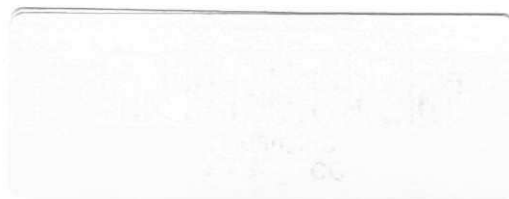


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

MONOGRAFIA

**Soroprevalência e fatores de risco para leishmaniose visceral canina em
Patos, Paraíba, Brasil.**

Maurina Lima Porto



2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

MONOGRAFIA

Soroprevalência e fatores de risco para leishmaniose visceral canina em Patos, Paraíba, Brasil.

**Maurina Lima Porto
Graduanda**

**Prof.^a Dr.^a Marcia Almeida de Melo
Orientadora**

**Patos
Abril de 2010**



Biblioteca Setorial do CDSA. Maio de 2022.

Sumé - PB



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CAMPUS DE PATOS - UFCG

P853s
2010

Porto, Maurina Lima.

Soroprevalência e fatores de risco para leishmaniose visceral canina em Patos, Paraíba, Brasil / Maurina Lima Porto.– Patos: CSTR/UFCG, 2010.

46 p.: il. + anexos.

Inclui bibliografia.

Orientador: Márcia Almeida de Melo.

Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Zoonose– Monografia. 2 – Saúde Publica. I – Título.

CDU: 614

Patos
Abril 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA



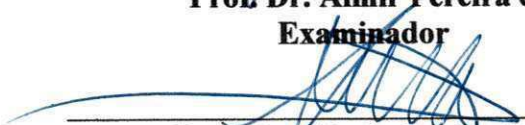
MAURINA LIMA PORTO
Graduanda

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Medico Veterinário.

ENTREGUE EM:/...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

 _____ Prof. Dr. Marcia Almeida de Melo Orientadora	_____ Nota
 _____ Prof. Dr. Almir Pereira de Souza Examinador	<u>10,0</u> Nota
 _____ Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo Examinador	<u>10,0</u> Nota

Dedico este trabalho aos amores, razões da minha vida,
Melquisedeque, Maria do Céu, Mônica, Magna,
Mayara Késsia e Lourenço com muito carinho.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço em primeiro lugar a Deus pelo dom da vida e por estar sempre me protegendo, por me dar força de todos os dias enfrentarem uma nova batalha e por mais difícil e árdua que ela seja. Por me ensinar que as coisas têm seu tempo, que não adianta ser ansiosa ou sofrer com antecedência, pois tudo na vida tem seu tempo.

Aos meus Pais Melquisedeque Porto e Maria do Céu por me darem uma boa educação, por todo amor e dedicação que tens por mim, por todo esforço que fizeram para que pudesse realizar um sonho de infância de se torna Médica Veterinária. Eu sempre lembrarei dos seus olhos de felicidade quando passei no vestibular. Foi duro sair de casa e ficar longe de vocês durante esses cinco anos, mais vocês estarão sempre comigo no meu coração eu amo vocês.

As minhas irmãs Mônica e Magna por serem meu porto seguro, por me defenderem com unhas e dentes de tudo e de todos, por me proporcionarem oportunidades que vocês não tiveram nas suas vidas eu serei eternamente grata. Vocês são um exemplo de determinação, coragem, humildade e sucesso, eu amo vocês.

A minha sobrinha linda Mayara Késsia, que há sete meses vem enchendo nossa família de alegria. Está sendo difícil ficar longe de você, mais titia te ama muito, meu anjinho.

Aos meus avós paternos Doca (*in memória*) e Alaíde e materno Janúncio e Carminha por todo carinho e dedicação.

A minha tia Fátima por toda dedicação e incentivo, que tornou alguns dias dessa jornada mais felizes com suas palavras acolhedoras e sabedoria.

A minha orientadora, Dra. Marcia Almeida de Melo por compartilhar seus conhecimentos, por sua paciência, pelos bons conselhos e amizade, que pra mim é um exemplo de profissionalismo, mãe, mulher e amiga, que nesses anos de convivência foi pra mim muito mais que minha orientadora e sim minha segunda mãe, a qual sempre lembrarei com muito carinho por toda vida, meu muito obrigado!

Ao professor Sérgio Azevedo por ter realizado a estatística desse trabalho.

A todos os meus professores que muito contribuíram para minha formação profissional e pessoal, mais especialmente Solange Absalão (*in memória*), Gildenor Xavier, Márcia Melo, Almir, Pedro Izidro, Verônica, Sônia Lima, Norma Lúcia, Carlos Peña, Patrícia Brandão, Graça Xavier, Nara Geanne, Iara Nunes, Sara Vilar, Sérgio Azevedo.

Aos funcionários da UFCG, em especial a Damião e Tereza, que em muitos momentos foram nossos “anjos da guarda”.

A equipe do Laboratório que ajudaram no desenvolvimento do meu trabalho em especial à Aline, Gilzane e Kamila pela amizade.

À minha turma, pelos cinco anos de convivência que me ensinaram a conviver com as diferenças e especialmente a quem tenho um carinho especial, Sabrina e Gilzane, que mesmo ocupadas com suas monografias encontraram tempo para fazer coletas comigo para que meu trabalho pudesse ser apresentado a tempo. Syduane, Juliana Molina, Roberta, Danelly, Clara, Andréia, Elaine, Genezino. A Allyson, Cícero, Ariclones, Temístocles que além da convivência todos os dias na sala de aula só nos sabemos as dificuldades que passamos como residentes para terminar o curso, na qual foi mais fácil tendo vocês como amigos.

As minhas companheiras de quarto Dulciana, Carol, Adjane, Kesia e Erileide que me e receberam com todo carinho e tiveram paciência comigo, na qual se tornaram minha família durante esse período.

A Cheila Deisy que durante esses quatro anos se tornou mais que uma amiga e sim minha irmã, já passamos por tantas dificuldades, tantas noites em claro estudando e na maioria das vezes conversando; dividimos tudo nesse tempo as alegrias, tristezas, conquistas. Você foi um anjo que Deus colocou na minha, hoje eu sei que os grandes e eternos amigos não necessariamente conhecemos na infância, mas em todas as fases da vida.

A meu namorado Lourenço que foi meu alicerce, que foi capaz de deixar seus sonhos para que eu realizasse os meus, que esteve sempre ao meu lado durante todo o curso, passou várias noites acordado comigo para que eu tivesse forças para estudar, na qual explodiu de alegria a cada conquista minha durante esses cinco anos e teve toda paciência do mundo para suportar meus dias de estresse e mal humor. Você foi o melhor presente que Deus me deu nesses últimos cinco anos, você é muito mais que meu namorado é meu amigo, companheiro, irmão é simplesmente minha alma gêmea. Quero passar o resto dos meus dias ao seu lado.

Sumário

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	08
LISTA DE TABELAS.....	09
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Histórico.....	13
2.2 Epidemiologia.....	14
2.3 Agente Etiológico e Classificação.....	16
2.4 Vetor e Ciclo Biológico.....	17
2.5 Reservatório.....	20
2.6 Sinais Clínicos.....	20
2.7 Diagnóstico.....	21
2.8 Tratamento.....	23
2.9 Controle e Prevenção.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Localidade.....	26
3.2 Amostragem.....	26
3.3 Animais.....	27
3.4 Coleta do Material.....	27
3.5 Questionário Epidemiológico.....	28
3.6 Diagnósticos Sorológico.....	28
3.7 Análises dos Fatores de Risco Associados à Soropositividade para Leishmaniose Visceral Canina.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5 CONCLUSÃO.....	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
7 ANEXOS.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1 – Distribuição mundial dos casos de leishmaniose visceral humana	14
Figura 2 – Forma amastigota da leishmania	17
Figura 3 – Forma promastigota da leishmania	17
Figura 4 – Vetor da leishmaniose visceral <i>Lutzomyia longipalpis</i>	18
Figura 5 – Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	19
Figura 6 – Resultados da prevalência do calazar canino no município de Patos-PB	30

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1- Análise univariada de fatores de risco associados com a soropositividade para leishmaniose visceral em 138 cães do município de Patos, Paraíba.	32
Tabela 2 – Fatores de risco com a soropositividade para leishmaniose visceral em 138 cães do município de Patos, Paraíba, estimados por regressão logística múltipla.	33

RESUMO

PORTO, MAURINA LIMA. Soroprevalência e fatores de risco para leishmaniose visceral canina em Patos, Paraíba, Brasil. Patos, UFCG. 2010, 48 p.(Monografia do Curso de Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal).

A leishmaniose visceral canina é uma zoonose maior prevalência na região nordeste. Vários fatores epidemiológicos contribuem para a sua expansão e o convívio com o cão é um fator de risco importante no aparecimento dos casos humanos. O objetivo do presente trabalho foi verificar a prevalência de leishmaniose visceral canina em cães domiciliados e os fatores de risco associados à infecção no município de Patos, Paraíba, Brasil. Um questionário foi aplicado aos proprietários de 138 cães e sangue dos animais foi coletado para realização do ELISA S7 recombinante. A prevalência encontrada foi 7,2%. Os fatores de risco associados com a soropositividade dos animais foram, coabitação com animais silvestres (*odds ratio* = 12,13; IC 95% = 1,64 – 89,92; $p = 0,015$) e a frequência de limpeza do local onde os animais permaneciam (*odds ratio* = 6,07; IC 95% = 1,12 – 32,91; $p = 0,037$). Esses resultados são preocupantes já que os casos de leishmaniose visceral humana precedem os casos do calazar canino, sendo um indicativo para que medidas de controle do calazar canino sejam retomadas pelos órgãos competentes do município.

Palavras-chave: calazar, ELISA, epidemiologia, Nordeste, Brasil

ABSTRACT

PORTO, MAURINA LIMA. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in Patos, Paraiba, Brasil. Patos, UFCG. 2010, 48 p.(Monography – Preventive Veterinary Medicine)

Canine visceral leishmaniasis is a zoonotic disease that has the higher prevalence in the northeast region. Several epidemiological factors contribute to its expansion and to living with dogs is an important risk factor for increasing human cases. The aim of this study was to assess the prevalence of canine visceral leishmaniasis in dogs and to evaluating the risk factors associated with the disease in Patos, Paraiba, Brazil. A questionnaire was administered to owners and it was collected blood of 138 dogs to performing the ELISA recombinant S7. The prevalence was 7.2% and the risk factors associated with animal seropositivity were cohabiting with wild animals (odds ratio = 12.13, 95% CI = 1.64 to 89.92, $p = 0.015$) and frequency of cleaning the place where the animals remained (odds ratio = 6.07, 95% CI = 1.12 to 32.91, $p = 0.037$). These results are worrying and an indicator that visceral leishmaniasis control measures should be taken up by the local government.

Key words: kala-azar, ELISA, epidemiology, northeast region, Brazil.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose parasitária causada pelo protozoário flagelado *Leishmania chagasi*. Ela acomete o homem e o cão, além de alguns animais silvestres, sendo transmitida por dípteros como *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, flebotomíneos vulgarmente conhecidos como mosquito palha, tatuquira e birigui. É uma doença de grande relevância para saúde pública, tendo nas duas últimas décadas deixado de ser uma doença eminentemente rural e passado a ser endêmica na periferia dos grandes centros urbanos do Nordeste e mesmo em bairros mais urbanizados na região Sudeste.

Os reservatórios são os mamíferos, principalmente os canídeos, como as raposas, no ciclo silvestre, e os cães, no ciclo rural e urbano. Devido à estreita convivência do cão com o homem, o cão é peça fundamental para a transmissão da doença, principalmente porque o animal parasitado e assintomático é uma eficiente fonte de infecção para o vetor.

A sorologia pela reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e pelo ensaio Imunoenzimático (ELISA) são as técnicas mais utilizadas no diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina, no entanto nenhuma delas é 100% específica e sensível.

O tratamento da doença no homem é a base de antimoniais pentavalentes; no entanto, o cão não mostra uma resposta terapêutica satisfatória porque não ocorre a eliminação do parasito, mas apenas uma regressão temporária na sintomatologia clínica, podendo ocorrer recidivas.

A leishmaniose visceral é mais prevalente no Nordeste do Brasil, em especial nas áreas agrestinas e sertanejas, e numa estreita faixa litorânea entre o norte de Salvador e Natal. A distribuição da doença acompanha a do inseto vetor, que na região é a *Lutzomyia longipalpis*. Não há uma estatística confiável dos casos humanos na última década, mas a incidência da doença no homem parece estar aumentando.

Patos está em uma região endêmica, que há 10 anos não há realização de inquéritos sorológicos na população canina, este trabalho objetivou determinar a prevalência e fatores de risco para leishmaniose visceral na população domiciliar canina da cidade de Patos-PB.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

A leishmaniose humana foi descrita pela primeira vez na Grécia em 1835 e em seguida na Índia em 1869. Por causar aumento de pigmentação na pele e febre recebeu o nome de Kala-jwar ou Kalazar, que significa febre negra (MARZOCHI et al., 1981). Anos mais tarde, William Boog Leishman e Charles Donovan isolaram o protozoário do baço de um soldado indiano e de uma criança, respectivamente (LEISHMAN, 1903). Ronald Ross criou o gênero *Leishmania* em homenagem a Leishman e Donovan, o agente causador do calazar foi denominado *Leishmania donovani* (PESSÔA & MARTINS, 1988; REY, 2001).

Presat em, 1905, sugeriu que o díptero responsável pela transmissão da doença no Oriente era um flebotomíneo (CABRERA, 1999). Em 1908, na Tunísia, Nicolle e Comte encontraram o parasito em cães, sugerindo que o mesmo participava do ciclo epidemiológico (NICOLLE & COMTE, 1908).

O primeiro a descrever a ocorrência de um caso de leishmaniose visceral em humanos nas Américas foi Migone em 1913, após realizar necropsia de um paciente originário do Brasil (Boa Esperança – MG), mas falecido no Paraguai (MIGONE, 1913). Em 1934, Penna observou formas amastigotas do parasito em lâminas histológicas do fígado de pacientes que faleceram com suspeita de febre amarela, no Nordeste do Brasil (BADARÓ & DUARTE, 1996).

Em 1937, Evandro Chagas foi o primeiro a observar a doença no cão e no homem e a infecção do flebotomo *Lutzomyia longipalpis*, classificando o parasito como *Leishmania chagasi* (BADARÓ E DUARTE, 1996). Em 1956, Deane aponta o cão e a raposa como reservatórios naturais do parasito em áreas endêmicas e caracteriza a doença como zoonose (DEANE, 1956).

O primeiro surto da doença foi registrado em Sobral, no Ceará (DEANE, 1956). Nas décadas de 80 e 90, a leishmaniose visceral se espalhou por todo território nacional; a doença, que antes era restrita à zona rural da região Nordeste, alcançou as periferias dos grandes centros urbanos nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (BRASL, 2003).

O combate sistêmico ao calazar no Ceará e em outros Estados iniciou-se na década de 50 pelo Departamento Nacional de Endemias (DNERU), sendo interrompido

em 1964. Em 1980 foram retomados os trabalhos de controle através da antiga SUCAM, Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (BRASIL, 2006).

Através do Decreto nº 100 de 16 de abril de 1991, foi criada a Fundação Nacional de Saúde (FNS) que, entre outras atribuições, tinha a finalidade de implementar atividades para o controle de doenças e outros agravos à saúde. Entretanto, em 1999, através da Portaria nº 1399, a atribuição de execução das medidas de controle passou para a responsabilidade dos Estados e do Municípios, cabendo a atual FUNASA a “coordenação nacional das ações de Epidemiologia e Controle de Doenças”.

2.2 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a LV é uma das sete endemias mundiais e afeta de 1 a 2 milhões de pessoas a cada ano. Estima-se que cerca de 360 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção no mundo. Ocorre em 47 países e tem como agente etiológico três espécies: *Leishmania donovani* na Índia e leste da África; *Leishmania infantum* na China, Ásia central, Europa e África; *Leishmania chagasi*, na América do Sul e Central (CAMARGO et al., 2007) (Figura 1).

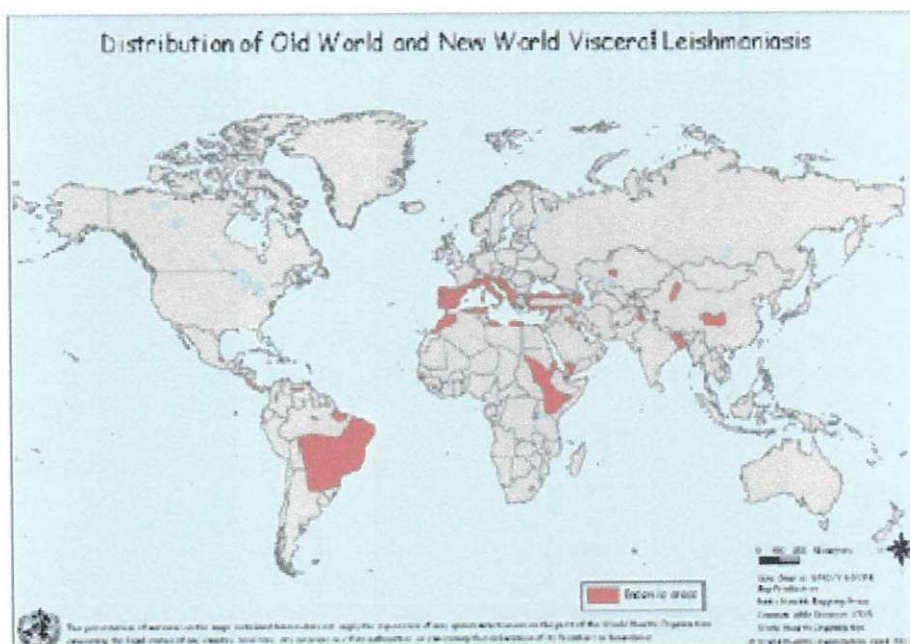


Figura 1 – Distribuição mundial dos casos de leishmaniose visceral humana.
Fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html

A leishmaniose visceral, tanto canina quanto humana, encontra-se em expansão no Brasil, sendo ausente apenas na região sul. Atualmente tem sido considerada uma doença re-emergente, caracterizando-se por processo de transição epidemiológica. Vários fatores epidemiológicos são citados para justificar o aumento da incidência: áreas que se urbanizam rapidamente nas regiões do Nordeste e Sudeste. O convívio próximo com o cão, constante processo migratório, o desmatamento acentuado e a ocupação das matas residuais e encostas nos centros urbanos (CAMARGO et al., 2007; IESBICH, 2008; MARZOCHI, 1989) e o aumento do número de vetor. Além do êxodo rural e o aumento da população urbana, outros fatores servem de estímulo para domiciliação do vetor como as questões socioeconômicas e as condições higiênico-sanitárias da população (WHO, 2002).

A região Nordeste é a que tem a mais alta prevalência. Amora et al (2006) avaliou 198 cães áreas endêmicas no Rio Grande do Norte dos 68 animais da zona rural 45% são positivos e dos 136 da zona urbana 35% são positivos. Matos et al (2006) realizando estudo de prevalência em cães com sintomatologia clínica sugestiva de leishmaniose visceral atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) dos 139 animais analisados 39 (28%) foram positivos. Entre estes, 58% estavam na faixa etária de 3 anos e eram provenientes da zona urbana da cidade de Mossoró. Dessa forma, a LV canina em Mossoró apresentou-se como uma doença urbana de animais adultos jovens.

Em um inquérito sorológico realizado nos distritos de Itapuã, Cajazeiras e Pau da Lima, pertencentes ao município de Salvador dos 811 cães analisados apenas 6 (0,7%) foram soropositivos no Elisa e RIFI (BARBOZA, 2009). Por outro lado, em São Luiz-MA de 62 cães analisados, 33 (51,61%) foram positivos sendo 18 (36,68%) eram polissintomáticos, 9 (38,41%) oligossintomáticos e 6 (26,13%) assintomáticos (SILVA ABREU, 2008).

Alves et al (1998) em um levantamento epidemiológico realizado em Fortaleza-CE de 811 cães apreendidos pelo Centro de Controle de Zoonoses, obtiveram 14 (1,59%) animais positividade pelo RIFI. Na cidade de Caicó-RN, a prevalência de leishmaniose visceral dos 358 cães domiciliares foi de 5,02%, e dos 70 animais do Centro de Zoonoses 8,5% (BATISTA, 2008).

No Estado de Minas Gerais, a prevalência tem aumentado nos últimos 15 anos. Atualmente Belo Horizonte não possui bairros livres da doença. O mesmo tem se aplicado para outros municípios. Segundo Silva et al (2008) em um inquérito

epidemiológico município Brumadinho-MG, de 772 cães testados pelo RIFI, a prevalência da LVC foi de 22,2% na localidade do Inhotim, 11,0% em Piedade do Paraopeba, 12,3% no São Conrado, 8,0% em Casa Branca e 8,5% na Cohab, indicando que Brumadinho está numa área endêmica e em expansão da LVC, como ocorre em Belo Horizonte. Na cidade Poxoréo-MT em uma avaliação epidemiológica de 1.112 cães domiciliados a prevalência foi de 7,8% (AZEVEDO et al., 2008) e dos 468 cães domiciliares da zona urbana de Cuiabá-MG, 16 (3,4%) foram positivos no RIFI (ALMEIDA, 2009).

Mattos et al (2004) obtiveram 50% de animais positivos de 18 cães apreendidos na rua e recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses em Niterói-RJ.

2.3 Agente Etiológico e Classificação

As leishmanioses são causadas por protozoários pertencentes ao reino Protista, filo Protozoa, subfilo Sarcomastigophora, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (URQUHART et al., 1998).

A classificação das espécies é baseada em características morfológicas, isoenzimáticas, localização nos tecidos do hospedeiro, patogenicidade e tipo de lesão que produz, além de critérios clínicos e epidemiológicos. Atualmente são conhecidas 30 espécies de *Leishmania*, sendo aproximadamente 20 patogênicas para o homem (ASHFORD, 2000).

A partir desses critérios, três espécies causam a leishmaniose visceral: a *Leishmania donovani*, na Ásia; a *Leishmania infantum* na Ásia, Europa e África e a *Leishmania chagasi*, nas Américas (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

A forma amastigota da leishmania é oval, com comprimento de 2,5 a 5µm, largura 1,5 a 2µm e se mantém no interior do macrófago. O cinetoplasto em forma de bastão está associado a um flagelo rudimentar (URQUHART et al., 1998). A reprodução é por divisão binária no interior da célula (GREENE, 2006), mas já foi relatada a possibilidade de reprodução sexuada do protozoário (KREUTZER et al., 1994; YOUSSEF et al., 1997) (Figura 2).

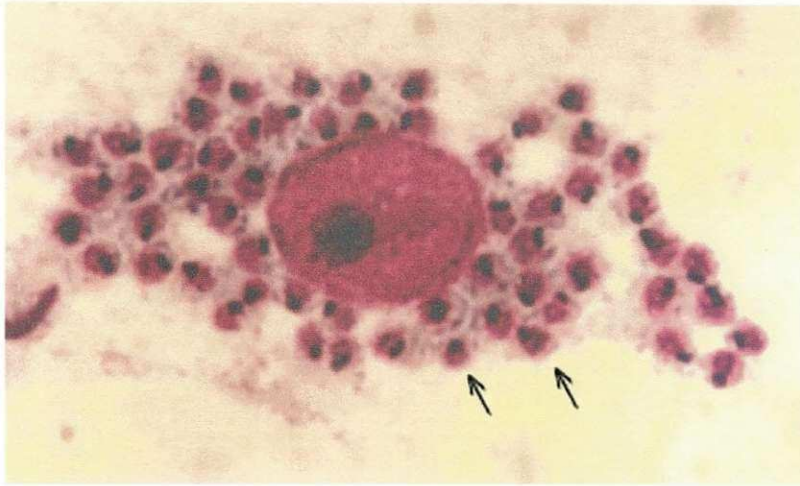


Figura 2 – Forma amastigota da Leishmania.
 Fonte: www.ufrgs.br/.../Protozoa/Imagens/amastlei.jpg

A forma promastigota caracteriza-se por ser alongada, com núcleo único, um flagelo anterior e um cinetoplasto. Esta forma é a encontrada no intestino do inseto. (URQUHART et al., 1998) (Figura 3).



Figura 3- Forma promastigota da Leishmania.
 Fonte: <http://www.jornalivre.com.br>

2.4 Vetor e Ciclo Biológico

Os vetores da leishmaniose visceral são dípteros da família Psychodidae, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados (DANTAS-TORRES et al., 2007).

No Brasil, a distribuição geográfica de *L. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão. Esta espécie é encontrada em quatro das cinco regiões geográficas: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste. São conhecidos popularmente como mosquito-palha, birigui e tatuquira, caracterizados pelo pequeno porte, 1 a 3 mm de comprimento, com corpo e patas cobertas de cerdas; mantêm as asas em posição vertical quando em repouso (Figura 4). A atividade noturna é predominante e as fêmeas apresentam maior importância epidemiológica por serem hematófagas. Com a urbanização, esses vetores têm sido encontrados em ambiente peridomiciliar e domiciliares (FEITOSA, 2002; PRATA & SILVA, 2005).



Figura 4- Vetor da leishmaniose visceral *Lutzomyia longipalpis*.

Fonte: <http://www.memorias.ioc.fiocruz.br>

As espécies *L. cruzi* (SANTOS et al., 1998) e *L. forattinii* (PITA-PEREIRA et al., 2005) foram incriminadas como vetores no estado de Mato Grosso do Sul.

O ciclo biológico da *L. longipalpis* ocorre em ambiente terrestre e o inseto possui quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (BRASIL, 2004). Após a cópula, os ovos ficam sobre o solo úmido e eclodem após 7 a 10 dias. Em condições ambientais ideais, dentro de 20 a 30 dias alcançam o estágio de pupa, que são mais resistentes as variações climáticas; dentro de duas semanas o ciclo está completo (BRASIL, 2003).

A infecção do vetor ocorre quando a fêmea suga o sangue do mamífero contaminado ingerindo as formas amastigotas de *Leishmania* spp existentes no interior dos macrófagos. Na porção média do tubo digestivo do inseto, as amastigotas se reproduzem por divisão binária, transformam-se em promastigota, e estas se

multiplicam rapidamente até originarem as promastigotas metacíclicas infectantes; esta fase dura de 3 a 4 dias (BRASIL, 2003).

Através de um novo repasto sanguíneo, as fêmeas dípteras, inoculam junto à saliva as formas promastigotas metacíclicas infectantes em um novo hospedeiro. Na epiderme do hospedeiro estas formas são fagocitadas pelos macrófagos e no interior do vacúolo transformam-se em amastigotas e multiplicam-se até rompê-los. As amastigotas são fagocitadas por novos macrófagos e ocorre a disseminação hematogênica para os tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (URQUHART et al,1998; BRASIL, 2003). O ciclo de transmissão está representado na Figura 5.

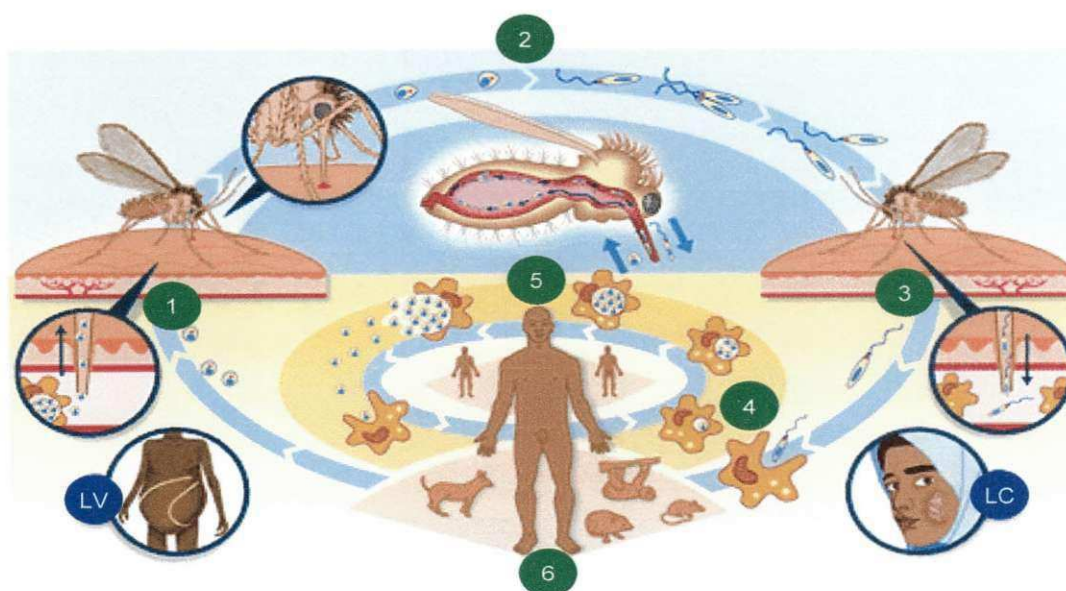


Figura 5 - Ciclo de vida da *Leishmania*. 1. O flebótomo ingere macrófagos contendo amastigotas de um mamífero infectado; 2. As amastigotas, no interior do tubo digestivo do inseto, transformam em promastigotas procíclicas, que se multiplicam e aderem ao epitélio do trato digestivo. Após 7 a 15 dias, as metacíclicas infectantes para o hospedeiro vertebrado aparecem na luz do tubo digestivo; 3. Ao se alimentar em outro mamífero, o flebótomo regurgita parte do conteúdo do trato digestivo inoculando as formas metacíclicas na pele do hospedeiro; 4. Estas são fagocitadas, transformam-se de volta em amastigotas e proliferam no fagolisossomo da célula fagocítica; 5. O rompimento das células infectadas libera amastigotas, que vão infectar novas células. 6. O homem e vários outros mamíferos participam do ciclo, incluindo roedores, edentados, marsupiais e canídeos.

Fonte: www.who.int/tdr

2.5 Reservatório

No geral, os reservatórios do parasito são mamíferos, principalmente canídeos, sendo os mais importantes a raposa, no ciclo silvestre e rural e o cão, no ciclo rural e, particularmente, nas áreas urbanas (ASHFORD, 1996).

No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No Brasil, as raposas foram encontradas infectadas nas regiões Nordeste e Norte (BRASIL, 2004). Duas espécies de raposas foram encontradas naturalmente infectadas *Lycalopex*(ou *Dusicyon*) *vetulus* no Ceará (DEANE, 1956) e *Cerdocyon thous* no Pará (LAINSON et al., 1990; COURTEUAY et al., 1996). Apesar da infecção natural ser observada em raposa, de acordo com Courtenay et al (2002), a espécie *C. thous* não é um reservatório importante para a infecção do flebótomo e, conseqüentemente, não participa no ciclo epidemiológico da doença no cão doméstico.

Os marsupiais didelfídeos foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (BRASIL, 2003). No Brasil a *L. chagasi* foi isolada em marsupiais da espécie *Didelphis albiventris* na Bahia (SHERLOCK et al., 1984) e no Rio de Janeiro (CABRERA et al., 2003).

O cão adquiriu grande importância como reservatório da *Leishmania chagasi* no ambiente doméstico devido a sua convivência estreita com o homem. A elevada ocorrência de infecções inaparentes e oligossintomáticos nestes animais, associada ao intenso parasitismo cutâneo, faz do cão uma fonte de infecção preferencial para o vetor, sendo importante na transmissão da doença para o homem (FEITOSA et al., 2000).

2.6 Sinais Clínicos

A leishmaniose visceral é a forma mais grave das leishmanioses, sendo de evolução crônica, sistêmica e fatal se não tratada. Clinicamente as manifestações apresentadas pelo cão e homem doentes são similares, apresentando sinais inespecíficos como febre irregular, anemia, perda de peso progressiva e caquexia (FEITOSA et al., 2000).

Quanto as manifestações clínicas, o cão infectado pode ser assintomático, quando não apresentam sinais clínicos sugestivos de infecção; oligossintomáticos, quando há presença de linfadenopatia, leve perda de peso e alterações dermatológicas; e

sintomático, onde alguns ou todos sinais comuns da doença são evidentes, como: alterações dermatológicas (alopecia, descamação, hiperqueratose, espessamento e nódulos intradérmicos sobre o focinho, as orelhas externas e coxins), bem como linfadenopatia, esplenomegalia, emagrecimento acentuado, uveíte, ceratoconjuntivite (ETTINGER & FELDMAN, 2004).

Raramente ocorre cura espontânea. A recuperação depende da resposta imunológica celular, e se isto não ocorre, as lesões persistem resultando em aumento do baço, fígado e linfonodos (URQUHART, 1998).

2.7 Diagnóstico

Várias técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana e canina, devido aos avanços que têm ocorrido nos últimos anos, no entanto nenhum dos testes disponíveis apresenta 100% de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da leishmaniose visceral (GONTIJO & MELO, 2004).

Os exames diretos de material colhido do paciente e as culturas foram os primeiros ensaios diagnósticos e ainda são bastante utilizados. O cultivo de aspirado de baço é mais eficiente do que quando a cultura é feita com amostras de medula óssea ou linfonodo (SIDDIG et al., 1988). A sensibilidade do método depende do grau de parasitemia, do material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina. Em condições ideais a cultura pode atingir elevados índices de positividade, entretanto, a coleta é invasiva, causando desconforto ao paciente, além de necessitar de um profissional extremamente capacitado para realização da mesma e demandar um longo tempo para a resposta (PIARROUX et al., 1994).

Os linfonodos de escolha para pesquisa direta são: o poplíteo e pré-escapulares, que normalmente permite a detecção de 30% dos casos positivos de leishmaniose. Para a punção de medula óssea os locais de escolha são: o fêmur, crista ilíaca, externo e tibia, permitindo uma detecção de 60% de casos positivos que ocorre pela elevada concentração de amastigotas nesse tecido (CAMPILLO et al., 1999). A biópsia de pele para visualização do parasito é realizada quando se tem lesões na pele a punção no baço deve ser realizado quando o animal apresentar esplenomegalia permitindo uma detecção de quase 100% de positividade, no entanto ela exige pessoas treinadas além de trazer varias complicações para o animal (CAMPILLO et al., 1999).

Em relação ao método indireto, podemos destacar dois procedimentos: o isolamento de *Leishmania* em meio de cultura onde o parasita multiplica-se até serem visualizadas, por observação microscópica, as formas promastigotas de leishmania, outro método e a inoculação em animais de experimentação para isso é necessário uma amostra de tecido macerado procedente do animal suspeito, que posteriormente será inoculado em animais de laboratório susceptíveis. O animal de eleição é o hamster (*Mesocricetus auratus*), e a inoculação da amostra realiza-se intraperitonealmente, multiplicando-se de tal forma que ao fim de 3 a 4 semanas se podem observar as formas amastigotas nos macrófagos peritoneais (CAMPILLO et al., 1999). Estes métodos de diagnóstico são limitados pela baixa sensibilidade e por resultados frequentemente inconclusivos (GOMES et al., 2008).

Os testes sorológicos são largamente empregados na detecção de anticorpos pois a doença promove uma estimulação policlonal de linfócitos B que resulta em uma grande produção de anticorpos. No Brasil, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é o teste de escolha nos levantamentos epidemiológicos de leishmaniose visceral na população canina, com o sangue coletado originalmente em papel de filtro. Entretanto o Ministério da Saúde recomendou a substituição da sorologia utilizando o eluato do papel de filtro pela convencional com soro (COSTA e VIEIRA, 2001). A imunofluorescência indireta tem sido o método mais comumente utilizado por sua alta sensibilidade de 98 a 99,2% e boa especificidade de 70 a 94% (MAIA, 2005). Uma das principais limitações dessas técnicas é a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, Doença de Chagas, malária em áreas endêmicas para essa enfermidade em humanos (SUNDAR & RAI, 2002). Devido a problemas na produção do antígeno (suspensão de promastigotas) em larga escala, há uma tendência à substituição da RIFI pelo ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – Ensaio de Imunoadsorção Enzimática).

Uma preferência crescente pelos ensaios imunoenzimáticos (ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) tem sido observada nos laboratórios de diagnóstico em todo o mundo, por permitirem testar um grande número de amostras, com elevada sensibilidade e especificidade, utilizando antígeno recombinante ou mesmo antígenos totais do parasito. Os resultados do ELISA com soro e com eluato de papel de filtro parecem concordar, o que facilita a coleta do sangue canino para exame (ROSÁRIO et al., 2005). Além do laboratório da Fundação Oswaldo Cruz, responsável pela distribuição gratuita do kit de imunofluorescência para o diagnóstico do calazar canino

por órgãos públicos (Biomanguinhos - <http://www.bio.fiocruz.br/>), apenas um segundo kit, na forma de um teste ELISA baseado na fração carboxi-terminal da HSP70 de *Leishmania chagasi*, está autorizado pelo Ministério da Agricultura para utilização no diagnóstico sorológico do calazar canino no Brasil (Biogene Ind. Com. Ltda – <http://www.biogene.ind.br>).

O teste de imunocromatografia, inicialmente denominado TRALd (Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani*) e hoje vendido com o nome comercial de IT-LEISH®¹, também baseado no antígeno recombinante rK39, foi avaliado por França-Silva (1997) em uma amostra de 1798 cães, utilizando como padrão ouro a reação de imunofluorescência indireta. A sensibilidade obtida foi de 92,16% e especificidade de 99,52%.

O Western Blotting (WB) é mais sensível e específico quando comparados com o RIFI e ELISA, no entanto é mais laboriosa e não apropriada para avaliação de grande número de amostras (AISA et al., 1998).

Dentre os métodos moleculares, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) é a que mais vem sendo utilizada em trabalhos visando o diagnóstico e monitoramento da leishmaniose (GOMES et al., 2008) mas embora possua elevado potencial diagnóstico, ainda não ganhou o mercado para as leishmanioses pois necessita de laboratórios bem equipados e habilidade técnica (BENSOUSSAN et al., 2006; SALOTRA & SINGH, 2005; MARY et al., 2004). Esta técnica baseia-se na amplificação *in vitro* de sequências de nucleotídeos específicas presentes no parasito, sendo um método sensível e específico para detectar DNA de *Leishmania* spp, em ampla variedade de amostras clínicas do homem, cães, reservatórios silvestres e vetores (GOMES et al., 2008).

O desenvolvimento de ensaios sorológicos baseados em antígenos definidos foi e continua sendo um paradigma da busca por melhores métodos diagnósticos para as leishmanioses.

2.8 Tratamento

No Brasil, desde 1939, o tratamento para leishmaniose visceral em humanos é realizado com antimoniais pentavalentes sendo o antimoniato de n-metil glucamina o de primeira escolha (DEANE, 1939). No entanto essa droga é tóxica, tem ação sobre o

¹ DiaMed IT-LEISH®

aparelho cardiovascular e não é aconselhável o uso nos dois primeiros trimestres de gravidez (BRASIL, 2003).

Podem ser utilizadas drogas alternativas como a anfotericina B e suas formulações lipossomais (anfotericina B lipossomal e anfotericina B-dispersão coloidal), as pentamidinas (sulfato e mesilato) e os imunomoduladores (interferon gama). Em função da toxicidade, a administração dessas drogas só deve ocorrer em hospitais de referência.

A miltefosine, uma droga ainda não utilizada no Brasil, promoveu cura de 95% no calazar indiano. Ela tem como vantagem o uso oral e é bem tolerada, embora seja potencialmente teratogênico, o que limita sua utilização por grávidas (BRASIL, 2006 & BRASIL, 2007).

A sensibilidade de amastigotas e promastigotas à miltefosina foi avaliada *in vitro* em seis espécies do parasita e entre todas elas a mais sensível foi a *L. donovani* (ESCOBAR et al., 2002). Quando a droga foi utilizada em humanos na América Central e do Sul, houve 91% de cura no tratamento de *L. panamensis*, de 53% para *L. braziliensis* e *L. mexicana* na Guatemala e acima de 75% na Bolívia (SOTO e TOLEDO, 2007).

O cão se demonstra mais resistente ao tratamento do que o homem (GREENE, 2006). Por isso o tratamento em cães é uma questão difícil, por ser demorado, de custo elevado é parcialmente eficaz, pois na maioria das vezes não se consegue a eliminação do parasita, ocorre só uma regressão dos sinais clínicos e diminuição no tempo em que o cão pode infectar o flebotomíneos. As recidivas podem ocorrer de seis meses à dois anos após o término do tratamento, além de levar o risco de selecionar parasitas resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humanos (BRASIL, 2006).

Quando a miltefosina é utilizada em cães, são observados os mesmos efeitos colaterais que ocorrem no homem como: náusea, vômitos e redução da contagem de células sanguíneas. Mas apesar de através da mesma droga ter se obtido sucesso no tratamento humano para calazar, em cães a droga não obteve sucesso no tratamento, reduzindo apenas o número de parasitos nos linfonodos mas não no sangue (MANNA et al., 2009).

A portaria interministerial nº 1.426 de 11 de Julho de 2008, considerando todos os problemas ao tratamento de cães infectados, proíbe em todo território nacional, o tratamento da leishmaniose visceral em cães infectados ou doentes, com produtos de uso humano ou produtos não-registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e

Abastecimento (MAPA), aplicando-se ao Médico Veterinário infrator as infrações e penalidades do Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, no artigo nº 268 do Código Penal e as infrações e penalidades previstas na Lei No-6.437, de 20 de agosto de 1977, e no Decreto-Lei No-467, de 13 de fevereiro de 1969

2.9 Controle e Prevenção

O controle da leishmaniose canina está intimamente ligada ao controle da leishmaniose no homem (CAMPILLO et al., 1999). Este consiste em interromper a cadeia de transmissão (BRASIL, 2006). O controle do vetor depende das características epidemiológicas e entomológicas da região, esse controle pode ser químico realizando pulverizações com veneno nas paredes internas e externas e nos tetos das casas. Ele deve ser realizado no final do período chuvoso onde a população de insetos é maior, tendo eficácia por 3 meses após a borrifação; os produtos mais utilizados são a cipermetrina e a deltamitrina (BRASIL, 2006).

No Brasil, estas ações foram sempre descontínuas por razões como problemas orçamentários e escassez de recursos humanos adequadamente treinados. Estas medidas não atingiram os efeitos esperados ocorrendo reinfestações dos ambientes e ressurgimento de casos humanos e caninos de LV (GONTIJO, 2004).

Com relação aos reservatórios, a medida de controle utilizada no ciclo urbano ou rural é a realização de inquéritos soropidemiológicos identificando os animais positivos e realizando a eutanásia dos mesmos (LEÃO, 1997). Em áreas endêmicas a utilização de coleiras impregnadas com deltamitrina pode diminuir a taxa de infecção canina, por evitar que o vetor não se aproxime do reservatório (MANZILLO et al., 2006). Recomenda-se também a colocação de telas e malhas finas nos canis impregnados com inseticida nas residências, hospitais veterinário e petshop (BRASIL, 2006).

Em alguns estudos, a eliminação de cães soropositivos de uma região não tem diminuído a taxa de infecção em humanos. Esses dados sugerem que, nestes casos, a eliminação de cães sem o controle do vetor, não seja suficiente para impedir a disseminação, da infecção. Além das medidas citadas são realizadas também ações educativas junto à população, considerando-se os aspectos sociais e culturais, para

garantir a compreensão e o envolvimento da comunidade nas ações de vigilância e controle da doença nos seus vários aspectos (BRASIL, 2006).

A prevenção dos cães através da imunoprofilaxia é uma das poucas alternativas de controle, pois não existe tratamento eficaz ou profilático para os cães infectados. Em 2003 o laboratório Fort Dodge lançou no mercado a Leishmune® sendo uma vacina de segunda geração inativada feitas de extratos de promastigota da *Leishmania donovani*. Estudos realizados em áreas endêmicas apresentaram uma proteção de 92% à 95% (NOGUEIRA et al., 2005). No entanto o Ministério da Saúde não autoriza a utilização desta para o controle da leishmaniose visceral canina no Brasil, porque ainda estão faltando estudos em relação ao impacto que esta causa no controle da incidência da doença em humanos e cães (BRASIL, 2004).

Em 2008, foi lançada uma nova vacina contra leishmaniose visceral canina a Leish-Tec® desenvolvida pela Hertape Calier Saúde Animal S/A. Ela é composta por um antígeno recombinante da *Leishmania donovani* A2 e o adjuvante saponinas. A proteína A2 é um fator de virulência do parasito, sendo considera como melhor antígeno capaz de induzir uma resposta imune protetora no animal. Ela foi capaz de induzir uma proteção significativa contra a infecção provocada por *L. donovani*, *L. amazonensis* e *L. chagasi* tanto em camundongos como em cães (HERMONT, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localidade

O trabalho foi realizado no período de fevereiro à abril de 2010 no município de Patos, sertão da Paraíba, a 360 km da capital João Pessoa. É caracterizada por apresentar clima BSH de acordo com a classificação de Köpper, com temperatura anual média máxima de 32,9 °C, mínima de 20,8 °C e umidade relativa de 61%.

3.2 Amostragem

Para o cálculo do número de animais a serem utilizados, foram considerados os seguintes parâmetros: (a) prevalência esperada; (b) erro absoluto; e (c) nível de

confiança, de acordo com a fórmula para amostras aleatórias simples (NOORDHUIZEN et al., 1997; THRUSFIELD, 1995):

$$n = \frac{Z^2 \times P(1 - P)}{d^2}$$

Onde:

n = número de animais a serem utilizados

Z = valor da distribuição normal para o nível de confiança de 95% $\rightarrow Z = 1,96$

P = prevalência esperada $\rightarrow P = 28,2\%$

d = erro absoluto $\rightarrow d = 10\%$

O número de amostra deste trabalho foi calculado baseado na média da prevalência de 3 municípios da região Nordeste (BATISTA, 2008; SILVA et al., 2008; MATTOS et al., 2006), obtendo-se uma prevalência média de 28,2%. De acordo com a fórmula acima, o número de amostra calculado para este trabalho foi de 78 cães, no entanto por motivos de segurança foram utilizadas 141 animais.

3.3 Animais

Fizeram parte da amostra cães domiciliados jovens, a partir de seis meses, adultos e idosos, machos e fêmeas, castrados e inteiros, provenientes de diferentes bairros da cidade. As amostras foram coletas nas residências, com autorização dos proprietários, nos locais com mais de um cão a escolha do animal a ser testado ficou a critério do proprietário.

3.4 Coleta do Material

A coleta do material biológico foi realizada após a contenção física do animal com auxílio de mordças. Em seguida foi realizado o garroteamento e desinfecção do local com álcool iodado. 3 ml de sangue foi coletado por venopunção cefálica ou safena com auxílio de agulhas 25 X 0,8 mm e tubos a vácuo 13 X 75 mm contendo 3,2% de citrato de sódio. Após a colheita o tubo foi agitado delicadamente em um ângulo de 180° de cinco à oito vezes. Todo material utilizado foi individual e descartável. As amostras foram acondicionadas em um isopor com gelo e encaminhado para o Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido localizado no Hospital Veterinário da

Universidade Federal de Campina Grande, campus de Patos – PB. O sangue foi centrifugado durante 5 minutos em velocidade de 450 rpm (rotação por minuto) tendo a finalidade de separar o plasma do sangue total. O plasma foi alicotado em microtubo de 1,5 ml, identificados e congelados a -20°C.

3.5 Questionário Epidemiológico

Os proprietários dos cães responderam a um questionário epidemiológico com o intuito de verificar a ausência ou presença de algumas práticas e condições que pudessem atuar como possíveis fatores de risco para a leishmaniose visceral canina (Anexo 1).

3.6 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico sorológico realizado foi ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática), baseado no reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos fixados no suporte de plástico. O reconhecimento dos animais positivos é visualizado por adição de proteína-A conjugada com peroxidase. O Kit utilizado foi ELISA/S7 recombinante², autorizado pelo Ministério da Agricultura, possuindo uma alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico do calazar canino.

O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante que consiste basicamente em (Anexos 2 e 3):

1. Sensibilizar a placa com 100µl de solução S7 por poço da placa e incubar por 4 horas em temperatura ambiente;
2. Desprezar toda a solução e lavar a placa 3 vezes com 100µl de PBS Tween 20 a 0,05%;
3. Bloquear a placa com 100µl de PBS Tween 20 a 0,05% mais 2% de leite em pó desnatado e incubar por mais 30 minutos à temperatura ambiente.
4. Lavar a placa 2 vezes com tampão PBS Tween 20 a 0,05%.

² Biogene Ind. & Com. LTDA.

5. Diluir os soros teste, controles positivo e negativos a 1:100 em solução de coleta e incubar por 4 horas em temperatura ambiente.
6. Distribuir 100µl dos soros teste, controles positivo e negativos na placa.
7. Incubar a placa por 30 minutos em temperatura ambiente.
8. Lavar a placa 3 vezes com PBS Tween 20 a 0,05%.
9. Diluir o conjugado proteína A-peroxidase na concentração de 1:10000 e distribuir 100µl em cada poço.
10. Incubar por mais 30 minutos em temperatura ambiente.
11. Lavar a placa 3 vezes com PBS Tween 20 a 0,05%.
12. Preparar a solução de revelação (TMB³, H₂O₂, e tampão citrato) e distribuir 100µl por poço.
13. Incubar por 20 minutos no escuro, em seguida adicionar em cada poço duas gotas de solução de parada (H₂SO₄ 2N), realizando a leitura em seguida.

Os soros dos animais que apresentarem resultado suspeito será coletada após 30 dias para realização de um novo teste para observar se houve soroconversão. Para os animais que apresentaram resultados positivos, os proprietários serão notificados. Os resultados também serão notificados à Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde Municipal.

3.7 Análise dos Fatores de Risco Associados à Soropositividade para Leishmaniose Visceral Canina

A análise dos possíveis fatores de risco associados à soropositividade para leishmaniose visceral foi efetuada através dos dados coletados com os questionários epidemiológicos aplicados aos proprietários. As variáveis independentes (possíveis fatores de risco) foram categorizadas e codificadas (LATORRE, 2004).

A análise de fatores de risco foi efetuada em duas etapas: análise univariada e análise multivariada. Na primeira, foram formados dois grupos de animais – soropositivos e soronegativos – que foram comparados frente às variáveis analisadas.

Aquelas variáveis que apresentaram um valor de $p \leq 0,20$ pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher (ZAR, 1999), foram selecionadas e usadas na análise multivariada, utilizando-se a regressão logística múltipla (HOSMER & LEMESHOW,

³ tetrametilbenzidina

2000). A colinearidade entre as variáveis preditoras foi verificada por análise de correlação, e para aquelas que apresentarem forte colinearidade ($p < 0,05$), uma das duas foi excluída da análise múltipla de acordo com a plausibilidade biológica (DOHOO et al., 1996). O nível de significância adotado na análise múltipla foi de 5%. Todas as análises foram realizadas com o programa SPSS 13.0 for Windows.

4 Resultados e Discussão

Dos 141 soros analisado pelo ELISA S7, 3 amostras apresentaram-se na zona cinza, devido ao seu resultado inconclusivo não foram utilizados nesta análise, 10 amostras foram positivas e 128 negativas para leishmaniose visceral que representa uma prevalência de 7,2% (Figura 6).

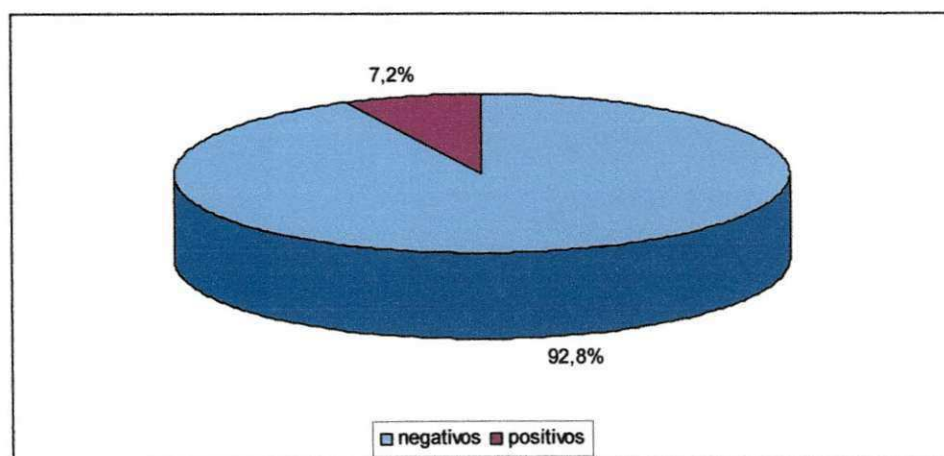


Figura 6 – Resultado da prevalência do calazar canino no município de Patos-PB.

A partir deste resultado, observa-se que a prevalência no município aumentou de 1,1% em 2000 (exame de 2379 cães pelo ELISA S7, Marcia Almeida de Melo, dados não publicados) para 7,2%. Isto pode ser justificado pelo fato das medidas de controle terem passado para a responsabilidade dos Estados e dos Municípios através da Portaria nº 1399 de 1999. A partir de então, o inquérito epidemiológico canino e o sacrifício dos cães positivos deixaram de ser realizados no município.

A prevalência do calazar canino varia bastante em função da região estudada. Azevedo et al. (2008) observaram prevalência de 7,8% na cidade de Poxoréo – MT. Entretanto resultados inferiores foram encontrados por Barbosa et al (2009) em Salvador – BA, Batista (2008) em Caicó – RN, Alves et al (1998) em Fortaleza – CE,

Almeida (2009) Cuiabá – MG que obtiveram 0,7%, 5,02%, 1,59%, 3,4% de positividade, respectivamente.

Resultados superiores foram relatados por Amora et al (2006) no Rio Grande do Norte onde a prevalência na área rural foi 45% e na urbana 34%. Em São Luiz - MA a positividade foi de 51,6% (SILVIA-ABREU et al., 2008). Silva et al (2008) ao avaliarem 772 cães domiciliados em áreas de casos de leishmaniose visceral em humanos obtiveram uma prevalência de 22,2% para LVC, na localidade do Inhotim, 11,0% em Piedade do Paraopeba, 12,3% no São Conrado, 8,0% em Casa Branca e 8,5% na Cohab.

Mattos et al (2006) em Mossoró – RN; que obtiveram 28% de prevalência em animais atendidos no Hospital Veterinário da UFERSA. Batista (2006) encontrou 8,5% de animais reagentes no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Caicó – RN, isto se justifica por serem animais errantes e estarem mais exposto ao vetor. A prevalência observada em animais dirigidos à Hospitais Veterinários e Centros de Zoonoses, normalmente, são superiores as dos respectivos municípios uma vez que quando os cães são levados a estes locais já apresentam alguma lesão sugestiva.

Na análise de fatores de risco para leishmaniose visceral, foram selecionadas na análise univariada: sexo dos animais, contato com animais silvestres, suínos, frequência de limpeza do local de permanência do cão, se há outros animais em casa, se os vizinhos possuem animais e se os animais realizam passeios constantes (Tabela 1). Os fatores de risco identificados na análise multivariada por regressão logística múltipla foram o contato com animais silvestres (*odds ratio* = 12,13; IC 95% = 1,64 – 89,92; p 0,015) e frequência da limpeza do local de permanência do cão (*odds ratio* = 6,07; IC 95% = 1,12 – 32,91; p = 0,037) (Tabela 2). O fato do proprietário criar animais silvestres em casa tem importância epidemiológica, pois ele se torna mais uma fonte de alimento para o vetor. A frequência de limpeza no ambiente doméstico e peri-doméstico é importante, porque atrai outros animais para o recinto, como roedores, além de criar um habitat favorável a multiplicação do vetor, que utiliza material orgânico para a deposição dos ovos.

Tabela – 1. Análise univariada de fatores de risco associados com a soropositividade para leishmaniose visceral em 138 cães do município de Patos, Paraíba.

Variável	Categoria	Total de animais	Soropositivos (%)	P
Grau de escolaridade	Analfabeto	14	1 (7,1%)	0,605
	1º Grau incompleto	34	1 (2,9%)	
	1º Grau completo	34	4 (11,8%)	
	2º Grau incompleto	21	1 (4,8%)	
	2º Grau completo	25	2 (8,0%)	
	3º Grau incompleto	4	1 (25,0%)	
	3º Grau completo	6	0 (0,0%)	
Renda familiar	Menos de 2 salários mínimo	91	5 (5,5%)	0,438
	2 a 4 salários mínimo	37	4 (10,8%)	
	5 a 6 salários mínimos	5	0 (0,0%)	
	Mais de 6 salários mínimos	5	1 (20,0%)	
Sexo dos animais	Macho	69	8 (11,6%)	0,101*
	Fêmea	69	2 (2,9%)	
Idade dos animais	6 – 12 meses	28	1 (3,6%)	0,344
	> 12 – 24 meses	37	1 (2,7%)	
	> 24 – 48 meses	26	4 (15,4%)	
	> 4 – 6 anos	27	2 (7,4%)	
	> 6 anos	20	2 (10,0%)	
Raça	Sem raça definida	97	6 (6,3%)	0,739
	Com raça definida	41	4 (9,8%)	
Tipo de criação	Domiciliar	119	8 (6,7%)	0,205
	Semi-domiciliar	19	2 (20,0%)	
	Solto	9	0 (0,0%)	
Alimentação	Ração comercial	18	1 (5,6%)	0,460
	Alimento preparado em casa	86	8 (9,3%)	
	Ambos	34	1 (2,9%)	
Contato com animais	Não	16	0 (0,0%)	0,605
	Sim	122	10 (8,2%)	
Contato com animais silvestres	Não	130	8 (6,2%)	0,105*
	Sim	8	2 (25,5%)	
Contato com felinos	Não	91	8 (8,8%)	0,494
	Sim	47	2 (4,3%)	
Contato com cães	Não	65	5 (7,7%)	1,000
	Sim	73	5 (6,8%)	
Contato com suínos	Não	136	9 (6,6%)	0,140*
	Sim	2	1 (50,0%)	
Contato com galinhas	Não	123	9 (7,3%)	1,000
	Sim	15	1 (6,7%)	

Tabela – 1. Análise univariada de fatores de risco associados com a soropositividade para leishmaniose visceral em 138 cães do município de Patos, Paraíba. Continuação.

Variável	Categoria	Total de animais	Soropositivos (%)	P
Ambiente dos cães	Terra	47	6 (12,8%)	0,121*
	Cimento	66	4 (6,1%)	
	Terra/Cimento	25	0 (0,0%)	
Limpeza do local	Não	19	2 (10,5%)	0,628
	Sim	119	8 (6,7%)	
Frequência da limpeza	Semanal	101	5 (5,0%)	0,100*
	Quinzenal/mensal	18	3 (16,7%)	
Possui outros animais em casa	Não	65	7 (10,8%)	0,190*
	Sim	73	3 (4,1%)	
Vizinhos tem animais	Não	110	6 (5,5%)	0,118*
	Sim	28	4 (14,3%)	
Vai ao Petshop	Não	134	10 (7,5%)	1,000
	Sim	4	0 (0,0%)	
Passeios constantes	Não	121	7 (5,8%)	0,108*
	Sim	17	3 (17,6%)	

* Variáveis selecionadas e usadas na análise multivariada

Tabela – 2. Fatores de risco associados com a soropositividade para leishmaniose visceral em 138 cães do município de Patos, Paraíba, estimados por regressão logística múltipla.

Fator de risco	Odds ratio	IC 95%	p
Contato com animais silvestres	12,13	1,64 – 89,92	0,015
Frequência da limpeza do local onde os animais permanecem (Quinzenal/mensal)	6,07	1,12 – 32,91	0,037

Neste estudo, outros fatores, embora não identificados como de risco para a leishmaniose visceral canina, merecem ser destacados.

Em relação ao ambiente onde os animais positivos são criados, 12,8% são criados na terra e 6,1% em piso de cimento. A maior positividade está relacionada aos animais criados na terra devido à dificuldade de limpeza do local, proporcionando um ambiente favorável para a multiplicação do vetor. Azevedo et al (2008) relataram que a

grande maioria dos quintais das residências avaliadas era de terra 96,4%, estas encontravam-se em boas condições sanitárias. No entanto isto não foi fator relevante para o aparecimento de animais positivos no seu estudo.

Em relação ao grau de escolaridade dos proprietários, dos 10 animais positivos 4 pertencem a proprietários com 1º completo, 2 com 2º completo, 1 pertencem a proprietários analfabetos, 1 com 1º incompleto e 1 com 3º incompleto. Em relação a renda familiar, 5 animais positivos são de famílias que possuem renda mensal menos de 2 salários mínimos, 4 animais de famílias com 2 a 4 salários mínimos, 1 animal pertencer com mais de 6 salários mínimos. Dessa forma podemos concluir que o maior número de animais positivos pertencem à proprietários com 1º completo e com renda mensal menos de 2 salários mínimos.

Isso é indicativo que as condições sócio-econômicas é um fator relevante para o aparecimento da doença na população canina e conseqüentemente em humanos. Provavelmente este fator de risco não foi relevante neste trabalho porque em bairros cujos proprietários tinham o poder aquisitivo mais alto, as coletas foram reduzidas pois os mesmo não autorizaram nossa entrada na residência para coleta de sangue dos animais.

Entre os 138 cães utilizados nesse estudo havia 69 machos e 69 fêmeas cuja prevalência foi de 11,6% (8) e 2,9% (2), respectivamente. A maior positividade entre os machos esta relacionada ao fato da população preferir criar cães machos ao invés das fêmeas devido à procriação indesejada e de serem melhores cães de guarda. Esses dados são os mesmos observados por Almeida (2009), Mattos et al (2008), Batista (2008), Rondon (2007), Amora et al (2006), no entanto não significa que a doença tenha predisposição ao gênero.

A positividade foi maior em animais acima de 2 anos, diferindo do encontrado por Batista (2008), que encontrou uma positividade mais acentuada em cães jovens. Isto se justifica pela alta rotatividade dos animais do CCZ, na qual a população esta sempre sendo renovada.

Dos 138 animais, 97 eram sem padrão de raça definida (SPRD) e 41 possuíam raça (Poodle, Pit Bull, Pincher, Cocker Spaniel), no entanto, isso não é fator epidemiológico relevante, pois o vetor não tem predisposição racial.

Entre os animais SPRD, 6,3% foram positivos e entre os que possuíam raça definida, 9,8%. Este fator epidemiológico não é relevante, pois o vetor não tem predisposição racial.

Mattos et al (2006) observaram uma frequência de 33,3% em cães com raça definida, sendo o Pit Bull a raça mais acometida, que foi justificado pela quantidade de animais dessa raça na cidade onde foi realizado o estudo e pela preocupação que os proprietários de animais desta raça tem em realizar exames frequentes. França-Silva (1997) também não verificou predisposição racial em adquirir a doença, mas quando verificou o comprimento do pêlo, observou que animais de pêlo curto são mais susceptíveis a ação do vetor do que os animais de pêlo longo.

Segundo Gontijo e Melo (2004) e França-Silva (1997), realizando estudos sobre os fatores de riscos para leishmaniose visceral canina no Brasil, observaram que não há predisposição do aparecimento da doença em cães, quanto ao gênero, raça e faixa etária. Que estão de acordo com dados encontrados nesse estudo.

Quando ao habitat dos cães, observou-se que entre os 10 animais positivos, 8 cães eram domiciliados e 2 semi-domiciliados. Resultados diferentes foram encontrados por Amora et al (2006) e Batista (2008), que observaram o maior número de cães soropositivos possuem habitat semi-domiciliados, justificado porque os animais no semi-domicílio estão expostos constantemente à ação do vetor.

Dos 10 animais positivos, 8 são alimentados com comida caseira, 1 de ração comercial e 1 tanto de ração como de comida caseira. A princípio, a comida caseira pode atrair reservatórios para próximo do domicílio que sirvam de fonte de infecção para o vetor animais.

Entre os 10 animais positivos todos conviviam com outros animais (2 com felinos, 1 com suínos e galinhas, 2 com animais silvestres e 5 com cães). A convivência com outros animais aumenta a fonte de alimentação para o vetor além dos ambientes úmidos e sombreados proporcionados por chiqueiros e galinheiros funcionarem como criadouros dos flebótomos. Resultado diferente foram encontrados por Azevedo et al (2008) onde avaliaram a prevalência em relação com a coabitação de outras espécies com cães positivos; co-habitação com galinhas foi mais frequente entre os cães positivos, seguida de suínos e equinos. Barbosa et al (2009), observaram a presença de galinhas, suínos e equinos, sendo o felino com 12% o animal mais presente nas casas de cães soropositivos.

Outras formas de contatos com animais positivos foram observada como vizinhos com animais (14,3% dos positivos) e se o animal faz passeios constantes (17,6% dos positivos).

5 CONCLUSÃO

Houve um aumento preocupante nesses últimos 10 anos da prevalência de leishmaniose visceral canina. Desta forma, sugere-se a retomada das medidas de controle do calazar canino pelos órgãos responsáveis no município de Patos/PB.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISA, M. J.; CASTILLEJO, S.; GALLEGO, M.; FISA, R.; RIERA, M. C.; DE COLMENARES, M. et al. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with Leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 2, p.154-159, 1998.
- ALVES, A. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAES, N. B.; FRANCO, S. O. Levantamento epidemiológico da leishmaniose visceral em cães vadios da cidade de Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**, v. 8 n. 2, p. 63-68, 1998.
- ALMEIDA, A. B. P. F. **Inquérito soroepidemiológico e caracterização da leishmaniose canina por PCR-RFLP em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Sanidade de Animais Domésticos e Selvagens, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá-MG, Brasil, 2009. 67p.
- AMORA, S. S. A.; SANTOS, M. J. P.; ALVES, N. D.; COSTA, S. C. G.; CALABRESE, K. S.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em áreas endêmicas do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciências Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1854-1859, novembro, 2006.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinic in Dermatology**, v. 14, p. 523-532, 1996.
- ASHFORD, R. W. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 269-281, 2000.
- AZEVEDO, M. A. A.; DIAS, A. K. K.; PAULA, H. B.; PERRI, S. H. V.; NUNES, C. M. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréo, Estado do Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n. 3, p. 123-127, 2008.
- BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESE, R.; FOCACCI, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996, v. 2, p.1234-1259.
- BATISTA, M. G. N; **Levantamento de leishmaniose visceral no município de Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil: soroprevalência de risco e isolamento do agente**. Monografia do Curso de Especialização. Saúde Pública Veterinária. Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, Brasil, 2008. 51p.
- BARBOZA, D. C. P. M.; LEAL, D. C.; SOUZA, B. M. P. S.; CARNEIRO, A. J. B.; GOMES NETO, C. M. B.; ALCÂNATARA, A. C. D.; JULIÃO, F. S.; MOURA, S. A. B.; PERALVA, L. M. P.; FERREIRA, F.; FRANKE, C. R. Inquérito epidemiológico da leishmaniose visceral canina em três distritos sanitários do Município de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v.10, n.2, p.434-447, abr-jun, 2009.
- BRASIL. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Imprensa Nacional. **Ministério da Saúde**. Gabinete do Ministro.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006, 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2003. 122 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Serie A. Normas Técnicas. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2004, 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Serie A. Normas Técnicas. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2007, 120 p.

CABRERA, M. A. A. **Ciclo enzoótico da transmissão da Leishmania (*Leishmania chagasi* CUNHA & CHAGAS, 1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ: Estudo de possíveis variáveis preditoras**. Tese (Magister Scientiae), Escola de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, 1999. 90 p.

CABRERA, M. A. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCHI, M. C. A.;

XAVIER, S. C.; SILVA, A. V. et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto Tropical São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CAMPILLO, M. C.; VAZQUEZ, F. A. R.; FERNANDEZ, A. R. M.; ACEDO.; M. C. S.; RODRIGUEZ, S. H.; LOPEZ-COZAR, I. N.; BAÑOS, P. D.; ROMEROM H. Q.; VARELA, M. C. **Parasitologia Veterinária**. 1ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 1999, p. 651-665.

CAMARGO, J. B.; TRONCARELLI, M. Z.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, n.71, p. 86-92, 2007.

COURTEUAY, O.; SANTANA, E. W.; JOHNSONI, P. J.; VASCONCELOS, I. A. B.;

VASCONCELOS, A. W. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 498-502, 1996.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) brazileinsis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139-146, 2007.

DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará**. Tese Doutorado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo-SP, Brasil, 1956, 162p.

DEANE, L. Leishmaniose visceral neotropical. **O Hospital**, v.13, n.2, p. 315-321, 1939.

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. **Effect of Eliminating Seropositive Canines on the Transmission of Visceral Leishmaniasis in Brazil**. Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil; and the Division of Infectious Diseases, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA. 1997.

DOHOO, I. R.; DUCROC, C.; FOURICHON, C.; DONALD, A.; HURNIK, D. An overview of techniques for dealing with large numbers of independent variables in epidemiologic studies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 29, p. 221-239, 1996.

ESCOBAR P, MATU S, MARQUES C, CROFT SL. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Tropica**, v. 81, n. 2, p. 151-7, 2002.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Doenças do Cão e do Gato**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, v 1 e v 2, p. 437-438.

EVANS, T. G. et. al. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brasil : assement of serodiagnostic methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 23-118, 1990.

FEITOSA, M. M. Leishmaniose visceral: um desafio crescente. Boletim informativo – INTERVET PET, 2002, 15 p. Disponível no site: < www.intervet.com.br>. Acesso em 20 de março de 2010.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, n. 28, p. 36-44, 2000.

FRANÇA-SILVA, JOÃO CARLOS. Leishmaniose visceral canina no municípios de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Dissertação de mestrado em parasitologia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. 1997. 132p.

GOMES, Y. M.; CAVALCANTI, M. P.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, 2008, n.175, p. 45-52.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

- GONTINJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status os zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal Parasitology**, 2005, v. 35, p. 1169-1180.
- GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 3º ed, 2006, p.685-698.
- HERMONT, V. J. Leish-Tec® - Vacina Recombinante contra Leishmaniose Visceral Canina. **Manual Técnico**, 1ª ed., Juatuba – MG, outubro, 2008.
- HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**. New York: John Wiley & Sons, 2000. 375 p.
- IESBICH, M. P. **Avaliação de amostras de soro caninos para leishmaniose tegumentar americana (LTA), em área de baixa indemedicidade/Porto Alegre através de métodos diagnósticos laboratoriais imunológicos e biomoleculares**. Dissertação de Mestrado. Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2008. 93p.
- KREUTZER RD, YEMMA JJ, GROGL M, TESH RB, MARTIN TI. Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 3, p. 301-7,1994
- LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J. J.; MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O.;
- SOUZA, A. A. A.; SILVEIRA, F. A Amazonian visceral leishmaniasis – Distributions of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva) in relation to the *Cerdocyon thous* (Linn) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 135-137, 1990.
- LATORRE, M. R. D. O. Medidas de risco e regressão logística. In: MASSAD, E.; MENEZES, R. X.; SILVEIRA, P. S. P.; ORTEGA, N. R. S. **Métodos quantitativos em medicina**. Barueri: Manole, 2004, p. 337-350.
- LEÃO, R. N. Q. **Doenças Infeciosas e Parasitárias, Enfoque Amazônico**. Rio de Janeiro: Cepuj Instituto Evandro Chagas, 1997, p. 885.
- LEISHMAN, W .B. On the possibility of the occurens of trypanosomiasis in Índia. **British Medical Journal**, v.1, p. 1252-1254, 1903.
- MAIA, C. A. S. Diagnóstico laboratorial da leishmaniose canina. **Veterinária Técnica**, 2005, v. 2, p. 34-37.

- MANNA L, VITALE F, REALE S, PICILLO E, NEGLIA G, VESCIO F, GRAVINO AE. [Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis.](#) **Veterinary Journal**, v. 182, n. 3, p. 441-5, 2009.
- MANZILO, V., OLIVA, G., PAGANO, A., MANNA, L., MAROLI, M., GRADONI, L. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of Leishmania infection in kennelled stray dogs. **Veterinary Parasitology**, v.142, p. 142-145, 2006.
- MARQUES, M. I. L. M. **Leishmaniose canina**. Dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária, 2008, 89p.
- MARZOCHI M. C. A. A leishmaniose tegumentar no Brasil. **In: Grandes Endemias Brasileiras**. Universidade de Brasília, Brasília. 1989.
- MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W .J.; AMENDOEIRA, M .R. Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 41, n. 5, p. 61-84, 1981.
- MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos Saúde Pública**, v. 10, n. 2, p. 359-375, 1994.
- MATOS JR, D. G.; PINHEIRO, J. M.; MENEZES, R. C.; COSTA, D. A. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.119-122, 2004.
- MATOS, M. M.; FILGUEIRA, K. D.; AMORA, S. S. A.; SUASSUNA, A. C. D.; AHID, S. M. M.; ALVES, N. D. Ocorrência da leishmaniose visceral em cães em Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal**, v. 16, n.1, p. 51-54, 2006.
- MIGONE, L. E. Un cas de Kalazar en Assuncion (Paraguay). **Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique**, v. 6, p.118-120, 1913.
- NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine du Kala azar. **Comptes Rendues de l'Academie des Sciences de Paris**, v.146, p.789, 1908.
- NOGUEIRA, F. S.; MOREIRA, M. A. B.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. S.; MENZ, I.; PARRA, L. E.; XU, Z.; CHU, H. J.; SOUZA, C. B. P.; LUVEZOTTO, M. C. R. Leishmune R Vacciniblocks the Transmission of Canine Visceralleishmaniasis. Absence of Leishmania parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposid dogs. **Vaccine**. N. 23, 2005.
- NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; FRANKENA, K.; VAN DER HOOF, C. M.; GRAAT, E. A. M. **Application of quantitative methods in veterinary epidemiology**. Wageningen: Wageningen Press, 1997. 445 p.
- PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, p. 872.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A. B.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of

visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, v. 107, p. 66-69, 2008.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, v. 1, p. 713-732.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 349.

RONDON, F. C. M. **Estudo Transversal da Leishmaniose Visceral Canina na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil**. Dissertação de Mestrado, Ciência Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2007, 61p.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J., RIBEIRO, A. A.; DE PAIVA HOFFMANN, M., DE FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol**; v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI Jr., G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 511, 1984.

SILVA, D. C. B.; SILVA, D. C. B.; FREIRE, J. M.; OLIVEIRA, R. J.; DIAS, N. L. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Brumadinho, Minas Gerais, 2008. In: XXXV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Gramado, 2008. **Anais...** Gramado-RS, 2008.5p

SILVA, E. F. P. **Inquérito Sorológico de Leishmaniose Canina na Cidade de Rio Verde-GO**. Dissertação de Mestrado, Ciências da Saúde, Convênio Universidade de Brasília Universidade de Rio Verde, Goiás, Rio Verde, Brasil, 2007, 54p.

SILVA-ABREU, A. L.; LIMA, T.; MACEDO, A. A.; JUNIOR-MORAIS, F. J.; DIAS, E. L.; BATISTA, Z. B.; CALABRESE, K. S.; MORAES, J. L. P.; REBELO, J. M. M.; GUERRA, R. M. S. N. C. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotomíneos em uma área endêmica na ilha de São Luís, maranhão, Brasil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.17, supl. 1, p. 197-203, 2008.

SIMÕES-MATTOS, L. **O gato doméstico (*Felis catus*) como potencial hospedeiro reservatório de *Leishmania (Viannia) braziliensis***. Tese Doutorado - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, 2005, 231p.

SOTO J, ARANA BA et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clin Infect Dis.**; v. 1, n. 38, p. 1266-72, 2004.

SUNDAR. S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

THADEI, C. L. **Leishmaniose**. São Paulo: Saúde Animal, 2006. p.1-4. Disponível em: <http://www.saudeanimal.com.br/artigo99.htm>. Acesso em: 22 de fevereiro 2010.

THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. 2. ed. Cambridge: Blackwell Science, 1995. 479 p.

URQUHART, G. M.; ARMAOUR, J.; DUNGAM, J. L. ; DUNN, A. M. ; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. 2ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p. 190-192.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly Epidemiological Record**, v. 77, n. 44, p. 364-372, 2002. Disponível no site: <http://www.who.int/wer>. Acesso em 21 de Fevereiro de 2010.

YOUSSEF MY, EISSA MM, EL MANSOURY ST. Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* of the Old World. *J Egypt Soc Parasitol*. 1997 Dec; 27(3):651-7.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 663 p.

7 ANEXOS

Anexo 1 – Questionário epidemiológico

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS**

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO – Nº

I DADOS DO PROPRIETÁRIO	
1- Nome:	
2- Endereço:	Cidade:
3- Bairro:	CEP:
4- Telefone:	
5- Grau de escolaridade:	<input type="checkbox"/> Analfabeto <input type="checkbox"/> 1º grau incompleto <input type="checkbox"/> 1º grau completo <input type="checkbox"/> 2º grau incompleto <input type="checkbox"/> 2º grau completo <input type="checkbox"/> 3º grau incompleto <input type="checkbox"/> 3º grau completo
6- Renda familiar	<input type="checkbox"/> Menos de 2 salário mínimo <input type="checkbox"/> 2 a 4 salários mínimos <input type="checkbox"/> 5 a 6 salários mínimos <input type="checkbox"/> Mais de 6 salários mínimos
II DADOS DO ANIMAL	
7- Nome:	
8- Sexo:	<input type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Fêmea
9- Idade:	<input type="checkbox"/> 6 – 12 meses <input type="checkbox"/> 12 – 24 meses <input type="checkbox"/> 24 – 48 meses <input type="checkbox"/> 4 – 6 anos <input type="checkbox"/> Acima de 6 anos
10- Raça:	<input type="checkbox"/> Sem raça definida <input type="checkbox"/> Com raça definida Qual?
III MANEJO	
11- Tipo de criação:	<input type="checkbox"/> Domiciliar <input type="checkbox"/> Semi-domiciliar <input type="checkbox"/> Solto

Anexo 1 – Questionário epidemiológico. Continuação.

12- Alimentação :	<input type="checkbox"/> Ração comercial
	<input type="checkbox"/> Alimento preparado em casa
	<input type="checkbox"/> Ambos
	Que ração?
13- Tem contato com outros animais?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
14 – Se sim, com quais?	<input type="checkbox"/> Eqüídeos <input type="checkbox"/> Silvestres <input type="checkbox"/> Felinos <input type="checkbox"/> Cães <input type="checkbox"/> Suínos
15- Existem outras formas de contato?	<input type="checkbox"/> Animais em casa
	<input type="checkbox"/> Vizinhos tem animais
	<input type="checkbox"/> O seu animal vai ao petshop
	<input type="checkbox"/> Passeios constantes
16- Qual o ambiente onde o animal é criado?	<input type="checkbox"/> Terra <input type="checkbox"/> Cimento <input type="checkbox"/> Terra/cimento
17- É realizada limpeza ou desinfecção do local?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
18- Com que freqüência?	<input type="checkbox"/> Diária <input type="checkbox"/> Semanal <input type="checkbox"/> Quinzenal <input type="checkbox"/> Mensal
19- O animal tomou alguma vacina?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
20- Se sim, quais?	<input type="checkbox"/> Anti-rábica <input type="checkbox"/> Contra viroses
21- O animal já foi vermifugado?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
22- Se sim, quando?	
23- O animal apresenta ou já apresentou carrapatos?	
IV EXAME FÍSICO	
- Aspecto geral do animal:	

Anexo 2 – Protocolo do Kit diagnóstico ELISA S7 recombinante.

Crítérios de Validação

As Densidades Ópticas (D.O.) dos controles não reagentes devem ser sempre inferiores a 0,100. E as D.O.s dos controles reagentes devem ser sempre superiores a 0,300.

Cálculo do Ponto de Corte

Calcular a média aritmética das D.O.s. dos soros não reagentes e somar ao fator $R = 0,142$. Para determinação da amplitude da zona cinza (faixa de indeterminados) subtrair do ponto de corte 0,03.

Socorro Técnico

Em caso de dúvidas entrar em contato com o suporte no telefone (81) 9168.9072 ou por e-mail servio@biogene.ind.br.

Resp. Téc. Ana Cláudia Campos
Médica Veterinária CRMV - PE - 3201

Produzido e Fabricador por:

Biogene Indústria e Comércio Ltda ME
Rua Costa Sepúlveda, 749
Engenho do Meio - Recife - PE
CEP 50.730-260
C.N.P.J.: 69.951.234/0001-10
Insc. Est.: 18.2.001.0198256-0
Fone/Fax: 81 - 3453.2502 ou 9168.9072
E-mail: servio@biogene.ind.br
MAPA Licença n°. 7434/2000
Indústria Brasileira



Validade e data de fabricação na embalagem



Kit para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7®

Para Uso Veterinário

Descrição

A reação de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é baseada no reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos fixados em um suporte plástico. Este reconhecimento é revelado através de uma proteína conjugada a uma enzima (Peroxidase) permitindo a visualização da reação.

O ELISA/S7® tem como base um peptídeo recombinante, produzido por engenharia genética, que permite a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção. O emprego desse antígeno no kit para o diagnóstico do calazar canino - ELISA/S7® confere alta especificidade e sensibilidade ao teste, sendo único no mercado.

Apresentação

O kit é composto de uma placa de ELISA e de todos os reagentes necessários a realização de 96 reações.

Produto	Volume	Conservação
Solução de coleta	25 ml	- 20°C
Solução S7	10 ml	- 20°C
Soro controle reagente	10 µl	- 20°C
Soro controle não reagente	10 µl	- 20°C
Solução Citrato	10 ml	4°C
Conjugado (Ptn - A PO)	3 µl	4°C
Revelador (TMB)	100 µl	4°C
Água Oxigenada (H ₂ O ₂)	50 µl	4°C
Solução de lavagem (PBS 10x)	50 ml	4°C
Tween 20	200 µl	4°C
Solução de parada (H ₂ SO ₄ 2N)	10 ml	T.A

A estabilidade de todos os reagentes é de seis meses

Observações

- Usar sempre luvas
- As lavagens devem ser feitas utilizando-se picetas, dirigindo-se o jato de tampão diretamente no fundo do poço.
- As soluções devem ser desprezadas invertendo-se a placa de uma só vez.
- Pode haver formação de cristais na Solução de Lavagem 10x. Neste caso é só proceder uma pequena agitação.
- É necessário um segundo soro controle não reagente (não fornecido no kit), para o cálculo do ponto de corte.

1. Preparo dos tampões de lavagem

- O tampão de lavagem PBS está concentrado 10X. Diluir uma parte de PBS em nove partes de água destilada.
- Para o PBST é só acrescentar em uma parte do PBS 0,05% de Tween 20 (ex: para 400ml de PBS acrescentar 200µl de Tween).

2. Sensibilização e neutralização da placa

- Distribuir 100 µl por poço da solução S7 na placa.
- Incubar overnight à 4°C (geladeira) ou 4 horas em T.A.
- No dia seguinte desprezar a solução S7.
- Lavar 3 vezes com tampão PBST.
- Distribuir 100 µl por poço de uma solução composta de PBST + 2% de leite em pó desnatado.
- Incubar por 30 minutos a T.A.
- Após incubação desprezar a solução e lavar a placa duas vezes com PBST.

A placa sensibilizada e neutralizada pode ser utilizada imediatamente ou ser embalada seca em papel alumínio e estocada no freezer (- 20°C) por períodos de até 2 meses sem perda de suas características. No momento do uso deixar a placa descongelar por pelo menos 15 minutos a T.A.

3. Diluição dos soros

Os soros controles e amostras em testes devem ser diluídos em solução de coleta (1:100) e incubados por pelo menos 4 horas a T.A. ou 12 horas na geladeira (4°C).

O título da reação é de 1:100.

4. Realização dos testes

- Lavar a placa uma vez com tampão PBST.
- No primeiro poço (A1) colocar 100 µl de PBST. Este é o branco para o leitor de ELISA (indispensável em alguns equipamentos).
- Distribuir 100µl de cada um dos soros controles, previamente diluídos, nos poços: B1 e D1 não reagente e C1 reagente.
- Distribuir 100µl por poço dos soros em teste, previamente diluídos.
- Incubar por 30 minutos a T.A.
- Lavar a placa 3 vezes com PBST.
- Distribuir 100µl por poço da solução do conjugado (Proteína - A PO). Esta solução deve ser preparada na hora diluindo 1µl do conjugado em 10ml de PBST. Descarte a sobra desta solução.
- Incubar por 30 minutos a T.A.
- Lavar a placa 3 vezes com PBS (sem o Tween 20).
- Distribuir 100µl por poço da solução de revelação. Esta solução também deve ser preparada na hora acrescentando em 10ml de Tampão Citrato 100µl de TMB e 50µl de Água Oxigenada.
- Incubar a placa por 20 minutos no escuro (ex.: dentro de uma gaveta).
- Acréscimo de duas gotas da solução de parada.
- Efetuar a leitura em leitor de ELISA a $\lambda = 450 \text{ nm}$.

- O ELISA/S7® também pode ser executado com amostras de sangue. Neste caso 250µl da solução de coleta deve ser distribuído em um tubo *ependorf* e apenas 2 gotas de sangue (~30 µl) acrescentadas nesta solução.
- Nesta solução o sangue pode ser conservado por até 5 dias na geladeira (NÃO CONGELAR).
- As amostras de sangue podem ser centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos para que o coágulo seja totalmente separado da solução.
- Em caso de hemólise acentuada, após a centrifugação o sobrenadante deve ser transferido para um novo tubo e incubado por 20 minutos a 56°C (neutralização).
- O sobrenadante do tubo pode ser aplicado diretamente na placa para realização do teste. Neste caso, deve-se respeitar o período de incubação de pelo menos 4 horas em contato com a solução de coleta. A diluição deve ser feita acrescentando-se 25µl deste sobrenadante em 75µl de PBST (previamente colocado no poço).