

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO- UNISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA E BEM-ESTAR ANIMAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Hevila Gabrieli Nascimento de Campos
Orientadora: Prof^a Dr^a Solange Maria Gennari**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR
PARASITOS GASTRINTESTINAIS, *TOXOPLASMA GONDII*,
NEOSPORA CANINUM E *LEISHMANIA SPP* EM CÃES
DOMICILIADOS DA CIDADE DE MANAUS, AM**

São Paulo- SP

2021

HEVILA GABRIELI NASCIMENTO DE CAMPOS

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR
PARASITOS GASTRINTESTINAIS, *TOXOPLASMA GONDII*,
NEOSPORA CANINUM E *LEISHMANIA SPP* EM CÃES
DOMICILIADOS DA CIDADE DE MANAUS, AM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina e Bem-Estar Animal. Orientador: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

São Paulo- SP

2021

Hevila Gabrieli Nascimento de Campos

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR
PARASITOS GASTRINTESTINAIS, *TOXOPLASMA GONDII*,
NEOSPORA CANINUM E *LEISHMANIA SPP* EM CÃES
DOMICILIADOS DA CIDADE DE MANAUS, AM**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da
Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Medicina e Bem-Estar Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Solange Maria Gennari

São Paulo, 07 de dezembro de 2021

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Conceito final: _____

PARECER N. 20/2020

Projeto de Pesquisa: "Ocorrência de *Toxoplasma gondii* e de parasitos intestinais em fezes de cães da cidade de Manaus, Amazonas"

Pesquisador Responsável: Profa. Solange Maria Gennari
Hevila Gabrieli Nascimento de Campos

Curso: Medicina Veterinária

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca), as resoluções do CONCEA, que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, deliberando pela **Aprovação** do Projeto "**Ocorrência de *Toxoplasma gondii* e de parasitos intestinais em fezes de cães da cidade de Manaus, Amazonas**".

*** Prezado responsável, o CEUA solicita:**

- **Relatório ao término do prazo estipulado para a pesquisa.**
- **Ser informado sobre qualquer alteração na metodologia e cronograma informados.**

São Paulo, 07 de agosto de 2020.



PROFA. DRA. VALERIA CASTILHO ONOFRIO
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
UNISA - Universidade Santo Amaro

**DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS
CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS – DBCA
CONCEA**

5.2.9. Relatório de projetos ou protocolos

5.2.9.1. O responsável pelo projeto ou protocolo encaminhará à CEUA, ao final do estudo, um relatório de uso de animais. O relatório deverá conter informações básicas acerca do projeto ou protocolo buscando-se nos itens descritos no Anexo I (Formulário Unificado para Solicitação de Autorização para Uso de Animais em Ensino e/ou Pesquisa) da Resolução Normativa nº 04 do CONCEA, de 18 de abril de 2012.

VI. RESPONSABILIDADES DOS PESQUISADORES E PROFESSORES

VII. GERAIS

6.1.1. Pesquisadores e professores são responsáveis por todas as questões relacionadas ao bem-estar dos animais utilizados e devem agir de acordo com as exigências desta Diretriz. Essa responsabilidade se inicia quando os animais são alocados para uso em um projeto e se finaliza com término do mesmo.

6.1.2. Para garantir o bem-estar dos animais utilizados, os usuários de animais (pesquisadores, professores, alunos e técnicos) devem assegurar que a qualidade da supervisão do pessoal envolvido no cuidado e manejo dos animais usados esteja de acordo com a responsabilidade e com o nível de competência do pessoal.

6.1.3. Antes do início de qualquer atividade científica ou didática envolvendo o uso de animais, os pesquisadores e professores devem enviar uma proposta à CEUA, indicando que o planejamento do projeto ou protocolo se encontra de acordo com esta Diretriz, com a Lei nº 11.794 e seus instrumentos de regulamentação.

6.1.4. Pesquisadores, professores, alunos e técnicos não podem iniciar atividade científica ou didática envolvendo o uso de animais antes de obter a aprovação por escrito da CEUA, cumprindo todas as exigências solicitadas por esta.

6.1.5. Ao solicitar a aprovação para uma proposta, usuários de animais (pesquisadores, professores, alunos, técnicos) devem informar à respectiva CEUA sobre outras instituições científicas ou didáticas participantes do projeto ou protocolo.

6.1.6. Pesquisadores, professores, alunos e técnicos envolvidos em projetos com animais devem disponibilizar meios para que possam ser contatados em casos de emergência.

6.1.7. Os pesquisadores e professores devem garantir que a escolha da espécie animal a ser utilizada encontra-se apropriada ao fim científico ou didático. Devem ser observadas as condições de padrão genético, a ausência de patógenos específicos, a documentação de padrão sanitário, os históricos nutricionais e ambientais, e outros fatores relevantes.

6.1.8. Pesquisadores, professores, alunos e técnicos devem registrar e manter todas as informações sobre o uso e o monitoramento de animais usados para fins científicos ou didáticos. Os registros devem, sempre que possível, incluir a origem e o destino dos animais, o tempo de permanência dos animais no projeto, os procedimentos realizados, o manejo dos animais e as medidas para promoção do bem-estar animal durante seu período em experimentação.

6.1.9. A aprovação da CEUA é obrigatória quando animais são utilizados para adquirir, desenvolver ou demonstrar conhecimentos e técnicas para fins científicos ou didáticos.

6.1.10. Quando animais de produção, domésticos ou de companhia forem utilizados para fins científicos ou didáticos e seus proprietários (ou terceiros) tiverem a responsabilidade pelo tratamento e cuidados diários, a descrição dessas responsabilidades do pesquisador ou professor, assim como as do proprietário do(s) animal(is) ou terceiros devem estar claramente definidas na proposta.

6.1.11. Quando cabível deve ser anexado à proposta o Termo de Consentimento – TC, assinado pelos responsáveis.

6.1.12. Nos casos em que cadáveres ou parte deles sejam oriundos de animais utilizados em experimentos, o profissional responsável pelo protocolo original deverá obter aprovação prévia da CEUA. Nos casos em que cadáveres ou parte deles tenham outra origem, o profissional responsável deve informar a procedência deles à CEUA.

A minha mãe, Dra. Rosemí Araújo, por abrir os caminhos para mim, por ser inspiração, por sempre acreditar no meu sucesso e ser a minha maior e melhor torcida.

Posso ser ou ter tudo que quiser.

AGRADECIMENTO

A Deus pelo dom da vida, e por permitir eu viver mais um sonho.

A minha família, Rosemi, Helen e Heline, minhas sobrinhas Luisa e Isabella, por entender que mesmo eu ausente nos momentos importantes, compreenderem que eu estava correndo atrás das minhas realizações pessoais, por se alegrarem comigo em cada conquista, por torcerem e sempre acreditarem em mim, por vezes escutarem minhas queixas, por se fazerem presentes na minha vida mesmo que eu estivesse em outra cidade. Amo vocês.

A minha orientadora Profa. Dra. Solange M. Gennari, que desde o início acreditou em mim, confiou a mim esse trabalho, por toda dedicação, atenção e paciência, pelas vezes que me recebeu na sua casa, por todo o suporte no decorrer dessa jornada. Sou muito grata.

Agradeço ao Prof. Dr. Herbert S. Soares, pelo suporte, paciência e pela parceria.

A Livia Mendes, minha colega de turma, que se dispôs a colaborar com seus conhecimentos dando suporte quando também precisei.

Ao Ryan Emiliano Silva, pela disposição e paciência, em me receber no VPS-USP mesmo nos finais de semana, e pela parceria.

Ao Prof. Dr. Sergio Azevedo, pela colaboração e parceria.

A Unisa e sua equipe de colaboradores, coordenação e professores que fizeram parte da minha formação durante o mestrado.

Aos tutores dos cães que se disponibilizaram a participar da pesquisa.

Aos cães, e a todos os animais, todo meu amor e respeito, em especial a minha Heva, que reacendeu a minha paixão pela Medicina Veterinária.

A todos que fizeram ou fazem parte da minha vida durante esse período e os que puderam acompanhar, e por me ajudarem de alguma forma.

Muito obrigada.

Minha admiração e “reverence” a todos vocês.

RESUMO

A relação entre o homem e os animais tem se estreitado contribuindo para o surgimento de doenças conhecidas como zoonoses. Os cães ainda são os animais domésticos que mais se fazem presentes no âmbito domiciliar, contribuindo para a ocorrência de zoonoses. Dentre estas doenças as causadas por parasitos gastrintestinais e por protozoários como *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, se destacam. Outra importante zoonose, amplamente difundida no Brasil, é a leishmaniose, causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, que incluem várias espécies, manifestando-se na forma visceral ou tegumentar e que tem como principal reservatório os cães, que participam na manutenção do ciclo do parasito. A cidade de Manaus, capital do estado do Amazonas, é a maior cidade da região norte e, apesar da importância do município, praticamente nada se sabe sobre a epidemiologia de agentes zoonóticos, tanto em humanos como em animais. O objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência de parasitos gastrintestinais em fezes de cães domiciliados e a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii*, anti-*N. caninum* e anti-*Leishmania* spp. no soro desses cães e realizar o diagnóstico molecular de *Leishmania infantum*, no coágulo sanguíneo, bem como avaliar os fatores de risco associados a ocorrência desses patógenos na área estudada. Para tanto 401 amostras de fezes e 154 amostras de soro foram obtidas de cães das seis zonas do município e analisadas por técnicas coproparasitológicas e pesquisa de anticorpos séricos, respectivamente. Do coágulo sanguíneo pesquisou-se, pela Reação em Cadeia pela Polimerase, DNA de *L. infantum*. Os animais eram de ambos os sexos e com idade que variou de 45 dias a 12 anos. No momento das coletas um questionário epidemiológico foi feito com os tutores. A prevalência de cães positivos a parasitos gastrintestinais foi de 4% (IC 95% = 2,1% - 5,9%) com prevalência de 2% para *Ancylostoma* spp, 0,25% para *Toxocara canis* e 0,25% para *Strongyloides stercoralis*. A prevalência de protozoários foi de 1,0% para *Giardia* spp, 0,25% para *Cystosporospora* spp e 0,25% para *Cryptosporidium* spp. A pesquisa de anticorpos para *T. gondii* e *N. caninum*, realizados pela Reação de Imunofluorescência Indireta, encontrou, respectivamente, 19

(12,3%; IC 95% = 7,1% - 17,5%) e 3 (1,9%; IC 95% = 0,4% - 5,6%) cães reagentes. De todas as variáveis pesquisada somente cães que mantem contato com outros cães apresentaram associação ($p < 0,05$) com a presença de anticorpos contra *T. gondii*. A pesquisa de anticorpos para *Leishmania* spp foi realizada utilizando a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e detectou 32 (20,8% - IC 95% = 14,4% - 27,2%) animais positivos. DNA de *Leishmania infantum* foi detectado 60 (39.0% - 95% CI = 31.3% - 46%) amostras pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) indicando a circulação desse agente em cães da cidade de Manaus, recomendando-se estudos para isolamento desse parasito.

Palavras-chave: Parasitos Gastrintestinais; *Toxoplasma gondii*; *Neospora caninum*; *Leishmania* spp.; Cão; Manaus.

ABSTRACT

The relationship between man and animals has become closer, contributing to the emergence of diseases known as zoonoses. Dogs are still the domestic animals that are most present in the home environment, contributing to the occurrence of zoonoses. Among these diseases, those caused by gastrointestinal parasites and by protozoa such as *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*, stand out. Another important zoonosis, widely spread in Brazil, is leishmaniasis, caused by the protozoan of the genus *Leishmania*, which includes several species, manifesting in the visceral or integumentary form and whose main reservoir is dogs, which participate in the maintenance of the parasite's cycle. The city of Manaus, capital of the state of Amazonas, is the largest city in the northern region and, despite the importance of the city, practically nothing is known about the epidemiology of zoonotic agents, both in humans and animals. The aim of the present study was to determine the prevalence of gastrointestinal parasites in feces of domesticated dogs and the occurrence of anti-*T. gondii*, anti-*N. caninum* and anti-*Leishmania* spp. in the serum of these dogs and perform the molecular diagnosis of *Leishmania infantum*, in the blood clot, as well as evaluate the risk factors associated with the occurrence of these pathogens in the studied area. For this purpose, 401 fecal samples and 154 serum samples were obtained from dogs from the six areas of the city and analyzed by coproparasitological techniques and serum antibody testing, respectively. From the blood clot, DNA of *L. infantum* was investigated by Polymerase Chain Reaction. The animals were of both sexes and aged between 45 days and 12 years. At the time of collections, an epidemiological questionnaire was made with the tutors. The prevalence of positive dogs for gastrointestinal parasites was 4% (CI 95% = 2,1% - 5,9%) with prevalence values of 2% for *Ancylostoma* spp, 0.25% for *Toxocara canis* and 0.25% for *Strongyloides stercoralis*. The prevalence of protozoa was 1.0% for *Giardia* spp, 0.25% for *Cystosporospora* spp and 0.25% for *Cryptosporidium* spp. The occurrence of antibodies to *T. gondii* and *N. caninum*, analyzed by the Indirect Fluorescence Antibody Test, was, respectively, 12.3% (19; CI 95% = 7.1% - 17.5%) and 1.9% (3; CI 95% = 0.4% - 5.6%). Of all variables analyzed,

only dogs that maintain contact with other dogs were associated ($p < 0.05$) with the presence of antibodies against *T. gondii*. The investigation of antibodies to *Leishmania* spp was carried out using the immunofluorescent antibody assay (IFAT) and 32 (20.8% - 95% CI = 14.4% - 27.2%) animals were positives. *Leishmania infantum* DNA was detected in 60 (39.0% - 95% CI = 31.3% - 46%) using polymerase chain reaction indicating the circulation of this agent in dogs in the city of Manaus, recommending studies to isolate this parasite.

Keywords: Gastrointestinal parasites; *Toxoplasma gondii*; *Neospora caninum*; *Leishmania* spp.; Dog; Manaus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Divisão administrativa da cidade de Manaus/AM, com divisão por zonas, local de obtenção das amostras de fezes e sangue de cães domiciliados.....	27
Figura 2: Coleta de fezes de cães da cidade de Manaus e aplicação de questionário com tutores.....	29
Figura 3: Coleta de sangue de cães da cidade de Manaus.	29
Figura 4: Preparação de amostras de fezes para realização das técnicas coproparasitológicas.	30
Figura 5: Imagem microscópica de amostras positivas para A)Giarda spp;B)Cryptosporidium spp;C)Ancylostoma spp.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de amostras de fezes e sangue coletadas dos cães segundo o sexo, idade e zona de residência na cidade de Manaus, AM.....	28
Tabela 2: Amostras de fezes positivas e parasitos encontrados, por região de residência dos cães, no município de Manaus, AM.....	34
Tabela 3: Ocorrência de anti- <i>Toxoplasma gondii</i> e anti- <i>Neospora caninum</i> por variável analisada.....	35
Tabela 4: Número de cães positivos para anticorpos anti <i>Leishmania</i> spp. pela técnica de imunocromatografia (DPP) e número de amostras positivas para DNA de <i>Leishmania infantum</i> pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
IC	Intervalo de Confiança
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IFAT	Immunofluorescence antibody test
IGG	Imunoglobulina G
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmania visceral canina
N	Numero total de amostras
PBS	Pares de base
PCR	Proteína C reativa
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ZCO	Zona Centro Oeste
ZCS	Zona Centro Sul
ZL	Zona Leste
ZN	Zona Norte
ZO	Zona Oeste
ZS	Zona Sul

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Parasitos gastrintestinais	17
1.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	19
1.3 <i>Neospora caninum</i>	20
1.4 <i>Leishmania</i> spp	21
1.5 Município de Manaus, Amazonas	22
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Local de Coleta e Cálculo Amostral	26
4.2 Coleta de Amostras.....	27
4.3 Técnicas Coproparasitológicas	30
4.4 Técnicas Sorológicas	30
4.4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	30
4.5 Técnicas Moleculares (PCR).....	31
4.6 Análise Estatística.....	32
5. RESULTADOS	32
5.1 Exame Coproparasitológico	32
5.2 Sorologia para <i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i>	33
5.3 Sorologia para <i>Leishmania infantum</i>	33
5.4 PCR para <i>Leishmania infantum</i>	36
6. DISCUSSÃO	38
6.1 Parasitos Gastrintestinais	38
6.2 <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i>	39
6.3 <i>Leishmania</i> spp.....	41
7. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	54

1. INTRODUÇÃO

Devido ao estreitamento da relação homem/animal, faz-se necessário conhecer e avaliar o impacto que essa relação pode causar no tangente à saúde humana e animal. Os animais, principalmente os domésticos, podem se tornar fonte de infecção de importantes agentes zoonóticos de origem parasitária, bacteriana e fúngica (FIALHO, 2019).

Os cães são, dentre os animais domésticos, os que possuem maior interação com o ser humano. Estima-se que aproximadamente 44,3% da população brasileira possua um ou mais cães domiciliados (SCHNEIDER, 2018). Entretanto, apesar dessa participação ativa no âmbito familiar, alguns tutores deixam a desejar no que diz respeito ao manejo e aos cuidados sanitários oferecidos aos seus animais, fazendo com que haja maior probabilidade de surgimento de doenças. No Brasil, além da alta taxa de cães errantes, cerca de 30 milhões (OMS, 2019), existem também os problemas de saneamento básico, bastante precário em várias regiões, contribuindo para o aparecimento de doenças nos animais domésticos e nos humanos (JUNIOR & BARBOSA, 2013).

1.1. Parasitos gastrintestinais

As parasitoses são as causadoras das principais doenças que acometem o trato gastrintestinal, tanto do homem quanto dos animais, ocasionando distúrbios gastrentéricos e quadros de diarreia, desidratação e perda de peso (CAVALINI & ZAPPA, 2011). Estes distúrbios tendem a diminuir a imunidade do hospedeiro fazendo com que o indivíduo apresente, inclusive, baixo desenvolvimento. Dentre essas parasitoses, nos cães, destacam-se as zoonóticas de origem gastrentéricas, causadas por protozoários do gênero *Giardia* spp e *Cryptosporidium* spp e por nematóides ancilostomatídeos e ascarídeos (FUNADA et al., 2007).

A giardíase é uma parasitose intestinal, distribuída em todo mundo e de ampla importância zoonótica, tendo como formas infectantes os cistos e os trofozoítos e que pode ser adquirida através da ingestão de alimentos ou água contaminados pelos cistos, eliminados nas fezes (OLIVEIRA et al., 2010). Acomete, principalmente, animais imunossuprimidos ou jovens, sem predileção

por raças e sexo (CAVALINI & ZAPPA, 2011). Devido a importância da veiculação hídrica deste agente, ambientes com saneamento básico precário são altamente propícios para a propagação do protozoário (GENNARI et al., 1999).

A criptosporidiose, doença causada pelo protozoário *Cryptosporidium* spp., é prevalente em vários países e considerada negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (SAVIOLI, 2006). *Cryptosporidium* pode levar à diarreia em humanos e animais, inclusive os cães. As espécies predominantes de infecção são *C. hominis* e *C. parvum* em humanos e *C. canis* em cães. No entanto, *C. canis* pode infectar humanos imunocomprometidos (ITOH et al., 2019).

Ferramentas de diagnóstico molecular colaboraram muito para a compreensão da transmissão desses importantes protozoários zoonóticos, considerados os de maior importância dentre os que utilizam a via hídrica de transmissão. Estas ferramentas permitiram identificar a relação entre o parasita e os diferentes hospedeiros indicando as espécies de *Cryptosporidium* e as assemblages de *Giardia* melhor adaptados ao homem e aos hospedeiros animais (XIAO & FENG, 2017).

Dentre os nematóides que infectam os cães o ascarídeo, *Toxocara canis* e, o ancilostomatídeo, *Ancylostoma caninum*, agente etiológico da Larva Migrans Visceral e Larva Migrans Cutânea, respectivamente, são zoonoses de ampla ocorrência no Brasil e no mundo (VASCONCELOS et al., 2006).

Estudos de ocorrência de parasitos gastrintestinais em cães no Brasil foram realizados em várias regiões sendo os nematoides mais prevalentes *Ancylostoma caninum* e *Toxocara canis* e os protozoários *Giardia* spp, *Cryptosporidium* spp e *Cystoisospora* spp (VASCONCELOS et al., 2006; FUNADA et al., 2007; KLIMPEL et al., 2010; FERREIRA et al., 2013; FERREIRA et al., 2016).

Labruna et al. (2006) realizaram um dos poucos estudos de prevalência de parasitos gastrintestinais em cães domiciliados da região norte do Brasil, no Estado de Rondônia. Das 95 amostras examinadas o parasito mais prevalente foi *Ancylostoma* spp. (73,7%), seguido por *Toxocara canis* (18,9%), *Giardia* spp. (8,4%) e *Cryptosporidium parvum* (2,1%).

Outros agentes parasitários são também frequentemente descritos em cães, como *Trichuris vulpis*, *Dipylidium caninum* e *Strongyloides stercoralis* estes parasitos também já descritos infectando humanos (GENNARI et al., 2001; MÁRQUEZ-NAVARRO et al., 2012).

Na cidade de Manaus, Pereira Junior e Barbosa (2013) examinaram amostras de fezes de 80 cães errantes do município e, em todas as amostras, helmintos ou protozoários estavam presentes, com maior prevalência (85%) para *Ancylostoma* spp. No mesmo município, um estudo realizado com cães domiciliados e errantes encontrou 29,4% (10/34) de cães positivos; *Ancylostoma* spp., *Trichuris vulpis* e *Toxocara* spp. foram os helmintos mais prevalentes e *Cystoisospora* spp. e *Giardia* spp. os protozoários de maior prevalência (PEREIRA et al., 2012).

1.2. *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma importante zoonose, comum em todo o mundo e de elevada prevalência em humanos e animais no Brasil (DUBEY et al., 2012). Os felídeos são os únicos animais que excretam oocistos de *T. gondii* pelas fezes, hospedeiros definitivos do parasito, e mais de 350 espécies de mamíferos e aves já foram descritas como hospedeiros intermediários (DUBEY, 2010). Um gato pode excretar milhões de oocistos que, no ambiente, tornam-se infectantes e podem permanecer viáveis por meses no meio externo, dependendo da umidade e da temperatura (DUBEY, 2010). Animais e o homem podem se infectar ingerindo alimentos ou água contaminados com oocistos ou pelo consumo de cistos teciduais de *T. gondii*, presentes em carnes cruas ou mal cozidas, de animais infectados pelo coccídio. Há ainda uma importante forma de infecção, a transplacentária, que ocorre, em especial, quando a mãe se infecta durante a gestação e as formas de multiplicação rápida do parasito, os taquizoítos, atingem o feto (DUBEY, 2010).

Cães reagentes a anticorpos contra *T. gondii* já foram descritos em praticamente todos os estados brasileiros (DUBEY et al., 2012) e, no estado do Amazonas, há um único estudo, de 1980, no qual a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* foi avaliada em cães errantes da cidade de Manaus, pelo teste

de hemaglutinação, com ocorrência de 68%, com 13 dos 19 cães examinados reagentes (FERRARONI e MARZOCHI, 1980).

Revisão sobre toxoplasmose no Brasil (DUBEY et al., 2012), com estudos de 1968 a 2012, bem como revisão mais recente sobre toxoplasmose canina (DUBEY et al., 2020) apresenta dados de ocorrência de anticorpos em cães domiciliados, errantes, urbanos e rurais brasileiros, com ocorrência de 3,1% a 91% nos cães domiciliados. Entretanto, devido às diferentes metodologias e pontos de cortes empregados, comparações devem ser feitas com cuidado. Na última revisão de Dubey et al. (2020), 42 novos estudos sobre ocorrência de *T. gondii* em cães do Brasil foram descritos, entretanto nenhum estudo foi realizado no estado do Amazonas (DUBEY et al., 2020).

1.3. *Neospora caninum*

O coccídio Apicomplexa *Neospora caninum*, causador da neosporose, é considerado, em algumas regiões do mundo, como o principal responsável por abortos em bovinos e em cães, especialmente nos neonatos, podendo causar doença neuromuscular (DUBEY et al., 2007). Morfologicamente é um coccídio semelhante ao *T. gondii*, porém diferentes biologicamente, além de não ser considerado um agente zoonótico. Apesar de anticorpos contra *N. caninum* já terem sido encontrados em humanos, o parasita não foi detectado em tecidos humanos (TRANAS et al., 1999).

N. caninum tem como hospedeiro definitivo os canídeos domésticos e alguns gêneros de canídeos selvagens, como os coiotes e lobos cinzentos e vários animais de sangue quente como hospedeiros intermediários. Os canídeos eliminam oocistos não esporulados em suas fezes que, via alimentos e água, podem infectar uma série de outras espécies animais. Nos bovinos a infecção em fêmeas gestantes, dependendo da fase da gestação na qual ocorra a infecção, pode causar abortos ou nascimento de bezerros saudáveis, entretanto já infectados pelo parasito (CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017).

Os taquizoítos (na fase aguda da doença), os bradizoítos (presentes nos cistos teciduais) e os esporozoítos (nos oocistos) são os três estágios infecciosos do *N. caninum*. Os taquizoítos e os bradizoítos ocorrem nos tecidos

nos hospedeiros intermediários e os oocistos são excretados pelos canídeos através das fezes (CERQUEIRA- CÉZAR et al., 2017).

Estudos realizados no Brasil têm mostrado que contato entre cães e bovinos é um fator de risco para a infecção dos cães pelo *N. caninum* (FERNANDES et al., 2004; PLUGGE et al., 2008; CUNHA et al., 2008; SICUPIRA et al., 2012). Entretanto em um estudo sobre a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em cães da microrregião da serra de Botucatu, em São Paulo, observou-se uma maior ocorrência nos cães do meio urbano (MORAES et al., 2008).

Em um estudo realizado na região amazônica, com amostras dos estados de Mato Grosso e Tocantins, com cães de aldeias indígenas, observou-se ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* de 9,8%, com 32 dos 325 cães examinados positivos (MINERVINO et al., 2012). No estado do Pará, também região norte brasileira, cães do meio urbano e não domiciliados e cães do meio rural, foram examinados para anticorpos contra *N. caninum*, com 14% e 11,1% de positividade, respectivamente; diferença significativa não foi observada entre os cães que viviam no meio urbano e rural (VALADAS et al., 2010).

1.4. *Leishmania* spp

As leishmanioses, reconhecidas como antropozoonoses, são de ampla distribuição mundial e causadas pelo protozoário *Leishmania*. Por incluir várias espécies, manifestam-se de duas formas: visceral e tegumentar. O agente tem como principal vetor espécies variadas de dípteros que se alimentam de sangue, conhecidos como flebotomíneos (MARCONDES & ROSSI, 2013). Sendo considerado o principal reservatório doméstico, os cães possuem participação na manutenção do ciclo da doença, compondo relação na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral (COSTA, 2020).

A leishmaniose visceral, considerada de maior importância em saúde pública, é também a que apresenta a maior ocorrência em canídeos (FEITOSA et al., 2000). Entretanto o estado do Amazonas é considerado região endêmica para leishmaniose tegumentar americana em seres humanos e, em 2011, apresentou uma incidência de 64,5 casos por 100.000 habitantes (SINAM,

2011). De 90 pacientes atendidos com lesões cutâneas em uma Unidade Básica de Saúde, localizada na cidade de Rio Preto da Eva, interior do Amazonas, todos foram positivos para leishmaniose tegumentar com descrição de espécies variadas identificadas no estudo (FIGUEIRA et al., 2014).

Reis et al. (2011) analisaram 600 cães nas seis zonas urbanas da cidade de Manaus, utilizando de variados métodos de diagnóstico e 12,5% apresentaram-se soro reativos, constatando que há circulação de cães infectados por *Leishmania (Viannia)* spp. em Manaus, participando no ciclo da leishmaniose tegumentar no Amazonas. Entretanto não há descrição de cães ou humanos infectados pela forma visceral no município até o presente momento, apesar do muito baixo número de pesquisas nesse sentido.

O diagnóstico das Leishmanioses são motivos de muitos estudos numa tentativa de obter um método de alta sensibilidade e especificidade. CatLeish-PCR é uma ferramenta recente e que pode ser usada para o diagnóstico de leishmaniose visceral por ser uma ferramenta que supera os problemas recorrentes de baixa sensibilidade que as metodologias de visualização direta apresentam e supera ainda os exames de baixa especificidade e concordância entre os métodos sorológicos que são geralmente recomendados para o diagnóstico dessa doença (SILVA et al., 2019).

1.5. Município de Manaus, Amazonas

Um estudo do Instituto Trata Brasil (OLIVEIRA et al., 2018) descreve a Região Norte como a que possui o saneamento básico mais precário de todo o Brasil, favorecendo uma série de doenças, entre elas as parasitoses em humanos e em animais. Entretanto, dentre os Estados dessa região o Atlas de Desenvolvimento Humano do Brasil de 2010 (http://www.atlasbrasil.org.br/2013/pt/perfil_uf/amazonas) aponta o Estado do Amazonas com um IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) de 0,674, o mais alto dentre os Estados da região norte e o 18º dentre os 26 Estados brasileiros.

A cidade de Manaus, região conhecida pela Zona Franca, se tornou atrativa pelas oportunidades de trabalho na região. É o município mais populoso, com 2.219.580 habitantes e o mais rico da Amazônia, entretanto com

graves problemas sociais e de infraestrutura (IBGE, 2021), com um IDH de 0,737 sendo o maior dentre os 62 municípios do estado (IBGE, 2021).

Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS, 2015), no Estado do Amazonas havia cerca de 1.051.000 animais, sendo 727 mil cães e 43% desses animais eram domiciliados. Na capital, Manaus, estima-se que existam 205.771 cães domiciliados. No tangente à população de cães errantes, não existem dados quantitativos, frente à dificuldade de monitoramentos dos animais, pois o serviço de microchipagem e outros serviços públicos veterinários só são possíveis mediante a presença de um tutor responsável e identificado (SEMSA, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Estudos realizados em Manaus, com parasitoses gastrintestinais de humanos, encontraram, em algumas regiões do município, 100% de positividade para parasitos intestinais, sendo 30,7% para helmintos e 69,3% para protozoários (CRUZ et al., 2015). Estudos realizados com cães tiveram um enfoque em cães errantes ou utilizando amostras de fezes de cães levados para tratamentos em clínicas veterinárias, não abrangendo todas as zonas do município (PEREIRA et al., 2012; PEREIRA JUNIOR et al., 2013). Em relação ao controle das verminoses humanas, Labruna et al. (2006) recomendam que um rigoroso controle das verminoses canina deva ser associado aos programas de controle dessas doenças em humanos, sugerindo estudos em conjunto para o melhor conhecimento da epidemiologia desses agentes nas diferentes regiões do país. Vale ressaltar que uma grande quantidade de fármacos utilizados no controle de parasitas intestinais de cães, não são de amplo espectro, com grande parte deles agindo somente sobre helmintos nas doses recomendadas, e estes são justamente os medicamentos mais utilizados para tratamento e prevenção dessas infecções, entretanto uma boa parte dos agentes parasitários não é afetada por tais medicamentos (FERREIRA et al., 2016).

Toxoplasma gondii e *Neospora caninum*, ambos infectam cães e o primeiro representa uma importante zoonose, porém não há estudos recentes nessa espécie no Estado do Amazonas e, associado aos parasitos gastrintestinais, não tem merecido a mesma atenção que vem sendo dada em

outras regiões do país, onde há muito mais informações e possibilidades de introdução de métodos de controle. Da mesma forma, as infecções descritas em cães por *Leishmania* spp no Estado, são a forma tegumentar (GUERRA et al., 2007). Reis et al. (2011) descreveram dois casos de cães do mesmo estado infectados por *L. infantum*, entretanto foram considerados casos importados.

Devido ao aumento populacional da cidade de Manaus, a expansão de habitações e aproximação com a mata, além de relação da população com animais domésticos, como os cães, fez-se necessário expandir o conhecimento acerca de importantes doenças zoonóticas, de origem parasitárias, presentes nos cães domiciliados do município.

Considerando que existem poucos estudos sobre esse tema em cães na região norte, inclusive na capital do Amazonas, o estudo pretende preencher parte dessa lacuna e avaliar a ocorrência de parasitos gastrintestinais e de anticorpos contra *T. gondii*, *N. caninum* e *Leishmania* spp, além de possíveis fatores de risco para as infecções.

3. OBJETIVOS

O presente estudo, realizado com cães domiciliados do município de Manaus, Amazonas, teve por objetivos:

- Avaliar a prevalência de parasitos gastrintestinais em amostras fecais e determinar associações entre a presença dos parasitos e a idade, o sexo e a zona da residência do cão;
- Avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em amostras de soros e determinar associações com a idade, o sexo, a zona da residência do cão, o tipo de alimentação, contato com gatos, contato com outros cães e frequentar a rua;
- Avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras de soro e determinar associações com a idade, o sexo, a zona de residência do cão, o tipo de alimentação, contato com outros cães e frequentar a rua;
- Avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* spp., a detecção molecular de *Leishmania infantum* e determinar associações com a zona de residência do cão, sexo, idade, raça, se tem acesso a rua e contato com outros cães.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Santo Amaro, sob o número 020/2020.

4.1. *Local de Coleta e Cálculo Amostral*

O estudo foi conduzido na cidade de Manaus, capital do estado do Amazonas. O município de Manaus compreende cerca de 11.401 km² de área e uma estimativa de 2.219.580 habitantes e tem como coordenadas geográficas 3°6'6.98"S e 60°1'30"W (IBGE,2021). Se localiza na parte central da bacia Amazônica, na margem esquerda do Rio Negro, o clima de Manaus é considerado tropical úmido de monção (RIBEIRO,1991), com temperatura média anual de 27°C e índice pluviométrico em torno de 2.300 milímetros anuais (SILVA, 2012).

Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde (PNE, 2015), no Estado do Amazonas havia cerca de 727 mil cães, sendo 43% domiciliados e na capital, Manaus, estima-se que exista 205.771 cães domiciliados.

O número de amostras de fezes de cães domiciliados que deveria ser obtida no estudo para avaliação da prevalência de parasitos gastrintestinais foi definido com a fórmula para amostras aleatórias simples (THRUSFIELD, 2007),

$$n = \frac{Z^2 P_{esp} (1 - P_{esp})}{d^2}$$

em que n = número mínimo de animais, $Z = 1,96$ (valor para o nível de confiança de 95%), P = prevalência esperada de 50% (maximização da amostra) e d = erro amostral de 5%. Feito o cálculo o número amostral foi de 384 cães. Foram coletadas amostras de fezes de 401 cães domiciliados da zona urbana na cidade de Manaus. Desse total, os tutores permitiram a coleta de sangue de 144 (35,9%) animais e de 10 cães foi possível coletar apenas amostra de sangue, somando um total de 401 amostras de fezes e 154 de sangue.

As coletas foram feitas nas residências, de forma a cobrir toda a cidade que é dividida em seis zonas: Norte (ZN), Sul (ZS), Centro Sul (ZCS), Leste (ZL), Oeste (ZO) e Centro Oeste (ZCO). A Figura 1 ilustra as zonas do município de Manaus.

Figura 1 - Divisão administrativa da cidade de Manaus/AM, com divisão por zonas, local de obtenção das amostras de fezes e sangue de cães domiciliados. Fonte: <https://www.arcgis.com/apps/mapviewer/index.html>



A Tabela 1 apresenta o número de amostras de fezes e sangue obtidos para as variáveis: idade, sexo, possuir ou não raça definida e zonas da cidade.

4.2. Coleta de Amostras

Anteriormente e durante o período de coletas foi feita divulgação a respeito da pesquisa e do material que seria coletado. Essa divulgação foi realizada utilizando mídias sociais e, assim, foi possível a coleta de total de amostras necessárias, num período de 11 semanas, de janeiro a março de 2021.

A coleta era previamente agendada e foi solicitado ao tutor que somente coletasse as fezes no dia agendado, a fim de entregá-las frescas. Um

membro da equipe fazia as coletas pessoalmente e, nesse momento, também realizava o questionário (Figura 2) com as informações sobre o animal, o tutor e sobre as variáveis que seriam estudadas (Anexo 1). Também nesse momento foram obtidas autorizações dos tutores e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido para cada um dos cães amostrados (Anexo 2).

Tabela 1 – Número de amostras de fezes e sangue coletadas dos cães segundo o sexo, a idade e a zona de residência na cidade de Manaus, AM.

Variáveis		Fezes	Sangue
		No. amostras (%) N=401	No. amostras (%) N=154
Sexo	Macho	152 (37,9)	59 (38,3)
	Fêmea	249 (62,1)	95 (61,6)
Idade	0 -12 meses	69 (17,2)	25 (16,2)
	≥12 meses	332 (82,7)	129 (83,7)
Zona	Norte	71 (17,7)	40 (25,9)
	Sul	67 (16,7)	13 (8,44)
	Centro-sul	63 (15,7)	20 (12,9)
	Leste	69 (17,2)	31 (20,1)
	Oeste	67 (16,7)	29 (18,8)
	Centro-oeste	64 (15,9)	21 (13,6)
TOTAL		401 (100)	154 (100)

N = número total de amostras

Quando permitido, amostras de sangue (n=154) foram coletadas da veia jugular ou cefálica (Figura 3). Esse material foi acondicionado em tubo com gel separador (BD SST™ II Vacutainer®) e, posteriormente, centrifugado a 700 x g por 10min., separados em soro e coágulo e ambos armazenados em tubos de tipo Eppendorf®, separadamente e mantidos a 18°C negativos.

As fezes, coletadas de forma individual logo após os animais defecarem, foram conservadas em solução de dicromato de potássio (2,5%) e acondicionadas sob refrigeração (5°C) para posterior análise.

Figura 2 – Coleta de fezes de cães da cidade de Manaus e aplicação de questionário com tutores. Fonte: Imagem do autor (2021)



Figura 3 – Coleta de sangue de cães da cidade de Manaus. Fonte: Imagem do autor (2021)



4.3. Técnicas Coproparasitológicas

As amostras de fezes foram examinadas por dois métodos de flutuação, método de Willis e Faust (1938), realizado com sulfato de zinco a 33% ($d = 1,18 \text{ g/cm}^3$) e de Ogassawara et al. (1986), realizado com solução de sacarose ($d = 1,203 \text{ g/cm}^3$). Também foi realizada a técnica de centrifugo-sedimentação em água éter segundo Ferreira et al. (1962). A amostra foi considerada positiva quando formas parasitárias eram encontradas em qualquer uma das técnicas realizadas (Figura 4).

Figura 4 – Preparação de amostras de fezes para realização das técnicas coproparasitológicas.

Fonte: Imagem do autor/colaborador (2021)



4.4. Técnicas Sorológicas

4.4.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Os soros foram analisados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos contra *T. gondii* e *N. caninum* de acordo com Camargo (1974). Foi utilizado o conjugado anti-cão IgG (Sigma®, USA) obtido em coelho, marcado com isotiocianato de fluoresceína diluído em 1:600, em solução de tampão fosfato (PBS) pH 7,2 contendo azul de Evans a 0,01%.

Para anticorpos anti-*T. gondii* taquizoítos da cepa RH foram usados como antígenos e utilizou-se um ponto de corte de 16 (LOPES et al., 2011). Para *N. caninum* taquizoítos da cepa NC-1, mantidos em cultura de células, foram usados como antígenos e o ponto de corte foi de 50 (DE SOUZA et al., 2002). Em cada lâmina soros controles, positivos e negativos, foram

adicionados. As amostras de soro reagentes foram tituladas na base dois até a obtenção da última diluição positiva.

Para *L. infantum* as lâminas foram previamente preparadas com formas promastigotas íntegras de *L. infantum*. Para a revelação da reação primária foi empregado um conjugado anti-IgG de cão, marcado com Isotiocianato de fluoresceína (Bethyl Lab. Inc., EUA), acrescido de Azul de Evans 1% (Sigma Aldrich, EUA). Após as sucessivas etapas de incubação, lavagem e secagem, a lâmina foi coberta com glicerina e sobreposta por uma lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência, com ponto de corte estabelecido na diluição de 1:40 (OLIVEIRA et al., 2008; MELO et al., 2017). Soros provenientes de amostras sabidamente positivas e negativas foram usados como controles da reação.

4.5. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para o diagnóstico molecular de *Leishmania infantum* foi realizada a extração do DNA das amostras de coágulos de sangue, utilizando o kit de extração PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®, Carlsbad, USA) seguindo as instruções do fabricante e posterior quantificação em espectrofotometria para atestar a eficiência da extração.

Para a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) um procedimento específico foi utilizado a partir da seguinte mistura de reação: 100ng de DNA genômico, 100ng de cada "primer" e 20uL de solução mix GreenTaq (Sinapse, USA). Os ciclos de amplificação e as temperaturas de anelamento foram definidos de acordo com os "primers" empregados: CatLeishF (5' GACAACGGCACCGTCGGCGCCAAAATAAAAG 3') e CatLeishR (5' CAGTACGGCGGTTTCGCTTGTCTGTTGAAGC 3') com etapas de desnaturação a 94°C por 01 minuto, de anelamento a 64°C por 01 minuto e de extensão da fita a 72°C por 45 segundos repetidos por 34 ciclos que amplificam um fragmento de 223pb de gene de catepsina *L-like* (SILVA et al., 2019). Os produtos amplificados por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%) seguidos de revelação em transiluminador e luz ultravioleta.

4.6. Análise Estatística

As análises de associação entre a positividade dos cães para parasitos intestinais, anticorpos contra *T. gondii*, *N. caninum* e *Leishmania* spp (RIFI), bem como presença de DNA de *L. infantum* (PCR) e as variáveis: zona de residência, sexo, raça, idade dos animais, acesso às ruas, contatos com outros cães e contato com gatos foram feitas com os testes de qui-quadrado, exato de Fisher ou teste G. O nível de significância foi 5%. As análises foram efetuadas no ambiente R (R Core Team, 2020) e interface RStudio.

5. RESULTADOS

5.1. Exame Coproparasitológico

Das amostras de fezes obtidas das seis zonas do município, valores bem próximos foram coletados entre cada região com um mínimo de 63 amostras na região CS a um máximo de 71 amostras na região N.

A prevalência de cães positivos a parasitos gastrintestinais foi de 4% (IC 95% = 2,1% - 5,9%). Dentre os protozoários encontrados, *Giardia* spp foi o de maior prevalência (1,0%) seguido por *Cystoisospora* spp. e *Cryptosporidium* spp. com 0,25% de positividade (Figura 5). Entre os helmintos, *Ancylostoma* spp apresentou uma prevalência de 2% e *Toxocara canis* e *Strongyloides stercoralis* de 0,25% (Tabela 2).

Dos 16 cães positivos, 16 apresentaram infecção por pelo menos um tipo de parasito e não foi observada associação significativa entre a presença dos parasitos gastrintestinais e as variáveis analisadas ($p > 0,05$).

Figura 5 – Imagem microscópica de amostras positivas para A) *Giardia* spp.; B) *Cryptosporidium* spp.; C) *Ancylostoma* spp.

Fonte: Imagem do autor/colaborador (2021)



5.2. Sorologia para *T. gondii* e *N. caninum*

Em relação a amostras testadas para anticorpos anti-*T. gondii*, a ocorrência foi de 12,3% (IC 95% = 7.1% - 17.5%) com 19 das 154 amostras analisadas reagentes pela RIFI, com títulos de anticorpos de: 16 (n=5), 32 (n=9), 64 (n=1), 128 (n=2), 256 (n=1) e 512 (n=1). Todas as amostras da ZS foram negativas e nas outras zonas os valores de ocorrência variaram de 5,0% a 25,8%, respectivamente nas ZCS e ZL.

Dentre as variáveis analisadas somente contato com outros cães apresentou associação com a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* ($p < 0,05$).

Para anticorpos contra *N. caninum*, três cães apresentaram positividade sendo um da ZL, um da ZO e um da ZCS, com valor de ocorrência de 1,9% (IC 95% = 0,4% - 5,6%). Os valores dos títulos de anticorpos anti-*N. caninum* foram: 800 (n=1), 200 (n=1) e 100 (n=1). Nenhuma das variáveis analisadas apresentou associação com a presença de cães soropositivos para *N. caninum* ($p > 0,05$). Os valores de ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* e as variáveis estudadas encontram-se na Tabela 3.

5.3. Sorologia para *Leishmania* spp.

Pela RIFI foi possível detectar 32 amostras positivas a anticorpos anti-*Leishmania* spp., com ocorrência de 28% (IC 95% = 14,4% - 27,2%). Quando avaliado pela RIFI cães que saem as ruas apresentaram mais chances de infectar. Outra variável significativa foi a zona de residência do cão, com ocorrências mais altas observadas nas ZN, ZS e ZO que foram semelhantes entre si. A ZO, com ocorrência de 20,7% foi semelhante a ZL e a ZCO, com valores de 9,6% e 9,5% respectivamente (Tabela 4).

Tabela 2 – Amostras de fezes positivas e parasitos encontrados, por região de residência dos cães, no município de Manaus, AM.

REGIÃO	Total de Amostras (%)	<i>Ancylostoma</i> spp (%)	<i>Toxocara canis</i> (%)	<i>Strongyloides stercoralis</i> (%)	<i>Giardia duodenalis</i> (%)	<i>Cystoisospora</i> spp (%)	<i>Cryptosporidium</i> spp (%)
NORTE	71 (17,7)	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
SUL	67 (16,7)	0 (0,0)	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,4)	1 (1,4)
LESTE	69 (17,2)	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (2,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
OESTE	67 (16,7)	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
CENTRO OESTE	64 (15,9)	2 (3,1)	0 (0,0)	1 (1,5)	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
CENTRO SUL	63 (15,7)	3 (4,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
TOTAL	401 (100,0)	8 (2,0)	1 (0,25)	1 (0,25)	4 (1)	1 (0,25)	1 (0,25)

Tabela 3 – Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* por variável analisada.

Variáveis	No. de cães (%)	No. de positivos (%)	
		<i>T. gondii</i>	<i>N. caninum</i>
Sexo			
Macho	59 (38.3)	9 (15.2)	2 (3.4)
Fêmea	95 (61.6)	10 (10.5)	1 (1,0)
Idade			
0-12 meses	25 (16.2)	3 (12.0)	0 (0.0)
>12 meses	129 (83.8)	16 (12.4)	3 (2,3)
Raça			
Definida	55 (35.7)	4 (7.3)	0 (0.0)
Não definida	99 (64.2)	15 (15.1)	3 (20.0)
Alimentação			
Comercial	131 (85.0)	14 (10.7)	3 (21.4)
Mista	23 (15.0)	5 (21.7)	0 (0.0)
Contato com a rua			
Sim	23 (15.0)	4 (17.4)	0 (0.0)
Não	131 (85.0)	15 (11.5)	3 (20.0)
Contato com outros cães*			
Sim	87 (56.5)	18 (20.7)	3 (9.1)
Não	67 (43.5)	1 (1.5)	0 (0.0)
Contato com gatos			
Sim	87 (56.5)	11 (12.6)	0 (0.0)
Não	67 (43.5)	8 (11.9)	0 (0.0)
Residência (Zona)			
Norte	40 (25.9)	4 (10.0)	0 (0.0)
Sul	13 (8.4)	0 (0.0)	0 (0.0)
Leste	31 (20.1)	8 (25.8)	1 (3.2)
Oeste	29 (18.8)	6 (20.7)	1 (3.4)
Centro oeste	21 (13.6)	2 (9.5)	0 (0.0)
Centro sul	20 (13.0)	1 (5.0)	1 (5.0)
TOTAL	154 (100)	19 (12.3)	3 (1.9)

*Associação com ocorrência de anticorpos séricos para *T. gondii*

5.4. PCR para *Leishmania infantum*

PCR para pesquisa de DNA de *L. infantum* detectou animais positivos em todas as zonas estudadas, com 60 (39%; IC 95% = 31,3% - 46,7%) cães positivos (Tabela 4).

Das variáveis analisadas (acesso à rua, contato com outros cães, sexo, idade, raça e zona de residência), animais com acesso à rua e que mantem contato com outros cães apresentaram associação ($p < 0.05$) de DNA do parasito (PCR). A zona de residência do cão apresentou associação ($p < 0,05$) com os resultados da PCR. A ZN e a ZCS apresentaram as maiores frequências, com valores de 57,5% e 60,0%, respectivamente, e foram semelhantes entre si e semelhantes a ZS (30,8%). A ZS também foi semelhante as outras zonas (ZL, ZO e ZCO) que apresentaram frequências estatisticamente iguais, com ocorrência de 25,8%; 27,6% e 23,8%, respectivamente.

Tabela 4 – Número de cães positivos para anticorpos anti-*Leishmania* spp. pela técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e número de amostras positivas para DNA de *Leishmania infantum* pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

Variáveis		No. Examinado (%)	No. Positivos (%)	
			PCR	RIFI
Sexo				
	Machos	59 (38,3)	28 (47,5)	8 (13,5)
	Fêmeas	95 (61,6)	32 (33,7)	24 (25,3)
Idade				
	0-12 m	25 (16,2)	12 (48,0)	3 (12,0)
	> 12 m	129 (83,8)	48 (37,2)	29 (22,4)
Raça				
	Definida	55 (35,7)	27 (49,1)	8 (14,5)
	SRD	99 (64,2)	33 (33,3)	24 (24,2)
Sai a rua*				
	SIM	18 (11,6)	16 (88,9)	10 (55,5)
	Não	136 (88,3)	44 (32,4)	22 (16,2)
Outros cães#				
	Sim	87 (56,4)	54 (62,1)	17 (19,5)
	Não	67 (43,5)	6 (8,9)	15 (22,4)
Residência				
Zona**				
	N	40 (25,9)	23 (57,5)^{a,c}	16 (40)^a
	S	13 (8,44)	4 (30,8)^{b,c}	5 (38,46)^{a,b}
	L	31 (20,0)	8 (25,8)^b	3 (9,6)^{c,d}
	O	29 (18,8)	8 (27,6)^b	6 (20,68)^{a,b,c}
	CO	21 (13,6)	5 (23,8)^b	2 (9,52)^{c,d}
	CS	20 (12,9)	12 (60,0)^{a,c}	0 (0)^d
TOTAL		154 (100,0)	60 (39,0)	32 (20,8)

N – norte, S – sul, L – leste, O – oeste, CO – centro-oeste, CS – centro-sul, n = total de amostras.

* Diferença estatística ($p < 0,05$) entre as frequências em ambas as técnicas.

Diferença estatística ($p < 0,05$) entre as frequências na PCR.

** Diferença estatística entre as frequências na PCR e RIFI. Na mesma coluna, frequências com letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

6.1. Parasitos Gastrintestinais

Os cães utilizados no presente estudo eram todos domiciliados, assim os resultados representam esta categoria de animais e comparações com cães de abrigos e ferais devem ser feitas com atenção. A prevalência foi baixa para todos os parasitos gastrintestinais quando comparados com valores encontrados em cães domiciliados e errantes do mesmo município (PEREIRA et al., 2012; PEREIRA JUNIOR et al., 2013) e de outras regiões do país (FUNADA et al., 2007; FERREIRA et al., 2013; FERREIRA et al., 2016; LIMA et al., 2021). Entretanto o helminto e o protozoário mais prevalentes, *Ancylostoma* spp. e *Giardia duodenalis*, respectivamente, também vem ocorrendo com alta frequência em diferentes regiões do Brasil, sendo o nematoide e o protozoário de maior prevalência (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002; LEITE et al., 2004; ALVES et al., 2005; LABRUNA et al., 2006; FUNADA et al., 2007; FERREIRA et al., 2016; LIMA et al., 2021). Nos estudos realizados em Manaus *Ancylostoma* spp também foi o parasito mais frequentemente encontrado (PEREIRA et al., 2012; PEREIRA JUNIOR et al., 2013), tanto em cães errantes como domiciliados.

Parasitas do gênero *Ancylostoma* spp., *Giardia duodenalis* e *Toxocara* spp. são os mais relevantes parasitas no tangente ao potencial zoonótico, entretanto, pela alta prevalência destes parasitos em cães no Brasil, o conhecimento da real importância desses agentes em humanos, ainda é pouco conhecido (NUNES et al., 2000; MURADIAN et al., 2005; COELHO et al., 2017) e merece maior atenção,

Na cidade de Manaus, o rio Negro, que banha a cidade, ainda conta com vários cursos de água de menor porte, denominados igarapés, que perpassam em todo o município e que causam enchentes nos períodos de maior chuva, comumente entre os meses de dezembro a maio, período das coletas de amostras do presente estudo. Essa característica pode estar diluindo as formas parasitárias presentes no ambiente, entretanto, estudos com maior número de animais e com cães não domiciliados, devem ser feitos nos diferentes períodos do ano para melhor avaliar se as enchentes frequentes que

ocorrem no município podem apresentar alguma influência na contaminação ambiental pelas formas infectantes dos parasitos gastrintestinais.

Nenhuma das variáveis estudadas apresentou associação com infecção pelos parasitos gastrintestinais, provavelmente devido à pequena quantidade de cães positivos, entretanto, por serem os mais prevalentes parasitos com potencial zoonótico, novos estudos devem ser realizados no município, com cães sob diferentes manejos e com humanos.

6.2. *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*

Os resultados indicam que cães do município de Manaus estão expostos a infecção por *N. caninum* e *T. gondii*. A soropositividade para *T. gondii* apresentou associação com cães que conviviam com outros cães ou que tinham contato com cães, os quais apresentaram uma ocorrência mais de dez vezes superior à encontrada em cães que não mantinham esse contato.

Apesar de os valores de ocorrência serem muito maiores para cães que se alimentam de rações comerciais associadas com alimentação caseira em comparação com a alimentação exclusivamente caseira, esta diferença não foi significativa ($p > 0,05$). Os cães que frequentam as ruas também foram mais reativos do que os cães que não têm contato com as ruas, porém essa diferença também foi considerada não significativa ($p > 0,05$).

Com exceção da ZS, uma das zonas mais desenvolvidas da cidade, em todas as demais áreas, cães reativos a anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados. Vale ressaltar que o sistema de enchentes e secas, que constantemente ocorre no rio Negro e nos igarapés que cortam praticamente toda a cidade, provavelmente possa estar diluindo a contaminação ambiental por oocistos e, portanto, a exposição dos animais. No entanto, o efeito real dessas mudanças entre os períodos de seca e inundação, sobre estas formas parasitárias, não foi estudado e merece maior atenção.

A ocorrência de *T. gondii*, encontrada entre os cães do presente estudo, foi menor (12,3%; IC 95% = 7.1% - 17.5%) do que a taxa de 68% encontrada anteriormente por Ferraroni e Marzochi (1980) na mesma cidade, no entanto, poucos cães foram examinados na primeira avaliação e foi utilizado teste de diagnóstico diferente.

Na região amazônica, estudos de ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em cães também apresentaram taxas superiores aos resultados do presente estudo, com 61,6% em Lábrea - AM, município que fica a 700 Km ao sul de Manaus (BASANO et al., 2016), 76,5% em Rondônia (CAÑÓN-FRANCO et al., 2004), 69,8% e 38% no Pará (VALADAS et al., 2010, da PAZ et al., 2019). Porém, apesar de todos os estudos terem sido realizados na região Amazônica, esta possui características ambientais diversas, bem como o perfil dos cães utilizados nos diferentes estudos não podem ser comparados.

Esta é a primeira descrição de cães soropositivos para *N. caninum* no estado do Amazonas. A ocorrência de anticorpos séricos de 1,9% (IC 95% = 0,4% - 5,6%) para *N. caninum*, encontrada em cães neste estudo, foi inferior à relatada para cães da região amazônica, estados de Mato Grosso e Tocantins, com prevalência de 9,8% (MINERVINO et al., 2012). Na mesma região, no estado do Pará, cães de rua da área urbana apresentaram uma ocorrência de 14% a anticorpos anti-*N. caninum* (VALADAS et al., 2010) e, em cães domiciliados em Rondônia, mas que frequentavam as ruas, a prevalência foi de 8,3% (CAÑÓN-FRANCO et al., 2003).

No presente estudo, nenhum dos cães apresentou sinais clínicos de distúrbios neurológicos e nenhuma das variáveis estudadas associação com cães reativos a anticorpos contra *N. caninum*.

Os cães são considerados sentinelas da contaminação ambiental, especialmente por *T. gondii*. Dados sobre toxoplasmose humana em Manaus são muito raros e antigos. Ferraroni et al. (1980) descreveram valores de 70,6% em indivíduos de apenas uma região da cidade e encontraram valores muito altos em comparação com a ocorrência do presente trabalho. Devido a importância da toxoplasmose em humanos e, por ter sido encontrado cães domiciliados positivos neste estudo, recomenda-se que um levantamento epidemiológico seja feito nos humanos do município.

Em relação a *N. caninum*, uma vez que uma proporção de cães apresentou evidências de exposição, a neosporose deve ser considerada quanto ao diagnóstico diferencial de distúrbios neurológicos em cães do município.

6.3. *Leishmania* spp.

No Amazonas, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é considerada uma doença endêmica e possui registros em praticamente todos os municípios do estado (CHAGAS, 2018). Devido a mudanças ambientais que ocorreram com frequência na região no decorrer de seu desenvolvimento, com abertura de estradas, extrações de matérias primas, exploração de madeira e principalmente a expansão das áreas urbanas, mudanças na dinâmica da população de vetores e reservatórios, que participam na transmissão de doenças infecciosas ocorreram na região (REIS et al., 2013).

São oito as espécies já catalogadas de leishmania no Brasil, que causam a enfermidade na forma tegumentar em humanos: *Leishmania (V) braziliensis*, *Leishmania (V) guyanensis*, *Leishmania (V) lainsoni*, *Leishmania (L) amazonenses*, *Le. (V) shawi*, *Le. (V) naiffi* e *Le. (V) lindenbergi*, além da causadora na forma visceral denominada de *Leishmania (L) chagasi* (SANTOS, 2019).

A espécie que mais ocorre em casos de LTA em humanos são: *Leishmania (V.) guyanensis* limita-se ao norte da Bacia Amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e estende-se pelas Guianas, sendo encontrada principalmente nas florestas de terra firme. Além disso, já foram identificados vários animais silvestres como hospedeiros naturais, como exemplo: a preguiça, o tamanduá, marsupiais e roedores (REIS & FRANCO, 2010). Os vetores são *Lutzomyia anduzei*, *Lutzomyia whitmani* e o principal vetor, *Lutzomyia umbratilis* (MS, 2006).

Entre 1999 a 2001, registros apontados pela FUNASA, mostraram cerca de 22.066 casos de LTA no Amazonas, sendo a maior parte desse registro no município de Manaus e no Rio Preto da Eva. Aproximadamente há 100 casos novos por ano registrados, provenientes no município de Manaus (GUERRA et al., 2007).

No presente estudo 32 (20,8%) dos animais apresentaram anticorpos anti- *Leishmania* spp. pela RIFI, entretanto como não foi feito o isolamento dos parasitos a avaliação da técnica sorológica empregada não pôde ser avaliada. Reis et al. (2008), pesquisando LTA em cães de Manaus, encontraram soropositividade para anticorpos anti-*Leishmania* spp. em 12,5% (75/600) pela

técnica de ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática) e 3,5% (21/600) pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI).

No presente estudo, quando as ocorrências foram analisadas pela RIFI, associação foi encontrada em cães que frequentam as ruas com mais chances de estarem infectados. Estudo sobre fatores de risco para LV Canina realizado no município de Panorama, São Paulo, utilizando um modelo de regressão logística obteve, como fatores de risco: cães não castrados, cães com acesso livre a rua, cães que dormem fora de casa, famílias com renda inferior a três salários-mínimos, ter vegetação próximo do domicílio, não ter vidro na janela, ter vasos com plantas e aquisição de um cão no último ano (VILLEGAS, 2015). No presente estudo apesar da avaliação de um número muito menor de variáveis, algumas dessas, como frequentar as ruas (quando avaliado pela RIFI e PCR) e contato com outros cães (quando avaliado pela PCR) além da região de residência (PCR e RIFI) foram variáveis de risco para a infecção por *Leishmania*.

Pela RIFI, as maiores ocorrências de cães positivos a anticorpos anti *Leishmania* spp, foram encontradas na ZN e na ZS, com valores estatisticamente semelhantes. Já para a PCR, a ZN e a ZCS foram as de maior ocorrência e também semelhantes entre si.

A zona considerada a mais carente do município é a ZL, porém atualmente devido ao crescimento desordenado da cidade, a ZN e ZO têm concentrado maiores quantidades de invasões sem nenhuma ou pouca estrutura de saneamento básico e uma série de problemas de infraestrutura (BARBOSA, 2004). A carência de infraestrutura de saneamento básico associada ao aumento do número de humanos positivos para LV foi observada também em estudos realizados em outras regiões do país, fatores de risco para LV em humanos de Campo Grande, MS, encontraram que a transmissão da doença e os fatores de riscos estão associados as altas densidades humana e canina e precária infraestrutura de saneamento básico. (MARGONARI et al., 2006; TELES, 2015).

Silva et al. (2014) destacam que a avaliação comparativa entre vários métodos de diagnóstico para Leishmaniose deve empregar mais de um teste diagnóstico para identificar adequadamente cães com LVC e, por esse motivo, é de suma importância a combinação de métodos diferentes. Nesse sentido, no

presente estudo foi realizado a identificação do DNA do parasito em coágulo sanguíneo utilizando o marcador CatLeish-PCR, por essa técnica 60 (39%) cães foram positivos para *L. infantum* uma vez que esse marcador possui alta especificidade e não permite a ocorrência de reação cruzada com outras espécies de *Leishmania* da forma tegumentar (SILVA et al., 2019).

Os achados da PCR com marcador específico indicaram a presença da *L. infantum* no município, onde também já foram descritos possíveis vetores do parasito (SANTOS, 2019).

Infecção por LV em cães em Manaus já foram descritas, entretanto em cães originários de outras regiões da Amazônia, sugerindo-se de não serem casos autóctones (LAINSON et al., 1987). Rolim (2011) relata casos de cães positivos em Manaus oriundos de Mato Grosso e de Minas Gerais, regiões consideradas endêmicas para LV.

Esta é a primeira descrição de cães com infecção autóctone pela *L. infantum* em Manaus e futuros estudos, com o isolamento do parasito, devem ser feitos para a confirmação dos achados do presente estudo.

Desde os anos 90, os estados do Pará e do Tocantins, ambos na região Norte, além do Mato Grosso do Sul (região Centro Oeste) e Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste) passaram a influir de maneira significativa nas estatísticas da LV no Brasil (Ministério da Saúde, 2001). Apesar de o estado do Amazonas ser considerado silencioso para LV, é passível de vulnerabilidade devido ao fluxo migratório e, principalmente, devido as ocorrências de casos em estados vizinhos (REIS, 2011). Vale também ressaltar que não existem estudos recentes, apesar das alterações ambientais terem se mantido altas.

Levantamento entomológico para reconhecimento de vetores da LV não identificou o vetor, apesar de que existe a presença de outras espécies que podem estar envolvidas na transmissão da doença (BARBOSA et al., 2008), como é o caso da *Migonemyia migonei*, vetor de *L. braziliensis* (LT) no Brasil e que já foi encontrada na região Amazônica e segundo Santos (2019) pode estar participando do ciclo de transmissão da *L. infantum chagasi*, tanto no Brasil quanto na Argentina. Nogueira et al. (2016) constataram que *M. migonei* foi capaz de sustentar a infecção de duas linhagens de *L. amazonensis*, demonstrando que este vetor pode ser suscetível a diferentes

espécies e linhagens de *Leishmania*, reforçando os achados do presente estudo.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo, realizado com cães domiciliados do Município de Manaus, permitiram concluir que: Houveram infecção por parasitos gastrintestinais nos cães utilizados e o parasito de maior prevalência foi *Ancylostoma* spp., agente zoonótico da larva migrans cutânea em humanos. Os cães apresentaram-se reagentes a anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e cães que convivem com outros cães apresentaram associação com a infecção pelo coccídio. Além disso, os cães foram reagentes ao coccídio *Neospora caninum*, entretanto nenhuma das variáveis estudadas apresentou associação com a presença de anticorpos contra o protozoário. Alguns cães também apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* spp. e aqueles que tem acesso às ruas e contato com outros cães apresentaram associação com a presença desses anticorpos. Cabe destacar que o DNA para *Leishmania infantum chagasi* foi descrito em cães do município pela primeira vez. Colaborando assim, na atualização de dados para a cidade de Manaus, bem como revelando a importância de mais estudos e atenção à Saúde Única no que diz respeito a parasitos de origem gastrintestinais, *T. gondii* , *N. caninum* e *L. infantum* spp.

REFERÊNCIAS

1. ALVES O.F., GOMES A.G., SILVA A.C. Ocorrência de enteroparasitos em cães do município de Goiânia, Goiás: Comparação de técnicas de diagnóstico. *Cienc Anim Bras* 2005;6(2):127-133.
2. BARBOSA, M.D.G.V., FÉ, N.F., MARCIAO, A.H.R., SILVA, A.P.T., MONTEIRO, W.M., GUERRA, J.A.D.O. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [online]. 2008, v. 41, n. 5 [Acessado 24 Novembro 2021] , pp. 485-491. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000500010>>. Epub 06 Nov 2008. ISSN 1678-9849. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000500010>.
3. BASANO, S.D.A., TARSO, P., SOARES, H.S., COSTA, A.P., MARCILI, A., LABRUNA, M.B., DIAS, R.A., CAMARGO, L.M.A., GENNARI, S.M. (2016). *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania amazonensis* antibodies in domestic dogs in the western Brazilian Amazon region. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 53(4), 1-9. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2016>.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006. 136 p.
5. CAMARGO M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, São Paulo, v.10, n. 4, p. 143-171, 1974.
6. CAÑÓN-FRANCO, W.A., BERGAMASCHI, D.P, LABRUNA, M.B., CAMARGO, L.M., SILVA, J.C., PINTER, A., GENNARI, S.M. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondônia, Brazil. *Veterinary Research Communications*, v. 28, n. 2, p. 113-118, 2004. Feb;28(2):113-8.[doi: 10.1023/b:verc.0000012114.71235.73](https://doi.org/10.1023/b:verc.0000012114.71235.73). PMID: 14992241
7. CAVALINI P.P., ZAPPA V. Giardíase felina - revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. Ano IX, n.16, 1-17, 2011.
8. CERQUEIRA-CÉZAR C.K., CALERO- BERNAL R., DUBEY J.P., GENNARI S.M. All about neosporosis in Brazil. *Brazilian J. Vet. Parasitol.*, v. 26, p.253- 279, 2017.
9. COELHO, C.H., DURIGAN, M., LEAL, D.A.G., SCHNEIDER, A.B., FRANCO, R.M.B., SINGER, S.M. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Oct 24;11(10):e0006005. doi: 10.1371/journal.pntd.0006005. PMID: 29065126; PMCID: PMC5678545.
10. COSTA C.A.A.R. Diagnóstico sorológico e molecular de Leishmaniose canina e isolamento de parasitas do gênero *Leishmania* em cães no município de Itapeçerica da Serra, Cotia e São Paulo. Dissertação (Mestrado em Medicina e Bem Estar Animal). Universidade Santo Amaro, 67f. São Paulo, 2020.

11. CRUZ, V.T.C., SOARES A.R.L.; CARMIM, A.A.; NASCIMENTO, A.P.; SOUZA, A.M.; PEREIRA, F.C.; RAIIO, G.C. Prevalência das parasitoses intestinais associados aos fatores socioambientais na Comunidade Tropical no Município de Manaus Amazonas - Brasil. V Congresso de Iniciação Científica-XV PAIC Tropical, p. 56, 2015.
12. CUNHA FILHO N.A., LUCAS A.S., PAPPEN F.G., RAGOZO A.M.A., GENNARI S.M., LUCIA JR T. Fatores de risco e prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães urbanos e rurais do Rio Grande do Sul, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet., v.17, n. supl.1, p.301-306, setembro 2008.
13. DE SOUZA, S.L., GUIMARÃES J.S. JR., FERREIRA F, DUBEY J.P., GENNARI S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. J Parasitol. 2002 Apr;88(2):408-9. doi: 10.1645/0022 3395(2002)088[0408:PONCAI]2.0.CO;2. PMID: 12054023.
14. DUBEY J.P. 2010. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. Zoonoses Public Health 57(1):60-73. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01274.x>. Pmid:19744305
15. DUBEY J.P., GENNARI S.M., SUNDAR N., VIANA M.C.B., BANDINI L.M., YAI L.E.O., KWOK C H, SU C. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil. J. Parasitol., v. 93, n.1, p.60–64, 2007.
16. DUBEY J.P., LAGO E., GENNARI S.M., SU C., JONES J.L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. Parasitology, v.139, n.11, p.1375-1424, 2012.
17. DUBEY JP., MURATA FHA., CERQUEIRA-CÉZAR CK., KWOK OCH., YANG Y., SU C. *Toxoplasma gondii* infections in dogs: 2009-2020. *Veterinary Parasitology* 287, 109223.
18. FAUST E.C., D'ANTONI J.S., ODOM V., MILLER M.J., PERES C., SAWITZ W., THOMEN L.F., TOBIE J., WALKER H.A. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces - I. Preliminary communication. American J. Trop. Med., v.18, p.169-183, 1938.
19. FEITOSA M.M., IKEDA F.A., LUVIZOTTO M.C.R., PERRI S.H.V. Clinical aspects of dogs with visceral leishmaniasis from Araçatuba-São Paulo State (Brazil). Clínica Veterinária, v.5, n.28, p.36–44, 2000.
20. FERNANDES B.C.T.M, GENNARI S.M., SOUZA S.L.P., CARVALHO J.M., OLIVEIRA W.G., CURY M.C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Vet Parasitol., v.123, n.1– 2, p.33–40, 2004.
21. FERRARONI J.J., REED S.G., SPEER C.A. Prevalence of *Toxoplasma* antibodies in humans and various animals in the Amazon. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, v.47, p.148-150, 1980.
22. FERREIRA F.P., DIAS R.C.F., MARTINS T.A., CONSTANTINO C., PASQUALI A.K.S., VIDOTTO O., FREIRE, R.L., NAVARRO, I.T.. Frequência de parasitas gastrointestinais em cães e gatos do município

- de Londrina, PR, com enfoque em saúde pública. *Semina: Ciências Agrárias*, v.34, n.6, suplemento 2, p.3851-3858, 2013.
23. FERREIRA J.I.G.S., PENA H.F.J., AZEVEDO S.S., LABRUNA M.B., GENNARI S.M.. Occurrence of gastrointestinal parasites in fecal samples from domestic dogs in São Paulo, SP, Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, v. 25, n. 4, p. 435-440, 2016.
 24. FERREIRA L.F., MORTEO R.E., SILVA J.R.. Padronização de técnicas para o exame parasitológico das fezes. *J Bras. Med.*, v.6, n.2, p.241-257, 1962.
 25. FIALHO W.M.A. Controle Integrado das doenças tropicais negligenciadas em áreas urbanas de Manaus beneficiadas por Projetos de Saneamento. Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas – FVS-AM, 2019.
 26. FIGUEIRA L.P., SOARES F.V., NAIFF M.F., SILVA S.S., ESPIR T.T., PINHEIRO F.G., FRANCO A.M.R. Distribuição de casos de leishmaniose tegumentar no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Vet. Patol.Trop.*, v.43, n.2, p.173-181, 2014.
 27. FUNADA M.R., PENA H.F.J., SOARES R.M., AMAKU M., GENNARI S.M.. Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 59, n.5, p.1338-1340, 2007.
 28. GENNARI S.M., KASAI N., PENA H.F.J., CORTEZ A.. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.36, n.2, p. 87-91, 1999.
 29. GENNARI S.M., PENA H.F.J., BLASQUES L.S. Frequência de ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Vet News*, v.8, n.52, p.10-12, 2001.
 30. GONTIJO, C. M. F., & MELO, M. N. (2004). Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7(3), 338–349. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1415-790x2004000300011>
 31. GRIMALDI G., TEV A., FERREIRA A.L., dos SANTOS C.B., PINTO I.S., de AZEVEDO C.T., FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP ® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.106, n.1, p.54–59, 2012.
 32. GUERRA J.A.O., PAES M.G, COELHO R.I.A.R, BARROS M.L.B., FÉ, N.F., BARBOSA M.G.V., GUERRA M.V.F. Estudo de dois anos com animais reservatórios em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana em bairro de urbanização antiga na cidade de Manaus-AM, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 37, n.1, p. 133-138, 2007.
 33. IBGE. Cães e gatos domésticos superam a marca de 1 milhão no Amazonas. Disponível em: <https://www.em.com.br/app/noticia/nacional/2016/07/28/interna_nacional,788614/no-brasil-44-3-dos-domicilios-possuem-pelomenos-um-cachorro-e-17-7.shtml>. Acesso em: 12.04.2021.

34. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2021. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/am/manaus/pesquisa/23/22957>. Acesso em: 12.04.2021.
35. ITOH N., TANAKA H., IJIMA Y., KAMESHIMA S., KIMURA Y. Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp. in breeding kennel dogs. *Korean J Parasitol.*, v.57, n.2, p.197-200, 2019.
36. KLIMPEL S., HEUKELBACH J., POTHMANN D., RUCKERT S. Gastrointestinal and ectoparasites from urban stray dogs in Fortaleza (Brazil): high infection risk for humans? *Parasitol Res* v.107, n.3, p.713-719, 2010.
37. LABRUNA M.B., PENA H.F.J., SOUZA S.L.P., PINTER A., SILVA J.C.R., RAGOZO A.M.A., CAMARGO, L.M.A., GENNARI, S.M. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. *Arq Ins Biol*, v.73, n.2, p.183-193, 2006.
38. LAINSON R, SHAW J.J., SILVEIRA F.T., BRAGA R.R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 517.
39. LEITE, L.C., MARINONI, L.P., CIRIO, S.M., DINIZ, J.M.F., SILVA, M.A.N., LUZ, E. MOLINARI, H.P, VARGAS, C.S.G., LEITE, S.C. ZADOROSNEI, A.C.B, VERONONESI, E.M. ENDOPARASITAS EM CÃES (*Canis familiaris*) NA CIDADE DE CURITIBA PARANÁ BRASIL. *Archives of Veterinary Science*, [S.l.], dez. 2004. ISSN 2317-6822. doi:<http://dx.doi.org/10.5380/avs.v9i2.4071>.
40. LIMA, N.D., RAIMUNDO, D.C., SOUZA, V.A.F.D., AGUIAR, J.M. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos domiciliados em Santos, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* [online]. 2021, v. 30, n. 4. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1984-29612021080>>. Epub 22 Out 2021. ISSN 1984-2961. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021080>.
41. LOPES, A.P., SANTOS, H., NETO., F, RODRIGUES, M., KWOK., O.C.H., DUBEY J,P., CARDOSO L. (2011). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in dogs from Northeastern Portugal. *Journal of Parasitology* 97, 418–420.
42. LOPES,U.G; MOMEN.H., GRIMALDI, JR.G.; MARZOCHI, M.C. A.; PACHECO, R. S.& MOREL,C.M. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci visceral and cutaneous Leishmaniasis. *J. Parasit.*, v. 70, n.1, p. 89-98.,1984.
43. M.S, Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. *Boletim Epidemiológico* 2001; 6: 1-11.
44. MADEIRA M.F., UCHÔA C.M.A., LEAL, C.A., SILVA, R.M.M., DUARTE R., MAGALHÃES C.M., SERRA, C.M.B. 2003 *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(5): 551-555.
45. MARCONDES, M., ROSSI, C.N. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013
46. MARGONARI C., FREITAS C.R., RIBEIRO R.C., MOURA A.C.M., TIMBÓ M., GRIPP A.H., PESSANHA J.E., DIAS E.S. Epidemiology of

- visceral leishmaniasis through spatial analysis in Belo Horizonte municipality, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(1):31-38.
47. MÁRQUEZ-NAVARRO, A., GARCÍA-BRACAMONTES, G., ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, B.E.; ÁVILA-CABALLERO, L. P.; SANTOS-ARANDA, I.; DÍAZ-CHIGUER, D.L.; NOGUEDA-TORRES, B. *Trichuris vulpis* (Froelich, 1789) infection in a child: a case report. *Korean Journal Parasitologic*, 50(1): 69-72, 2012.
 48. MELO, A. L. T., COSTA, A. P. DA., MIYAZAKI, S. S., STOCCO, M. B., SEMEDO, T. B. F., PACHECO, T. DOS A., WITTER, R., PACHECO, R. DE C., LABRUNA, M. B., MARCILI, A., & AGUIAR, D. M. DE. (2017). Rural area of the Brazilian Pantanal wetlands associated with the occurrence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in dogs. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 54(4), 375-382. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.128549>
 49. MINERVINO A.H.H., CASSINELLI A.B.M., LIMA J.T.R., SOARES H.S., MALHEIROS A.F., MARCILI A., GENNARI S.M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from two different indigenous communities in the Brazilian Amazon Region. *J. Parasitol.*, v.98, n.6, p. 1276-1278, 2012.
 50. MORAES C.C.G., MEGID J., PITUCO E.M., OKUDA L.H., DEL FAVA C., STEFANO E., CROCCI A.J. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da microrregião da Serra de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet.*, v.17, n. 1, p. 1-6, 2008.
 51. MURADIAN, V., GENNARI, S.M., GLICKMAN, L.T., PINHEIRO, SR. Epidemiological aspects of Visceral Larva Migrans in children living at São Remo Community, São Paulo (SP), Brazil. *Vet Parasitol.* 2005 Nov 25;134(1-2):93-7. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.05.060. Epub 2005 Jul 27. PMID: 16054301.
 52. NOGUEIRA, P.M., ASSIS, R.R., TORRECILHAS, A.C., SARAIVA, E.M., PESSOA, N.L., CAMPOS, M.A., MARIALVA, E.F., RÍOS-VELASQUEZ, C.M., PESSOA, F.A., SECUNDINO, N.F., RUGANI, J.N., NIEVES, E., TURCO, S.J., MELO, M.N., SOARES, R.P. Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* Strains Display Immunomodulatory Properties via TLR4 and Do Not Affect Sand Fly Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Aug 10;10(8):e0004848. doi: 10.1371/journal.pntd.0004848. PMID: 27508930; PMCID: PMC4980043.
 53. NUNES, C.M., PENA, F.C., NEGRELLI, G.B., ANJO, C.G.S., NAKANO, M.M., STOBBE, N.S. Ocorrência de larva migrans na areia de áreas de lazer das escolas municipais de ensino infantil, Araçatuba, SP, Brasil. *Revista de Saúde Pública* [online]. 2000,v. 34, n. 6 [Acessado 28 Novembro 2021],pp. 656-658. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0034-89102000000600015>>. Epub 07 Ago 2001. ISSN 1518-8787. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102000000600015>.
 54. OGASSAWARA S., BENASSI S., LARSSON C.E., HAGIWARA M.K. Prevalência de endoparasitas em gatos na cidade de São Paulo. *Ver. Fac. Med. Vet. Zootec.*, v.23, n.1, p.39-46, 1986.
 55. OLIVEIRA G., SCAZUFCA P., PIRES R.C. Ranking do Saneamento. Instituto Trata Brasil. São Paulo, SP, 118p., 2018.

56. OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G., AMARANTE A.F., FERRARI T.B., NUNES L.C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 2002;103(1-2):19-27. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00575-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00575-1).
57. OLIVEIRA, T.M.F.S., FURUTA, P.I., CARVALHO, D., MACHADO, R.Z. Study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2008; 17(1): 7-11.
58. P.N.S (Pesquisa Nacional de Saúde). IBGE. Acesso em 12.04.2020
59. PAZ, GS., COLHADO, B.S., ANTON, M.M., ROCHA, K.S., DA SILVA, D.B., MORAES, C.C.G., LUCHESI, S.B., LANGONI, H. (2019). Infecção por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi* em cães do Estado do Pará. *Ciência Animal Brasileira*, 20(1), 1–10. Available from: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/33566>
60. PEREIRA JUNIOR, G., BARBOSA, P.S.B. Prevalência de endoparasitas em cães errantes na cidade de Manaus-Am. *Acta Biomedica Brasiliensia*, v.4, n.2, 52-57, 2013.
61. PEREIRA, N.V., SOUZA, F.S., PIRANDA, E.M., CANÇADO, P.H.D., LISBÔA, R.S. Enteroparasitos encontrados em cães e gatos atendidos em duas clínicas veterinárias na cidade de Manaus, AM. *Amazon Science*, v.1, n.1, p.8-17, 2012.
62. PLUGGE, N.F., MONTIANI-FERREIRA, F., RICHARTZ, R.R.T.B., DAL PIZZOL, J., MACHADO JUNIOR, P.C., PATRÍCIO, LFL, ROSINELLIS, A.S., LOCATELLI-DITTRICH, R. Frequency of antibodies against *Neospora caninum* in stray and domiciled dogs from urban, periurban and rural areas from Paraná State, Southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.*, v.17, n.4, p.222-226, 2008.
63. REIS, S.R., GOMES, L.H.M., FERREIRA, N.M., NERY, L.R., PINHEIRO, F.G., FIGUEIRA, L.P., SOARES, F.V., FRANCO, A.M.R. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no ambiente peridomiciliar em área de foco de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Manaus, Amazonas. *Acta Amaz.*, v.43, n.1, p.123–126, 2013.
64. REIS, S.R., MICHALIK, M.S.M., FRANCO, A.M.R. Leishmaniose tegumentar experimental e natural no cão doméstico (*Canis familiaris*), Município de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude*, v.2, n.2, p.81, 2011.
65. REIS, S.R.; FRANCO, A.M.R. 2010. A Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Amazonas, Brasil: Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose canina. *Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária*, 50: 35-40.
66. RIBEIRO, A. Análise das variações climáticas observadas na região de Manaus (AM) [dissertação]. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 1991 [citado 2021-11-24]. doi:10.11606/D.11.2019.tde-20191218-114457.
67. SANTOS, E.F.M.D. Bionomia de *Migonemyia migonei* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) em condições experimentais. 2019. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) -

- Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, 2019.
68. SAVIOLI, L., SMITH, H., THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the neglected diseases initiative. *Trends in Parasitol.*, v.22, n.5, p.203-208, 2006.
 69. SCHNEIDER, M. Relação entre cães, gatos e zoonoses. Consultor Legislativo da Área XI Meio Ambiente e Direito Ambiental, Organização Territorial, Desenvolvimento Urbano e Regional São Paulo. Estudo Técnico, março-2018.
 70. SEMSA (Secretária Municipal de Saúde). Capital possui cerca de 205,7 mil cães e 62.233 gatos domiciliados, diz Semsas. Animais com sinais de doenças de relevância para saúde pública seguem para eutanásia. 26/05/2017-Disponível em <https://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/centro-de-zoonoses-apreende-63-caes-em-manauas-em-quatro-meses-voluntarios-buscam-adocoes.ghtml> (Acesso em 12.04.2020).
 71. SICUPIRA P.M.L., MAGALHÃES V.C.S., GALVÃO G.S., PEREIRA M.J.S., GONDIM L.F.P., MUNHOZ A.D. Factors associated with infection by *Neospora caninum* in dogs in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.185, n.2-4, p.3-5-308, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.09.029>
 72. SILVA R.E., SAMPAIO B.M., TONHOSOLO R., COSTA A.P., COSTA L.E.S., BASTOS F.A.P., PERANÇA M.A., MARCILI A. Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. *BMC Infectious Diseases*, v.19, p.895-904, 2019.
 73. SILVA, D.A.D. (2012). A função da precipitação no conforto do clima urbano da cidade de Manaus. *Revista geonorte*, 3(9), 22 -. Recuperado de <https://www.periodicos.ufam.edu.br/index.php/revista-geonorte/article/view/2476> (2012).
 74. SINAN, Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2011. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/sinan-net> . Acesso em: 10 de agosto de 2021
 75. TELES, A. P. S., HERRERA, H. M., AYRES, F. M., BRAZUNA, J., & DA ABREU, U., GOMES PINTO. (2015). Fatores de risco associados a ocorrência da leishmaniose visceral na área urbana do município de Campo Grande. *Hygeia : Revista Brasileira De Geografia Médica e Da Saúde*, 11(21), 35. Retrieved from <https://www.proquest.com/scholarly-journals/fatores-de-risco-associados-ocorrencia-da/docview/1756952932/se-2>
 76. THRUSFIELD, M. *Veterinary Epidemiology*. Oxford: Blackwell Science, 2007. 610p.
 77. TRANAS J., HEINZEN R.A., WEISS L.M., McALLISTER M.M., Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, v. 6, p.765 – 767, 1999.
 78. VALADAS S., MINERVINO A.H.H., LIMA V.M.F., SOARES R.M., ORTOLANI E.L., GENNARI S.M. Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum*, anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Leishmania chagasi* in serum of dogs from Pará State, Amazon Brazil. *Parasitol. Res.*, v.107, n.2, p.453-457, 2010.

79. VASCONCELLOS M.C., BARROS J.S.L., OLIVEIRA C.S.D. Parasitoses em cães institucionalizados. Rev. Saúde Pública. v.40, n.2, p.321-323, 2006.
80. VILLEGAS. T. J., FERREIRA, F. Fatores de risco de Leishmaniose Visceral em cães no município de Panorama, estado de São Paulo, SP, Brasil. 2015. 65f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
81. XIAO, L., FENG, Y., 2017. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* sp. and *Giardia duodenalis*. Food and Waterborne Parasitology, vol. 8-9, pp. 14-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fawpar.2017.09.002>. PMID:32095639

ANEXOS

Anexo 1

QUESTIONÁRIO

Animal No. _____

1. Endereço

Nome do Proprietário -

Clinica -

Residência -

Fone -

E-mail –

Clinica de Coleta -

2. Animal

Nome –

Idade –

Sexo –

Raça –

3. **Acesso as ruas** - sim () não ()

4. **Alimentação** - caseira () comercial () mista ()

5. **Contato com outros animais** não () sim ()

Quais –

6. **Vacinas** sim () não ()

7. **Vermífugos** sim () não ()

Qual -

Última dose -

OBSERVAÇÕES -

DATA –

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo OCORRÊNCIA DE *Toxoplasma gondii* E DE PARASITOS INTESTINAIS EM FEZES DE CÃES DA CIDADE DE MANAUS, AMAZONAS. Eu discuti com os responsáveis pelo projeto sobre a minha decisão de permitir a participação do meu animal nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que esta participação é isenta de despesas e que tenho garantido o respeito a meus direitos legais. Concordo voluntariamente em permitir a participação do cão, _____, da raça _____ neste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

----- Data / /

Assinatura do sujeito de pesquisa

Nome:

Identificação:

----- Data / /

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante para a participação neste estudo, conforme preconiza a Resolução CNS 466, de 12 de dezembro de 2012, IV.3 a 6.

Solange Maria Gennari
Doutora em Ciências - Professor Titular
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Medicina e Bem-Estar Animal - UNISA
Data:

Hevila Gabrieli Nascimento de Campos
Pós-Graduanda do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Medicina e Bem-Estar Animal - UNISA
Data:

Anexo 3

CARTA DE INFORMAÇÃO

PROJETO: OCORRÊNCIA DE *Toxoplasma gondii* E DE PARASITOS INTESTINAIS EM FEZES DE CÃES DA CIDADE DE MANAUS, AMAZONAS

Estes esclarecimentos estão sendo apresentados para solicitar sua participação livre e voluntária no projeto OCORRÊNCIA DE *Toxoplasma gondii* E DE PARASITOS INTESTINAIS EM FEZES DE CÃES DA CIDADE DE MANAUS, AMAZONAS, do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Medicina e Bem-Estar Animal da Universidade Santo Amaro - UNISA, que será realizado por HEVILA GABRELI NASCIMENTO DE CAMPOS, aluna de mestrado em Medicina Veterinária sob orientação da Profa. Dra. SOLANGE M. GENNARI, responsável pelo estudo.

O objetivo dessa pesquisa é determinar a ocorrência de parasitas gastrintestinais em cães domiciliados do município de Manaus, Amazonas e analisar possíveis fatores de risco para as infecções.

Uma única amostra de fezes será colhida de cada animal. Solicitaremos que você obtenha a amostra de fezes e a leve à clínica veterinária que está colaborando com o estudo. Também iremos solicitar uma amostra de sangue que será coletada pelo veterinário quando da consulta do animal. Estes procedimentos não oferecem riscos aos animais, que sofrerão um pequeno desconforto somente no momento da contenção para colheita de sangue.

Trata-se de um estudo sobre a presença de importantes parasitas intestinais e teciduais, alguns deles zoonóticos. Não há dados sobre a ocorrência desses parasitas no município de Manaus, tornando esse estudo bastante importante. Nos comprometemos a enviar os resultados dos exames, a você, tutor do animal, e ao colega médico veterinário da clínica colaboradora, em, no máximo, até três meses pós coletas.

Todas as informações fornecidas por você **terão privacidade garantida** pelo pesquisador responsável, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

É garantido o acesso, em qualquer etapa do estudo, aos profissionais responsáveis pela pesquisa para **esclarecimento de eventuais dúvidas ou informações** sobre os resultados parciais da mesma.

A pesquisadora responsável, Profa. Dra. SOLANGE M GENNARI, pode ser encontrada no endereço: Rua Prof. Eneias de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías, São Paulo, SP – Tel: (11) 2141-8687 ou pelo e-mail da pós-graduanda Hevila Gabrieli Nascimento de Campos (email: hevilagabrieli@gmail.com). Caso haja alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNISA) – Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías, SP – Tel.: (11) 2141-8687.

É **garantida a liberdade da retirada de consentimento** a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de qualquer benefício que você tenha obtido junto à Instituição, antes, durante ou após o período deste estudo. Não há **despesas pessoais** para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo os exames que serão feitos com os materiais coletados. Também não há **compensação financeira** relacionada à participação neste estudo. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Uma via deste Termo de Consentimento ficará em poder do tutor participante.

Manaus, _____

Solange M. Gennari

Hevila Gabrieli N. de Campos

