71)	81 (76,42)
Vacina múltipla			
Sim	105 (64,81)	38 (67,86)	67 (63,21)
Não	57 (35,19)	18 (32,14)	39 (36,79)

Alimentação				
	Ração	86 (53,09)	28 (50,00)	58 (54,72)
	Sobras	76 (46,91)	28 (50,00)	48 (45,28)
Consultas no último ano				
	Sim	46 (28,40)	19 (33,93)	27 (25,47)
	Não	116 (71,60)	37 (66,07)	79 (74,53)
Ectoparasitos				
	Sim	57 (35,19)	18 (32,14)	39 (36,79)
	Não	75 (46,30)	26 (46,43)	49 (46,23)
	Ignorado	30 (18,52)	12 (21,43)	18 (16,98)
Repelente no cão				
	Sim	27 (16,67)	11 (19,64)	16 (15,09)
	Não	135 (83,33)	45 (80,36)	90 (84,91)
Acesso livre ao meio externo				
	Sim	97 (59,88)	25 (44,64)	66 (62,26)
	Não	65 (40,12)	31 (55,36)	40 (37,74)
Dorme fora de casa				
	Sim	123 (75,93)	39 (69,64)	84 (79,25)
	Não	39 (24,07)	17 (30,36)	22 (20,75)
Outros cães no lote				
	Sim	71 (43,83)*	30 (53,57)	65 (61,32)*
	Não	91 (56,17)	26 (46,43)	41 (38,68)
Aves no lote				
	Sim	47 (29,01)	13 (23,21)	34 (32,08)
	Não	115 (70,99)	43 (76,79)	72 (67,92)
Quintal pavimentado				
	Sim	50 (30,86)	25 (44,64)	25 (23,58)
	Não	112 (69,14)	31 (55,36)	81 (76,42)
Janelas teladas				
	Sim	10 (6,17)	5 (8,93)	5 (4,72)
	Não	152 (93,83)	51 (91,07)	101 (95,28)
Inseticidas no ambiente				
	Sim	117 (72,22)	40 (71,43)	77 (72,64)
	Não	45 (27,78)	16 (28,57)	29 (27,36)
<hr/>				
	Variáveis contínuas	Elegíveis N (%)	Censurados N (%)	Coorte N (%)
<hr/>				
Idade (anos completos)				
	Média	4,55	4,83	4,39
	Desvio padrão	3,76	3,41	3,95
	Máximo e mínimo	0 - 16	0 - 13	0 - 16
	Nº de informações ausentes	7 (4,32%)	2 (3,57%)	5 (4,72%)
<hr/>				
Escore socioeconômico				
	Média	29,27	30	28,89

	Desvio padrão	10,85	9,58	11,48
	Máximo e mínimo	10 - 64	10 - 54	10 - 54
Escore clínico				
	Média	2,22	2,05	2,3
	Desvio padrão	2,55	2,35	2,66
	Máximo e mínimo	0 - 13	0 - 8	0 - 13

* Proporções diferem com significância estatística ($p < 0,05$).

Durante a realização do estudo de coorte diversos cães entraram e saíram em momentos distintos (Figura 8). O tempo médio de acompanhamento dos cães da coorte foi de 10,70 meses e o tempo em risco observado foi de 1,134 cães-mês.

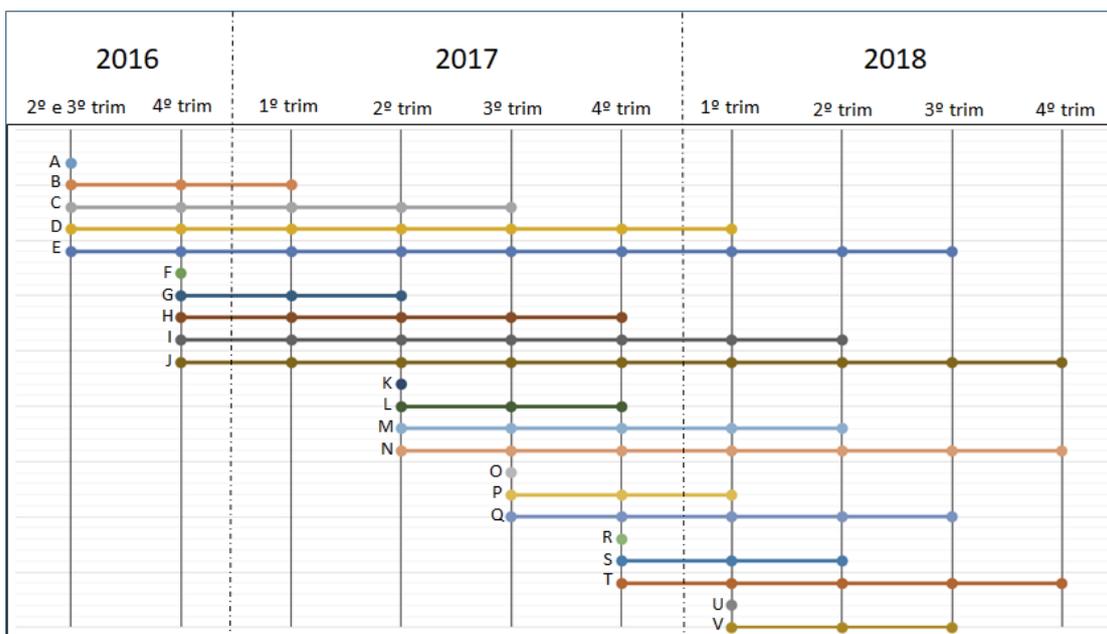


Figura 8 – Quadro com o momento de entrada e contribuição de tempo em risco dos 162 cães elegíveis. (Cada letra representa um grupo de animais que entrou em um mesmo trimestre e teve um tempo igual de contribuição. Número de animais em cada grupo: A = 10, B = 13, C= 2, D= 2, E= 2, F = 10, G= 9, H=4, I=1, J=3, K= 14, L=11, M=16, N=4, O=18, P=9, Q=12, R=2, S=1, T=8, U=2 e V=9)

Dos 162 cães elegíveis para o estudo de coorte, 133 cães foram censurados e 29 cães apresentaram o desfecho, ou seja, foram

diagnosticados como positivos pela qPCR ou pela série TR-DPP e EIE-LVC. Na figura 9 descreve-se a distribuição das perdas e ocorrência de desfechos entre as visitas. As 133 censuras ocorreram pelas seguintes razões: finalização do período do estudo (30,3%), não conseguir localizar o dono do cão (27,3%), recusa do dono em continuar na pesquisa (19,7%), o óbito do cão (12,1%), mudança de endereço (6,1%), agressividade do cão (3,8%) e fuga do cão (0,8%).

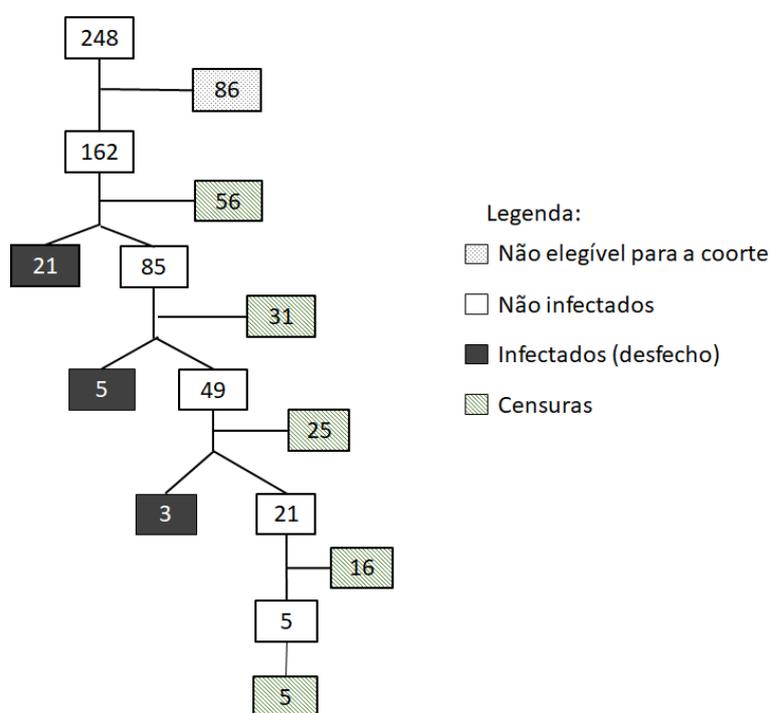


Figura 9 – Fluxograma de desfechos e censuras durante o andamento da coorte para estimar a incidência de leishmaniose canina em área endêmica do Distrito Federal. 2016-2018.

A estimativa de sobrevivência até a infecção por *Leishmania* em um ano e dois anos de acompanhamento, respectivamente, é 72,8% (IC 95%: 62,2% a 80,8%) e 63,7% (IC 95%: 49,7% a 74,7%), o gráfico da estimativa de sobrevivência e número de cães suscetíveis e desfechos em cada visita estão descritos na Figura 10. A sobrevivência de um ano é de 73% (IC: 62,2% a

0.81%). Os desfechos ocorreram principalmente na primeira visita. Dos 106 cães em risco aos 6 meses de acompanhamento, 21 foram diagnosticados como infectados por *Leishmania*, dos 54 em risco na segunda visita 5 tiveram o mesmo desfecho e dos 24 em risco na terceira visita mais 3 se tornaram infectados. Na quarta visita nenhum dos cinco cães em risco apresentaram o desfecho.

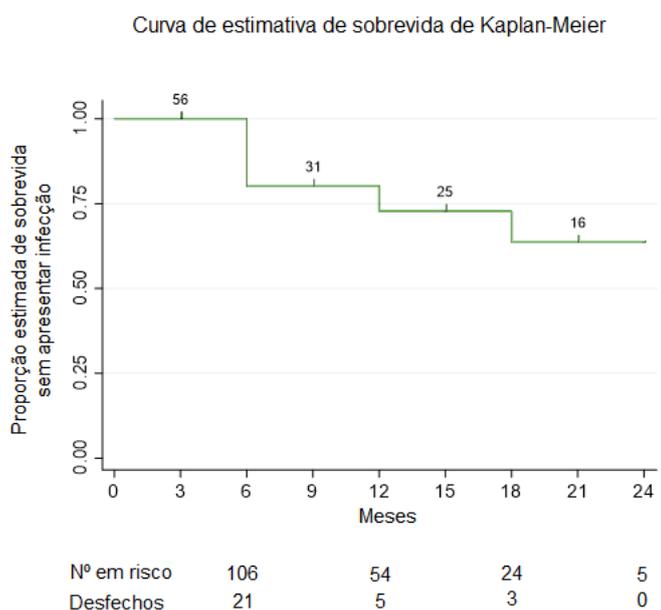


Figura 10 – Gráfico de sobrevida até a infecção por *Leishmania* numa coorte de cães acompanhada em área endêmica do Distrito Federal. 2016-2018. (Os números realçados na curva mostram o número de censuras entre os períodos de avaliação)

A densidade de incidência estimada para a infecção por *Leishmania* na população canina estudada durante os dois anos de acompanhamento foi 1,91 casos por 100 cães-mês (IC 95% 1,33 a 2,75).

5.6. Estudo de fatores de risco

Inicialmente as variáveis independentes foram analisadas de forma univariada por meio da regressão de Cox de taxas de falha proporcionais

(Tabela 4). As variáveis “localidade”, “escore econômico”, “vacina múltipla”, “repelente no cão”, “idade”, “vacina LVC”, “quintal pavimentado” e “aves no lote” apresentaram p-valor menor que 0,250 e foram selecionadas para inclusão nos modelos de regressão multivariados. Como a variável idade teve observações faltantes todos os modelos multivariados foram realizados apenas com dados de 101 cães que possuíam as informações de idade.

Tabela 4 - Hazard ratios obtidos por meio do modelo de Cox univariado com desvio padrão robusto ajustado para 116 *clusters*, referentes as residências.

Variável	Exposição	N	Hazard ratio	Desvio Padrão	P-valor	IC 95%
Localidade	Vila Rabelo/ Serra Azul	106	0,56	0,21	0,119	0,27 a 1,16
Escore econômico	Pontuação +1 /pontuação	106	1,03	0,01	0,025	1,00 a 1,06
Idade	Idade+1/idade	101	1,08	0,05	0,143	0,98 a 1,19
Pelo curto	Sim/não	106	0,89	0,32	0,745	0,43 a 1,82
Pelo claro	Sim/não	106	0,85	0,38	0,727	0,35 a 2,06
Vacina LVC	Sim/não	106	0,50	0,22	0,118	0,21 a 1,19
Vacina múltipla	Sim/não	106	1,78	0,67	0,129	0,85 a 3,73
Alimentação	Sim/não	106	1,50	0,57	0,285	0,71 a 3,15
Consultas no último ano	Sim/não	106	1,39	0,61	0,449	0,59 a 3,27
Ectoparasitos	Sim/não	88	0,64	0,26	0,263	0,29 a 1,41
Repelente no cão	Sim/não	106	0,37	0,26	0,154	0,10 a 1,45
Acesso livre ao meio externo	Sim/não	106	1,13	0,44	0,761	0,53 a 2,40

Dorme fora de casa	Sim/não	106	0,73	0,32	0,473	0,32 a 1,71
Outros cães no lote	Sim/não	106	0,67	0,26	0,312	0,31 a 1,46
Aves no lote	Sim/não	106	0,48	0,20	0,077	0,21 a 1,08
Quintal pavimentado	Sim/não	106	0,48	0,25	0,162	0,17 a 1,34
Janelas teladas	Sim/não	106	1,49	1,05	0,566	0,38 a 5,90
Uso de inseticida no ambiente	Sim/não	106	0,78	0,32	0,551	0,35 a 1,74

A seleção *backward* retirou sequencialmente as variáveis “vacina múltipla”, “local”, “vacina LVC”, “quintal pavimentado”, “aves no lote” e “idade” (Tabela 5). Restaram no modelo final as variáveis “escore econômico” e “repelente no cão” com *hazard ratio* de 1,04 (IC95%: 1,01 a 1,06) e 0,20 (IC95%: 0,03 a 1,33) respectivamente. O AIC e BIC do modelo final foram de 225,27 e 230,50 (Tabela 6).

Tabela 5 – Modelo de Cox multivariado para fatores de risco da infecção por *Leishmania* em cães obtido por seleção *backward*.

Covariável	HR	DP robusto	P-valor	95% IC	
Escore econômico	1,02	0,01	0,161	0,99	1,05
Localidade	0,89	0,38	0,789	0,39	2,06
Vacina múltipla	1,05	0,5	0,922	0,41	2,66
Repelente no cão	0,25	0,23	0,127	0,04	1,48
Vacina LVC	0,69	0,38	0,494	0,24	2,01
Idade	1,07	0,05	0,154	0,98	1,17
Aves no lote	0,48	0,26	0,169	0,17	1,37
Quintal pavimentado	0,49	0,26	0,183	0,18	1,39

Covariável	HR	DP robusto	P-valor	95% IC	
Escore econômico	1,02	0,01	0,163	0,99	1,05
Localidade	0,89	0,38	0,791	0,39	2,06
Repelente no cão	0,25	0,23	0,126	0,04	1,48
Vacina LVC	0,68	0,33	0,423	0,26	1,75
Idade	1,07	0,05	0,145	0,98	1,17
Aves no lote	0,47	0,24	0,148	0,17	1,3
Quintal pavimentado	0,49	0,26	0,176	0,18	1,37

Covariável	HR	DP robusto	P-valor	95% IC	
Escore econômico	1,02	0,01	0,13	0,99	1,05
Repelente no cão	0,25	0,24	0,139	0,04	1,56
Vacina LVC	0,65	0,28	0,322	0,28	1,52
Idade	1,07	0,05	0,133	0,98	1,17
Aves no lote	0,47	0,25	0,151	0,17	1,31
Quintal pavimentado	0,48	0,25	0,168	0,17	1,36

Covariável	HR	DP robusto	P-valor	95% IC	
Escore econômico	1,03	0,01	0,05	1	1,05
Repelente no cão	0,26	0,25	0,156	0,04	1,67
Idade	1,07	0,05	0,147	0,98	1,17
Aves no lote	0,49	0,25	0,154	0,18	1,31
Quintal pavimentado	0,52	0,27	0,204	0,18	1,44

Covariável	HR	DP robusto	P-valor	95% IC	
Escore econômico	1,03	0,01	0,031	1	1,06
Repelente no cão	0,23	0,22	0,125	0,03	1,51
Idade	1,07	0,05	0,15	0,98	1,17
Aves no lote	0,55	0,26	0,212	0,22	1,4

Covariável	HR	DP robusto	P-valor	95% IC	
Escore econômico	1,04	0,01	0,007	1,01	1,06
Repelente no cão	0,20	0,2	0,103	0,03	1,39
Idade	1,07	0,05	0,144	0,98	1,18

Covariável	Haz.Ratio	DP robusto	P-valor	95% IC	
Escore econômico	1,04	0,01	0,007	1,01	1,06
Repelente no cão	0,20	0,19	0,095	0,03	1,33

Tabela 6 – Valores dos critérios de informação para os modelos de Cox multivariados gerados pela seleção *backward*.

	AIC	BIC
Modelo 1	231,216	252.1364
Modelo 2	229,226	247.532
Modelo 3	227,285	242.9761
Modelo 4	225,896	238.9714
Modelo 5	225,534	235.9944
Modelo 6	224,962	232.8071
Modelo Final	225,268	230.4978

O modelo hierárquico iniciou-se com a análise do escore socioeconômico e localidade no primeiro bloco (Tabela 7). Somente o escore socioeconômico obteve um *hazard ratio* estatisticamente significativo (p-valor = 0,065) e prosseguiu para os próximos blocos e modelo final. O *hazard ratio* teve valor de 1,03 (IC 95%: 1,00 a 1,06) indicando que para cada ponto adicional no escore socioeconômico a densidade de risco aumenta em 3%.

Tabela 7 – Modelo de Cox hierárquico para infecção por *Leishmania*: covariáveis do contexto socioeconômico (Bloco 1).

	HR	DP robusto	P-valor	95% IC	
Escore econômico	1,03	0,02	0,065	1,00	1,06
Localidade	0,77	0,33	0,549	0,33	1,8

No bloco de cuidados com os cães nenhuma variável atingiu os parâmetros de seleção para as próximas avaliações (Tabela 8). A variável “repelente no cão” ficou com um *hazard ratio* de 0,21 (IC 95%: 0,03 a 1,43) próxima ao valor de corte, mas com p-valor superior ao limite estabelecido (p=0,112).

Tabela 8 - Modelo de Cox hierárquico para infecção por *Leishmania*: covariáveis de cuidado com os cães (Bloco 2).

	HR	DP robusto	P-valor	95% IC	
Escore econômico	1,04	0,01	0,006	1,01	1,06
Vacina múltipla	1,32	0,55	0,507	0,58	2,97
Repelente no cao	0,21	0,21	0,112	0,03	1,43

No bloco de variáveis ambientais a presença de aves, com um *hazard ratio* de 0,41 (IC 95%: 0,16 a 1,07) foi considerada um fator de proteção significativo ($p=0,07$) e incluído no modelo final e nos próximos modelos (Tabela 9).

Tabela 9 - Modelo de Cox hierárquico para infecção por *Leishmania*: covariáveis ambientais (Bloco 3).

	HR	DP robusto	P-valor	95% IC	
Escore econômico	1,03	0,01	0,063	1	1,05
Aves no lote	0,41	0,2	0,07	0,16	1,07
Quintal pavimentado	0,45	0,24	0,139	0,16	1,29

Das características biológicas cães nenhuma variável foi selecionada para avaliação nos próximos blocos (Tabela10).

Tabela 10 - Modelo de Cox hierárquico para infecção por *Leishmania*: covariáveis biológicas (Bloco 4).

	HR	DP robusto	P-valor	95% IC	
Escore econômico	1,03	0,02	0,077	1,00	1,06
Aves no lote	0,48	0,22	0,116	0,19	1,2
Vacina LVC	0,8	0,35	0,606	0,34	1,89
Idade	1,07	0,05	0,137	0,98	1,18

Por fim, o escore econômico e a presença de aves foram selecionados pelo modelo hierárquico como fatores significantes para a explicação da infecção por *Leishmania* (Tabela 11), com *hazard ratio* de 1,03 (IC95%: 1,00 a 1,06) e 0,41 (IC95%: 0,16 a 1,07) respectivamente. Ao criar um

modelo final somente com essas duas variáveis obtemos um AIC de 227,22 e um BIC de 232,45 (Tabela 12).

Tabela 11 – Modelo de Cox hierárquico para infecção por *Leishmania*: modelo final.

	Bloco de origem		Modelo final seleção hierárquica	
	HR	P-valor	HR	P-valor
Escore econômico	1,03	0,065	1,03	0,052
Aves no lote	0,41	0,070	0,48	0,114

Tabela 12 – Critérios de informação dos modelos de Cox multivariados gerados pela seleção hierárquica em blocos.

	AIC	BIC
Bloco 1	229,2395	234,4698
Bloco 2	226,8406	234,686
Bloco 3	226,7866	234,632
Bloco 4	228,7122	239,1727
Modelo final	227,2213	232,4515

O modelo resultante do método *backward* e o modelo resultante do método hierárquico foram avaliados pelo teste de proporcionalidade baseado em resíduos de Schoenfeld, o qual não encontrou evidência de que os riscos não eram proporcionais (p-valor = 0,69 e 0,42, respectivamente).

6. DISCUSSÃO

As localidades estudadas apresentam transmissão autóctone de LV e são alvo de intervenções para controle da LVC (CARRANZA-TAMAYO et al., 2010). Em geral os proprietários dos cães estavam familiarizados com o nome da doença (89,31%), mas uma parcela significativa deles não sabia

como a doença é transmitida (57,2%) e muito menos os sintomas (83,0%). Ainda, mesmo com uma campanha de vacinação para LVC ocorrendo nas proximidades, dos donos da Vila Rabelo, 40,9% desconheciam a existência de uma vacina para LVC. Estes resultados indicam que a conscientização da população sobre LV precisa ocorrer de forma mais abrangente e mais profunda durante as intervenções de vigilância epidemiológica ou em outros ambientes tais como escolas e atividades de educação em saúde nas unidades do SUS.

O recrutamento de cães ocorreu paulatinamente durante o estudo de coorte e os cães da Vila Rabelo entraram posteriormente na amostragem, contribuindo com um tempo menor de acompanhamento. Durante a inclusão dos cães da Vila Rabelo no estudo de coorte houve uma campanha de vacinação realizada pela DIVAL-DF e assim que foi descoberto que a vacinação estava ocorrendo, o recrutamento foi interrompido na Vila Rabelo e retomado quando a vacinação havia terminado. Nenhum dos cães incluídos no estudo antes do início da vacinação foi vacinado posteriormente e não houve retirada substancial de cães de nenhuma das regiões durante o andamento da coorte.

Dentre as opções de testes diagnósticos para a infecção por *Leishmania* optou-se por utilizar testes realizados em sangue periférico devido à facilidade de obtenção de amostras a campo e para reduzir o número de recusas que testes mais invasivos poderiam ocasionar. Os testes TR-DPP e o EIE-LVC foram escolhidos por terem boa sensibilidade e especificidade dentre os testes sorológicos (PEIXOTO, DE OLIVEIRA & ROMERO, 2015) e por constituírem o diagnóstico de LVC recomendado pelo programa nacional de controle de LV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A qPCR foi escolhida por ser baseada em princípio distinto dos testes sorológicos e por ter alta sensibilidade (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015).

O uso de amostras do sangue periférico, apesar de ser menos invasivo que o uso de outros tecidos, trouxe novos desafios metodológicos. A dificuldade de se obter amostras de qualidade adequada para a execução da qPCR foi aparente na reprodutibilidade da técnica, considerada de

moderada a boa ($\kappa = 0,6623$, IC 95%: 0,53 a 0,79). Mesmo com a presença confirmada de DNA íntegro pela PCR convencional, a reação de qPCR pode ter falhado em parte das amostras por ser mais sensível a contaminantes, especialmente a hemoglobina (AL-SOUD & RÅDSTRÖM, 2001).

Conforme preconizado no *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* utilizamos réplicas técnicas para a padronização da reação de qPCR e obtenção das curvas de eficiência (BUSTIN et al., 2009). Para as amostras preferimos repetir a reação em uma nova placa e utilizar o cálculo da estatística kappa ao invés do uso de duplicatas ou triplicatas. O uso de réplicas para análise de uma qPCR qualitativa necessita de uma definição arbitrária de quantas réplicas devem estar positivas para se considerar um diagnóstico positivo. Com o cálculo do kappa foi fornecida uma descrição mais justa da qualidade da técnica.

Mesmo com os desafios encontrados, a qPCR do sangue periférico identificou mais cães como positivos na linha de base (67/248) em comparação com os testes sorológicos (5/248). De forma geral testes moleculares são mais sensíveis do que sorológicos na detecção de infecção por *L. infantum* (LOPES et al., 2017; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2019). Todavia, a qPCR do sangue total apresenta baixa sensibilidade quando comparada com a qPCR de outros tecidos, como pele e órgãos linfáticos, e já foi reportada com sensibilidade menor que testes sorológicos (NUNES et al., 2018; SOLCÀ et al., 2014). Neste ponto o uso dos *primers* descritos por Pita-Pereira *et. al* (2012), que amplificam fragmentos de DNA de múltiplas cópias, podem ter contribuído para um aumento considerável da sensibilidade da técnica com relação TR-DPP e EIE-LVC. A predominância de baixo escore clínico dos cães também pode ter contribuído para uma baixa positividade dos testes sorológicos, visto que estes podem ter pior desempenho em cães assintomáticos (DO ROSÁRIO et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2018; GRIMALDI et al., 2012; NUNES DE CARVALHO et al., 2018), apesar de alguns estudos discordarem (LARSON et al., 2017; LAURENTI et al., 2014).

A prevalência da infecção estimada na população canina da Vila Rabelo e Serra Azul pela combinação do diagnóstico da qPCR e dos testes sorológicos foi 27,52% (IC 95%: 22,19 a 33,34). O resultado foi muito semelhante ao previamente encontrado na Fercal, Distrito Federal, com 26,25% (IC95%: 20,05 a 33,57) de prevalência detectada por meio de um diagnóstico combinado de técnicas moleculares, sorológicas e parasitológicas (SÉGUIN & DESCOTEAUX, 2016).

A baixa soroprevalência encontrada, 2,02% (IC 95%: 0,84 a 4,78), frente a prevalência de infecção indica que mesmo com a retirada de cães soropositivos ainda restariam na população a presença de animais infectados que podem manter a doença na região, reduzindo a efetividade do programa de controle da leishmaniose visceral.

Dos 162 cães negativos na linha de base o desfecho ocorreu somente para 29 e o resto foi considerado como censuras. O tipo mais comum de censuras foi a pôr finalização do estudo de corte (30,3%), seguida por impossibilidade de localizar o dono (27,3%) e recusas (19,7%). O primeiro tipo de censura é consequência de uma baixa incidência da doença e de um período curto de observação dos cães. Os dois outros tipos de censura ilustram a dificuldade de se acompanhar esses cães, muitos donos ao receberem o primeiro diagnóstico julgavam desnecessário sujeitar o cão a uma segunda avaliação e alguns preferiam não realizar mais testes com receio de um resultado positivo que fosse resultar em uma possível eutanásia do animal.

A quarta causa mais comum de censuras foi o óbito, infelizmente não foi possível diagnosticar a causa dos óbitos com precisão. Os donos de oito cães relataram sintomas como secreção em olhos e narinas, mioclonia, desnorreamento e caquexia, sinais clínicos que em conjunto são associados principalmente, mas não exclusivamente, a cinomose canina (MARTELLA, ELIA & BUONAVOGLIA, 2008). Ademais, um cão morreu devido a projétil de revólver, um devido a atropelamento e o restante os donos não souberam dar detalhes precisos. Pela forma aguda como a maioria dos cães veio a

óbito suspeita-se que tenha ocorrido um surto de cinomose e que a maioria das mortes se deva principalmente a essa virose.

A sobrevida até a infecção por *Leishmania* tem sua maior queda na avaliação de 6 meses e isto pode ter ocorrido devido a dois motivos: (1) reprodutibilidade limitada do diagnóstico de qPCR, que pode ter ignorado cães infectados em um primeiro momento e posteriormente identificá-los, ou (2) cães mais susceptíveis apresentariam a infecção nos primeiros meses e o restante dos cães sobreviventes seriam menos propensos a desenvolverem infecções detectáveis. A taxa de sobrevida ter sido a mesma no mês 18 e no mês 24 foi provavelmente um artefato decorrente do exaurimento de cães em risco associado às censuras.

O valor da incidência encontrado para cães residentes no Serra Azul e Vila Rabelo, DF, foi 1,91 casos por 100 cães-mês (IC 95% 1,33 a 2,75), um valor menor do encontrado em outros estudos em outros estados brasileiros.

Uma incidência de infecção de 5,8 casos por 100 cães-meses (IC 95%: 5,1 a 6,5) em uma coorte de 282 cães, acompanhada por 26 meses, da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais (COURA-VITAL et al., 2013a). Em outro estudo com 455 cães da mesma região, a incidência de soroconversão foi 0,65 e 1,2 casos por 100 cães-meses a depender do tipo de tipo de EIE utilizado (COURA-VITAL et al., 2013b). Lopes *et. al* (2013) em mais um estudo na cidade de Belo Horizonte encontraram uma incidência de 0,206 cães por ano (IC 95%: 0,178-0,238) com o uso o EIE e IFI para diagnóstico (LOPES et al., 2016). Em Jequié, Bahia, Moreira *et. al* (2003) obtiveram uma densidade de incidência de 11,8 casos por 100 cães-ano (IC 95%: 8,6–15,6) em uma coorte de 447 cães acompanhados por 25 meses com o diagnóstico por EIE (MOREIRA et al., 2003).

Para entender os determinantes envolvidos na incidência da infecção canina por *Leishmania*, foi realizada a análise dos fatores de risco. A seleção de covariáveis em um primeiro momento foi feita com base na significância estatística do *hazard ratio* obtido no modelo de Cox univariado ($p \leq 0,250$). Em sequência, foram aplicados modelos de Cox multivariados com seleção

por hierarquia e com seleção *backward* ($p \leq 0,10$). Utilizaram-se métodos de seleção distintos porque o primeiro modelo tem forte coerência teórica e o segundo serve de contraponto por ser mais imparcial.

A significância estatística dos coeficientes do modelo multivariado foi determinada em 0,10, ao invés do valor usual de 0,05, para identificarmos as variáveis de maior impacto no modelo mesmo com uma pequena coorte de animais. Todas as variáveis analisadas apresentam plausibilidade biológica e adotar um alfa a cinco por cento neste caso poderia excluir variáveis de controle no modelo final, induzindo a uma interpretação do fenômeno de forma muito simplista.

A seleção hierárquica permite que determinantes distais na explicação causal permaneçam no modelo para servir de ajuste às variáveis mais próximas (VICTORA et al., 1997). Espera-se que ocorra uma redução do efeito das variáveis distais com a inclusão dos determinantes mais proximais no modelo, contudo isto não significa que essas variáveis distais sejam irrelevantes para a explicação do desfecho e devam ser desconsideradas. Por tanto, os valores finais de *hazard ratio* e p-valores são considerados conforme obtidos no bloco de entrada das covariáveis e não no modelo final obtido (VICTORA et al., 1997).

No modelo multivariado de Cox construído pela seleção hierárquica, as covariáveis “escore econômico” e “aves no lote” foram selecionados pelo modelo hierárquico como fatores significantes para a explicação da infecção por *Leishmania*, com *hazard ratio* 1,03 ($p=0,052$) e 0,41 ($p=0,070$) respectivamente.

No Distrito Federal, o estudo de Teixeira (2019) detectou uma associação entre infecção por *Leishmania* nos cães com maior poder aquisitivo (TEIXEIRA, 2019). Este achado foi confirmado em nosso modelo, o *hazard ratio* obtido indica que a cada ponto a mais no escore socioeconômico a densidade de risco do cão aumenta em 3%, ou seja, quanto maior o poder aquisitivo maior o risco de infecção por *Leishmania*.

A associação entre escore socioeconômico e infecção canina ainda não é bem descrita em literatura (BELO et al., 2013b). O estudo transversal de

fatores de risco de Coura-Vital et Al. (2011), por exemplo, encontrou o efeito contrário ao relatado, com cães de famílias de baixo poder aquisitivo com maior risco de infecção (OR 2,3; IC95% 1,4 a 3,8).

A covariável “escore econômico” por ser distal possivelmente está associada a variáveis proximais que não conseguimos especificar nesse estudo. Características da biologia dos cães, como aquisição de cães susceptíveis de outras localidades, e do microambiente das casas, como irrigação e sombreamento dos quintais, podem estar associadas a um maior escore socioeconômico e a um maior risco de infecção.

Nos blocos seguintes apenas a covariável “aves no lote” foi selecionada para o modelo final com um *hazard ratio* de 0,41 ($p=0,070$), indicando que a presença de aves no lote é protetora para a infecção por *Leishmania*. Por vezes descrita como fator de risco e por vezes como fator de proteção (BELO et al., 2013b), o papel das aves no ciclo epidemiológico da LV é complexo. As aves podem servir para o vetor como uma alternativa ao repasto sanguíneo em cães e são refratárias à infecção por *L. infantum*. Seu desempenho como fator de risco ou profilático depende de balanço entre facilitar a existência de uma população de vetores no ambiente peridomiciliar e de ser uma alternativa livre de infecção aos vetores (ALEXANDER et al., 2002).

No modelo multivariado de Cox pela seleção *backward*, as covariáveis “escore econômico” e “repelente no cão” foram selecionados pelo modelo hierárquico com *hazard ratio* de 1,04 ($p=0,007$) e 0,20 ($p=0,095$) respectivamente.

O uso de produtos *spot on* ou coleiras repelentes teve um efeito notadamente protetor nos cães, mas marginalmente significativo, possivelmente devido à falta de diferenciação na coleta de dados entre princípios ativos que teriam ou não ação contra o flebótomo. O resultado encontrado é condizente com outras publicações que indicam o uso de repelentes em cães, especialmente pelo uso de coleiras impregnadas de deltametrina 4%, como uma alternativa para o controle da LVC (KAZIMOTO et al., 2018; QUINNELL; COURTENAY, 2009; SILVA et al., 2018).

Ambos os modelos gerados apresentam o escore socioeconômico como a variável de maior contribuição para o modelo, diferindo na inclusão de presença de aves no domicílio ou repelentes tópicos em cães. Em termos de modelo, considerando os critérios de informação, o modelo final com o uso de repelentes é moderadamente superior ao modelo com aves. Todavia, ambas as variáveis em questão apresentam plausibilidade biológica e são consideradas de importância para a infecção por *L. infantum* (BELO et al., 2013a).

Algumas variáveis contrariam as expectativas e não se mostraram significantes no modelo como a localidade, comprimento do pelo, tipo de pavimentação do quintal e vacinação para leishmaniose.

A localidade definida pela residência em Vila Rabelo ou em Serra Azul, não permaneceu no modelo, pois possivelmente expressa mais a desigualdade entre grupos socioeconômicos do que diferenças em fatores ambientais das comunidades, dado a proximidade geográfica entre elas.

A exclusão da covariável “pelo curto” nas análises preliminares diferiu do que normalmente se esperaria para essa característica. Comprimento do pelo curto foi considerado um forte fator preditivo no estudo Moreira *et al.* (2003) com um risco relativo de 9,4 (IC 95%: 4,3 a 20,7) e também identificada como fator de risco na meta-análise de Belo et al. (2013).

A variável “quintal pavimentado” teve efeito protetor, indicando que a presença de terra ou gramado no quintal seriam condições de risco para a infecção por *Leishmaniose*, mas não alcançou os requisitos de significância estatística para inclusão no modelo. A presença de vegetação nas proximidades das casas é um fator de risco bem descrito em estudos transversais (BELO et al., 2013b).

O efeito protetor da vacinação para LVC nos modelos perde força quando confrontado com outras variáveis, como o escore socioeconômico, indicando que em parte seu efeito seria devido a confundidores. A vacinação para LVC foi realizada na região como um piloto e abrangeu apenas uma parcela dos animais na região. Devido às dificuldades logísticas de aplicar as três doses nos animais apenas uma pequena parcela da população foi

imunizada corretamente é possível que o efeito protetor tenha sido pequeno para ser detectado com o tamanho da amostra estudada.

Das três variáveis obtidas como de importância para a incidência da infecção por *Leishmania*, a com maior efeito, a condição socioeconômica, não é passível de intervenção. A variável com maior potencial de intervenção e com maior suporte de da literatura científica é o uso de repelentes tópicos em cães (COURA-VITAL et al., 2018; RIBAS et al., 2013; SILVA et al., 2018).

Faz-se necessária a realização de estudos com melhor detalhamento sobre a presença de galinhas e outras aves e a sua associação com a infecção por *L. infantum* antes de qualquer indicação de intervenção sobre essa condição. Dada a seleção natural e artificial pela morte ou eutanásia de cães susceptíveis, uma variável interessante para ser abordada em novos estudos de fatores de risco seria a origem do cão quanto à descendência de progenitores da mesma região.

7. CONCLUSÕES

O estudo constatou 27,52% (IC 95%: 22,19 a 33,34) de prevalência e 1,91 casos por 100 cães-mês (IC 95% 1,33 a 2,75) de incidência de infecção dos cães por *Leishmania* em uma área endêmica de leishmaniose visceral humana e canina no Distrito Federal. No cenário estudado, o maior poder aquisitivo dos tutores, a presença de aves no domicílio e o uso de repelentes em cães são as variáveis com maior efeito na infecção por *Leishmania*, sendo a primeira uma variável de risco e as últimas duas de proteção. Os resultados reiteram o desafio que representa a implementação de medidas de controle da LVC já que a característica associada ao risco de infecção com maior significância não abre espaço para intervenções já que estas iriam exatamente em direção contrária ao que beneficiaria potencialmente a redução da incidência de LVC (a redução da pobreza). Por outro lado, a

sugestão de que a adoção de repelentes tópicos nos cães constituiria um fator protetor é auspiciosa no contexto atual das evidências sobre o seu uso para controle da LVC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, JAFFE CL. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* [Internet]. 1991;13(5):537–50. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1991.tb00550.x>

Alexander B, de Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2002;8(12):1480–5. Available at: <https://10.0.12.129/eid0812.010485>

Allahverdiyev AM, Bagirova M, Uzun S, Alabaz D, Aksaray N, Kocabas F. The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2005;73(2):276–80. Available at: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.276>

Almeida ABPF, Sousa VRF, Gasparetto ND, Da Silva GFR, Figueiredo FB, Dutra V, et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2013;76(3):321–4. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.017>

Al-Soud WA, Rådström P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells Purification and Characterization of

PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):485–93.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(5):1–12. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

Alves MCGP, de Matos MR, Reichmann MDL, Harrison Dominguez M. Estimation of the dog and cat population in the State of São Paulo. *Rev Saude Publica* [Internet]. 2005;39(6):891–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102005000600004>

Arruda MM De, Figueiredo FB, Cardoso FA, Brazuna M, Regina M, Oliveira F De. Validity and Reliability of Enzyme Immunoassays Using *Leishmania major* or *L . infantum* antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(7):1–6. Available at: <https://10.0.5.91/journal.pone.0069988>

Ashford DA, David R, Sherlock I, Eulálio MC, Sampaio DP, David JR, et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1998;59(1):53–7. Available at: <https://10.0.16.173/ajtmh.1998.59.53>

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Galego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* [Internet]. 2008;42(7):324–30. Available at: <https://10.0.3.248/j.pt.2008.04.001>

Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* [Internet]. 2006;28(7):329–37. Available at: <https://10.0.4.87/j.1365-3024.2006.00840.x>

Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, de Andrade Filho FA, Trigo J, Julião

FS, Franke CR, et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet J* [Internet]. 2006;171(2):331–9. Available at: <https://10.0.3.248/j.tvjl.2004.11.010>

Belo VS, Struchiner CJ, Werneck GL, Barbosa DS, de Oliveira RB, Neto RGT, et al. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. *Vet Parasitol* [Internet]. 2013b;195(1–2):1–13. Available at: <https://10.0.3.248/j.vetpar.2013.03.010>

Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BWL, da Silva ES, et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013;7(4):1–12. Available at: <https://10.0.5.91/journal.pntd.0002182>

Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2006;44(4):1435–9. Available at: <https://10.0.4.104/JCM.44.4.1435-1439.2006>

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* [Internet]. 2009;55(4):611–22. Available at: <https://10.0.5.93/clinchem.2008.112797>

Camargo-neves VLF De, Rodas LAC, Gomes A de C. Avaliação do hábito alimentar de *Lutzomyia longipalpis* no Estado de São Paulo. *Bol Epidemiológico Paul*. 2007;4(39):2–7.

Carranza-Tamayo CO, Carvalho M do SL de, Bredt A, Bofil MIR, Rodrigues RMB, Silva AD da, et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet].

agosto de 2010;43(4):396–9. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000400012>

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2007;5(11):873–82. Available at:
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>

CODEPLAN. Pesquisa distrital por amostra de domicílios - PDAD/DF 2015. Brasília: Governo do Distrito Federal; 2016.

Conti RV, Lane VFM, Montebello L, Pinto Junior VL. Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. *J Vector Borne Dis* [Internet]. 2016;53(2):99–104. Available at:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27353578>

Costa CHN, Pereira HF, Araújo M V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Rev Saude Publica* [Internet]. outubro de 1990;24(5):361–72. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101990000500003>

Costa CHN, Tapety CMM, Werneck GL. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2007;40(4):415–9. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822007000400009>

Costa CHN, Vieira JBF. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. abril de 2001;34(2):223–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822001000200013>

Costa DNCC, Codeço CT, Silva MA, Werneck GL. Culling dogs in scenarios of imperfect control: Realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013;7(8):1–8. Available at: <https://10.0.5.91/journal.pntd.0002355>

Coura-Vital W, Gomes de Almeida Leal G, Marques LA, Da Costa Pinheiro A, Carneiro M, Reis AB. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area in Brazil. PLoS One. 2018;13(12):1–17.

Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Reis LES, et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(8).

Coura-Vital W, Reis AB, Fausto MA, de Leal GGA, Marques MJ, Veloso VM, et al. Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. PLoS One [Internet]. 2013;8(8):1–9. Available at: <https://10.0.5.91/journal.pone.0071833>

Coura-Vital W, Reis AB, Reis LES, Braga SL, Roatt BM, Aguiar-Soares RD de O, et al. Canine visceral leishmaniasis: Incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. Vet Parasitol [Internet]. 2013;197(3–4):411–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.031>

Courtenay O, Bazmani A, Parvizi P, Ready PD, Cameron MM. Insecticide-impregnated dog collars reduce infantile clinical visceral leishmaniasis under operational conditions in NW Iran: A community-wide cluster randomised trial. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2019;13(3):1–19. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007193>

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. J Infect Dis [Internet]. 2002;186(9):1314–20. Available at: <https://doi.org/10.1086/344312>

da Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF, Schallig

HDFH, Brazil RP. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet Res Commun* [Internet]. 2006;30(6):637–43. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3324-2>

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2006;48(3):151–6. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000300007>

Dantas-Torres F, Miró G, Bowman DD, Gradoni L, Otranto D. Culling dogs for zoonotic visceral leishmaniasis control: The wind of change. *Trends Parasitol* [Internet]. 2019;35(2):97–101. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.005>

Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* [Internet]. 2007;149(3–4):139–46. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.007>

de Carvalho MR, Valença HF, da Silva FJ, de Pita-Pereira D, de Araújo Pereira T, Britto C, et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop* [Internet]. 2010;116(1):108–10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.009>

De Mendonça IL, Batista JF, Werneck GL, Soares MRA, Costa DL, Costa CHN. Serological tests fail to discriminate dogs with visceral leishmaniasis that transmit *Leishmania infantum* to the vector *Lutzomyia longipalpis*. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2017;50(4):483–8. Available at: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0014-2017>

de Oliveira AG, Marassá AM, Consales CA, Dorval MEC, Fernandes CE, de Oliveira GR, et al. Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Trop*. 2008;107(3):238–41.

de Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque S da C, Tavares D de HC, et al. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci* [Internet]. 2015;5(1):1–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2007;25(5):1240–2. Available at: <https://doi.org/10.1086/516096>

Do Rosário EY, Genaro O, França-Silva JC, Da Costa RT, Mayrink W, Reis AB, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2005;100(2):197–203. Available at: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000200015>

Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1996;55(2):125–30. Available at: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.55.125>

Espinosa OA, Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG, Shaw JJ. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology* [Internet]. 2018;145(4):430–42. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0031182016002092>

Farca AM, Miniscalco B, Badino P, Odore R, Monticelli P, Trisciuglio A, et al. Canine leishmaniosis: In vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. Parasitol Res [Internet]. 2012;110(6):2509–13. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2792-7>

Ferroglio E, Poggi M, Trisciuglio A. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. Zoonoses Public Health [Internet]. 2008;55(3):145–8. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01092.x>

Figueiredo FB, Vasconcelos TCB de, Madeira M de F, Menezes RC, Maia-Elkhoury ANS, Marcelino AP, et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2018;113(11):1–7. Available at: <https://doi.org/10.1590/0074-02760180260>

Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. Parasites and Vectors. 2018;11(1):1–13.

Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FGC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. Vet J [Internet]. 2008;175(1):45–52. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.019>

Grimaldi G, Teva A, Dos-Santos CB, Santos FN, Pinto IDS, Fux B, et al. Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. PLoS One [Internet]. 2017;12(9):1–18. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185438>

Grimaldi G, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto I de S, de-Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP®CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2012;106(1):54–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.001>

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2002;2(8):494–501. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00347-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00347-X)

Guimarães VCFV, Pruzinova K, Sadlova J, Volfova V, Myskova J, Filho SPB, et al. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. *Parasit Vectors* [Internet]. 2016;9(1):159. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1444-2>

Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Henrique C, Costa N. Urban parasitology : visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol* [Internet]. 2011;27(9):403–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001>

Instituto brasileiro de geografia e Estatística. Censo 2010, sinopse por setores. [Internet]. 2018 [citado 18 de setembro de 2019]. Available at: <https://censo2010.ibge.gov.br/sinopseporsetores>

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011;9(8):604–15. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>

Kazimoto TA, Amora SSA, Figueiredo FB, Magalhães JM e, Freitas YBN, Sousa MLR, et al. Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the prevalence and incidence of canine visceral leishmaniasis. *Vector-Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2018;18(7):356–63. Available at:

<https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2166>

Lainson R, Rangel BF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2005;100(8):811–27. Available at: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000800001>

Lainson R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Rev Pan-Amazônica Saúde [Internet]. junho de 2010;1(2):61–6. Available at: <http://doi.org/10.5123/S2176-62232010000200002>

Larson M, Toepp A, Scott B, EPID:158:, Kurtz M, Fowler H, et al. Semi-quantitative measurement of asymptomatic *L. infantum* infection and symptomatic visceral leishmaniasis in dogs using Dual-Path Platform® CVL. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 2017;101(1):381–90. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7925-6>

Laurenti MD, de Santana Leandro M V., Tomokane TY, De Lucca HRL, Aschar M, Souza CSF, et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. Vet Parasitol [Internet]. 2014;205(3–4):444–50. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.002>

Laurenti MD, Rossi CN, Matta VLR da, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. Vet Parasitol [Internet]. 2013;196(3–4):296–300. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.017>

Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Caprì A, Solano-Gallego L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. Vet Parasitol [Internet]. 2012;184(1):10–7. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.010>

Lopes EG, Sev AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB, Hiramoto RM, et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in brazilian endemic area: One out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2017;145(12):2436–44. Available at: <http://doi.org/10.1017/S0950268817001443>

Lopes EGP, Oviedo-Pastrana ME, Borges LFNM, Freitas ACP, Dias ES, Silva SR, et al. Transmission of visceral leishmaniasis in dogs in a risk area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec* [Internet]. dezembro de 2016;68(6):1403–12. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352016000601403&lng=en&tlng=en

Macedo-Silva VP, Martins DRA, De Queiroz PVS, Pinheiro MPG, Freire CCM, Queiroz JW, et al. Feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the sand fly vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *J Med Entomol* [Internet]. 1 de janeiro de 2014;51(1):237–44. Available at: <https://doi.org/10.1603/ME12131>

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* [Internet]. dezembro de 2008;158(4):274–87. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.009>

Maia C, Dantas-Torres F, Campino L. Parasite Biology: The Reservoir Hosts. In: *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 79–106. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0_4

Maia C, Ramada J, Cristvo JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using

different tissues. *Vet J* [Internet]. 2009;179(1):142–4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.009>

Maroli M, Mizzoni V, Siragusa C, D’Orazi A, Gradoni L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2001;15(4):358–63. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.0269-283x.2001.00321.x>

Martella V, Elia G, Buonavoglia C. Canine Distemper Virus. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract*. 2008;38(4):787–97.

Martínez-Moreno A, Moreno T, Martínez-Moreno FJ, Acosta I, Hernández S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. outubro de 1995;48(3–4):209–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8578681>

Michalsky ÉM, Rocha MF, da Rocha Lima ACVM, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol* [Internet]. 2007;147(1–2):67–76. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.004>

Ministério da Saúde DC. Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde [Internet]. 2011. Available at: http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/nota-tecnica-no.-1-2011_cglab_cgdt1_lvc.pdf

Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral. 1º ed. Nucom/SVS/MS, organizador. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Rio de Janeiro: MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2014. 327–353 p.

Ministério da Saúde. SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE

NOTIFICAÇÃO- SINAN. Notificações Registradas: banco de dados. [Internet]. 2018 [citado 27 de abril de 2018]. Available at: <http://tabnet.datasus.gov.br>

Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol*. 2008;24(8):371–7.

Miró G, López-Vélez R. Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. *Vet Parasitol* [Internet]. 2018;254(March):151–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.002>

Missawa NA, Lorosa ES, Dias ES. Feeding preference of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in transmission area of visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2008;41(4):365–8. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-56049103129&partnerID=40&md5=43c2f07036a3d59ecc5dcfb2660bf537>

Mohammadiha A, Haghighi A, Mohebbali M, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, et al. Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. *Vet Parasitol* [Internet]. 2013;192(1–3):83–90. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.013>

Moreira ED, De Souza VMM, Sreenivasan M, Lopes NL, Barreto RB, De Carvalho LP. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: New findings from a prospective study in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1 de outubro de 2003;69(4):393–7. Available at: <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2003.69.393>

Moreira ED, Mendes De Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG, Pontes De Carvalho L. Assessment of an optimized dog-culling program in

the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol* [Internet]. 2004;122(4):245–52. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.05.019>

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* [Internet]. 2005;366(9496):1561–77. Available at: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67629-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67629-5)

Narciso TP, Carvalho RC, Campos LC, Viana AG, Fujiwara RT, Barçante TA, et al. First report of an autochthonous human visceral leishmaniasis in a child from the south of Minas Gerais State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2019;61(July 2018):1–4. Available at: <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201961001>

Nunes CM, Lima VMF de, Paula HB de, Perri SHV, Andrade AM de, Dias FEF, et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* [Internet]. 2008;153(1–2):19–23. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.005>

Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Filho JG, Perri SHV. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol* [Internet]. 2010;170(1–2):131–3. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.044>

Nunes de Carvalho FL, De Oliveira Riboldi E, Lima Bello G, Rocha Ramos R, Bones Barcellos R, Gehlen M, et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis : a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiol Infect.* 2018;

Nunes JB, Coura-Vital W, Colombo FA, Baêta FJM, Pinheiro AC, Roatt BM, et al. Comparative analysis of real-time PCR assays in the detection of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* [Internet]. 2018;117(10):3341–6. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6038-9>

Nylén S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* [Internet]. 2007;28(9):378–84. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.07.004>

Oliveira dos Santos S, Arias JR, De Paiva Hoffmann M, Grotta Furlan MB, Francisco Ferreira W, Pereira C, et al. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2003;36(5):633–4. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000500017>

Oliveira E, Saliba JW, Oliveira D, Dias ES, Paz GF. A prototype of the direct agglutination test kit (DAT-Canis) for the serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2016;221:9–13.

Oskam L, Slappendel RJ, Beijer EGM, Kroon NCM, Van Ingen CW, Özensoy S, et al. Dog-DAT: A direct agglutination test using stabilized, freeze-dried antigen for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 1996;16(3–4):235–9. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(96\)00089-2](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(96)00089-2)

Palatnik-De-Sousa CB, Day MJ. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2011;4(1):1–10. Available at: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-197>

Paranhos-Silva M, Nascimento EG, Melro MCBF, Oliveira GGS, Dos Santos WLC, Pontes-De-Carvalho LC, et al. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for american visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Trop* [Internet]. 1998;69(1):75–83. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00116-2)

Peixoto HM, de Oliveira MRF, Romero GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Systematic review and meta-

analysis. Trop Med Int Heal [Internet]. 2015;20(3):334–52. Available at: <https://doi.org/10.1111/tmi.12429>

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenber J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infect Immun [Internet]. 1994;62(1):229–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8262632>

Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BAS, Moreira OC, et al. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. Parasites and Vectors [Internet]. 2012;5(1):1–9. Available at: <http://doi.org/10.1186/1756-3305-5-15>

Porrozzi R, Santos da Costa M V., Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, et al. Comparative evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. Clin Vaccine Immunol [Internet]. 1 de maio de 2007;14(5):544–8. Available at: <http://doi.org/10.1128/CVI.00420-06>

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology [Internet]. 2009;136(14):1915–34. Available at: <http://doi.org/10.1017/S0031182009991156>

Rangel EF, Lainson R, Afonso MMS, Shaw JJ. Eco-Epidemiology of American Visceral Leishmaniasis with Particular Reference to Brazil. In: Brazilian Sand Flies [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 381–416. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-75544-1_8

Regina-Silva S, Feres AMLT, França-Silva JC, Dias ES, Michalsky ÉM, de Andrade HM, et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vaccine* [Internet]. 2016;34(19):2233–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.019>

Reguera RM, Morán M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* [Internet]. 2016;227:98–114. Available at: <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.011>

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2009;128(1–3):87–95. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.307>

Ribas LM, Zaher VL, Shimozako HJ, Massad E. Estimating the optimal control of zoonotic visceral leishmaniasis by the use of a mathematical model. *Sci World J* [Internet]. 2013;2013:1–6. Available at: <http://doi.org/10.1155/2013/810380>

Rodrigues V, Cordeiro-Da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2016;9(1):1–13. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1412-x>

Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2010;4(1):1–17. Available at: <https://10.0.5.91/journal.pntd.0000584>

Sant’Anna MRV, Jones NG, Hindley JA, Mendes-Sousa AF, Dillon RJ, Cavalcante RR, et al. Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA

databasing paper. *Acta Trop* [Internet]. 2008;107(3):230–7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.003>

Santini MS, Utgés ME, Berrozpe P, Manteca Acosta M, Casas N, Heuer P, et al. *Lutzomyia longipalpis* presence and abundance distribution at different micro-spatial scales in an urban scenario. Valenzuela JG, organizador. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 14 de agosto de 2015;9(8):1–16. Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003951>

Schubach EYP, Figueiredo FB, Romero GAS. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. setembro de 2014;108(9):568–74. Available at: <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru109>

Secretaria de Estado de Saúde. Informativo Epidemiológico das Leishmanioses no DF [Internet]. Vol. 21. Brasília: Governo do Distrito Federal; 2012. p. 1–7. Available at: <http://www.saude.df.gov.br/images/Leishmaniose/04 - Leishmaniose - Informe Epidemiologico.pdf>

Séguin O, Descoteaux A. *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. *Cell Immunol* [Internet]. 2016;309(August):1–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.08.004>

Sevá AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EAB, et al. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(7):1–20. Available at: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0160058>

Silva RA, de Andrade AJ, Quint BB, Raffoul GES, Werneck GL, Rangel EF, et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:

Psychodidae: Phlebotominae) populations. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2018;113(5):1–9. Available at: <https://doi.org/10.1590/0074-02760170377>

Silva RA, Santos FKM, Sousa LC de, Rangel EF, Bevilaqua CML. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei* in an endemic area for visceral leishmaniasis. Rev Bras Parasitol Veterinária [Internet]. 2014;23(3):320–7. Available at: <http://doi.org/10.1590/s1984-29612014068>

Sim J, Wright CC. The Kappa Statistic in Reliability Studies: Use, Interpretation, and Sample Size Requirements. Phys Ther. 2005;85(3):257–68.

Solano-Gallego L, Cardoso L, Pennisi MG, Petersen C, Bourdeau P, Oliva G, et al. Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. Trends Parasitol [Internet]. 2017;33(9):1–12. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.06.004>

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. Parasit Vectors [Internet]. 20 de dezembro de 2011;4(1):86. Available at: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J Clin Microbiol [Internet]. 1 de fevereiro de 2001;39(2):560–3. Available at: <http://doi.org/10.1128/JCM.39.2.560-563.2001>

Solcà MDS, Bastos LA, Guedes CES, Bordoni M, Borja LS, Larangeira DF, et al. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. PLoS One [Internet]. 2014;9(7). Available at:

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0103635>

Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2007;85(2):138–47. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.icb7100011>

Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2017;10(1):1–10. Available at: <http://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>

Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase Chain Reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis* [Internet]. 2004;189(9):1729–33. Available at: <https://doi.org/10.1086/383281>

Teixeira AIP. Cães e tutores: os desafios do diagnóstico e do controle da leishmaniose visceral canina. Universidade de Brasília; 2019.

Teixeira AIP, Silva DM, Vital T, Nitz N, De Carvalho BC, Hecht M, et al. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A challenge for current and future tests. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2019;114(1):1–9. Available at: <https://doi.org/10.1590/0074-02760180452>

Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miró G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2018;12(1):1–13. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006082>

Victora CG, Huttly SR, Fuchs SC, Olinto MT. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. *Int J Epidemiol* [Internet]. 1 de fevereiro de 1997;26(1):224–7. Available at: <http://doi.org/10.1093/ije/26.1.224>

Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH.

Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2007;135(2):195–201. Available at: <http://doi.org/10.1017/S0950268806006881>

Werneck GL. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2008;24(12):2937–40. Available at: <http://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200023>

Apêndice I: Questionário sobre condição socioeconômica, conhecimento sobre a LV, cuidados com o cão e características do ambiente domiciliar.

QUESTIONÁRIO

NOME:
ENDEREÇO:
TELEFONES:
EMAIL:

CLASSIFICAÇÃO SOCIO-ECONÔMICA

VARIÁVEIS	QUANTIDADE DE ITENS				
	0	1	2	3	4+
BANHEIROS (não coletivo com outra residência)	0	3	7	10	14
EMPREGADOS DOMÉSTICOS (5 dias por semana)	0	3	7	10	13
AUTOMOVEIS (apenas de passeio)	0	3	5	8	11
COMPUTADOR (de mesa, notebooks, netbooks, laptop)	0	3	6	8	11
LAVA-LOUÇA	0	3	6	6	6
GELADEIRA	0	2	3	5	5
FREEZER (considerar o da geladeira duplex)	0	2	4	6	6
LAVA ROUPA (automática e semi-automática)	0	2	4	6	6
DVD ou BLUE-RAY	0	1	3	4	6
MICRO-ONDAS	0	2	4	4	4
MOTOCICLETA (não considerar as exclusivas de trabalho)	0	1	3	3	3
SECADORA DE ROUPAS (considerar as que lavam e secam)	0	2	2	2	2
	NÃO				SIM
ÁGUA ENCANADA	0				4
RUA PAVIMENTADA	0				2

GRAU DE INSTRUÇÃO DE QUEM TEM MAIOR RENDA NO DOMICÍLIO

NOMECLATURA ANTIGA	NOMECLATURA ATUAL	PONTOS
ANALFABETO/PRIMÁRIO INCOMPLETO	ANALFABETO/FUNDAMENTAL 1 INCOMPLETO	0
PRIMÁRIO COMPLETO/GINASIAL INCOMPLETO	FUNDAMENTAL 1 COMPLETO/ FUNDAMENTAL 2 INCOMPLETO	1
GINASIAL COMPLETO/COLEGIAL INCOMPLETO	FUNDAMENTAL 2 COMPLETO/ MÉDIO INCOMPLETO	2
COLEGIAL COMPLETO/SUPERIOR INCOMPLETO	MÉDIO COMPLETO/ SUPERIOR INCOMPLETO	4
SUPERIOR COMPLETO	SUPERIOR COMPLETO	8

QUESTÕES SOBRE O COTIDIANO

1. POSSUI OUTRO ANIMAL?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO			
2. QUAIS?	() CÃO	() GATO	() AVES	() PORCOS	() PEQUENOS MAMÍFEROS	() RÉPTEIS
3. O SERVIÇO DE ZOOSES/DIVAL JÁ VISITOU SUA RESIDÊNCIA?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO			
4. VOCÊ JÁ TINHA OUVIDO FALAR ANTES SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL OU CALAZAR?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO			
5. VOCÊ SABE COMO A LEISHMANIOSE VISCERAL É TRANSMITIDA?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO			
6. VOCÊ SABE COMO SÃO OS SINTOMAS EM SERES HUMANOS?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO			
7. EXISTE CURA PARA OS CÃES?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO			2 NÃO SEI
8. EXISTE VACINA CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO			2 NÃO SEI
9. DAS OPÇÕES A SEREM APRESENTADAS, QUAL (QUAIS) QUE VOCÊ ACHA CORRETA(S) PARA O CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL?	1. NÃO SEI.		4. ACOMPANHAMENTO DA POPULAÇÃO CANINA.		3. LIMPAR O QUINTAL (rastelar grama, retirar fezes)	
	2. ACOMPANHAMENTO DA POPULAÇÃO HUMANA E CANINA		5. VACINAÇÃO DOS CÃES		6. COMBATE AO MOSQUITO	

QUESTÕES SOBRE RESIDÊNCIA

1. TEM QUINTAL?	0 NEGATIVO	1 POSITIVO		
2. QUAL O TIPO?	1 TERRA	2 GRAMADO	3 CIMENTADO	4 PRESENÇA DE MATÉRIA ORGÂNICA
3. AS JANELAS DA RESIDÊNCIA SÃO TELADAS?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO	
4. VOCÊ USA ALGUM TIPO DE INSETICIDA/VENENO	0 NEGATIVO		1 POSITIVO	
5. QUAIS?	1.VENENO CONTRA BARATA		4.DEDETIZAÇÃO PROFISSIONAL	
	2.RATICIDA			
	3. REPELENTE GENÉRICO (baygon, elétrico, cinzas, cheiro...)			

MANEJO ANIMAL

1. QUAL O TIPO DE ALIMENTAÇÃO É OFERECIDA AO ANIMAL	1 RAÇÃO OU ALIMENTO ESPECÍFICO	2 SOBRAS DE COMIDA CASEIRA COMUM OU ALIMENTAÇÃO MISTA (RAÇÃO + SOBRAS)			
2. ANIMAL JÁ FOI VACINADO ALGUMA VEZ?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO		
3. QUAIS VACINAS?	1RAIVA	2 V8/V10	3 GIÁRDIA	4 TOSSE DOS CANIS	5 LeishTec
4. O ANIMAL TEM ACESSO A AMBIENTES EXTERNOS A CASA? COMO QUINTAL? VARANDA?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO		
4 COMO É O ACESSO DO ANIMAL A AMBIENTES EXTERNOS?	1 SEMPRE. FICA NO QUINTAL		3. SOMENTE DURANTES CAMINHADAS, PELA MANHÃ E/OU PELO FIM DA TARDE OU POR CURTO PERÍODO DE TEMPO		
	2 ACESSO LIVRE A TODOS AMBIENTES DA CASA, INCLUSIVE O QUINTAL				
5 EM QUAL LUGAR O CÃO DORME?	1.LOCAL ESPECÍFICO DENTRO DE CASA				
	2. SOLTO NO QUINTAL				
	3. ABRIGO ESPECIFICO (CANIL)				
6. FAZ USO DE ALGUM PRODUTO REPELENTE EXCLUSIVO PARA ANIMAIS?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO		
7. QUAIS?	1SHAMPOO/SABONETE ANTIPULGAS		4 BORRIFICAÇÃO CANIL/CASINHA		
	2 COLEIRA COMUM CONTRA ECTOPARASITAS		5 Produto spot-on		
	3 Coleira ESPECÍFICA contra ectoparasitas e mosquitos		6 OUTROS		
8. NO ULTIMO ANO, QUANTAS VEZES TEVE QUE LEVAR O ANIMAL AO VETERINÁRIO?	1 Zero		3 Três ou mais		
	2 Uma a duas				
9. O ANIMAL TEM EMAGRECIDO?	0 NEGATIVO		1 POSITIVO		
10. QUANTO TEMPO NOTOU ISSO?					

Apêndice II: Ficha de avaliação clínica.

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

NOME ANIMAL:			
NOME PROPRIETÁRIO:			
GÊNERO: () MACHO () FÊMEA			
IDADE:	PELAGEM: () CURTA () MÉDIA () LONGA	COR:	
ECTOPARASITAS () SIM () NÃO - QUAL?			

Ficha Clínica: Adaptado do Protocolo de Campo Veterinário da FioCruz – Rio de Janeiro e Proverbio et al., Relationship between *Leishmania* IFAT titers and Clinicopathological manifestations (Score) in Dogs, 2014 BioMed Inter Res Article ID 412808

SINAL CLÍNICO/SCORE	0	1	2	3	VALOR
CONDIÇÃO CORPORAL	() OBESO () NORMAL	() MAGRO	() MUITO MAGRO	() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
MUCOSAS	() NORMOCORADAS () HIPERCORADAS	() HIPOCORADAS	() ICTÉRICAS	() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
DESIDRATAÇÃO	() AUSENTE	() LEVE	() MODERADA A FORTE	() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
ATROFIA MUSCULAR EM ALGUM MEMBRO	() AUSENTE	() LEVE	() MODERADA A FORTE	() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
LESÕES CUTÂNEAS	() NÃO	() SIM		() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
LINFOADENOMEGALIA	() NÃO	() 1 A 2 LINFONODOS		() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
ESPLENOMEGALIA	() NÃO	() SIM		() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
CONJUNTIVITE E/OU BLEFARITE	() NENHUMA	() UNILATERAL E LEVE	() UNILATERAL SEVERA BILATERAL LEVE/MODERADA	() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
UVEITE E/OU CERATITE	() NENHUMA	() UNILATERAL E LEVE	() UNILATERAL SEVERA BILATERAL LEVE/MODERADA	() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
EPISTAXE	() AUSENTE	() PRESENTE		() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
ULCERAS E/OU NÓDULOS NA BOCA	() AUSENTE	() 1 A 2	() 3 OU MAIS	() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
VOMITO	() AUSENTE	() PRESENTE		() FREQUENTE E COM SANGUE	
DIARRÉIA	() AUSENTE	() PRESENTE		() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
CLAUDICAÇÃO	() AUSENTE	() PRESENTE		() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
ERITEMA	() AUSENTE	() 1 A 25% DO CORPO	() 25 A 40% DO CORPO	() MAIS DE 40% DO CORPO	
DERMATITE ESFOLIATIVA SECA	() AUSENTE	() 1 A 25% DO CORPO	() 25 A 40% DO CORPO	() MAIS DE 40% DO CORPO	
DERMATITE ULCERATIVA	() AUSENTE	() 1 A 25% DO CORPO	() 25 A 40% DO CORPO	() MAIS DE 40% DO CORPO	
DERMATITE NODULAR	() AUSENTE	() 1 A 25% DO CORPO	() 25 A 40% DO CORPO	() MAIS DE 40% DO CORPO	
DERMATITE PUSTULAR	() AUSENTE	() 1 A 25% DO CORPO	() 25 A 40% DO CORPO	() MAIS DE 40% DO CORPO	
ALOPECIA	() AUSENTE	() 1 A 25% DO CORPO	() 25 A 40% DO CORPO	() MAIS DE 40% DO CORPO	
PIGMENTAÇÃO ALTERADA	() AUSENTE	() PRESENTE		() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
HIPERQUERATOSE DAS TRUFAS E COXINS	() AUSENTE	() PRESENTE		() 3 ou MAIS GENERALIZADA	
ONICOGRIFOSE	() AUSENTE	() PRESENTE		() 3 ou MAIS GENERALIZADA	

Apêndice III: Padronização da reação de qPCR

Padronização da técnica de qPCR foi realizada com DNA extraído da cultura de promastigotas de *Leishmania infantum* (MCER/BR/79/M6445). Foram feitas 12 diluições seriadas do DNA de *L. infantum* (em fator 1:10) as quais foram submetidas a qPCR em duplicata (Figura I). As diluições amplificaram sequencialmente, a partir da de maior quantidade de DNA, 4ng/ μ l, até a oitava amostra, 4×10^{-7} ng. Considerando que 10pg de DNA correspondem a aproximadamente 120 parasitos (GALLUZZI et al., 2018), a técnica teve um limite de quantificação de 0,14 parasitos.

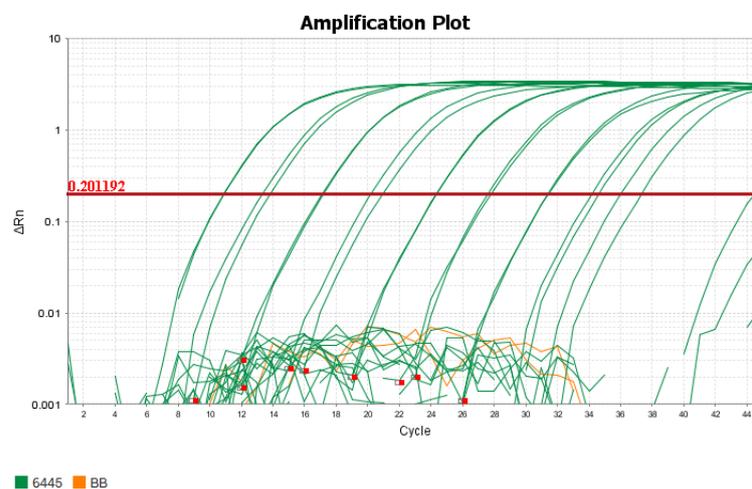


Figura I – Curva de amplificação de amostras em diluição seriada do DNA extraído de *L. infantum*

Pelo próprio software do termocilador foi definida uma curva de eficiência da reação conforme a Figura II. A reação apresentou $R^2=0,997$ eficiência 98,415%.

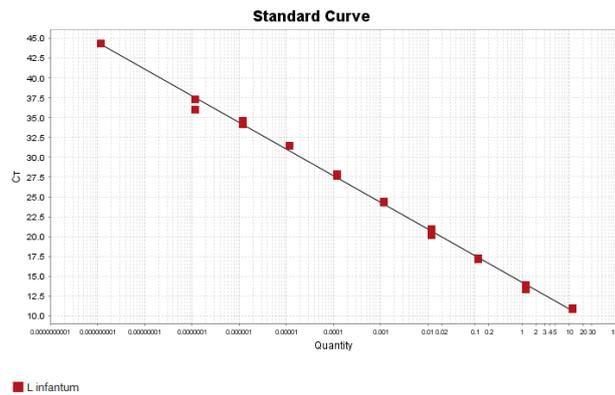


Figura II – Curva de eficiência da reação de qPCR para *L. infantum*.

A curva de dissociação apresentou dois picos, um na temperatura de 82,3°C e outro em 77,5°C (Figura III), ao realizar uma eletroforese em gel de poliacrilamida pelo tamanho do fragmento formado foi inferido que o pico menor seria um dímero de primer (FiguraIV). A presença de dímeros de primer mesmo em amostras com abundancia de DNA *template* indica que os primers descritos em Pita-Pereira et al. (2012) apresentaram uma forte propensão para a formação de dímeros. Mantivemos o uso desses primers devido a sua alta sensibilidade, alta eficiência e pela fácil distinção entre dímeros e *amplicons* por meio da curva de dissociação.

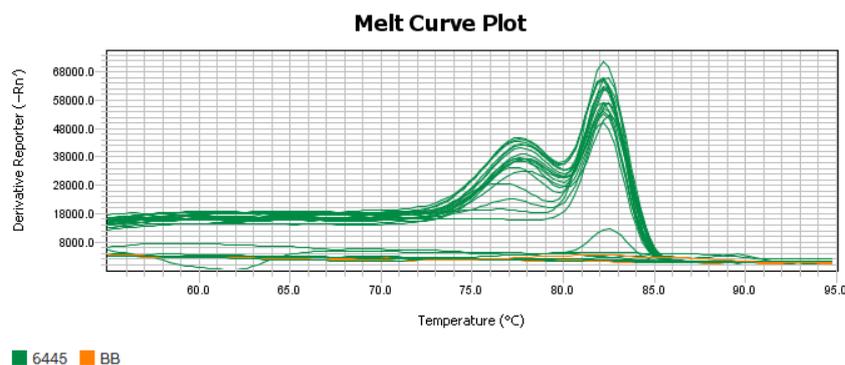


Figura IV – Curva de dissociação das amostras de cultura de *L. infantum* amplificadas na qPCR.

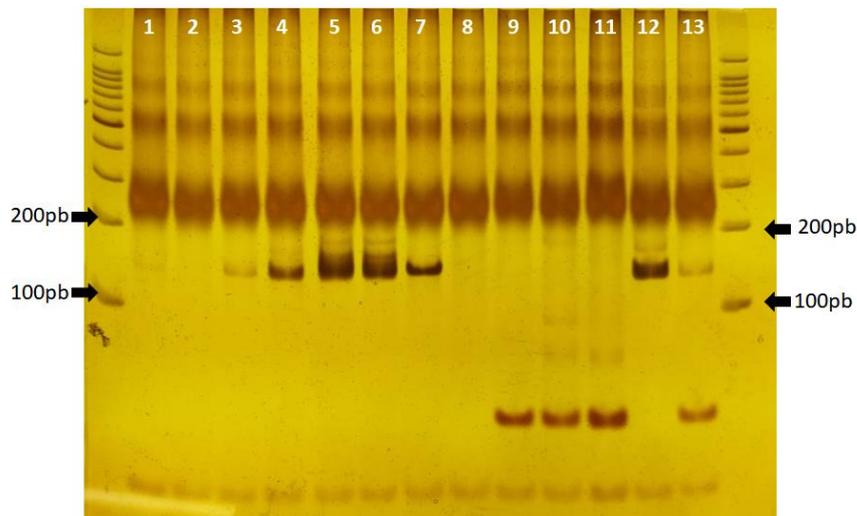


Figura IV – Gel de poliacrilamida com os produtos amplificados em qPCR. Amostras 1 e 2 são de diluições da cultura 10^{-9} e 10^{-10} sem curva de dissociação proeminentes. As amostras 3,4 e 5 são de cães com apenas um pico de dissociação próximo a $82,3^{\circ}$. As amostras 6,7, 8 e 12 são de amostras de *L. infantum* com apenas um pico de dissociação próximo a $82,3^{\circ}$. A amostra 8 é de um controle negativo sem amplificação. As amostras 9, 10 e 11 são de controles negativos com amplificação e pico de temperatura por volta de 77°C . A amostra 13 é referente a uma cultura de *L. infantum* com um pico proeminente por volta de 77°C e outro menor próximo a $82,3^{\circ}$. Todas as amostras apresentaram um rastro, possivelmente um artefato pela coloração com prata de reagentes da qPCR.

Pelas curvas de dissociação não foi possível diferenciar as espécies de *Leishmania* (FiguraVI).

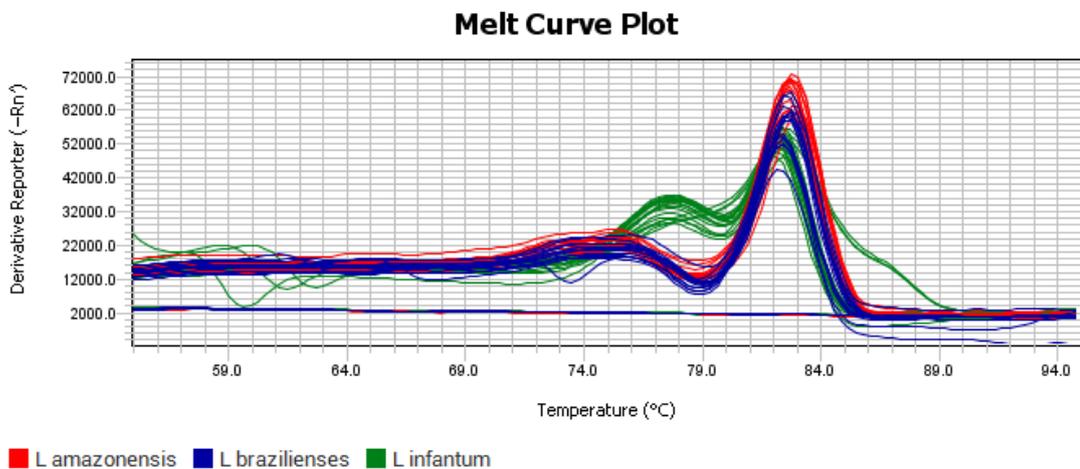


Figura IV – Curva de dissociação dos amplicons da qPCR para *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*.

Para avaliarmos a reprodutibilidade dos resultados uma amostra foi calculada de acordo com a tabela presente em Sim & Wright (2005)(SIM; WRIGHT, 2005). Os valores utilizados foram 0,10 de proporção de positivos, um kappa a detectar de 0,90 e o valor de kappa na hipótese nula bicaudal de 0,6 com 90% de poder. O número amostral obtido foi de 200 amostras. O kappa foi estimado em 0,6623 (IC 95% 0,53 a 0,79) e o kappa máximo que hipoteticamente poderia ser obtido era de valor 0,95559. O Quadro I apresenta quantas amostras foram consideradas positivas nas duas tentativas de amplificação.

Quadro I – Frequência absoluta de classificação em positivo ou negativo pela qPCR e pela repetição da técnica.

	Replicas -	Réplicas +	Total
Original +	145	10	155
Original -	13	32	45
Total	158	42	200

Anexo I: Certificado CEUA



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 19 de novembro de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**RISCO, DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.**”, UnBDoC n.º 11253/2015, sob responsabilidade do Professor Gustavo Adolfo Sierra Romero foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de Canis familiaris: 1000. A presente aprovação é válida pelo período de 9/2/2015 a 31/7/2019.



Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Anexo II: Instruções para preenchimento do questionário socioeconômico, retiradas do Critério Brasil 2016, ABEP.

PROCEDIMENTO NA COLETA DOS ITENS

É importante e necessário que o critério seja aplicado de forma uniforme e precisa. Para tanto, é fundamental atender integralmente as definições e procedimentos citados a seguir.

Para aparelhos domésticos em geral:

Devem ser considerados todos os bens que estão dentro do domicílio em funcionamento (incluindo os que estão guardados) independente da forma de aquisição: compra, empréstimo, aluguel, etc. Se o domicílio possui um bem que emprestou a outro, este não deve ser contado pois não está em seu domicílio atualmente. Caso não estejam funcionando, considere apenas se tiver intenção de consertar ou repor nos próximos seis meses.

Banheiro

O que define o banheiro é a existência de vaso sanitário. Considerar todos os banheiros e lavabos com vaso sanitário, incluindo os de empregada, os localizados fora de casa e os da(s) suíte(s). Para ser considerado, o banheiro tem que ser privativo do domicílio. Banheiros coletivos (que servem a mais de uma habitação) não devem ser considerados.

Empregados Domésticos

Considerar apenas os empregados mensalistas, isto é, aqueles que trabalham pelo menos cinco dias por semana, durmam ou não no emprego. Não esqueça de incluir babás, motoristas, cozinheiras, copeiras, arrumadeiras, considerando sempre os mensalistas.

Note bem: o termo empregado mensalista se refere aos empregados que trabalham no domicílio de forma permanente e/ou contínua, pelo menos cinco dias por semana, e não ao regime de pagamento do salário.

Automóvel

Não considerar táxis, vans ou pick-ups usados para fretes, ou qualquer veículo usado para atividades profissionais. Veículos de uso misto (pessoal e profissional) não devem ser considerados.

Microcomputador

Considerar os computadores de mesa, laptops, notebooks e netbooks. Não considerar: calculadoras,

agendas eletrônicas, tablets, palms, smartphones e outros aparelhos.

Lava-Louça

Considere a máquina com função de lavar as louças.

Geladeira e Freezer

No quadro de pontuação há duas linhas independentes para assinalar a posse de geladeira e freezer respectivamente. A pontuação será aplicada de forma independente:

Havendo uma geladeira no domicílio, serão atribuídos os pontos (2) correspondentes a posse de geladeira; Se a geladeira tiver um freezer incorporado – 2ª porta – ou houver no domicílio um freezer independente serão atribuídos os pontos (2) correspondentes ao freezer. Dessa forma, esse domicílio totaliza 4 pontos na soma desses dois bens.

Lava-Roupa

Considerar máquina de lavar roupa, somente as máquinas automáticas e/ou semiautomática. O tanquinho NÃO deve ser considerado.

DVD

Considere como leitor de DVD (Disco Digital de Vídeo ou Disco Digital Versátil) o acessório doméstico capaz de reproduzir mídias no formato DVD ou outros formatos mais modernos, incluindo videogames, computadores, notebooks. Inclua os aparelhos portáteis e os acoplados em microcomputadores.

Não considere DVD de automóvel.

Micro-ondas

Considerar forno micro-ondas e aparelho com dupla função (de micro-ondas e forno elétrico).

Motocicleta

Não considerar motocicletas usadas exclusivamente para atividades profissionais. Motocicletas apenas para uso pessoal e de uso misto (pessoal e profissional) devem ser consideradas.

Secadora de roupas

Considerar a máquina de secar roupa. Existem máquinas que fazem duas funções, lavar e secar. Nesses casos, devemos considerar esse equipamento como uma máquina de lavar e como uma secadora.