

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

MONOGRAFIA

**Levantamento Epidemiológico de Leishmaniose Visceral Canina em Municípios do
Agreste Paraibano: Dados Preliminares**

NEDJA FERNANDA DOS SANTOS PINTO

Patos-PB

Mai de 2016



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

MONOGRAFIA

**Levantamento Epidemiológico de Leishmaniose Visceral Canina em Municípios do
Agreste Paraibano: Dados Preliminares**

Nedja Fernanda dos Santos Pinto

Graduanda

Prof^a. Dra. Marcia Almeida de Melo

Orientadora

Patos-PB

Maior de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

P6591 Pinto, Nedja Fernanda dos Santos
Levantamento epidemiológico de Leishmaniose visceral canina em municípios do agreste paraibano: dados preliminares / Nedja Fernanda dos Santos Pinto. – Patos, 2016.
48f.: il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) -
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2016.

“Orientação: Prof.^a Dr.^a Marcia Almeida de Melo”

Referências.

1. Calazar. 2. Diagnóstico sorológico. 3. Fatores de risco.
4. Endemias. 5. Paraíba. I. Título.

CDU 614(813.3)

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

NEDJA FERNANDA DOS SANTOS PINTO
Graduanda

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

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

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Marcia Almeida de Melo

Nota

Profº. Dr. Severino Silvano dos Santos Higino

Nota

Profº. Dr. Paulo Paes de Andrade

Nota

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

NEDJA FERNANDA DOS SANTOS PINTO
Graduanda

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

APROVADO EM/...../.....

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^o. Dr^o. Severino Silvano dos Santos Higino

Prof^o. Dr. Paulo Paes de Andrade

*Á Deus por me GUIAR,
Nos caminhos que me trouxeram até aqui, permitindo que conseguisse mais uma vitória.*

“Por isso não temas, porque estou contigo, Não te assustes, porque sou o teu Deus”

(Isaias 41:10).

A Mainha, Painho, meu Amor e aos animais por acreditarem no meu potencial;

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Eu tenho muito que agradecer, aliás, só tenho a agradecer. Em primeiro lugar, agradeço ao meu bom Deus, por ter me concedido o dom da vida com muita saúde, para conseguir superar todos os obstáculos. Obrigada Deus por tudo que o Senhor me deu, pelas oportunidades, o aprendizado, as desavenças, as amizades, as conquistas e tudo que vivi durante estes cinco anos de faculdade. Sem esquecer da minha Nossa Senhora, que a cada dia estava intercedendo por mim junto ao Senhor Jesus.

Agradeço aos meus maiores exemplos de vida e de amor, minha Mãe Neuda e meu Pai Damião Pinto, por todo o esforço oferecido na minha educação e formação, tanto pessoal quanto profissional, Graças a vocês eu sou o que sou hoje, e se cheguei até aqui foi principalmente pela dedicação e esforço que vocês não mediram para que eu conseguisse concluir. Essa vitória é nossa!

A meu irmão querido, Felype, pela sua imensa contribuição na minha formação. Foi você irmão que diversas vezes me acudiu quando eu precisava de 10 reais para sustentar essa vida de apostilas e lanches kkk; era você que trazia ou levava tudo que Mainha mandava, mesmo com todo abuso, sempre me ajudou. E minha irmã caçula, Flayane o abuso da família; obrigada irmã pelas risadas, ajudas e brigas quando eu ia para casa e dividíamos o computador. Você não existe mulher! Agradeço a minha cunhada por ter me dado o sobrinho mais lindo do mundo, meu galego e amor. Titia ama você!

As minhas avós, por todo amor e preocupação que sentem por mim. Minha avó Neuza, em especial, por toda aquela preocupação bem notória, sempre querendo ajudar com uns ovinhos, um biscoito, um kg de arroz, seja o que for, ela sempre fez questão de ajudar, porém vó a melhor oferta que a Senhora nos faz é com seu amor. A toda a torcida da minha família, tios, tias, primos, primas e demais, obrigada meus amores.

Aos meus eternos e grandes amigos, por todo apoio e força em todos os anos da minha vida. Aqueles que estudaram comigo no fundamental e ensino médio, que até hoje fazem parte do meu grande círculo de amigos valiosos. E aos que durante meu percurso por aqui conquistei... As minhas companheiras de residência do início até o fim, Carlinha (minha eterna e melhor amiga), Marília (avexada), Roberta (companheira de farras), Sônia (paciente), Ingrid (companheira nas horas mais difíceis), Regina (calada), Gabi (preocupada e dedicada), Ana Luíza (a gorda do meu coração) e a Fera. Aos meus amigos veterinários que sempre procuro para me ajudar, Tereza, Ivana, e com um grande carinho você Manda, obrigada por toda atenção e ajuda.

Aos amigos que conquistei nesta cidade, que não foram poucos, em especial minha Turma 2011.1. Foram vocês que diversas vezes me ajudaram, me empurraram e impulsionaram fazendo com que eu conseguisse chegar aqui. Vou lembrar sempre das nossas reuniões (barulhentas), das provas, das noites de estudo (que não foram poucas), das notas, das confusões, das aulas extras e das aulas a campo; boas lembranças não faltarão...

Agora tenho o fã clube #meameoumedeixe do qual jamais esquecerei. São as mais abusadas e rudes que toda turma poderia ter, as mais amigas e extravagantes, as mais barulhentas e briguintas, aquelas que nem elas se aguentam kkk; vocês me fizeram mais feliz nesses cinco anos, sem vocês eu até poderia ter conseguido, mas não seria com a mesma felicidade, com o mesmo amor e com o mesmo gosto. Vocês dividiram comigo todos os momentos; os de alegrias, os de tristeza, os de sofrimento e até as contas. Foi com vocês que compartilhei os amores, as dúvidas, as escolhas, as questões de prova, as confusões, as cachaças, as brincadeiras, as risadas e as lágrimas. Eu vou sentir muito a falta de vocês, Aninha Luíza e Robertzinha que estiveram comigo em todos os momentos, inclusive ajudaram para que esse trabalho também fosse concretizado; Silvinha e Raissa (que não tem diminutivo com ela, porque é a mais braba mesmo kkk). Obrigada por tudo e desculpem as minhas ignorâncias por incontáveis vezes.

Um grande e carinhoso obrigada a minha Orientadora Marcia Almeida de Melo, por ter me acolhido há alguns anos. Sou extremamente grata por todas as oportunidades que a senhora me ofereceu, graças a senhora eu pude desenvolver algumas pesquisas que foram de grande valia para minha formação. Obrigada pelas orientações, correções, dedicação e paciência comigo. Agradecendo juntamente a toda a galera do Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido Paraibano, Professor Paulo Paes, Gilzanne, Heitor, Herta, Luciana, João e demais, obrigada pelas pesquisas, conhecimentos e companheirismo compartilhados.

Por falar em Laboratório de Biologia Molecular não posso esquecer jamais da pessoa que mais me ajudou durante toda a fase de testes e mais testes, de procura de artigos, nas dúvidas quando algo estava errado e nas confusões. A você Raizza meu muito obrigada por toda ajuda e paciência com todo esse meu trabalho, como também pelo aceite em participar da minha banca. Sem você eu, com certeza, não teria os mesmos resultados! Valeu mais uma vez.

Ao Prof. Dr. Severino Silvano dos Santos Higino, por toda atenção, compromisso e disposição, que demonstrou para comigo a partir do momento que o procurei para fazer parte da minha banca.

A Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), pelo acolhimento e por minha formação como Médica Veterinária, a qual é composta em grande parte por um corpo de Docentes capacitados e responsáveis, que se doam, se esforçaram e compartilham seus conhecimentos e experiências conosco, para que possamos aprender parte daquilo que é necessário. Agradeço assim, a todos os setores do Hospital Veterinário, nos quais estagiei e pude aprender bastante!

As Secretárias Municipais de Saúde em nome das Prefeituras das cidades onde trabalhei, Aroeiras, Gado Bravo, Umbuzeiro e Natuba, pela grande parceria. Em especial quero agradecer ao corpo de Agentes de Endemias de cada município que caíram em campo comigo, que foram de porta em porta em pleno sol quente, reclamando ou não kkk; estavam ali trabalhando e fazendo o que gostam. Com a certeza de que novas amizades conquistei posso citar alguns, que marcaram essas coletas: Márcio, Marcelo, Toinho Sales, Genuíno e Arnaldo; vocês foram demais, desculpa os aperreios e o excesso de trabalho.

E por último, mas, não menos importante quero agradecer ao amor da minha vida Mylton Marques, por todos os puxões de orelha, pelo carinho, dedicação, paciência e amor oferecidos a mim. Sem você amor, eu sinceramente não sei se estaria aqui. Foi graças a você que mudei meus planos e atitudes, você contribuiu muito na minha vida pessoal e profissional. Obrigada do fundo do meu coração por ter surgido e permanecido na minha vida. Eu te amo!

Sem esquecer é claro dos animais, fontes de inspiração, dedicação, carinho e amor durante todo esse percurso. Ao meu nego lindo, meu amor Jimmy, por me abraçar e acompanhar em todos os momentos de solidão nessa cidade.

*Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.*

Não sou o que deveria ser,

mas Graças a Deus,

não sou o que era antes.

(Martin Luther King)

Sumário

	Pág.
RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1- INTRODUÇÃO.....	15
2- REVISÃO DE LITERATURA	16
2-1 Agente etiológico	16
2-2 Vetor.....	16
2-3 Ciclo biológico	17
2-4 Epidemiologia.....	18
2-5 Sinais clínicos.....	21
2-6 Diagnóstico	22
2-7 Estratégias de controle	24
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3-1 Área de coleta	26
3-2 População estudada	27
3-3 Obtenção das amostras.....	27
3-4 Processamento das amostras	28
3-5 Realização dos testes.....	28
3-6 Diagnóstico de <i>Leishmania infantum</i>	28
3-6-1 DPP® Leishmaniose Visceral Canina.....	28
3-6-2 ELISA S7®	Erro! Indicador não definido.
3-6-3 ELISA BIOMAGUINHOS	30
3-7 Questionário epidemiológico	30
3-8 Análise estatística.....	31
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5- CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXOS.....	48

LISTA DE TABELAS

Pág.

- Tabela 1-** Análise univariada dos possíveis fatores de risco associados a leishmaniose visceral canina no município de Aroeiras, Agreste Paraibano. Variáveis significantes. 33
- Tabela 2-** Análise univariada dos possíveis fatores de risco associados a leishmaniose visceral canina no município de Umbuzeiro, Agreste Paraibano. Variáveis significantes..... 33
- Tabela 3-** Análise univariada dos possíveis fatores de risco associados a leishmaniose visceral canina no município de Gado Bravo, Agreste Paraibano. Variáveis significantes..... 34
- Tabela 4-** Análise univariada dos possíveis fatores de risco associados a leishmaniose visceral canina no município de Natuba, Agreste Paraibano. Variáveis significantes..... 34
- Tabela 5-** Fator de risco associados a leishmaniose visceral canina na cidade de Umbuzeiro, Agreste Paraibano, estimado por regressão logística múltipla..... 34
- Tabela 6-** Fator de risco associados a leishmaniose visceral canina na cidade de Natuba, Agreste Paraibano, estimado por regressão logística múltipla..... 34
- Tabela 7-** Análise univariada dos possíveis fatores de risco associados à leishmaniose visceral canina de todos os municípios do Agreste Paraibano. Variáveis significantes. 36
- Tabela 8-** Fatores de risco associados a leishmaniose visceral canina nos Municípios Agreste Paraibano, estimado por regressão logística múltipla..... 36

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1- Forma promastigota da <i>Leishmania sp</i>	16
Figura 2- Forma amastigota da <i>Leishmania sp</i>	16
Figura 3- Fêmea de flebotomíneo <i>Lutzomyia longipalpis</i> adulto, engurgitada	17
Figura 4- Ciclo biológico da leishmaniose visceral canina	18
Figura 5- Distribuição dos casos autóctones de leishmaniose visceral em humanos por município, Brasil 2010.....	19
Figura 6- Cão com leishmaniose visceral, apresentando lesões dermatológicas e emagrecimento.	21
Figura 7- Cão com leishmaniose visceral, apresentando onicogribose.....	21
Figura 8- Localização dos municípios Paraibanos onde foram realizadas as coletas das amostras, com indicação da população residente total.	26
Figura 9- Colheita do material biológico por venopunção cefálica (A) e femoral (B).....	27
Figura 10- Teste DPP®, Negativo.....	29
Figura 11- Teste DPP®, Positivo	29
Figura 12- Placa de Resultado do ELISA/S7.	30
Figura 13- Área urbana do município de Natuba-PB. Ambiente característico e propício para o desenvolvimento da leishmaniose.....	35
Figura 14- Área rural do município de Gado Bravo-PB. Ambiente característico e propício para o desenvolvimento da leishmaniose.....	35

RESUMO

PINTO, NEDJA FERNANDA DOS SANTOS. Levantamento Epidemiológico de Leishmaniose Visceral Canina em Municípios do Agreste Paraibano: Dados Parciais. UFCG. 2016. 45 f. (Trabalho de Conclusão do curso de Medicina Veterinária).

A leishmaniose visceral é uma doença de caráter zoonótico, infecciosa e crônica. No Brasil, é causada por um protozoário intracelular denominado *Leishmania infantum*. O cão é o principal reservatório doméstico. No Brasil, constitui um importante problema de saúde pública, devido sua crescente expansão. Nas últimas décadas, houve aumento dos casos urbanos e periurbanos em cães, mas não foram realizados inquéritos sorológicos pelos órgãos de controle. Objetivou-se com esse trabalho avaliar os fatores de risco para leishmaniose visceral canina na zona rural e urbana dos municípios de Aroeiras, Gado Bravo, Umbuzeiro e Natuba, Agreste Paraibano, utilizando as técnicas sorológicas autorizadas pelo Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. O diagnóstico foi realizado pelo ELISA S7®, ELISA/EIE e DPP®. Um questionário foi aplicado aos proprietários para a identificação dos possíveis fatores de risco. As frequências sorológicas encontradas em Aroeiras, Umbuzeiro, Gado Bravo e Natuba foram de 13,27%, 11%, 18,81%, 13,84%, respectivamente. Os fatores de risco identificados na análise multivariada por regressão logística múltipla foram contato com outros cães (*Odds ratio* = 4.4506; IC% = 1,06-18,76; p = 0,0420) e idade (*Odds ratio* = 1,9776; IC% = 1,20-3,26; p = 0,0075) em Umbuzeiro e Natuba, respectivamente. Quando a análise foi realizada englobando todos os municípios, os previsores significativos foram escolaridade (*Odds ratio* = 0,7828; IC% = 0,62-0,98; p = 0,0362) e renda (*Odds ratio* = 0,2508; IC% = 0,07-0,85; p = 0,0264). Os municípios do Agreste Paraibano apresentam uma alta frequência da LVC, devido às características socioambientais predisponentes para manutenção do ciclo vetor-parasito-hospedeiro. Desta forma, em função das características socioeconômicas comuns à região estudada, recomenda-se que medidas de gestão pública sejam tomadas para minimizar a ocorrência de fatores de risco em nível global, isto é, não particularizando por município. Adicionalmente, sugere-se o teste de ELISA como ensaio de triagem nos casos de leishmaniose visceral canina.

Palavras – chave: calazar, diagnóstico sorológico, endemias, fatores de risco, Paraíba.

ABSTRACT

PINTO, NEDJA FERNANDA SANTOS. Epidemiologic Survey of Canine Visceral Leishmaniasis in the Municipalities of the Harsh of Paraiba: Partial data. UFCG. 2016. 54 f. (Final Work for the Bachelor of Veterinary Medicine).

Visceral leishmaniasis is a character zoonotic disease, infectious and chronic. In Brazil, it is caused by an intracellular protozoan parasite called *Leishmania infantum*. The dog is the main domestic reservoir. In Brazil, it is an important public health problem due to its growing expansion. In recent decades, there was an increase of urban and peri-urban cases in dogs, but have not been conducted serological surveys by control authorities. The objective of this study was to evaluate risk factors for canine visceral leishmaniasis in rural and urban areas of the municipalities of Aroeiras, Gado Bravo, Umbuzeiro and Natuba, using serologic techniques authorized by the Ministry of Health and Ministry of Agriculture Livestock and Supply. The diagnosis was made by ELISA S7®, ELISA / EIA and DPP®. A questionnaire was applied to owners to identify possible risk factors. Serologic frequencies observed in Aroeiras, Umbuzeiro, Bravo Cattle and Natuba were 13.27%, 11%, 18.81%, 13.84% respectively. The risk factors identified in the multivariate analysis by multiple logistic regression were contact with other dogs (Odds ratio = 4.4506, CI = 1.06 to 18.76%; p = 0.0420) and age (odds ratio = 1.9776; CI = 1.20 to 3.26%; p = 0.0075) in Umbuzeiro and Natuba, respectively. When the analysis was performed covering all municipalities, significant predictors were education (odds ratio = 0.7828, CI = 0.62 to 0.98%; p = 0.0362) and income (Odds ratio = 0.2508; CI% = 0.07 to 0.85; p = 0.0264). Those municipalities in Paraiba have a high frequency of CVL due to predisposing environmental characteristics for maintaining the vector-parasite-host cycle. Thus, due to the common socioeconomic characteristics to those municipalities, it is recommended that public measures are taken to minimize the occurrence of risk factors globally, that is, not particularizing by municipality. Additionally, it is suggested ELISA test as a screening test in cases of canine visceral leishmaniasis.

Keywords: dog, serological diagnosis, risk factors, Paraiba.

1- INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma antroponose em crescente expansão no Brasil, constituindo um importante problema de saúde pública. A enfermidade é causada pela *Leishmania infantum*, transmitida pelo flebotômico *Lutzomyia longipalpis*, sendo o cão o principal reservatório em ambiente urbano.

A partir da década de 80, casos urbanos e periurbanos são registrados com crescente frequência e, apesar da falta de levantamentos mais abrangentes no Brasil, é consenso que na última década houve um aumento da prevalência da infecção tanto em cães como em humanos.

No Brasil, as medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde (MS) são: controle do reservatório canino (diagnóstico sorológico e eutanásia de cães positivos) e do vetor (aplicação de inseticidas); diagnóstico precoce e tratamento adequado em humanos.

A prevalência da infecção canina é um importante indicativo de risco e seu estudo aponta ações necessárias ao controle da endemia às agências e órgãos de controle locais. Após a descentralização das ações de controle da leishmaniose visceral, são quase ausentes os levantamentos de prevalência conduzidos no Nordeste pelas secretarias municipais ou estaduais de saúde. Com isso, avaliações epidemiológicas sobre a LV canina têm sido conduzidas pelo grupo do Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido em áreas urbanas e rurais nos municípios de Caicó, no Rio Grande do Norte, Patos, Campina Grande, Sousa, Cajazeiras, Uiraúna, Guarabira, Brejo do Cruz, Bananeiras, Areia, São José de Espinharas e Santa Terezinha, na Paraíba.

Tendo em vista o potencial de urbanização da leishmaniose visceral canina (LVC) e a ausência de estudos elaborados pelos órgãos competentes de controle da região, objetivou-se com este trabalho avaliar os fatores de risco da Leishmaniose Visceral Canina na zona rural e urbana dos municípios de Aroeiras, Gado Bravo, Umbuzeiro e Natuba, Agreste Paraibano, utilizando as técnicas sorológicas autorizadas pelo Ministério da Saúde (MS) e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

2- REVISÃO DE LITERATURA

2-1 Agente etiológico

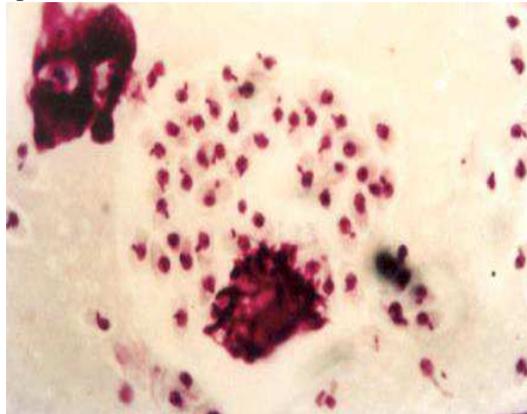
As leishmanioses são doenças causadas por protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, cuja espécie relacionada com a leishmaniose visceral é a *Leishmania (Leishmania) chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2005); a qual foi denominada mais recentemente de *Leishmania infantum* (SHAW, 2006). Durante seu ciclo vital as leishmanias apresentam duas formas distintas: promastigota (Figura 1), no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, e a amastigota (Figura 2), encontrada dentro de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (REY, 2008). Outras espécies de *Leishmania* encontrados no Brasil são a *Leishmania amazonensis* e a *Leishmania braziliensis*, causadoras de leishmaniose cutânea (DANTAS- TORRES, 2009).

Figura 1- Forma promastigota da *Leishmania sp.*



Fonte: BRASIL, 2014.

Figura 2- Forma amastigota da *Leishmania sp.*



Fonte: BRASIL, 2014.

2-2 Vetor

No Brasil, o principal vetor da LV é *Lutzomyia longipalpis* popularmente conhecido como mosquito palha ou birigui (LAINSON; RANGEL, 2005). Porém, outras espécies também já foram descritas como vetores da doença em algumas regiões do país (BRASIL, 2006; PITA-PEREIRA et al., 2008). Mesmo com a dispersão dos flebotomíneos para quase todas as regiões do Brasil, a ausência do vetor em áreas onde existem casos de leishmaniose visceral possibilita a existência de outros modos de transmissão da

enfermidade (DANTAS-TORRES, 2009). Carrapatos e pulgas têm sido incriminados como possíveis vetores de *L. infantum*, mas ainda não foi comprovado se são, de fato, vetores competentes (COUTINHO; LINARDI, 2007; FERREIRA et al., 2008; PAZ et al., 2010; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2010; DANTAS-TORRES, 2011).

Outras formas de transmissão também já foram descritas, tais como: transmissão venérea, transplacentária e por transfusão sanguínea, mas, até o momento, estes não são meios de importância epidemiológica (FREITAS et al., 2006; SILVA et al., 2009; NAUCKE; LORENTZ, 2012).

Apesar do cão ser considerado o principal reservatório da doença, em algumas áreas não é a fonte preferencial de alimentação para a *Lutzomyia longipalpis*. Os machos se alimentam de seiva, néctar de plantas e frutas maduras. As fêmeas são hematófagas (Figura 3), ingerindo sangue de diferentes espécies, entre eles, seres humanos, cães, gatos, cabras, bois, porcos, cavalos, jumentos, galinhas e animais silvestres (QUINNELL; DYE; SHAW, 1992; PASSOSDIAS; LOROSA; REBÊLO, 2003; MISSAWA; LOROSA; DIAS, 2008).

Figura 3- Flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Fêmea adulta engurgitada.



Fonte: BRASIL, 2014.

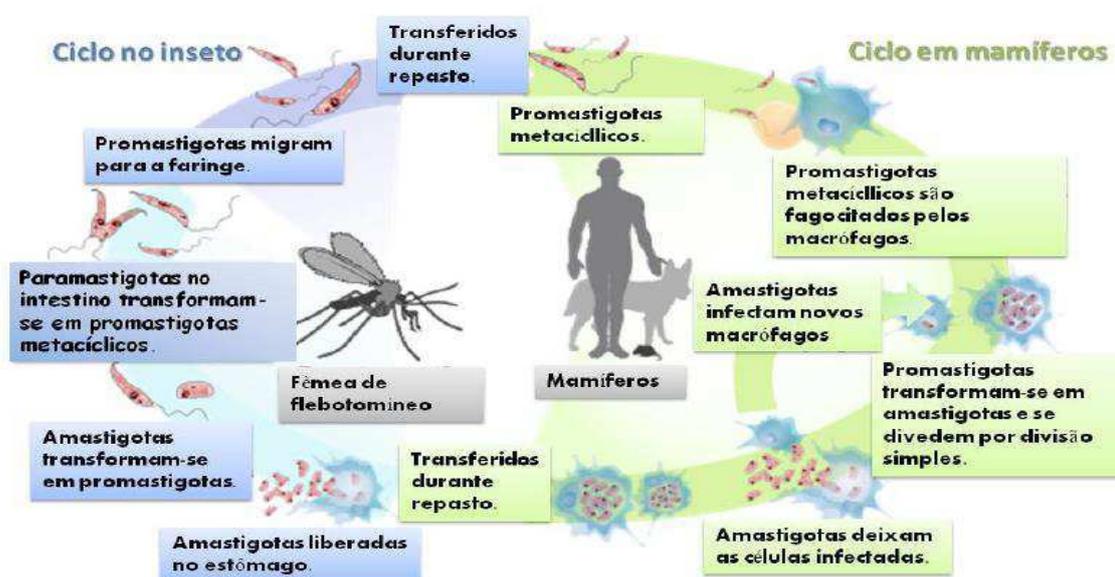
2-3 Ciclo biológico

Os flebotomíneos se infectam durante o repasto sanguíneo, ingerindo sangue do animal portador da doença. No vetor, o parasito se desenvolve no tubo intestinal para a forma promastigota, sendo essa introduzida nos mamíferos através da picada, se transformando na forma amastigota por divisão binária. A multiplicação das amastigotas

ocorre no interior de vacúolos parasitóforos em macrófagos de diferentes tecidos, originando a doença na forma cutânea, mucocutânea ou visceral (RATH et al., 2003).

Caso essas células não consigam destruir o parasito, inicia-se a multiplicação intracelular, lisando as células infectadas. Os parasitos são liberados, voltando a infectar novas células, repetindo o ciclo de penetração e destruição celular. A propagação da infecção causa um parasitismo intenso em células do sistema fagocítico mononuclear, causando um quadro crônico da doença (Figura 4) (BACELLAR; CARVALHO, 2005).

Figura 4- Ciclo biológico da leishmaniose visceral canina.



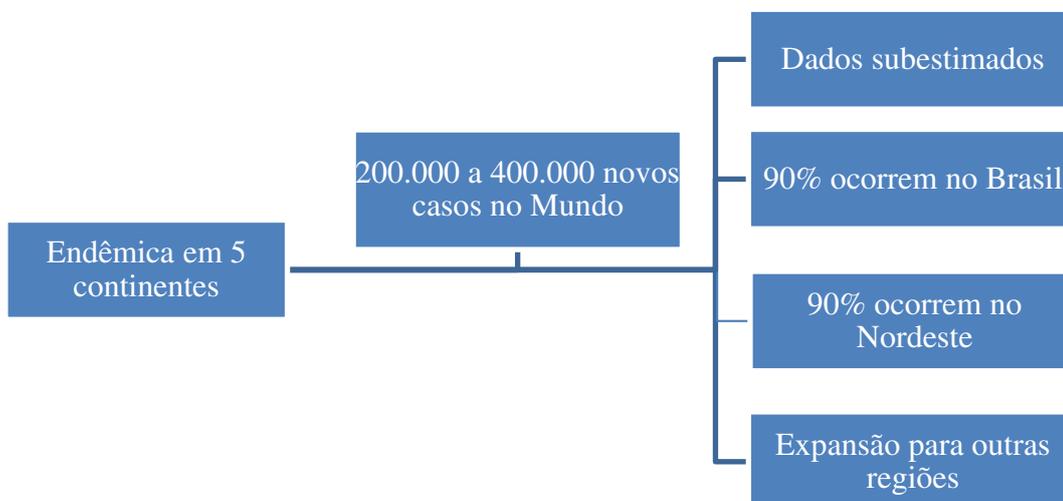
Fonte: Adaptado do wikipedia (SILVA, 2012).

2-4 Epidemiologia

As leishmanioses constituem importantes problemas de saúde pública, encontrando-se atualmente entre as doenças tropicais prioritárias da Organização Mundial de Saúde (BRASIL, 2014), além de ser uma das dezessete “Doenças Tropicais Negligenciadas” no mundo e a segunda no Brasil (WHO, 2014).

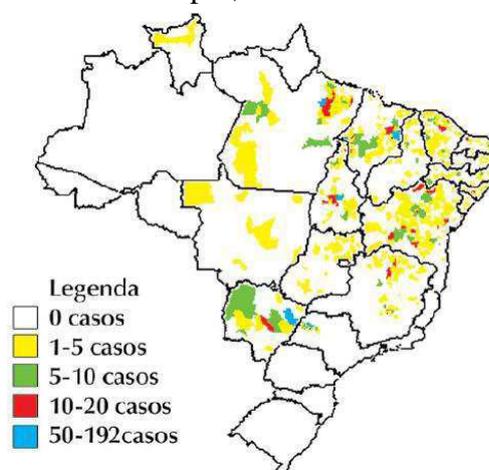
É uma doença endêmica em cinco continentes, com relatos de casos humanos em cerca de 54 países localizados em regiões tropicais e subtropicais. Cerca de 90% dos casos mundiais ocorrem em Bangladesh, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. A incidência anual estimada da doença é, em média, 200.000 a 400.000 novos casos. Porém, esses dados são subestimados, uma vez que a afecção não é de notificação compulsória em

todos os países, e muitos destes não realizam vigilância ou outras investigações e não possuem um sistema de armazenamento de dados (ALVAR et al., 2012; WHO, 2014).



Dos casos registrados na América Latina, cerca de 90% ocorrem no Brasil. No Brasil, a LV apresenta aspectos geográficos, sociais e climáticos diferentes, devido sua ampla distribuição geográfica. Na década de 90, 90% dos casos notificados da doença ocorreram na região Nordeste. Porém, à medida que a doença se expandiu para outras regiões foi atingindo áreas urbanas e periurbana, no período de 2000 a 2002 (Figura 5). Dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da LV, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRASIL, 2014).

Figura 5- Distribuição dos casos autóctones de leishmaniose visceral em humanos por município, Brasil 2002.



Fonte: BRASIL, 2014.

No Brasil, o cão doméstico representa o principal reservatório do parasito (COURTENAY et al., 2002). Outras espécies animais como: galinha, bovino, equídeo, caprino, ovino, suíno, gato, tem participação na epidemiologia da LV, onde podem ter associação à capacidade de atração dos vetores ao peridomicílio (MUTINGA et al., 1989; XIMENES; SOUZA; CASTELLÓN; 1999; MUKHTAR et al., 2000; ALEXANDER et al., 2002; MORAES-SILVA et al. 2006). Segundo Alencar (1956), a raposa é considerada o principal reservatório no ambiente silvestre, sendo que algumas espécies de marsupiais e roedores têm sido citadas como potenciais reservatórios do parasito (TRAVI et al., 1998; ZULUETA et al., 1999; CABRERA et al., 2003).

Características biológicas ou individuais dos cães, tais como a idade, sexo, comprimento do pelo e estilo de vida do animal, podem ser um fator de risco para a infecção por *Leishmania* sp. (DANTAS-TORRES; BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006; JULIÃO et al., 2007; MIRANDA et al., 2008; SILVA, 2015).

O cão apresenta uma importância na epidemiologia da doença não apenas no fato do mesmo apresentar altas prevalências de infecção quando comparadas à espécie humana, mas também pelo elevado número de animais assintomáticos, que pode chegar a 80% da população infectada (DANTAS-TORRES; BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006; BANETH et al., 2008; PALTRINIERI et al., 2010).

Segundo Laurenti et al. (2013), o desenvolvimento de sintomas inespecíficos e, às vezes tardios, tem contribuído para o subdiagnóstico da doença e transmissão do parasita no ambiente doméstico. A alta prevalência de cães assintomáticos sugere que estes animais mantenham o ciclo de transmissão da LV na mesma proporção, ou até em proporção superior aos cães sintomáticos. Existem discordâncias no que diz respeito à importância epidemiológica de cães assintomáticos. Recentemente foi comprovado que cães assintomáticos são altamente competentes para estabelecer a infecção em flebotomíneos, demonstrando o seu papel na manutenção do ciclo epidemiológico da doença.

O desmatamento é um fator considerável, visto que reduz a disponibilidade de fonte alimentar para os flebotomos, expondo o cão e o homem, que passam a ser as fontes mais acessíveis. O intenso processo migratório também contribui significativamente, pois provoca o deslocamento de pessoas que levam seus animais domésticos, muitas vezes já infectados, o que pode contribuir para a expansão e urbanização da doença (BRASIL, 2006).

No nordeste brasileiro, foi comprovado que 67% dos pacientes humanos com leishmaniose visceral possuíam animais de estimação em casa quando adoeceram (CESSE

et al., 2001). A criação de animais contribui para a produção de resíduos orgânicos piorando as condições sanitárias locais, o que favorece a atração e a manutenção do vetor no ambiente (FELICIANGELI, 2004; LAINSON; RANGEL, 2005).

A ausência de rede de esgoto e de coleta de lixo inadequada também podem estar associadas à manutenção da infecção por *L. infantum* em áreas urbanas, pois tornam o ambiente propício ao desenvolvimento de formas imaturas e à manutenção do vetor no ambiente (MORENO et al., 2005; CAMARGO-NEVES, 2007; CERBINO-NETO; WERNECK; COSTA, 2009; ALMEIDA; MENDONÇA; SOUSA, 2010; FERNÁNDEZ et al., 2012; BIGELI; OLIVEIRA JR.; TELES, 2012).

A leishmaniose visceral canina causa um impacto negativo para a saúde pública. Para isso é preciso entender melhor a epidemiologia da doença e melhorar a sensibilidade diagnóstica, assegurando-se da decisão correta quanto ao destino final de cães encaminhados para exame, assim, contribuindo para o controle da LVC em áreas endêmicas (COIRO, 2014).

2-5 Sinais clínicos

Os cães podem apresentar diferentes quadros clínicos da doença variando de animais assintomáticos, oligossintomáticos, a polissintomáticos com intenso parasitismo cutâneo (MONTEIRO et al., 2005).

A LVC, quando causada pela *Leishmania infantum*, é uma doença sistêmica essencialmente crônica que, em animais susceptíveis, pode causar anemia, linfadenomegalia generalizada, hepatoesplenomegalia, epistaxe, perda progressiva de peso, lesões cutâneas, renais, digestivas, locomotoras, oftálmicas e neurológicas (Figura 6 e 7) (FEITOSA et al., 2000; PALTRINIERI et al., 2010).

Figura 6- Cão com leishmaniose visceral apresentando lesões dermatológicas e emagrecimento.



Fonte: MELO, 2013

Figura 7- Cão com leishmaniose visceral apresentando onicogrifose.



Fonte: MELO, 2013

Em alguns cães, os sinais clínicos da doença apresentam-se logo após a infecção, no entanto, em muitos animais a infecção segue seu curso de forma assintomática. Quando os animais apresentam sinais após a infecção desenvolvem imunidade humoral, podendo ser identificados por sorologia, mas são incapazes de desenvolver uma imunidade celular efetiva. Já os animais que não demonstram sinais da doença podem permanecer desta forma por anos ou até por toda a vida. Porém, uma alteração em seu estado imune, em decorrência de alguma enfermidade ou do uso de medicamentos imunossupressores, pode levar ao aparecimento dos sintomas da doença (BANETH et al., 2008).

A leishmaniose visceral humana caracteriza-se por uma diminuição da resposta imune celular ao antígeno de *Leishmania*. A doença pode ser considerada imunomediada devido ao fato do parasito alterar o sistema imunológico do hospedeiro. Os neutrófilos fagocitam as formas promastigotas, que são as primeiras células a migrarem para o local de infecção, estimulando linfócitos T auxiliares. A principal alteração imunológica é a incapacidade dos linfócitos ativarem os macrófagos para destruir o parasita invasor (FEITOSA et al., 2000; BACELLAR; CARVALHO, 2005).

2-6 Diagnóstico canino

A identificação do parasito pode ser feita em material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. A LV é caracterizada por uma marcada estimulação policlonal de linfócitos B, que resulta em hipergamaglobulinemia e

grande produção de anticorpos, o que facilita o diagnóstico através de testes sorológicos, evitando os métodos parasitológicos, que são mais invasivos (GONTIJO, MELO; 2004).

Os métodos sorológicos são úteis no diagnóstico, sendo que os mais empregados para o diagnóstico de leishmaniose visceral são: os testes de imunoadsorção enzimática (ELISA), imunocromatografia, reação de imunofluorescência indireta (RIFI), aglutinação direta (DAT), Western blot (WB) (GÁLLEGO, 2004; FERREIRA et al., 2007; BRASIL, 2014; SILVA, 2015). Muitos avanços aconteceram nos últimos anos, mas nenhum ensaio apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (GONTIJO, MELO; 2004).

O diagnóstico parasitológico é realizado a partir da observação direta de formas amastigotas do parasito em esfregaços de órgãos linfoides. Alguns desses procedimentos, mesmo que ofereçam a vantagem da simplicidade, são métodos invasivos, que geram riscos para o animal e dificuldades de execução em programas de saúde pública, em que um grande número de animais deve ser avaliado em curto espaço de tempo. Considera-se que a detecção do parasito constitui o padrão ouro no diagnóstico da LVC, por apresentar especificidade que atinge 100%, apesar que a sensibilidade é variável, sendo que a distribuição tecidual não é homogênea (CONTIJO; MELO, 2004; BEPA, 2009).

O teste de ELISA consiste na reação entre o soro do animal e os antígenos solúveis e purificados de *Leishmania*, obtidos a partir de cultura *in vitro*. Os anticorpos específicos das amostras utilizadas se fixam aos antígenos e logo após é adicionado uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se liga aos anticorpos presentes (BRASIL, 2014). No teste ELISA, grande número de amostras pode ser aplicado em curto espaço de tempo, por isso muitos esforços foram e estão sendo concentrados para melhoria dos antígenos utilizados no teste (FARIA; ANDRADE, 2012).

O único kit ELISA comercializado no Brasil, o ELISA S7® ®, tem como base a fração carboxiterminal recombinante da HSP70 peptídeo, que permite, segundo o fabricante, a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção. Trata-se de um ensaio relativamente simples e rápido, considerado uma alternativa para a RIFI. É reconhecido pelo MAPA como tendo elevadas especificidade e sensibilidade. O emprego do antígeno no kit confere aproximadamente 95% de especificidade e sensibilidade ao teste. Devido a isso, tem sido extensamente adotado para o sorodiagnóstico do calazar canino no Brasil (BIOGENE, 2007).

No ano de 2011, por meio de nota técnica conjunta 01/2011, o MS substituiu o protocolo de diagnóstico para a LVC existente, recomendando o *Dual Path Platform* (DPP®R) (imunocromatografia) para a triagem e o ELISA como teste confirmatório. O

DPP®R é um teste rápido, qualitativo, cujos antígenos são as quinesinas recombinantes K26 e K39. É recomendado pelo Ministério da Saúde como rotina para todos os Centros de Controle de Zoonoses em nível nacional (BRASIL, 2011). Em estudos realizados por Grimaldi et al. (2012), obtiveram sensibilidade de 98% no diagnóstico de cães sintomáticos e 47% nos assintomáticos. O que sugere a necessidade de testes mais sensíveis no diagnóstico de animais recém-infectados, pois falhas nos resultados podem não detectar casos positivos, favorecendo a disseminação da doença.

Diante das limitações apresentadas dos métodos sorológicos e parasitológicos, as técnicas moleculares adquirem destaque no cenário atual. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que amplifica e identificação regiões específicas do DNA de interesse, constitui assim uma nova perspectiva para o diagnóstico da LV. A detecção do DNA do parasito é possível em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, biópsias cutâneas, aspirados de linfonodos, sangue, urina, soro, cortes histológicos de tecidos parafinados e também no vetor (MANNA et al., 2004; IKEDA; FEITOSA, 2006). A sensibilidade da PCR no diagnóstico da *L. infantum* depende do gene alvo. Normalmente, quando o alvo são sequencias do cinetoplasto, é possível detectar até 10 fg/ μ L de DNA do parasito (SILVEIRA NETO et al., 2012).

2-7 Estratégias de controle

A estratégia de controle está centrada na identificação e eliminação dos reservatórios, principalmente o cão positivo, aplicação de inseticidas para eliminação do vetor, diagnóstico e tratamento adequado dos casos humanos registrados. As medidas de controle geralmente empregadas não tem apresentado efetividade suficiente para redução da prevalência, ainda que importantes avanços tenham sido alcançados na redução da letalidade (BRASIL, 2014).

Por mais de sessenta anos, o tratamento das leishmanioses vem sendo realizado com antimoniais pentavalentes, tendo como tratamentos alternativos a anfotericina B, pentamidinas e os imunomoduladores. (GONTIJO; MELO, 2004). Tilley & Smith (2008) afirmam que o medicamento de escolha no tratamento da leishmaniose visceral humana é o antimonato de meglumina e estibogliconato de sódio, disponível no Centro de Controle e Prevenção de Doenças.

Na década de 90, surgiram novas alternativas para o controle e prevenção da LVC como o uso de coleiras impregnadas com deltametrina, que conseguiram controlar a

incidência da doença canina (KILLICK-KENDRICK et al., 1997), assim como o surgimento de vacinas para os cães (LEMESRE et al., 2007). As coleiras impregnadas com deltametrina (Scalibor®) demonstraram não só uma redução na taxa de alimentação dos flebotomíneos (DAVID et al., 2001; REITHINGER et al., 2004), como também diminuição do tempo de vida, o que levou a diminuição da taxa de propagação da doença (REITHINGER et al., 2004).

A primeira vacina desenvolvida para o controle da LVC, Leishmune®, produzida pela empresa Zoetis Saúde Animal, utiliza o antígeno purificado FML (o complexo glicoproteico-Ligante da fucose manose) de *L. donovani*, que nos cães vacinados promoveu um aumento da resposta imune celular do tipo Th1, ocorrendo regressão dos sinais clínicos e, aparentemente, esta alternativa parece bloquear a transmissão da doença (SARAIVA et al., 2006). Porém, em 2014 o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) suspendeu a licença de fabricação e comercialização de venda da Leishmune®, alegando que a empresa não atendeu completamente os requisitos que comprovam a eficácia do produto (MAPA, 2014).

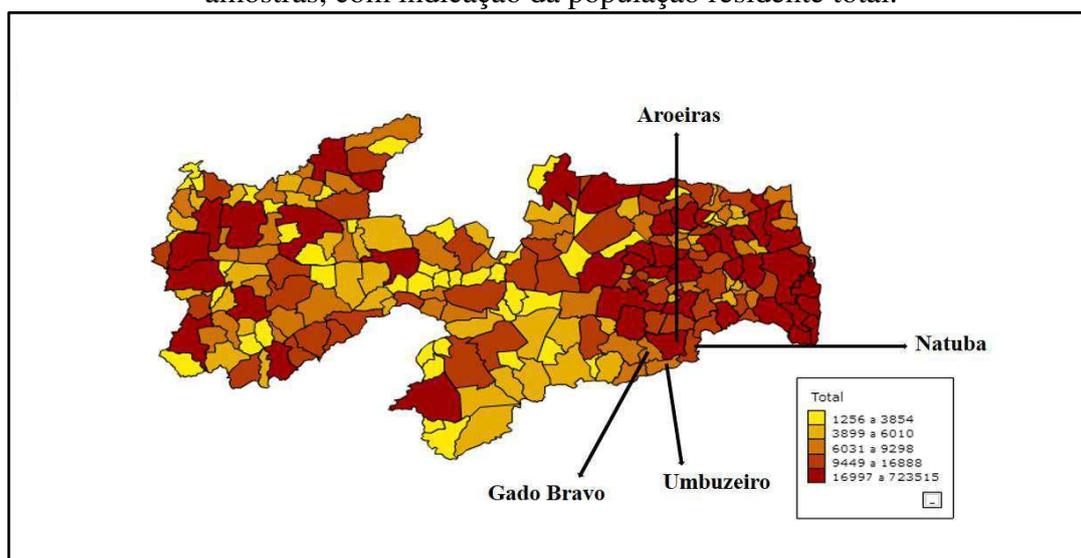
Em 2008, entrou no mercado brasileiro uma nova vacina, a Leish-Tec®, da empresa Hertape Saúde e Bem-estar Animal, que utiliza como antígeno a proteína recombinante A2, específica do estágio amastigota, sendo descrita em várias espécies de *Leishmania* spp. Os animais vacinados desenvolveram perfil imunológico protetor (Th1), ou seja, alta resposta imune celular. Na maioria das vezes, o animal não desenvolve reação pós-vacinal e permanece soronegativo frente aos exames sorológicos de rotina (ZANIN et al., 2007, FERNANDES et al., 2008).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3-1 Área de coleta

As coletas foram realizadas nos municípios de Aroeiras, Gado Bravo, Umbuzeiro e Natuba, Agreste paraibano (Figura 8), nas zonas urbana, periurbana e rural.

Figura 8- Localização dos municípios paraibanos onde foram realizadas as coletas das amostras, com indicação da população residente total.



Fonte: IBGE, 2010.

O município de Aroeiras apresenta uma população de 19.082 habitantes (IBGE, 2010). O município está situado a uma distância de 177.80 Km da capital, João Pessoa, e apresenta um clima tropical com temperatura média anual em torno de 25°, altitude de 363 m (FAMUP, 2016).

O município de Gado Bravo apresenta uma população de 8.376 habitantes (IBGE, 2010), distando 191.80 km da capital, João Pessoa. O clima é semiárido com temperatura média anual em torno de 25°, e altitude de 400 m (FAMUP, 2016).

O município de Umbuzeiro apresenta uma população de 9.298 habitantes (IBGE, 2010) e está situado a uma distância de 112.80 km da capital, João Pessoa. O clima é semiárido com temperatura média anual em torno de 24° e altitude de 541 m (FAMUP, 2016).

O município de Natuba apresenta uma população de 10.566 habitantes (IBGE, 2010), está situada a uma distância de 143.40 km da capital, João Pessoa, e apresenta um clima Semiárido e de transição para mata atlântica, com temperatura média anual em torno de 25°, e altitude de 331 m (FAMUP, 2016).

3-2 População estudada

O tamanho da amostra foi determinado através da fórmula para amostras simples aleatórias, com base numa estimativa de prevalência de 50% (a fim de maximizar a amostragem), um nível de confiança de 95% (THRUSFIELD, 2007), o que proporcionou uma população amostral de pelo menos 96 animais por município. Logo, 444 cães domiciliados, com idades entre 6 meses até mais de 6 anos, machos ou fêmeas, com ou sem raça definida. Dentre os quais 113 cães pertenciam ao município de Aroeiras, 101 a Gado Bravo, 100 a Umbuzeiro e 130 cães ao município de Natuba. As áreas escolhidas para coletas foram selecionadas pelas secretárias municipais cujo os locais já tinham dados de ocorrência prévia da doença em cães ou humanos, dados estes que ajudam no monitoramento e controle da leishmaniose visceral canina, que devem ser buscados pelos órgãos de controle.

3-3 Obtenção das amostras

A colheita do material biológico foi realizada por venopunção cefálica, femoral ou da jugular (Figura 9), em um total de 5 ml de sangue, com o auxílio de seringa de 5 ml BD e agulhas 25X8 mm BD. O sangue coletado foi depositado imediatamente em tubo de ensaio plástico contendo o anticoagulante citrato de sódio (4%).

Figura 9- Colheita do material biológico por venopunção cefálica (A) e femoral (B).



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2016.

3-4 Processamento das amostras

Após a coleta, o material foi encaminhado para o Laboratório de Análises Clínicas Dra. Juberlita Marques de Aguiar Marques, situado na Avenida José Pedro de Melo, centro, Aroeiras-PB, onde foram centrifugadas e separadas alíquotas do plasma, visando a realização dos testes sorológicos. As amostras foram identificadas individualmente e congeladas a -20°C, até a realização dos exames.

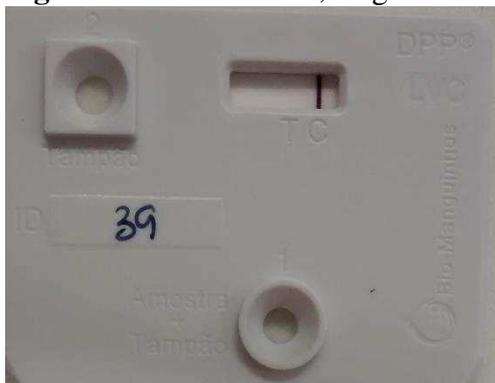
3-5 Realização dos testes

As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), campus Patos-PB, onde foram congeladas a -20°C. Em seguida, foram realizados os testes sorológicos imunocromatográfico *Dual Path Plataform* (DPP®) e o ELISA S7®. Posteriormente, os dados dos animais positivos no DPP/Bio-Manguinhos e o ELISA S7® foram anexados ao sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL), para serem enviadas ao Laboratório Central de Saúde Pública da Paraíba (Lacen-PB) onde foi realizado o ELISA/EIE - Bio-Manguinhos®.

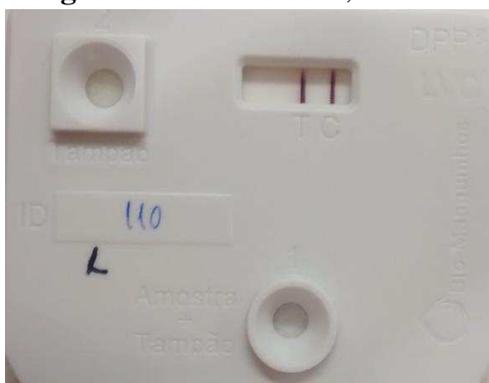
3-6 Diagnóstico de *Leishmania infantum*

3-6-1 DPP® Leishmaniose Visceral Canina

O teste rápido imunocromatográfico *Dual Path Plataform* (DPP®) é o teste de triagem disponível para as secretárias municipais de saúde, oferecendo o resultado em cerca de 15 minutos (BIO-MANGUINHOS, 2011). O teste DPP® foi realizado pela adição de 5 µL (cinco microlitros) de plasma ao poço 1 intitulado “Amostra + Tampão”, a seguir foram adicionadas 2 (duas) gotas do tampão. Após 5 (cinco) minutos as duas linhas azuis, controle (C) e teste (T), desapareceram. Em seguida coloca-se 4 gotas do tampão no poço 2 intitulado “Tampão”. A leitura dos resultados foi realizada 10 minutos após esta etapa, quando se visualiza as seguintes condições: a) aparecimento de uma linha vermelha - resultado negativo (Figura 10); b) duas linhas vermelhas – resultado positivo (Figura 11), (JÚNIOR, 2011).

Figura 10- Teste DPP®, Negativo.

Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2016.

Figura 11- Teste DPP®, Positivo.

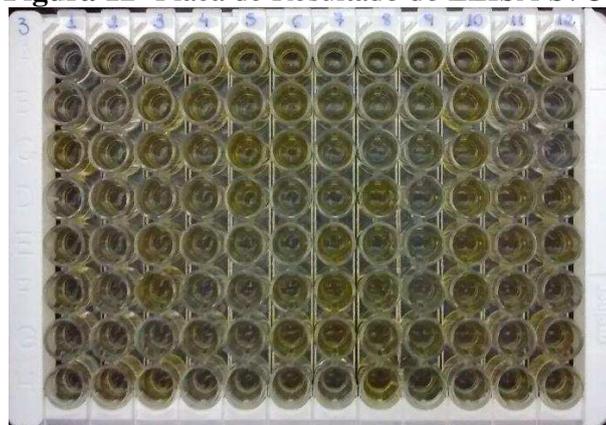
Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2016.

3-6-2 ELISA S7®

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania infantum* foi realizada também pelo ELISA S7®¹, seguindo as instruções do fabricante (Figura 12). Resumidamente, os soros controles e amostras foram diluídos em solução de coleta (1:100) e incubados por 4 horas a T.A. Após este período, foram transferidos 100µl de cada um dos soros para a placa sensibilizada e incubados por 30 minutos, a TA, em câmara úmida. Posteriormente, a placa foi lavada 3 (três) vezes com PBST. Após descarte da solução de lavagem, acrescentou-se 100µl por poço da solução do conjugado (Proteína A-peroxidase, 1/10000) e incubada por 30 minutos a T.A. A placa foi lavada 3 (três) vezes com PBS para posterior acréscimo de 100µl da solução de revelação, que consistia de tampão citrato pH 5.0, tetrametilbenzidina (TMB) e água oxigenada. Incubou-se a placa por 20 minutos no escuro. Acrescentou-se duas gotas da solução de parada (ácido sulfúrico 2N) e efetuou-se a leitura (Figura 12) em leitor de ELISA a $\lambda = 450$ nm.

¹ Biogene Ind. & Com. LTDA

Figura 12- Placa de Resultado do ELISA S7® .



Fonte: SILVA, 2016.

3-6-3 ELISA/EIE

O ensaio sorológico imunoenzimático ELISA/EIE é o método confirmatório de diagnóstico da leishmaniose visceral canina para o Ministério da Saúde e seus resultados são expressos em reagente ou não reagente. Sua sensibilidade varia de 71 a 100% e sua especificidade entre 85 e 100%.

A técnica consiste na reação de soros (controle e amostras) caninos com antígenos solúveis e purificados de *L. infantum*, obtidos a partir de cultura *in vitro*, que foram previamente adsorvidos nos poços de microplacas. Após a adição dos soros diluídos em diluente específico, na concentração de 1/100, os anticorpos específicos no soro se fixaram ao antígeno. A visualização da reação ocorre quando adiciona a anti-imunoglobulina de cão, conjugada a enzima peroxidase, que se liga aos anticorpos específicos. Após 30 minutos, foi adicionada a solução de revelação e a placa foi mantida no escuro por 20 minutos. Ácido sulfúrico 2N foi utilizado para interromper a reação. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 490nm. Foram considerados positivos os soros que apresentaram valores maiores que o *cut-off* (igual ou >3) resultado obtido através da média dos soros controle mais o desvio-padrão encontrado (AMÓRA et al., 2006; BRASIL, 2014).

3-7 Questionário epidemiológico

No momento da coleta foi aplicado aos proprietários dos cães um questionário epidemiológico com o intuito de verificar fatores sócio-ambientais que possam atuar como possíveis fatores de risco para a leishmaniose visceral canina (Anexo 1).

3-8 Análise estatística

A análise dos possíveis fatores de risco associados à soropositividade foi efetuada em duas etapas, análise univariada e análise multivariada. As variáveis independentes (possíveis fatores de risco) foram categorizadas e codificadas de acordo com Latorre (2004). As variáveis que apresentaram um valor de $p \leq 0,20$ pelo teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher foram usadas na análise multivariada, através da regressão logística múltipla (ZAR, 1999; HOSMER; LEMESHOW, 2000). O nível de significância adotado na análise múltipla foi de 5%. As análises foram realizadas com o programa SPSS 13.0 for Windows.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas um total de 444 amostras de sangue das zonas rural, urbana e peri-urbana dos quatro municípios. A frequência sorológica encontrada da LVC na região foi de 14,18%, ou seja, 63 dos 444 cães foram positivos em, pelo menos, dois testes sorológicos. As frequências nos municípios de Aroeiras, Umbuzeiro, Gado Bravo e Natuba foram de 13,27% (15/113), 11% (11/100); 18,81% (19/101) e 13,84% (18/130), respectivamente. Esses resultados demonstram uma alta frequência da LVC na região do agreste Paraibano, sendo superior aos resultados descritos por Vidal (2008) que obteve 3% de positivos no ELISA/EIE, na cidade de Campina Grande, agreste Paraibano e nos resultados descritos por Fernandes et al. (2016) que apresentou 7,8% de cães sorologicamente positivos em cinco municípios paraibanos, incluindo o agreste, através do ELISA S7®. Entretanto, nossos resultados assemelham-se ao encontrado por Silva (2015) que obteve 11,33% do total de 362 animais, no município de Patos-PB, através do ELISA/EIE, e pelo encontrado por Pinto e Melo (2011) nos municípios de Cajazeiras, Sousa e Uiraúna, com 19,4%, 10,1% e 15,5%, respectivamente, também no sertão Paraibano, que usou a técnica de ELISA S7®.

Visto que o Nordeste brasileiro é a região com as mais altas taxas de leishmaniose visceral canina e humana (BRAVIA et al., 2005), os municípios no agreste paraibano não são diferentes. Santos (2010) na cidade de Garanhuns-PE encontrou 16% reagentes dos 256 animais avaliados na RIFI e Oliveira et al. (2011) encontraram 10,25% cães positivos na cidade de Araripina-PE, em 556 cães avaliados.

Alguns fatores contribuem para que ocorram diferenças nas prevalências, entre estes a resposta imune do hospedeiro, o antígeno utilizado, sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos utilizados, como também da população canina que foi estudada (FERRER, 1999).

Nos exames sorológicos realizados, o ELISA S7® detectou 125/444 (28,15%) animais positivos e 22 ficaram na zona cinza (resultado indeterminado), o DPP detectou 110/444 (24,77%) animais positivos, no ELISA/EIE, 33/248 (13,3%) foram positivos e 13 animais ficaram na zona cinza, sendo considerados negativos para este estudo. Resultados encontrados por Silva (2015) mostrou que a técnica sorológica mais sensível foi o ELISA/EIE, que detectou 13,26% animais positivos, comparado com 11,60% no DPP, o que difere dos nossos resultados em que a técnica mais sensível foi o ELISA S7®, seguido dos resultados do DPP.

A população estudada era composta por 282 machos (63,5%), destes 38 (13,47%) foram positivos e 162 fêmeas (36,5%) das quais 25 (15,43%) também foram positivos. Observando assim maior frequência em fêmeas. Almeida et al. (2009) que não observaram predisposição sexual.

Dentre os animais positivos, 45 (71,4%) pertenciam a zona rural e 18 (23,8%) pertenciam a zona urbana, a alta prevalência de animais positivos na zona rural possivelmente se dá devido à proximidade que estes animais estão do habitat natural do vetor da doença. Em geral, a ocorrência na zona rural é maior do que na zona urbana (FRANÇA-SILVA et al., 2003; AMÓRA, 2006).

Quanto à raça, 414 (93,01%) animais não possuíam raça definida (SRD) e destes 15,01% (62/414) foram positivos para LVC. Entre os de raça definida, apenas 1 (1,6%), da raça Poodle, foi positivo. Em estudos realizados por Almeida et al. (2010) nenhuma raça foi determinada como predisposta, correspondendo aos nossos resultados em que raça e sexo não tiveram diferença significativa na análise estatística ($p < 0,05$) (CONTIJO; MELO, 2004). Feitosa et al., (2000) relataram que todos os cães são susceptíveis à infecção por *Leishmania* e associa a maior frequência de casos em animais de porte grande, porque estes têm função de guarda, habitando o ambiente peridomiciliar, o que os torna mais expostos ao vetor.

A faixa etária de maior frequência relatada foi entre um e seis anos de idade, concordando com alguns autores que afirmam que a LV é frequente em cães adultos, devido ao longo período de incubação do parasito, além do maior tempo de possível exposição ao vetor (GÁLLEGO, 2004). Nesta pesquisa, foi observada uma prevalência de 6,3% em animais com idade inferior a um ano, o que mostra que, independentemente da idade, há a probabilidade do animal contrair a leishmaniose, demonstrando que os animais jovens também devem ser incluídos em levantamentos epidemiológicos.

Em relação ao contato com outros animais, 86,2%, ou seja, 383 animais mantinham contato direto com outros animais.

Dentre os animais positivos, apenas 18 (28,57%) apresentaram sinais clínicos característicos da doença, principalmente o emagrecimento progressivo, lesões dermatológicas, úlceras, onicogribose, abdome distendido e mucosas hipocoradas. O que demonstra o grande percentual de animais positivos assintomáticos. Concordando com descrito em diversos trabalhos em que as principais manifestações clínicas observadas são, onicogribose, alterações dermatológicas, linfadenomegalia e esplenomegalia (abdome distendido) (ALMEIDA; MENDONÇA; SOUSA, 2010). Nunes Filho et al. (2015) em seu

estudo também encontrou sinais clínicos da doença, como mucosas hipocoradas, alterações dermatológicas e onicogribose.

Para análise estatística foram avaliados diversos fatores sócio-epidemiológicos que podem influenciar nos resultados da pesquisa em cada município. Na análise univariada, alguns fatores de risco apresentaram associação significativa ($p \leq 0,2$) nos quatro municípios de acordo com as tabelas 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Tabela 1- Análise univariada dos possíveis fatores de risco associados à leishmaniose visceral canina no município de Aroeiras, Agreste Paraibano. Variáveis significativas.

Análise Univariada ($p \leq 0,2$) - Aroeiras	
Variáveis	Valor de p
Criação	0,195
Contato com bovino	0,035
Contato com ave	0,018
Limpeza	0,143
Vacinações	0,199

Tabela 2- Análise univariada dos possíveis fatores de risco associados à leishmaniose visceral canina no município de Umbuzeiro, Agreste Paraibano. Variáveis significativas.

Análise Univariada ($p \leq 0,2$) - Umbuzeiro	
Variáveis	Valor de p
Idade	0,073
Criação	0,167
Contato com cães	0,076
Ambiente	0,198
Vacinações	0,198

Tabela 3- Análise univariada dos possíveis fatores de risco associados à leishmaniose visceral canina no município de Gado Bravo, Agreste Paraibano. Variáveis significativas.

Análise Univariada ($p \leq 0,2$) - Gado Bravo	
Variáveis	Valor de p
Renda	0,109
Zona	0,016
Contato com equídeos	0,045
Contato com carrapatos	0,010

Tabela 4- Análise univariada dos possíveis fatores de risco associados à leishmaniose visceral canina no município de Natuba, Agreste Paraibano. Variáveis significativas

Análise Univariada ($p \leq 0,2$) - Natuba	
Variáveis	Valor de p
Renda	0,110
Idade	0,053
Criação	0,132
Contato com bovino	0,092
Ambiente	0,068

Essas variáveis foram submetidas a análise multivariada, por regressão logística múltipla. Na cidade de Umbuzeiro, onde o fator de risco encontrado foi Contato com Cães com $p < 0,042$ (*Odds Ratio* = 4,45) (Tabela 5), em que os animais que tem contato com outros cães apresentam quatro vezes mais chances de apresentar a doença. Amóra (2006) relata que cães que convivem com outros cães apresentaram associação significativa ($p < 0,05$), independente da procedência destes.

Tabela 5- Fator de risco associados à leishmaniose visceral canina na cidade de Umbuzeiro, Agreste Paraibano, estimado por regressão logística múltipla.

Fatores de risco	<i>Odds ratio</i>	IC 95%	Valor de p
Contato com outros cães	4.4506	1.06-18.76	0,0420

Em Natuba, o fator de risco encontrado foi Idade ($p < 0,0075$; *Odds Ratio* = 1,97) em que os animais acima de quatro anos apresentaram quase duas vezes mais chances de desenvolver a doença (Tabela 6). Estudos mostram uma predisposição dos cães adultos em adquirirem a doença, provavelmente associada ao longo período de incubação do parasita, além do maior tempo de exposição ao vetor e parasita (ARIAS; MONTEIRO; ZICKER, 1996). Silva (2012) relata que animais que tinham idade acima de um ano apresentaram um maior percentual em desenvolver a doença.

Tabela 6- Fator de risco associados à leishmaniose visceral canina na cidade de Natuba, Agreste Paraibano, estimado por regressão logística múltipla.

Fatores de risco	<i>Odds ratio</i>	IC 95%	Valor de p
Idade	1.9776	1.20-3.26	0,0075

Quando a análise univariada foi realizada com o resultado global das amostras, isto é, considerando os fatores de risco de todos os municípios, observou-se associação significativa ($p \leq 0,2$) para as variáveis zona, escolaridade, renda, raça, criação, equídeo, cão, ave e adoção (Tabela 7). Essas variáveis foram submetidas à análise multivariada, por regressão logística múltipla, e os fatores de risco encontrados foram escolaridade (*Odds ratio* = 0.7828) e renda (*Odds ratio* = 0.2508) (Tabela 8), tornando-se então previsores significativos, indicando que: a) à medida que os proprietários estudam reduz a chance dos seus cães adoecerem em 21,7% e b) à medida que os proprietários apresentam renda superior a dois salários mínimos também reduz as chances dos seus cães adoecerem em 74,92%.

Tabela 7- Possíveis fatores de risco associados à leishmaniose visceral canina no Agreste Paraibano. Análise univariada por agrupamento dos dados dos municípios de Natuba, Aroeiras, Umbuzeiro e Gado Bravo. Variáveis significantes.

Análise Univariada ($p \leq 0,2$) – Todos os municípios	
Variáveis	Valor de p
Escolaridade	0,162
Renda	0,073
Zona	0,006
Raça	0,192
Criação	0,019
Contato com equídeos	0,025
Contato com cães	0,019
Contato com aves	0,130
Adoção	0,053

Tabela 8- Fator de risco associados à leishmaniose visceral canina, estimados por regressão logística múltipla, por agrupamento dos dados dos municípios de Natuba, Aroeiras, Umbuzeiro e Gado Bravo.

Fatores de risco	<i>Odds ratio</i>	IC 95%	Valor de p
Escolaridade	0.7828	0.62-0.98	0,0362
Renda	0.2508	0.07-0.85	0,0264

A leishmaniose está intimamente relacionada ao baixo nível socioeconômico da população, que, normalmente, vivem no meio rural e nas periferias das cidades, condição comum aos municípios estudados (Figuras 13 e 14). Fatores como o intenso processo migratório, as distorções econômicas e sociais, a má distribuição de renda e o processo de urbanização crescente, levaram a expansão de áreas endêmicas e o aparecimento de novos focos da doença (Figura 14) (BRASIL, 2014). Os nossos resultados corroboram com os descritos por Alvarenga et al. (2010), que observaram que os casos humanos tinham correlação com o local da moradia e ausência de infraestrutura sanitária, onde, normalmente, as pessoas têm baixa renda e baixo nível de escolaridade.

Figura 13- Área urbana do município de Natuba-PB. Ambiente favorável para a ocorrência da leishmaniose.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2016.

Figura 14- Área rural do município de Gado Bravo-PB. Ambiente favorável para a ocorrência da leishmaniose.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2016.

5- CONCLUSÃO

Os municípios do Agreste Paraibano apresentam uma alta frequência da LVC, devido às características socioambientais predisponentes para manutenção do ciclo vetor-parasito-hospedeiro e, como consequência, a ocorrência de casos de leishmaniose visceral humana e canina. Desta forma, em função das características socioeconômicas comuns à região estudada, recomenda-se que medidas de gestão pública sejam tomadas para minimizar a ocorrência de fatores de risco em nível global, isto é, não particularizando por município.

Adicionalmente, sugere-se o teste de ELISA como ensaio de triagem nos casos de leishmaniose visceral canina.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, J.E. Leishmaniose visceral no novo mundo. **Publicações Médicas**, v.27, n.196, p.1- 12, 1956.
- ALEXANDER, B.; CARVALHO, R. L.; McCALLUM, H.; PEREIRA, M. H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1480-1485, 2002.
- ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1610-1615, 2010.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.
- ALVARENGA, D. G.; ESCALDA, P. M. F.; COSTA, A. S. V.; MONREAL, M. T. F. D. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43(2):194-197, mar-abr, 2010.
- ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, n.1, p. 259-265, 2004.
- AMÓRA, S. S. A. **Epidemiologia da Leishmaniose e Tripanossomíase Canina no Município de Mossoró, Rio Grande do Norte**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias. 2004.
- AMÓRA, S. S. A.; SANTOS, M. J.; 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 endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1854-1859, 2006.
- ARIAS, J. R., MONTEIRO, P. S; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emergence Infection Diseases**, v.2, n.2 p.145-6, 1996.
- BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da leishmaniose visceral. **Revista Gazeta Médica da Bahia**. Bahia: v. 75, n. 1, p. 24-31, 2005.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.
- BEPA. **Boletim Epidemiológico Paulista(online)**. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral canina. São Paulo. 2009.

BIGELI, J. G.; OLIVEIRA JR., W. P.; TELES, N. M. M. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 18-23, 2012.

BIOGENE. Kit para diagnóstico do Calazar Canino ELISA S7® . Recife, 2007. Disponível em <<http://biogene.ind.br/idx.php?pag=produtos>>. Acesso em: 20 de julho de 2015.

BIO-MANGUINHOS, Bula - **Manual de Instrução do Kit Teste Rápido LVC – DPP**. 2011. Disponível em: <<http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2015/09/instru%C3%A7%C3%B5es-teste-rapido-Alere-LVC-manual.pdf>>. Acesso em: 05 de maio de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 120 p. 2006.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. **Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)**. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Técnica Conjunta nº 1, de 2011. **Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)**. Brasília: Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/ Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 122 p., 2014.

BRAVIA, M. E.; CARNEIRO, D. D.; GURGEL, H. C.; MADUREIRA FILHO, C.; BARBOSA, M. G. Remote sensing and geographic information systems and risk of American visceral leishmaniasis in Bahia, **Brazil. Parasitol.**, Cambridge, 47: 165-169, 2005.

CABRERA, M. A. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCHI, M. C. A.; XAVIER, S. C.; SILVA, A. V. M.; JANSEN, A. M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n.2, p.79-83, 2003.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. A leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo: situação atual. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 48, p. 12-14, 2007.

CERBINO-NETO, J.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: na ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 7, p. 1543-1551, 2009.

CESSE, E. A. P.; CARVALHO, E. F.; ANDRADE, P. P.; RAMALHO, W. M.; LUNA, L. Organização do espaço urbano e expansão do Calazar. **Revista Brasileira de Saúde Materno e Infantil**, v. 1, n. 2, p. 167-76, 2001.

COELHO, E.A.F.; TAVARES, C. A. P.; CARVALHO, F. A. A. et al. Immune responses induced by *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* the A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 7, p. 3988–3994, 2003.

COIRO, C. J. **Caracterização genotípica de amostras de *Leishmania* spp. Isoladas de cães de área endêmica para Leishmaniose Visceral Canina no estado de São Paulo.** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais, 2014.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of Infectious Diseases** v. 186, p.1314-1320, 2002.

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 320-325, 2007.

DAVID, J. R.; STAMM, L. M.; BEZERRA, H. S.; SOUZA, R. N.; KILLICK-KENDRICK, R.; LIMA, J. W. O. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 839-847, 2001.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.4, p.352-356, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822006000400007>. Acesso em: 20 de julho de 2015.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 54-60, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniasis in South America. *Parasites & Vectors*. **BioMed Central Ltd**. 2009. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-2-S1-S1>>. Acesso em: 16 de maio de 2016.

DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 155-159, 2011.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.4, n.3, p.198-212, 1962.

FAMUP. Federação das Associações de Municípios da Paraíba. Disponível em: <<http://www.famup.com.br/portal/index.php>>. Acesso em: 05 de maio de 2016.

FARIA, A.R.; ANDRADE, H.M. **Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática**. 2012. Disponível em: <<http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/rpas/v3n2/v3n2a07.pdf>>. Acesso em: 20 de julho de 2015.

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**, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 1, p. 71- 80, 2004.

FERNANDES, A. P.; COSTA, M. M. S.; COELHO, E. A. F.; MICHALICK, M. S. M.; FREITAS, E.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; RESENDE, D. M.; HERMONT, V.; ABRANTES, C. F.; GAZZINELLI, R. T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 2008.

FERNANDES, A. R. F.; PIMENTA, C. L. R. M.; VIDAL, I. F.; OLIVEIRA, G. C.; RAISSA SARAN SARTORI, R. S.; ARAÚJO, R. B.; MELO, M. M.; LANGONI, H.; AZEVEDO, S. A. Risk factors associated with seropositivity for *Leishmania* spp. And *Trypanosoma cruzi* in dogs in the state of Paraíba, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, vol. 25, n. 1, p. 90-98, jan.-mar. Jaboticabal, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016010>>. Acesso em: 5 de maio de 2016.

FERNÁNDEZ, M. S.; SALOMÓN, O. D.; CAVIA, R.; PEREZ, A. A.; ACARDI, S. A.; FERNANDEZ-COTRINA, J.; INIESTA, V.; BELINCHON-LORENZO, S.; MUNOZ MADRID, R.; SERRANO, F.; PAREJO, J. C.; GÓMEZ-GORDO, L.; SOTO, M.; ALONSO, C.; GÓMEZ-NIETO, L. C. Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniosis by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 2012 (article in press).

FERREIRA, S. A.; ITUASSU, L. T.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 257–263, 2008.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. From Canine Leishmaniasis: na update Proceedings of a Canine Leishmaniasis. **Forum**, Barcelona (Sitges), p.28-31, 1999.

FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; COSTA, C. A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic área of Montes Claros Municipality, Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**. 111:161-173, 2003.

FREITAS, E.; MELO, M. N.; COSTA-VAL, A. P.; MICHALICK, M. S. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 159-167, 2006.

GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: las leishmaniosis. **Review Scientific and Technical Office International des Epizooties**, v.23, n.2, p.661-676, 2004.

GONTIJO, 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.

GRIMALDI JR., G.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.B.; PINTO, I. D.; 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. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. 106(1): 54-9, 2012.

HOSMER, D.W.; LEMESHOW, W.S. **Applied Logistic Regression**. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, 375p, 2000. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=Po0RLQ7USIMC&printsec=frontcover&hl=ptBR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acessado em: 5 de maio de 2016.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico**, 2010.

IKEDA, G. F. A.; FEITOSA, M.M. Métodos de diagnóstico de leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**. 2006.62:32-38.

JULIÃO, F. S.; SOUZA, B. M. P. S.; FREITAS, D. S.; OLIVEIRA, L. S.; LARANGEIRA, D. F.; DIAS-LIMA, A. G.; SOUZA, V. M. M.; BARROUIN-MELO, S. M.; MOREIRA JR., E. D.; PAULE, B. J. A.; FRANKE, C. R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 8, p. 319-324, 2007.

JÚNIOR, E. M. Q. **Validação Do Teste Imunocromatográfico Rápido Dual Path Platform Para O Diagnóstico Da Leishmaníase Visceral Canina**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias. Fortaleza-CE, 2011.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M. P.; CADIERGUES, M. C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, n. 2, p. 105-111, 1997.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L. R.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 296-300, 2013.

LEMESRE, J. L.; HOLZMULLER, P.; GONÇALVES, R. B.; BOURDOISEAU, G.; HUGNET, C.; CAVALEYRA, M.; PAPIEROK, G. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the live ApMDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomized efficacy field trial. **Vaccine**, v. 25, n. 21, p. 4223-4234, 2007.

MANNA, L.; VITALI, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PANOVE, L. M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G.; STAAIANO N; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR- based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 125: 251-262, 2004.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Nota técnica- **Suspensão da Fabricação e comercialização do produto Leishmune – Vacina contra a Leishmaniose Visceral Canina**. Novembro, 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Produtos%20Veterin%C3%A1rios/NOTA%22TECNICA%20DFIP%2038-14%20LEISHMUNE.pdf>. Acesso em: 5 de maio de 2016.

MIRANDA, G. M. D. **Leishmaniose visceral em Pernambuco: a influência da urbanização e da desigualdade social**. 2008. 134 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2008.

MIRANDA, S.; ROURA, X.; PICADO, A.; FERRER, L.; RAMIS, A. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 1, p. 35-38, 2008.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365-368, 2008.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTE-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n.2, p. 147-152, 2005. Disponível em: <<http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/6001>>. Acesso em: 05 de maio de 2016.

MORAES-SILVA, E.; ANTUNES, F. R.; RODRIGUES, M. S.; DA SILVA JULIÃO, F.; DIAS-LIMA, A. G.; LEMOS-DESOUSA, G.; DE ALCANTARA, A.C.; REIS, E. A.; NAKATANI, M.; BADARO, R.; REIS, M. G.; PONTES-DE CARVALHO, L.; FRANKE, C. R. Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. infantum* infection. **Acta Tropica**, v.98, p.176-182, 2006.

MOREIRA JR, E. D; TORRES, E. B.; LOBO, C. F. L. Urbanização do calazar ou ruralização da periferia dos centros urbanos? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 33 (supl II): 100, 2006.

MOREIRA JR., E. D.; SOUZA, V. M. M.; SREENIVASAN, M.; BARRETO, N. L.; RONALD, B.; CARVALHO, L. P. Peridomestic Risk Factors For Canine Leishmaniasis In Urban Dwellings: New Findings From A Prospective Study In Brazil **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, 69(4), pp. 393–397, 2003.

MORENO, E. C.; MELO, M. N.; GENARO, O.; LAMBERTUCCI, J. R.; SERUFO, J. C.; ANDRADE, A. S. R.; ANTUNES, C. M. F.; CARNEIRO, M. Fatores de risco para infecção por *Leishmania chagasi* em uma área urbana do Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 456- 463, 2005.

MUKHTAR, M. M.; SHARIEF, A. H.; ELSAFFI, S. H.; HARITH, A. E.; HIGAZZI, T. B.; ADAM, A. M.; SULIEMAN ABDALLA, H. Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminary report. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.94, p. 33-36, 2000.

MUTINGA, M. J.; KIHARA, S. M.; LOHDING, A.; MUTERO, C. M.; NGATIA, T. A.; KARANU, F. Leishmaniasis in Kenya: description of leishmaniasis of domestic goat from Transmara, Narock District, Kenya. **Tropical Medicine and Parasitology**, v.40, p.91-96, 1989.

NAUCKE, T. J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 67, 2012.

NUNES-FILHO, J. M.; BATISTA, J. F.; ALVES, M. M. M.; ROCHA, F. S. B.; MENDONÇA, I. L. Leishmaniose visceral na cidade de Valença do Piauí, um problema de saúde pública. **PubVet**. Maringá, v. 9, n. 10, p. 442-447, Outubro, 2015.

OLIVEIRA, E. N. **Soroprevalência de anticorpos antileishmania em cães domiciliados na cidade de Araripina, sertão de Pernambuco**. Trabalho de Conclusão de Curso. Patos – PB, 2011.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. Fleas and ticks as vectors of *Leishmania* spp. to dogs: caution is needed. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 102, p. 173-174, 2010.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact Of Canine Control On The Epidemiology Of Canine And Human Visceral Leishmaniasis In Brazil. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. 65(5), pp. 510–517, 2001.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 36, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PASSOS-DIAS, F. O.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1373-1380, 2003.

PAZ, G. F.; RIBEIRO, M. F.; MICHALSKY, E. M.; LIMA, A. C. V. M. R.; FRANÇA SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; FORTESDIAS, C. L.; DIAS, E. S. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 106, n. 2, p. 523-528, 2010.

PINTO, N. F. S.; MELO, M. A. Levantamento Epidemiológico Da Leishmaniose Visceral Canina Na Mesorregião Do Sertão Paraibano. IX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE. **Anais**. 2011.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A.; 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, n. 1, p. 66-69, 2008.

QUINNELL, R. J.; DYE, C.; SHAW, J. J. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 6, n. 3, p. 195-200, 1992.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; JUNIOR, H. F. A.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**. São Paulo: v. 26, n. 4, jul./ago., 2003.

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J.C.; COURTENAY, O.; DAVIES, C.R. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. In domestic dogs (*Canis familiaris*). **J. Clin. Microbiol.** 41: 1486-1493, 2003.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SARAIVA, E. M.; BARBOSA, A. F.; SANTOS, F. N.; BORJA-CABRERA, G. P.; NICO, D.; SOUZA, L. O.; MENDES-AGUIAR, C. O.; SOUZA E. P.; FAMPA, P.; PARRA, L. E.; MENZ, I.; DIAS, J. G. J.; OLIVEIRA, S. M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. The FMLvaccine (Leishmune®) against canine visceral leishmaniasis: A transmission blocking vaccine. **Vaccine**, v. 24, n. 13, p. 2423-2431, 2006.

SCANDAR, S. A. S.; SILVA, R. A.; JUNIOR, R. P. C.; OLIVEIRA, H. **Ocorrência de leishmaniose visceral americana na região de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil**. Superintendência de Controle de Endemias. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (BEPA). São José do Rio Preto, SP, Brasil, 2011.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 577-579, 2006.

SILVA, F. L.; OLIVERA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, 2009b.

SILVA, M. A. L. **Desenvolvimento De Sistemas Baseados Em Nested-Pcr Convencional E Em Único Tubo Para O Diagnóstico De Leishmaniose Visceral**. Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências, 2012.

SILVA, R. B. S. **Leishmaniose visceral canina na zona rural do município de Patos-PB: aspectos epidemiológicos e padronização de um ensaio sorológico.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária. Patos-PB, 2015.

NETO, O. J. S.; DUARTE, S. C.; COSTA, H. X.; LINHARES, G. F. C. Design of primer pairs for species-specific diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* using PCR. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 21, n. 3, 2012.

THURSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology.** 3 ed. Wiley Blackwell, Oxford, 610p, 2007.

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. **Consulta Veterinária em 5 minutos:** espécies canina e felina. 3 ed. São Paulo: Manole, 2008. p. 890.

TRAVI, B. L.; OSÓRIO, Y.; GUARÍN, N.; CADENA, H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: Clinical and Parasitological Observations in Experimentally Infected *Didelphis marsupialis*, Reservoir of New World Visceral Leishmaniasis. *Exp Parasitol* 1998; 88:73-75.

VIDAL, I. F. **Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina em Campina Grande, Paraíba, Brasil.** 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 2008.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis.** 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 5 de maio de 2016.

XIMENES, M. F. F. M.; SOUZA, M. F.; CASTELLÓN, E. G. Density of sand fly (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, n.4, p.427-432, 1999.

ZANIN, F. H. C.; COELHO, E. A. F.; MARQUES-DA-SILVA, E. A.; SILVA COSTA, M. M.; REZENDE, S. A.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 9, p. 1070-1077, 2007.

ZAR, J.H. 1999. Biostatistical analysis. 4rd ed. Prentice-Hall, New Jersey. 663p.

ZULUETA, A. M.; VILLARROEL, E.; RODRIGUEZ, N.; FELICIANGELI, D.; MAZZARRI, M.; REYES, O.; RODRIGUEZ, V.; CENTENO, M.; BARRIOS, R. M.; ULRICH, M. Epidemiologic aspects of american leishmaniasis in an endemic focus in eastern Venezuela. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, n.6, p.945-950, 1999.

ANEXOS

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO - LVC
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO SEMIÁRIDO

I DADOS DO PROPRIETÁRIO	
1- Nome:	
2- Endereço:	Cidade:
3- Coordenadas:	
4- Telefone:	
5- Grau de escolaridade: () Analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto () 2º grau completo () 3º grau incompleto () 3º grau completo	
6- Renda familiar: () Menos de 2 salário mínimo () 2 a 4 () 5 a 6 () + 6	
II DADOS DO ANIMAL	
7- Nome:	8- Sexo: () Macho () Fêmea
9- Idade: () 6 – 12m () 13 – 24m () 25 – 48m () 4 – 6 anos () +6 anos	
10- Raça: () Sem raça definida () Com raça definida. Qual?	
III MANEJO	
11- Tipo de criação: () Domiciliar () Semi-domiciliar () Solto	
12- Alimentação: () Ração comercial () Alimento caseiro () Ambos	
13- Tem contato com outros animais? () não () sim	
14 – Se sim, com quais? () Equídeos () Caprinos () Ovinos () Bovinos () Suínos () Aves () Felinos () Cães () Silvestres. Quais?	
15- Qual o ambiente onde o animal é criado? () Terra () Cimento () Terra/cimento	
16- É realizada limpeza ou desinfecção do local? () Não () Sim	
17- Com que frequência? () Diária () Semanal () Quinzenal () Mensal	
18- O animal tomou alguma vacina? () Não () Sim Qual? () Anti-rábica () Víroses	
19- O animal já foi vermifugado? () Não () Sim Quando?	
20- O animal apresenta ou já apresentou carrapatos? Detalhar.	
21- O animal sempre morou com o proprietário? () Não () Sim	
22- O animal foi adotado? () da rua () tinha outro proprietário.	
23- O animal sempre morou nessa cidade? () Não () Sim Se NÃO: Local anterior? _____ Há quanto tempo mora aqui? _____	
24- O animal é usado para caça? () Não () Sim	
25- Aonde o animal dorme? () Dentro de casa () No Peridomicílio () Na rua	
26- Como passa a noite? () Amarrado () Solto	
27- Quando viaja, leva-o junto? () Não () Sim Há quanto tempo e Local? _____	
28- O animal faz/fez uso de coleiras repelentes? () Não () Sim	
- Aspecto geral do animal:	