

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

ISADORA FRAZON COSTA

**LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREA
NÃO ENDÊMICA**

**Araçatuba – SP
2020**

ISADORA FRAZON COSTA

**LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREA
NÃO ENDÊMICA**

Trabalho de tese apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Orientadora: Prof^a. Ass. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto

**ARAÇATUBA – SP
2020**

C837I Costa, Isadora Frazon
Levantamento soroepidemiológico da leishmaniose visceral canina em área não endêmica / Isadora Frazon Costa. -- Araçatuba, 2020
62 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Maria Cecília Rui Luvizotto

1. leishmaniose. 2. cão. 3. fatores de risco. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: **LEVANTAMENTO SEROEPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREA NÃO ENDÊMICA.**

AUTORA: ISADORA FRAZON COSTA

ORIENTADORA: MARIA CECILIA RUI LUVIZOTTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. **MARIA CECILIA RUI LUVIZOTTO**
Aposentada da Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. **KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI**
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. **WAGNER LUIS FERREIRA**
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. **HELIO LANGONI**
Aposentado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Câmpus de Botucatu/Unesp

Prof. Dr. **HEITOR FLÁVIO FERRARI**
Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Araçatuba, 09 de julho de 2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREA NÃO ENDÊMICA.

AUTORA, ISADORA FRAZON COSTA

ORIENTADORA, MARIA CECILIA RUI LUVIZOTTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área, Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA CECILIA RUI LUVIZOTTO
Aposentada da Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. HELIO LANGONI
Aposentado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Câmpus de Botucatu/Unesp

Prof. Dr. HEITOR FLÁVIO FERRARI
Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Araçatuba, 09 de julho de 2020.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREA NÃO ENDÊMICA.

AUTORA: ISADORA FRAZON COSTA

ORIENTADORA: MARIA CECILIA RUI LUMIZOTTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dra. MARIA CECILIA RUI LUMIZOTTO

Aposentada da Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dra. KATIA DENISE SARAINA BRESCIANI

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



Prof. Dr. HELIO LANGONI

Aposentado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Câmpus de Botucatu/Unesp

Prof. Dr. HEITOR FLÁVIO FERRARI

Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO(Araçatuba)

Araçatuba, 09 de julho de 2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREA NÃO ENDÊMICA.

AUTORA: ISADORA FRAZON COSTA

ORIENTADORA: MARIA CECILIA RUI LUVIZOTTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA CECILIA RUI LUVIZOTTO

Aposentada da Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

X Prof. Dr. HELIO LANGONI

Aposentado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Câmpus de Botucatu/Unesp

Prof. Dr. HEITOR FLÁVIO FERRARI

Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Araçatuba, 09 de julho de 2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLOGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM AREA NÃO ENDÊMICA.

AUTORA: ISADORA FRAZON COSTA

ORIENTADORA: MARIA CECILIA RUI LUVIZOTTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA CECILIA RUI LUVIZOTTO

Aposentada da Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. HELIO LANGONI

Aposentado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Câmpus de Botucatu/Unesp

Prof. Dr. HEITOR FLÁVIO FERRARI

Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Araçatuba, 09 de julho de 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com amor e gratidão à aqueles que me deram a '*vida*' e que zelam incessantemente por ela...

meus pais Isidoro e Angela

AGRADECIMENTOS

*"À Deus pelo **DOM DA VIDA**, à meus pais pela minha **ORIGEM**, à meus amigos pela certeza de **NUNCA ESTAR SÓ**"...*

Agradeço a Deus acima de tudo, por nunca me desamparar e dar forças para seguir meu caminho nessa jornada da vida, Deus é maravilhoso comigo!

Ao meu pai Isidoro, um ser humano fantástico cheio de 'princípios' que me motivam a ser uma pessoa melhor, um grande incentivador para que eu chegasse até aqui! Dizem que sou "*igualzinha a ele*", e saibam que me orgulho muito disso!!! GRATIDÃO pai... te amo infinitamente.

À Minha mãe Angela, uma mulher maravilhosa, com o colo mais acolhedor do mundo, também minha grande incentivadora e motivadora dos meus sonhos, muito obrigada mãe por tudo e por tanto... sabemos que não foi fácil chegar até aqui, mas nós vencemos! te amo infinitamente.

À minha querida orientadora, meu exemplo de que sabedoria e humildade podem (e devem) andar juntas...professora Maria Cecília, uma mulher admirável e autêntica, uma profissional incrível com quem tenho a honra de aprender...Obrigada professora pela sua amizade, pela confiança depositada em mim e por fazer parte da minha vida, tenho muito carinho pela senhora e espero que Deus permita que possamos estar juntas por muitos e muitos anos... (*ahhh véia morfética kkk*)

À minha irmã Mariana, minha amiga, colega de profissão, sócia e comadre... Obrigada '*Má*' por toda ajuda na execução deste trabalho, por confiar em mim e por me motivar a batalhar pelos meus sonhos! Você foi fundamental para que eu chegasse até aqui! Saiba que

tenho grande admiração por você, pela grande MULHER, MÃE E PROFISSIONAL que é...Te amo e estarei sempre...sempre ao seu lado!

À minha irmã Amanda, minha amiga e '*psicóloga particular*'....Obrigada por todo carinho, por acreditar no meu potencial...a irmã mais '*MANDONA*' que alguém poderia ter neste mundo (kkk)... Te amo e estarei sempre...sempre ao seu lado!

À minha '*TATA SOBERANA*' minha irmã (mais velha..kkk) e amiga Fernanda....Obrigada por todo incentivo e por ser assim...do jeitinho que você é, mulher forte, mãe dedicada...saiba que você é dona de si e pode chegar onde quiser! Te amo e estarei sempre...sempre ao seu lado!

Aos meus amados sobrinhos, Gá -Gabriel- (*meu príncipe*), Alice (*minha princesinha*) e Mariah (*meu Xantão*) pedaços do meu coração fora do peito, a tia Isa ama muito vocês, vou protegê-los por toda minha vida!

Ao meu namorado Vinicius, por acreditar no meu potencial, me incentivar e por fazer parte da minha vida.

À minha amiga querida Mariana (irmãs e almas gêmeas..kkk), também minha colega de profissão, obrigada por estar sempre ao meu lado, por me ouvir, me dar conselhos...obrigada pela sua amizade, Agradeço muitooooo a Deus por ter você na minha vida, te amo Marianinha!!

Aos irmãos que a vida me deu... meus cunhados Jú -Juliano- (cunhado acolhedor em Araçatuba...kkk) e Fabinho -Fábio- (cunhado tecnológico, o verdadeiro '*Magaiver*' kkk)... vocês foram FUNDAMENTAIS para que eu chegasse até aqui...Agradeço a Deus por tê-los em minha vida, amo vocês!

Aos colaboradores (e amigos) da Clínica Veterinária Saúde Animal Érica, Felix, Jorge, Marisa, Natália e Thaís, pelo convívio, amizade e apoio na execução deste trabalho.

À minha psicóloga Eliana e ao Dr. Torresan pelo cuidado e apoio emocional.

Gratidão ao Laboratório Santa Paula unidade Manduri, minhas amigas Érica, Mônica e Camila e ao querido Luiz Milani que hoje não se encontra entre nós..Obrigada por toda paciência e pela ajuda com o processamento das amostras, sem vocês este trabalho não seria possível.

Aos colaboradores do Laboratório Imlab Veterinário unidades Manduri e Cerqueira César e Laboratório Cepravet Ourinhos, muito obrigada pelo apoio.

Aos amigos Fernaíde, Vinícius, Maria Emília e Gabriel, pessoas muito queridas na minha vida, que estarão sempre em meu coração, obrigada pelo carinho e incentivo.

Ao meu amigo e colega de profissão José Renato, muito obrigada por toda ajuda, você foi fundamental nessa conquista.

Aos professores participantes da minha banca de avaliação, Professor Hélio Langoni, Professora Katia Denise Saraiva Bresciani, Professor Wagner Luiz Ferreira e Professor Heitor Flávio Ferrari.

Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - Unesp, e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp, campus de Botucatu, pela oportunidade de aprendizado e enriquecimento profissional.

Aos colegas pós-graduandos pelo convívio e troca de experiências.

Aos colaboradores do setor de pós-graduação da Unesp, campus de Araçatuba e Botucatu, pela eficiência e auxílio com formulários e prazos.

Aos meus clientes e tutores dos animais que permitiram a coleta das amostras.

À todos que fizeram e fazem parte da minha jornada...

E por fim, mas não menos importante, aos animais...seres iluminados, aqueles que tenho privilégio de cuidar e amar, à vocês dedico meus dias.

Muito obrigada!

"Ser você mesmo é a única coisa na qual você realmente pode ser perfeito"

Petruska Clarkan

Seja a sua melhor versão!

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende"

Leonardo da Vinci

COSTA, I. F. **Levantamento soropidemiológico da leishmaniose visceral canina em área não endêmica. 2020. 62f.** Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo determinar a soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à LVC em área indene no interior do Estado de São Paulo - Brasil. Fizeram parte deste experimento 500 cães (n=500) provenientes da rotina de clínicas veterinárias de 11 municípios das microrregiões de Ourinhos e Avaré. Para isso, as análises sorológicas de ELISA e RIFI foram realizadas pelo laboratório TECSA®. Este estudo foi pioneiro em realizar este levantamento. Foi registrado soropositividade em cães onde o diagnóstico de LVC ainda não havia sido realizado. Dos 500 cães avaliados, 3,2% foram soropositivos para LVC no ensaio ELISA e 14,6% (12,2% reagentes 1:40 e 2,4% reagentes 1:80) na RIFI. Os resultados obtidos indicam que o município de origem dos cães, sexo, estado de saúde, vacinação e a presença de carrapatos são variáveis epidemiológicas inerentes aos cães capazes de influenciar na soroprevalência da LVC nas microrregiões estudadas, em contrapartida, a idade, o porte, a cor e o comprimento da pelagem, o ambiente e o método de prevenção contra ectoparasitos não se demonstraram como fatores de risco à LVC neste estudo.

Palavras-chave: leishmaniose, cão, fatores de risco.

COSTA, I. F. **Survey epidemiological canine visceral leishmaniasis in an undamaged area. 2020. 62f.** Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

This study aimed was to determine the seroprevalence and the epidemiological variables related to CVL in dogs of an undamaged area of São Paulo State countryside, Brazil. Were included 500 dogs (n=500) from the routine of veterinary clinics in 11 cities assigned to the microregions of Ourinhos and Avaré. The serologic analyzes of ELISA and RIFI were performed by the laboratory TECSA®. This was a landmark study to assess this topic. Seropositivity was registered in dogs not previously diagnosed with CVL. From the totality of dogs, 3.2% were seropositive to CVL in ELISA and 14.6% (12.2% reagents 1:40 and 2.4% reagents 1:80) in IFI assay. The data suggest that the city of origin of the dogs, their gender, health status, immunization and the presence of ticks are capable to interfere in the seroprevalence of CVL at the surveyed microregions. On the other hand, age, size, color and length of the coat, environment and method for prevention of ectoparasites were not identified as risk factors for CVL.

Keywords: leishmaniasis, dog, risk factors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição dos 156 municípios do estado de São Paulo com presença confirmada do reservatório canino infectado em dezembro de 2017 19
- Figura 2.** Classificação dos municípios do estado de São Paulo com transmissão humana de LV, no triênio de 2015 a 2017 20
- Figura 3.** Casos de leishmaniose visceral por regiões brasileiras dos anos de 2008 a 2017 22
- Figura 4.** Distribuição dos 196 municípios do Estado de São Paulo com presença de *Lutzomyia longipalpis* (dezembro de 2017), segundo levantamento da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) 24
- Figura 5.** Distribuição dos municípios do Estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para LV em dezembro de 2017 25
- Figura 6.** Dados espaciais, populacionais (humanos e cães) e representação da área de estudo, que conta com 11 municípios das microrregiões de Ourinhos e Avaré e a proximidade geográfica da microrregião endêmica de Marília e do epicentro da LV, Bauru 31

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Porcentagem e número de animais soropositivos, negativos e indeterminados para *Leishmania* spp no teste sorológico de ELISA e RIFI nas microrregiões de Ourinhos e Avaré associados às variáveis epidemiológicas estatisticamente significativas 34
- Tabela 2** - Porcentagem e número de animais soropositivos, negativos e indeterminados para *Leishmania* spp no teste sorológico de ELISA e RIFI nas microrregiões de Ourinhos e Avaré associados às variáveis epidemiológicas estatisticamente não significativas 35

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

* - Asterisco

: - para

= - Igual

< - Menor

°C - Graus celcius

χ^2 - Qui-quadrado

° - Graus

' - Minuto

" - Segundo

- - Menos

μm - Micrômetro

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Viral Adquirida

ASS - Assistente

ABCVP - Associação Brasileira de Controle de Vetores e Pragas

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CVL - Canine visceral leishmaniasis

DPP - Dual Path Platform

Dra - Doutora

ELISA - Ensaio Imunossorvente Ligado a Enzima

et al - E outros

FOA - Faculdade de Odontologia de Araçatuba

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas

IFI - Indirect Immunofluorescence

kg - Quilogramas

km² - Quilômetros quadrados

LT - Leishmaniose tegumentar

LTC - Leishmaniose tegumentar canina
LV - Leishmaniose visceral
LVC - Leishmaniose visceral canina
LVH - Leishmaniose visceral humana
m - Metro
MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mL - Mililitro
MS - Ministério da Saúde
n - Número de animais
nº - Número
O - Oeste
p - Probabilidade de significância
Prof^a - Professora
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta
RPM - Rotações por minuto
S - Sul
SP - São Paulo
spp - Espécies
SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias
TR - Teste rápido
UNESP - Universidade Estadual Paulista
WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
3 OBJETIVOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICE A: QUESTIONÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO DOS CÃES DO EXPERIMENTO	59
APÊNDICE B: MATERIAL EDUCATIVO DESENVOLVIDO PARA CONSCIENTIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	60
ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA	62

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença tropical negligenciada de caráter zoonótico, pantopolista que afeta milhares de cães e seres humanos todos os anos, é transmitida pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas, no Brasil principalmente o *Lutzomyia longipalpis* (BANETH et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WHO, 2020).

A prevalência da doença em humanos está diretamente relacionada à prevalência nos cães, portanto, estudos com essa espécie fornecem dados importantes para a saúde pública, visto que os cães são considerados como principal reservatório da LV, por serem altamente suscetíveis à infecção, devido albergarem protozoários no subcutâneo, o que favorece a contaminação dos flebotomíneos no repasto sanguíneo e, principalmente à sua estreita relação com o homem, em áreas urbanas e rurais (BELO et al., 2013 BANETH et al., 2015).

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) é um desafio em virtude da falta de um teste que possua 100% de especificidade e sensibilidade. Tendo em vista a variedade dos sinais clínicos e o fato destes não serem patognomônicos, a confirmação clínica também é difícil de ser realizado tanto para humanos, quanto para cães. Portanto o diagnóstico parasitológico, sorológico ou molecular, até mesmo a combinação destes, se faz necessário para a confirmação definitiva (LIMA et al., 2017).

O controle da LV baseia-se na conscientização da população, no diagnóstico precoce e no tratamento adequado dos casos humanos. Para a espécie canina as orientações sugerem borrifação ambiental de inseticidas de poder residual, vacinação dos animais suscetíveis, uso de coleiras repelentes, medidas sanitárias para a redução da po-

pulação de vetores em áreas endêmicas, tratamento ou eutanásia de cães soropositivos (NUNES et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O Brasil é o sétimo país com 90% de novos casos de LV humana (WHO, 2020). Segundo o Ministério da Saúde (2017), no Brasil o índice de soroprevalência pode variar de quatro a 75% dependendo das variáveis epidemiológicas de cada região. As variáveis epidemiológicas são os elementos do processo saúde-doença que se quer avaliar, para isso, métodos e técnicas epidemiológicas são necessárias para detectar possível associação entre uma doença e características do ser humano, do animal, condições climáticas e ambientais; na literatura até o momento não existe um consenso em relação às variáveis epidemiológicas associadas à infecção e prevalência da LVC no Brasil, pois estas podem sofrer variações de acordo com a região de estudo.

As microrregiões avaliadas são consideradas até o momento como indenes, no entanto, a LVC vem aumentando nas áreas urbanas e se disseminando por todo território brasileiro. Os municípios das microrregiões de Ourinhos e Avaré avaliados neste estudo localizam-se espacialmente próximas às microrregiões de Bauru e Marília, que são consideradas endêmicas para LVC com transmissão canina e humana. Dessa forma, considerando a importância zoonótica da infecção por *Leishmania* spp no Brasil e os aspectos epidemiológicos das microrregiões citadas, este trabalho teve por objetivo determinar a soroprevalência e as variáveis epidemiológicas associadas à LVC em área indene no interior do estado de São Paulo.

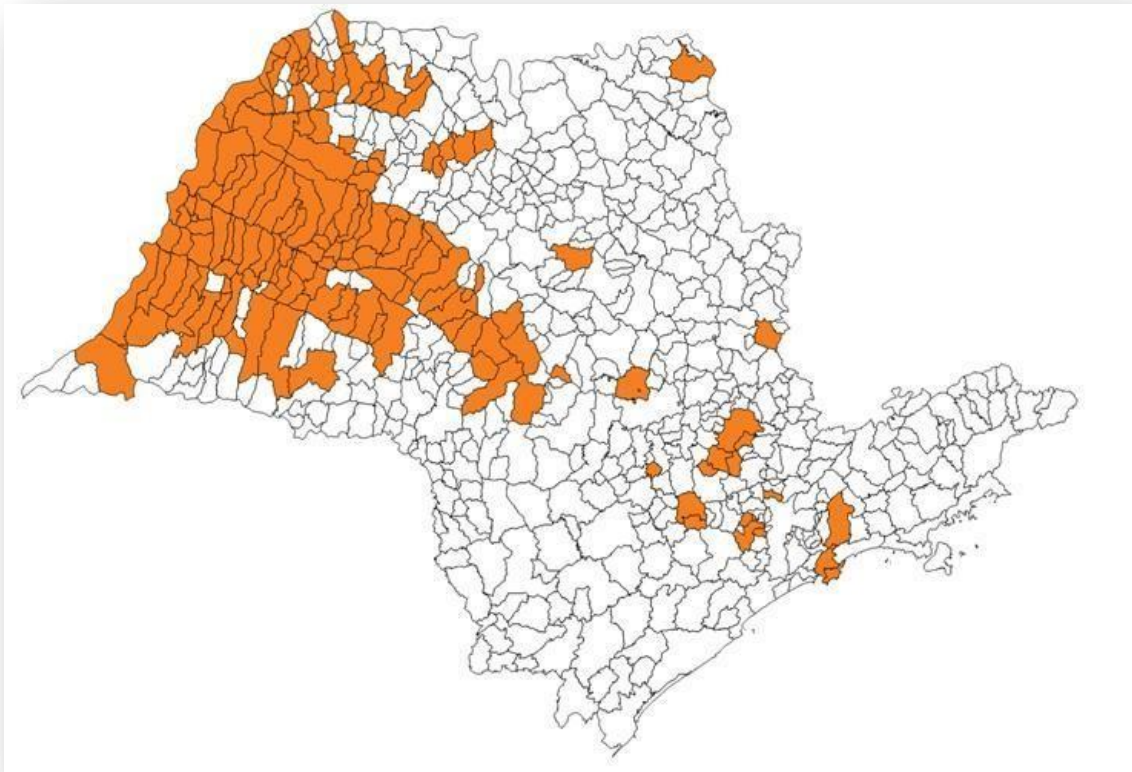
2 REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose é uma doença transmitida pela picada de flebotômíneos contaminados. No mundo existem mais de 20 espécies de *Leishmania*, mais de 90 espécies de vetores e muitos reservatórios envolvidos na sua transmissão. A doença possui três formas de apresentação, a leishmaniose tegumentar (LT), leishmaniose mucocutânea e a LV, sendo esta a forma mais grave da doença e de caráter fatal em mais de 95% dos casos sem tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WHO, 2020).

A LV é uma zoonose sistêmica, de evolução crônica, causada por um protozoário da espécie *Leishmania infantum* (*syn Leishmania infantum chagasi*), que se multiplica nas células do sistema imune do hospedeiro, chamadas macrófagos. No Brasil o principal vetor é o mosquito *Lutzomyia longipalpis*, que se desenvolve em locais úmidos, ricos em matéria orgânica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WHO, 2020).

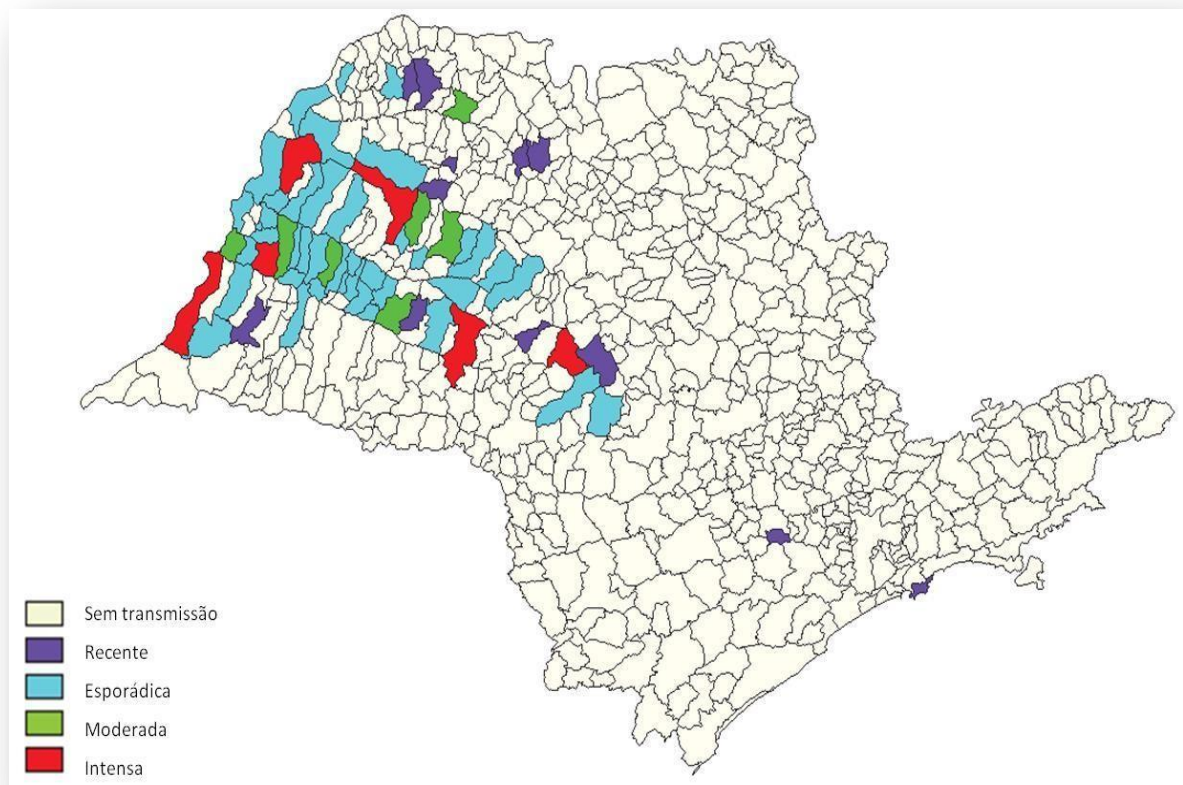
Aproximadamente 70 espécies animais, incluindo os seres humanos, podem ser hospedeiros naturais e reservatórios da LV, entretanto no ambiente urbano, o cão é a principal fonte de infecção para o vetor e por consequência para o ser humano. Mundialmente a infecção no cão têm sido mais prevalente que no homem, e o mesmo vem sendo observado no Brasil e no Estado de São Paulo (Figuras 1 e 2), mas a doença pode ser fatal para ambos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; HIRAMOTO et al., 2019; WHO, 2020).

Figura 1 - Distribuição dos 156 municípios do estado de São Paulo com presença confirmada do reservatório canino infectado em dezembro de 2017



Fonte: Hiramoto et al, 2019 - Boletim Epidemiológico Paulista.

Figura 2 - Classificação dos municípios do estado de São Paulo com transmissão humana de LV, no triênio de 2015 a 2017



Fonte: Hiramoto et al, 2019, Boletim Epidemiológico Paulista.

Ainda, para seres humanos, formas de transmissão não naturais da doença passaram a ser alvo de estudo dentro do controle epidemiológico; transfusões de sangue, transplantes de órgãos e uso de agulhas compartilhadas por usuários de drogas; sendo que este último pode resultar em co-infecções de LV com a Síndrome da Imunodeficiência Viral Adquirida (AIDS) acarretando em maior letalidade e resistência ao tratamento. O primeiro caso de coinfeção *Leishmania*-AIDS foi descrito em 1985, no sul da Europa, e atualmente, há registro em 35 países, sendo Brasil, Etiópia e Índia os países mais acometidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; SOUSA-GOMES et al., 2011; WHO, 2020).

Os cães e seres humanos infectados podem apresentar a doença de forma sintomática ou assintomática, o curso clínico depende da idade, resposta imune, estado nutricional do hospedeiro e também da virulência do parasito (LUZ et al., 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Mesmo assintomáticos, os cães são capazes de infectar flebotomíneos e transmitir a doença (BORJA et al., 2016; LAURENTI et al., 2013; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016). O período de incubação é variável tanto para humanos, como para cães. No homem varia de 10 dias a 24 meses, e no cão, varia de três meses a anos, com média de três a sete meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Os sinais clínicos são similares no cão e no homem, podendo ser inespecíficos, como febre irregular por longos períodos, anemia, perda de peso progressiva e apatia. No cão comumente ocorrem manifestações dermatológicas como alopecia, piodermite, descamação, nódulos cutâneos e onicogribose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Alterações renais também podem ser um sinal da doença no cão, Solano-Gallego et al. (2011) cita como principal causa de óbito em cães com LV. Outras manifestações clínicas como tosse, diarreia sanguinolenta, icterícia, alterações oftalmológicas e neurológicas são sinais frequentes e dificultam o diagnóstico diferencial com outras doenças, retardando sua identificação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

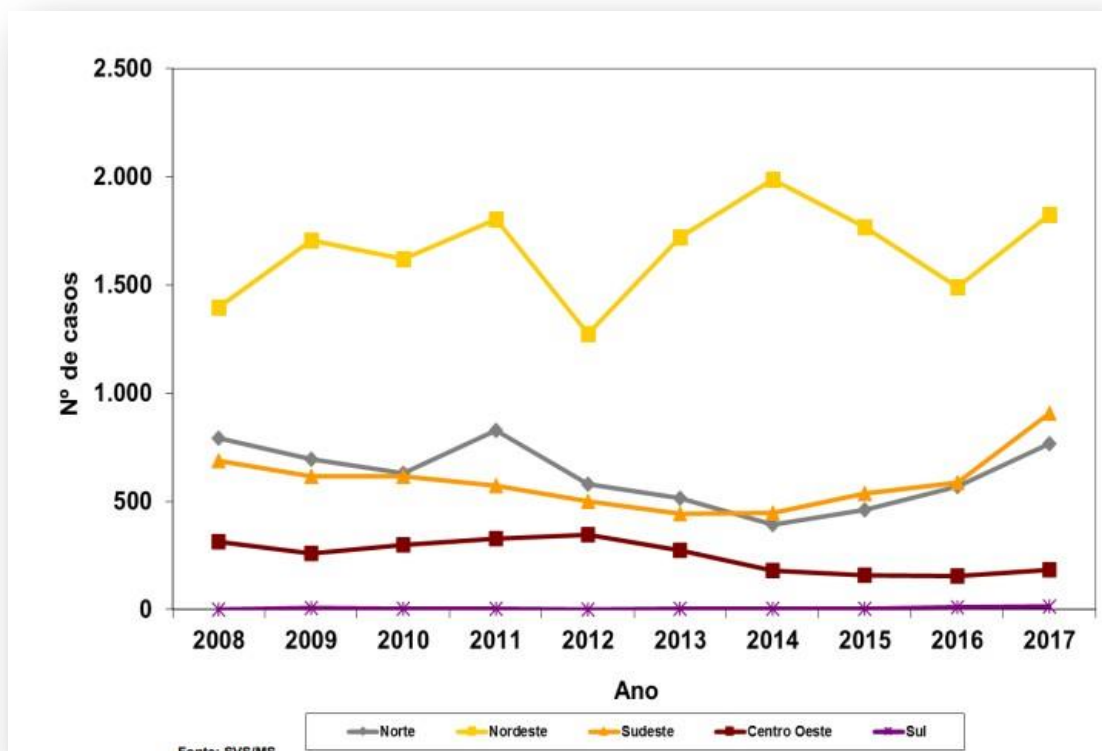
Apesar de ser historicamente conhecida como doença de ocorrência no ambiente rural, com as diversas alterações no ambiente, aumento do desmatamento e urbanização, a LV atingiu proporções endêmicas nas cidades, se tornando um grave problema de saúde pública. Sua ocorrência está associada aos países mais pobres, populações mais vulneráveis, com acesso difícil aos serviços de saúde (WERNECK, 2008; WHO, 2020).

No mundo de 700.000 a 1 milhão de pessoas são infectadas anualmente pela LV, levando de 25.000 a 65.000 mortes por ano. A maioria dos casos de LV ocorre no Leste da África, Sudeste da Ásia e continente Americano, mundialmente o Brasil tem o segundo maior

número de notificações e a maior incidência do continente (WHO, 2020).

No Brasil a LV apresenta expansão geográfica significativa desde 1999, sendo as regiões de maior incidência Nordeste e Norte (Figura 3). A ocorrência da doença apresenta ampla distribuição territorial e envolve aspectos biológicos, climáticos e sociais diferenciados, fatores como destruição das matas pelo homem gerando desequilíbrio do ecossistema e consequente aumento da densidade do vetor, a proximidade entre homem e cão e o constante processo migratório interagem e possibilitam a manutenção e a difusão da enfermidade (BARATA et al., 2013; HIRAMOTO et al., 2019; MARCONDES; NAZARETIAN, 2013).

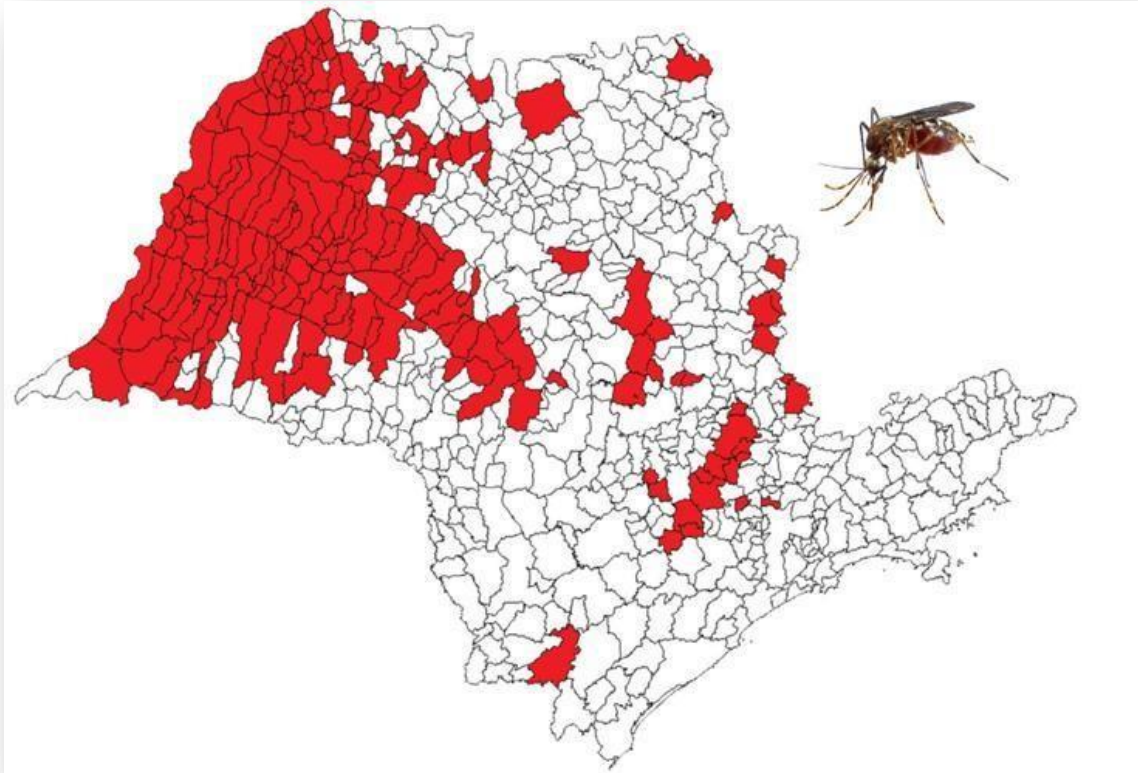
Figura 3 - Casos de leishmaniose visceral por regiões brasileiras dos anos de 2008 a 2017



Fonte: Ministério da Saúde, 2017.

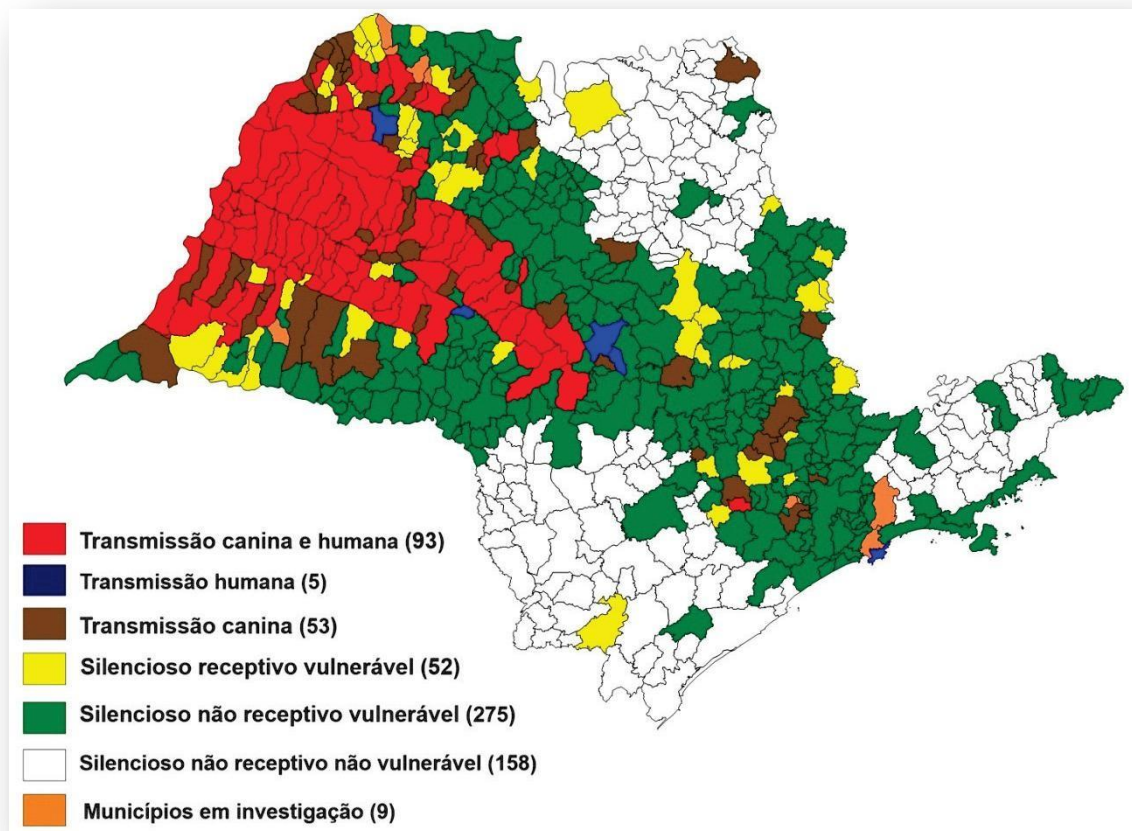
No estado de São Paulo a rápida disseminação da LV canina e humana ocorreu nas últimas duas décadas, associada a disseminação do vetor que nessa época era encontrado em apenas dois municípios do estado, em 2014 em 164 (CASANOVA et al., 2015) e 196 municípios (Figura 4) em 2017 (HIRAMOTO et al., 2019). Essa expansão da LV ocorreu ao longo de um grande eixo que se estende do noroeste para o sudeste do estado, em direção à região de Bauru, seguindo o gasoduto Bolívia-Brasil e a rodovia Marechal Rondon. As primeiras identificações de casos autóctones ocorreram em 1998 quando foi registrada a enzootia canina no município de Araçatuba. Nesta época outros fatores também podem ter contribuído para expansão da LV, como condições socioeconômicas, fatores climáticos e desequilíbrios ecológicos (CARDIM et al., 2016). Houve uma redução do número de casos da LV de 2012 a 2016, porém maior expansão territorial, passando de 76 municípios com transmissão autóctone canina e humana em 2012, para 93 em 2016 (Figura 5), o que significa aumento de 25% de municípios com transmissão de LV (HIRAMOTO et al., 2019).

Figura 4 - Distribuição dos 196 municípios do Estado de São Paulo com presença de *Lutzomyia longipalpis* (dezembro de 2017), segundo levantamento da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN)



Fonte: Hiramoto et al, 2019, Boletim Epidemiológico Paulista, adaptado pela autora.

Figura 5 - Distribuição dos municípios do Estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para LV em dezembro de 2017



Fonte: Hiramoto et al, 2019, Boletim Epidemiológico Paulista.

O diagnóstico clínico da LV é difícil de ser realizado tanto para humanos, quanto para cães, devido à variedade dos sinais clínicos e o fato destes não serem patognomônicos, sugerindo outras enfermidades. Portanto o diagnóstico parasitológico, sorológico ou molecular, até mesmo a combinação destes se faz necessária para a confirmação definitiva (LIMA et al., 2017).

O diagnóstico parasitológico, considerado "padrão ouro" envolve a pesquisa direta do protozoário em esfregaços de aspirados de linfonodos, medula óssea e/ou baço. A confirmação da doença consiste na identificação de formas amastigotas da *Leishmania* spp, caracterizadas por sua morfologia esférica a ovóide, medindo 2-5 μ m, con-

tendo um núcleo arredondado e cinetoplasto alongado (LIMA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2016). Moreira et al. (2007) relataram sensibilidade de 75% e 39% no diagnóstico parasitológico de linfonodo em cães sintomáticos e assintomáticos, respectivamente.

Com os métodos sorológicos, faz-se a detecção de anticorpos circulantes anti- *Leishmania* spp, sendo estes os mais utilizados para o diagnóstico da LVC. Dos testes sorológicos para LV o Ensaio Imunossorvente Ligado a Enzima (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foram os recomendados pelo Ministério da Saúde até 2011 como teste de triagem e confirmatório, respectivamente, para a prática clínica e em inquéritos epidemiológicos (GRIMALDI et al., 2012). A partir de 2012, o Ministério da Saúde emitiu uma nota técnica orientando a utilização de um teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso (TR DPP® LVC, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), como teste de triagem e um ELISA como confirmatório, sendo este protocolo o que apresentou maior eficácia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A RIFI é um dos testes indicado como referência pelo Ministério da Saúde (2017) para o diagnóstico sorológico da LVC. Para a realização deste teste utiliza-se o soro sanguíneo, sendo considerado soropositivo o animal que possuir título igual ou superior ao ponto de corte que é a diluição de 1:40. No entanto, um resultado negativo não exclui totalmente que o cão esteja infectado, já que existem animais que demoram algum tempo para desenvolver a resposta humoral e a atingir títulos de anticorpos considerados positivos (OLIVEIRA et al., 2015). Segundo o Ministério da Saúde (2017) para seres humanos, considera-se como positiva amostra reagente com titulação a partir de 1:80. Nos títulos iguais a 1:40, com clínica sugestiva de LV, recomenda-se a solicitação de nova amostra em 30 dias.

O ensaio de ELISA é bastante útil para análises de laboratório, possibilitando avaliar grande quantidade de amostras em pouco tempo e também permite detectar baixos títulos de anticorpos, apresentando sensibilidade de 95,65%, no diagnóstico de casos assintomáticos (GRADONI, 2002). Os testes sorológicos não tem 100% de sensibilidade, desta forma, podem falhar na detecção de cães infectados no período pré-patente e antes da soroconversão, portanto, devem ser utilizados com cautela (IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006).

Os testes imunocromatográficos rápidos vem sendo amplamente aplicados nos últimos anos, pois apresentam inúmeras vantagens, tais como: rápido processamento das amostras e obtenção dos resultados, possibilidade de realização no local da coleta, análise de grande número de amostras em tempo reduzido, aplicação em pesquisas epidemiológicas, menor custo por dispensar estrutura laboratorial (WOYAMES PINTO et al., 2016).

Na última década, ensaios moleculares, incluindo a detecção de parasitas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), vem se mostrando altamente sensível e específico para detecção de DNA de *Leishmania* spp. Para essa análise pode-se utilizar uma grande variedade de tecidos caninos, incluindo medula ossea, baço, linfonodos, pele, conjuntiva e sangue periférico (AKHTARDANESH et al., 2017).

A expansão territorial e soroprevalência da LV depende da epidemiologia de cada região e de aspectos ligados aos cães e humanos, portanto o risco de infecção e o desenvolvimento da doença podem estar relacionados a diversos fatores, que vão desde a suscetibilidade individual, estado imunológico, até questões sanitárias e ambientais (WHO, 2020).

Os principais fatores de risco apontados pela WHO (2020) para a LV em seres humanos são: as condições socioeconômicas precárias, a pobreza está diretamente relacionada à maior incidência

da leishmaniose; a desnutrição; fatores ligados a mobilidade populacional, como migração de pessoas para áreas com ciclos de transmissão existentes, exposição ocupacional; as mudanças ambientais, como a urbanização e desmatamento; as alterações climáticas, pois a leishmaniose é considerada doença sensível ao clima, portanto, mudanças de temperatura, precipitação e umidade podem influenciar vetores, reservatórios e hospedeiros.

Na literatura, existem também estudos relacionando as características caninas como fatores de risco à LVC, tais como: sexo (ALMEIDA et al., 2010; BARBOSA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010), raça (BARBOSA et al., 2010), idade (ALMEIDA et al., 2010; AZEVEDO, 2019; OLIVEIRA, et al., 2010), comprimento e coloração da pelagem (BARBOSA et al., 2010) e ambiente de criação (BARBOSA et al., 2010). Oliveira et al. (2010) e Azevedo (2019), estudaram soroprevalência em relação aos cães de área rural e urbana. Dantas-Torres et al. (2010) e Silva et al. (2018), buscaram relacionar o papel do carrapato na soroprevalência da LVC.

A prevenção e o controle da leishmaniose requerem uma combinação de estratégias de intervenção. A expansão das áreas de transmissão da LV traz questionamentos sobre as estratégias de controle empregadas no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Segundo o Ministério da Saúde (2017) e Sevá et al. (2017), em virtude das características epidemiológicas e do conhecimento ainda insuficiente sobre os vários elementos que compõem a cadeia de transmissão desta doença, as estratégias de controle ainda são pouco efetivas e estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos, redução da população de flebotomíneos, eliminação dos reservatórios e atividades de educação em saúde

No Brasil, atualmente, existe vacina contra LVC em comercialização, entretanto, não existem estudos que comprovem sua relação com a diminuição da incidência da LV em humanos, dessa forma, o

seu uso está restrito à proteção individual dos cães e não pode ser considerada ferramenta de Saúde Pública. Ainda, esta vacina é indicada somente para cães soronegativos e não é o único instrumento de prevenção individual para a LVC. O uso de coleiras impregnadas com inseticidas ainda é considerada ferramenta importante para a prevenção da doença nos cães, conforme normatização do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). De acordo com Marcondes e Nazaretian (2013), cães de área endêmica deveriam fazer uso de coleiras impregnadas com inseticidas, tanto os doentes em tratamento, por permanecerem com capacidade infectante ao vetor, quanto os sadios vacinados.

Os animais que apresentam sinais clínicos compatíveis com LVC e/ou sorologias reagentes não devem ser vacinados e estarão passíveis das medidas sanitárias vigentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A identificação e eliminação do reservatório canino atualmente não trata-se de uma medida obrigatória, já que por meio da Nota Técnica Conjunta (nº 001/2016 MAPA/MS) assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo Ministério da Saúde (MS) foi autorizado o registro do produto Milteforan®, indicado para o tratamento da LV em cães, entretanto o tratamento não se caracteriza como uma medida de saúde pública para controle da doença e, portanto, exclusivamente de escolha do proprietário do animal (MAPA/MS, 2016).

A Organização Mundial da Saúde, destaca que a mobilização social no sentido de mudar o comportamento da população requer estratégias eficazes de comunicação, sugerindo o diálogo permanente entre população e profissionais de saúde (ZUBEN; DONALÍSI, 2015; SEVÁ et al., 2016).

3 OBJETIVOS

A presente pesquisa teve por objetivo determinar a soroprevalência e as variáveis epidemiológicas associadas à LVC em área indene no interior do estado de São Paulo.

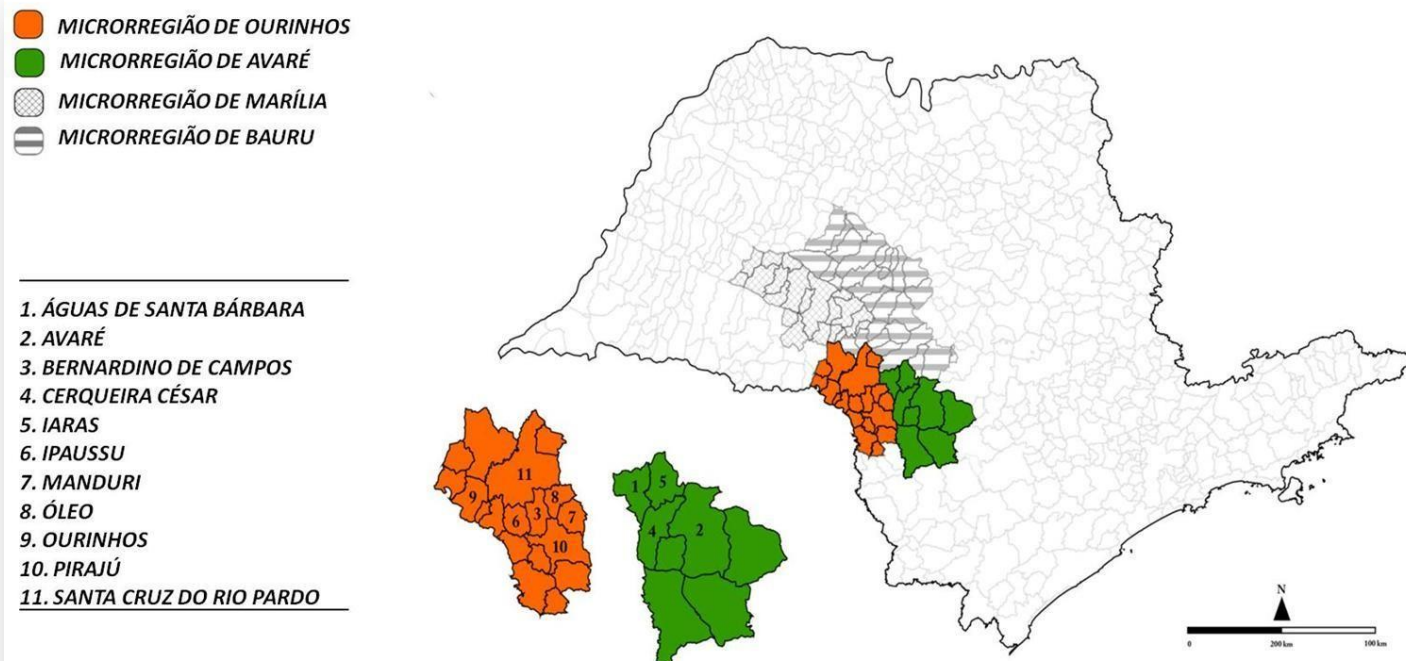
4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e recebeu a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), processo de número FOA: nº00822-2017 de 18 de maio de 2018.

Este estudo foi desenvolvido a partir dos dados obtidos de 11 municípios do interior do estado de São Paulo pertencentes às microrregiões de Ourinhos e Avaré, municípios estes, segundo Hiramoto et al. (2019), considerados silenciosos não receptivos não vulneráveis para LVC.

A microrregião de Ourinhos possui 293.751 habitantes (IBGE, 2019), com área total estimada em 5.568,472km², densidade populacional 53,0 habitantes/km², da qual fazem parte 18 municípios, dos quais foram selecionados: Bernardino de Campos, Ipaussu, Manduri, Óleo, Ourinhos, Piraju e Santa Cruz do Rio Pardo (Figura 6). O clima predominante nessa microrregião é tropical chuvoso com inverno seco. A microrregião de Avaré tem população estimada pelo IBGE (2019) em 178.609 habitantes e é constituída por oito municípios. Sua área total é de 5.928,430km², com densidade populacional 30,1 habitantes/km². Para este estudo foram analisadas amostras sorológicas de cães dos seguintes municípios: Águas de Santa Bárbara, Avaré, Cerqueira César e Iaras (Figura 6). O clima predominante na microrregião é quente e temperado.

Figura 6 - Dados espaciais, populacionais (humanos e cães) e representação da área de estudo, que conta com 11 municípios das microrregiões de Ourinhos e Avaré e a proximidade geográfica da microrregião endêmica de Marília e do epicentro da LV, Bauru



1. ÁGUAS DE SANTA BÁRBARA
2. AVARÉ
3. BERNARDINO DE CAMPOS
4. CERQUEIRA CÉSAR
5. IARAS
6. IPAUSSU
7. MANDURI
8. ÓLEO
9. OURINHOS
10. PIRAJÚ
11. SANTA CRUZ DO RIO PARDO

CIDADE	ÁREA	ALTITUDE	LONGITUDE	LATITUDE	POPULAÇÃO HUMANA (IBGE 2019)	POPULAÇÃO CANINA (IBGE 2019)
ÁGUAS DE SANTA BÁRBARA	408,4km ²	644m	49° 14' 20" O	22° 52' 50" S	6.075	1.289
AVARÉ	1.213,0km ²	766m	48° 55' 33" O	23° 05' 55" S	90.655	19.348
BERNARDINO DE CAMPOS	244,8km ²	695m	49° 28' 27" O	23° 00' 47" S	11.146	2.279
CERQUEIRA CÉSAR	511,6km ²	737m	49° 09' 58" O	23° 02' 08" S	19.985	4.529
IARAS	401,3km ²	648m	49° 09' 46" O	22° 52' 15" S	7.704	1.949
IPAUSSU	209,1km ²	568m	49° 37' 15" O	23° 03' 24" S	13.663	3.582
MANDURI	229,4km ²	710m	49° 19' 19" O	23° 00' 12" S	9.529	1.994
ÓLEO	197,9km ²	682m	49° 19' 19" O	23° 00' 12" S	2.652	1.036
OURINHOS	296,8km ²	483m	49° 52' 14" O	22° 58' 44" S	115.813	16.233
PIRAJÚ	505,2km ²	646m	49° 23' 02" O	23° 11' 37" S	29.728	6.172
SANTA CRUZ DO RIO PARDO	1.114,9km ²	467m	49° 37' 57" O	22° 53' 56" S	47.395	8.414

Fonte: Suporte Geográfico, elaborado a partir da base de dados cartográficos do IBGE 2019 e adaptado pela autora.

O número amostral foi calculado de forma aleatória simples, com confiança mínima de 95% e erro estatístico de 5%. Fizeram parte deste experimento 500 cães ($n=500$), de ambos os sexos, sem distinção de raça, com idade variável de seis meses a 14 anos, submetidos à avaliação clínica prévia. Sem pré seleção, os cães foram provenientes da rotina de atendimento de clínicas veterinárias dos 11 municípios já referidos que pertencem às microrregiões de Ourinhos e Avaré. Cada animal foi identificado com ficha individual, e o tutor entrevistado com breve questionário padronizado, previamente ao exame clínico (Apêndice A).

Para a amostragem de conveniência foi colhido 5mL de sangue de cada animal por venopunção jugular. Para tal o animal foi contido de forma adequada por meio de focinheira e a região de coleta foi previamente higienizada com álcool 70%. A amostra de sangue total foi armazenada em frasco sem anticoagulante e submetida à centrifugação a 2000rpm imediatamente após a coleta e o soro obtido, aliquotado em três frascos, identificados e armazenados em freezer a -20°C até a realização das análises laboratoriais. As aliquotas de soro utilizadas se apresentavam translúcidas, conferindo qualidade amostral.

As análises laboratoriais ELISA e RIFI foram realizadas pelo laboratório TECSA®, na cidade de Belo Horizonte - Minas Gerais.

Para realização da sorologia pelo método ELISA foi utilizado Kit padrão do laboratório TECSA®, com licença no MAPA, sob número: 7.434/2000, partida 001/19. A interpretação dos resultados foi realizada da forma descrita a seguir: amostra considerada positiva, quando o valor da densidade óptica apresentava-se acima do ponto de corte (0,224); negativa, quando o valor da densidade óptica apresentava-se abaixo do ponto de corte (0,224) e indeterminado, quando o resultado apresentava-se com valores intermediários, correspondente à zona cinza, onde os testes não foram capazes de determinar se a

amostra analisada era positiva ou negativa. Para determinação da amplitude subtraiu-se 0,03 do ponto de corte.

Pelo método RIFI foi utilizado Kit padrão do laboratório TECSA® com licença no MAPA, sob número: 9347/2007, partida 250. A interpretação dos resultados foi realizada como segue: positivo, com título igual ou superior a diluição 1:40; negativo, cujo resultado não apresentou título de anticorpos.

Para a análise estatística, foi aplicada associação entre os resultados dos ensaios sorológicos de ELISA e RIFI e as variáveis epidemiológicas associadas aos cães, sendo elas: município, sexo, idade, porte, comprimento e coloração da pelagem, estado de saúde, ambiente, vacinação, método de prevenção contra ectoparasitos, presença de carrapato, pelo teste qui-quadrado (χ^2), utilizando Minitab 16. As variáveis estatisticamente significativas foram reavaliadas mediante teste de Goodman complementado com as comparações múltiplas entre e dentro de populações multinomiais, a nível de 5% de significância (GOODMAN, 1964 e 1965).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisados os soros de 500 cães procedentes de 11 municípios das microrregiões de Ourinhos e Avaré, que revelou índice de soropositividade para LVC pelos testes de ELISA e RIFI de 3,2% e 14,6% (12,2% reagentes 1:40 e 2,4% reagentes 1:80) respectivamente. Nas tabelas 1 e 2 estão expressos os resultados dos ensaios sorológicos de ELISA e RIFI, associados às variáveis epidemiológicas, a análise e discussão dos resultados foi realizada em nível de 5% de significância.

Tabela 1 - Porcentagem e número de animais soropositivos, negativos e indeterminados para *Leishmania* spp no teste sorológico de ELISA e RIFI nas microrregiões de Ourinhos e Avaré associados às variáveis epi- demiológicas estatisticamente significativas

VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS	n(%)	ELISA			valor de p	RIFI			valor de p
		reagente	não reagente	indeterminado		reagente 1:40	reagente 1:80	não reagente	
MUNICÍPIO					0,002*				0,643
Águas de Santa Bárbara	72(14,4%)	1(1,38%)	70(97,16%)	1(1,38%)		9(12,49%)	1(1,38%)	62(86,05%)	
Avaré	11(2,2%)	0	9(81,81%)	2(18,18%)		2(18,18%)	0	9(81,81%)	
Bernardino de Campos	17(3,4%)	0	14(82,34%)	3(17,64%)		1(5,88%)	0	16(94,11%)	
Cerqueira César	19(3,8%)	0	16(84,20%)	3(15,78%)		0	0	19(100%)	
Iaras	3(0,6%)	0	3(100%)	0		0	0	3(100%)	
Ipaussu	7(1,4%)	0	3(42,85%)	4(57,14%)		0	0	7(100%)	
Manduri	273(54,6%)	10(3,66%)	244(89,30%)	19(6,95%)		34(12,44%)	8(2,92%)	231(84,54%)	
Óleo	48(9,6%)	2(4,16%)	39(81,23%)	7(14,58%)		7(14,58%)	1(2,08%)	40(83,32%)	
Ourinhos	31(6,2%)	1(3,22%)	25(80,62%)	5(16,12%)		5(16,12%)	0	26(83,85%)	
Pirajú	16(3,2%)	2(12,5%)	11(68,75%)	3(18,75%)		3(18,75%)	2(12,5%)	11(68,75%)	
Santa Cruz do Rio Pardo	3(0,6%)	0	2(6,66%)	1(3,33%)		0	0	3(100%)	
SEXO					0,045*				0,042*
macho	212(42,4%)	2(1%)	188(88,5%)	22(10,5%)		20(9,5%)	2(1%)	190(89,5%)	
fêmea	288(57,6%)	14(5%)	248(86%)	26(9%)		41(14%)	10(3,47%)	237(82,5%)	
ESTADO DE SAÚDE					0,104				0,011*
sadio	328(65,6%)	7(2%)	286(87%)	35(11%)		32(10%)	5(1,5%)	291(88,5%)	
doente	172(34,4%)	9(5,5%)	150(87%)	13(7,5%)		29(17%)	7(4%)	136(79%)	
VACINAÇÃO					0,003*				0,014*
vacinado	324(64,8%)	5(1,5%)	293(90,5%)	26(8%)		40(12,5%)	3(1%)	281(86,5%)	
não vacinado	176(35,2%)	11(6,5%)	143(81%)	22(12,5%)		21(12%)	9(5%)	146(83%)	
CARRAPATO					0,119				0,009*
presente	220(44%)	11(5%)	187(85%)	22(10%)		31(14%)	10(4,5%)	179(81,5%)	
ausente	280(56%)	5(2%)	249(89%)	26(9%)		30(10,5%)	2(1%)	248(88,5%)	

* resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Porcentagem e número de animais soropositivos, negativos e indeterminados para *Leishmania* spp no teste sorológico de ELISA e RIFI nas microrregiões de Ourinhos e Avaré associados às variáveis epi- demiológicas estatisticamente não significativas

VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS	n(%)	ELISA				valor de p	RIFI			valor de p
		reagente	não reagente	indeterminado	reagente 1:40		reagente 1:80	não reagente		
AMBIENTE					0,183				0,761	
urbano	355(71%)	12(3,5%)	309(87%)	34(9,5%)		41(11,5%)	9(2,5%)	305(86%)		
rural	72(14,4%)	1(1,5%)	68(94,5%)	3(4%)		8(11%)	1(1,5%)	63(87,5%)		
urbano/rural	73(14,6%)	3(4%)	59(81%)	11(15%)		12(16,5%)	2(2,5%)	59(81%)		
IDADE					0,186				0,155	
até 1 ano	51(10,2%)	1(2%)	46(90%)	4(8%)		9(17,5%)	0(0%)	42(82,5%)		
1 a 7 anos	259(51,8%)	13(5%)	222(85,5%)	24(9,5%)		31(12%)	10(4%)	218(84%)		
> 7 anos	190(38%)	2(1%)	168(88,5%)	20(10,5%)		21(11%)	2(1%)	167(88%)		
PORTE					0,418				0,166	
pequeno	189(37,8%)	7(3,5%)	167(88,5%)	15(8%)		22(11,5%)	3(1,5%)	164(87%)		
médio	190(38%)	3(1,5%)	20(10,5%)	167(88%)		28(15%)	3(1,5%)	159(83,5%)		
grande	121 (24,2%)	6(5%)	13(10,5%)	102(84,5%)		11(9%)	6(5%)	104(86%)		
COMPRIMENTO DA PELAGEM					0,683				0,360	
curta	374(74,8%)	13(3,5%)	327(87,5%)	34(9%)		44(12%)	11(3%)	319(85%)		
longa	126(25,2%)	3(2,5%)	109(86,5%)	14(11%)		17(13,5%)	1(1%)	108(85,5%)		
COR DA PELAGEM					0,469				0,306	
clara	240(48%)	8(3,5%)	213(88,5%)	19(8%)		24(10%)	5(2%)	211(88%)		
escura	260(52%)	8(3%)	223(86%)	29(11%)		37(14,5%)	7(2,5%)	216(83%)		
PREVENÇÃO ECTOPARASITO					0,429				0,517	
não faz	228(45,6%)	11(5%)	191(83,5%)	26(11,5%)		33(14,5%)	8(3,5%)	187(82%)		
pipeta tópica	121(24,2%)	3(2,5%)	111(91%)	7(6%)		11(9%)	3(2,5%)	107(88,5%)		
coleira	2(0,4%)	0(0%)	2(100%)	0(0%)		0(0%)	0(0%)	2(100%)		
oral	64(12,85%)	1(1,5%)	55(86%)	8(12,5%)		6(9,5%)	1(1,5%)	57(89%)		
pipeta tópica /oral	85(17%)	1(1%)	77(90,5%)	7(8,5%)		11(13%)	0(0%)	74(87%)		

Até o presente momento, este estudo é pioneiro em realizar a investigação da soroprevalência e das variáveis epidemiológicas associadas à LVC nestas regiões, portanto os resultados obtidos demonstraram ser de grande valia, já que foi registrado soropositividade em cães nas regiões onde o diagnóstico sorológico de LVC ainda não havia sido realizado. A detecção, quantificação e mapeamento dos cães com LV por meio de levantamento soroprevalência é citado por Travi et al. (2018) como ferramenta importante para o controle da doença. No entanto, não se pode afirmar que os mesmos sejam casos autóctones, devido à possibilidade de acesso desses cães às regiões endêmicas sem as necessárias medidas de prevenção e também pelo

acesso de cães possivelmente contaminados a estas regiões que atualmente são classificadas como livres da doença. Hoje no Brasil, para o transporte intermunicipal e interestadual de cães e gatos o MAPA prevê somente atestado clínico de sanidade e vacinações emitido por médico veterinário, sem a necessidade da realização de provas sorológicas que excluam a possibilidade da veiculação de zoonoses, além disso, não existem estudos epidemiológicos afirmando a presença do flebotomíneo vetor nestas regiões. Prestes-Carneiro et al. (2019) citaram que a análise da distribuição espacial de vetores e fatores de risco ambientais são essenciais para identificar as áreas mais vulneráveis à disseminação e/ou manutenção da LV canina e humana.

Durante a execução deste experimento pôde-se observar o escasso conhecimento dos tutores e população sobre a LVC. Com vistas a difundir e prestar esclarecimentos sobre a doença foram realizadas palestras e fornecido material educativo impresso (Apêndice B) e por meio de mídias. A falta de conhecimento por parte dos tutores, é apontado por Coura-Vital et al. (2011) como fator de risco para LVC. Bernardino et al. (2020) demonstraram que o nível educacional do tutor está associado à soroprevalência da LVC, cães com tutores analfabetos ou com ensino fundamental incompleto apresentaram prevalência 0,57 vezes maior para LVC do que aqueles que possuíam ensino fundamental completo.

Os cães soropositivos avaliados neste estudo não apresentavam sinais clínicos de LVC, e por se tratar de área indene, os médicos veterinários dificilmente incluem esta doença na lista de diagnóstico diferencial. Bernardino et al. (2020) avaliaram 409 cães na Paraíba e dos 120 animais soropositivos, apenas 15 (12,5%) apresentaram sinais clínicos sugestivos da LVC, portanto, a maior parte dos animais era assintomática, reforçando o fato da doença ser de difícil diagnóstico clínico. Ainda, características epidemiológicas já referidas revelam que a LVC é uma doença com alta proporção de

assintomáticos, e estes animais podem agir como reservatórios silenciosos no ambiente urbano (BRASIL, 2016).

Fraga et al. (2016) e Solano-Gallego et al. (2017) referem que os métodos sorológicos de diagnóstico da LVC são vantajosos e importantes nos levantamentos epidemiológicos, entretanto com limitações importantes, podendo dificultar o diagnóstico, principalmente em cães assintomáticos. Neste estudo, os tutores não autorizaram a realização de punção de medula óssea e/ou linfonodos para o diagnóstico parasitológico, entretanto a literatura cita que a forma clínica faz diferença no diagnóstico da LVC, já que para cães assintomáticos, o diagnóstico está baseado na realização de testes sorológicas e para os sintomáticos, inicialmente pelo diagnóstico parasitológico.

Segundo Borja et al. (2016), a LVC pode causar sinais clínicos que acometem diversos sistemas do organismo, porém, grande parte dos animais infectados são assintomáticos, fato que não limita o cão em permanecer com capacidade infectante ao flebotomíneo, tornando-se importante na disseminação da doença para outros cães e para os seres humanos. Ademais, de acordo com Figueiredo et al. (2014), cães sintomáticos têm cerca de três vezes mais chance de serem positivos nos testes sorológicos em relação aos assintomáticos. Laurenti et al. (2013) descreveram que a capacidade infectante ao vetor do cão com LVC assintomática é igual ou até superior a de cães sintomáticos, pois nestes casos nenhuma conduta de vigilância epidemiológica é tomada quanto a esses animais, deixando-os mais suscetíveis à picada do flebotomíneo.

Curi et al. (2014) referem que os animais sedentários e aqueles que vivem em espaços restritos são considerados alvos mais fáceis para o flebotomíneo, portanto com maior risco de infecção. Ainda, Costa et al. (2018) descrevem que a presença de mais de um cão por domicílio está associado ao aumento na probabilidade da infecção por

LVC, esse fato pode ser explicado dada a facilidade de ação do flebotomíneo, ainda um número maior de cães em um mesmo domicílio pode levar a menores ações de cuidado sanitário.

Quando determinada a soroprevalência por município, Pirajú apresentou o maior índice de soropositividade no ELISA, já que 12,5% (2/16) dos cães foram positivos, e na RIFI, 19% (3/16) dos cães positivos com titulação 1:40 e 12,5% (2/16) com título 1:80. De acordo com Cardim et al. (2016) e Hiramoto et al. (2019) os municípios avaliados são considerados silenciosos não receptivos não vulneráveis para LVC, mesmo estando geograficamente próximos ao epicentro Bauru, portanto, até a realização deste estudo, as microrregiões não tinham diagnóstico comprovado de leishmaniose visceral humana (LVH) e LVC.

Há relatos no município de Pirajú de doenças transmitidas por vetores, como febre maculosa e dengue, e a incidência destas foram relacionadas a presença do Rio Paranapanema que atravessa a cidade, ainda, é provável que a LVC recém diagnosticada no município esteja relacionada ao ecossistema constituído pelo rio, mata ciliar e a população de animais silvestres que lá habita, fatos que podem contribuir para o aparecimento do flebotomíneo, vetor da leishmaniose, facilitando o ciclo da doença. De acordo com nota emitida pelo Centro de Controle de Zoonoses de Pirajú em 2017, no município foram confirmados cinco casos de leishmaniose tegumentar canina (LTC), entretanto estes não foram descritos em periódicos indexados. Nesta ocasião a SUCEN realizaria um mapeamento na região para averiguar a presença do flebotomíneo (Jornal Diário de Notícias Expresso Pirajú, 2017), mas não houve divulgação de mais fatos até a presente data.

Desta forma, considerando os casos de LVC constatados neste experimento e a casuística de LTC do município de Pirajú, faz-se necessário a realização de mais estudos a fim de compreender a presença da doença no município, visando também conscientizar a popu-

lação e estabelecer estratégias de controle. Segundo o MAPA, na sorologia pelo método de RIFI pode ocorrer reação cruzada entre LV e LT, o que poderia ser uma justificativa para o índice de soroprevalência no município. Nos municípios de Cerqueira César, Iaras, Ipaussu e Santa Cruz do Rio Pardo não foram detectados casos soropositivos para LVC, fato que pode estar relacionado ao menor número amostral proveniente destas cidades. Nos demais municípios a soropositividade variou de 1,5% a 18%, mesmo com menor incidência ações de vigilância e controle também devem ser tomadas nestes locais.

Outro ponto importante a ser considerado é a Rodovia Raposo Tavares. Segundo Cardim et al. (2016), a expansão da LV no estado de São Paulo ocorreu no sentido oeste-leste, com destaque ao papel das rodovias, especialmente a Marechal Rondon. Neste sentido, hipoteticamente a Rodovia Raposo Tavares que passa próxima aos municípios deste estudo pode ter contribuído para a soroprevalência da doença em Pirajú, bem como nos municípios de Manduri, Bernardino de Campos, Ipaussu e Ourinhos. Sugere-se que novas investigações soroepidemiológicas sejam realizadas considerando o papel da Rodovia Raposo Tavares na distribuição da LV no sudoeste paulista.

Quanto ao sexo, as fêmeas foram soropositivas para RIFI em 14% (41/288) na titulação 1:40 e 3,5% (10/288) com título 1:80 e no ensaio ELISA 5% (14/288), resultando em diferença estatisticamente significativa quando comparado aos machos. Amóra et al. (2006) relatam maior soropositividade entre as fêmeas do meio rural de área endêmica. Fêmeas podem demonstrar maior suscetibilidade à LVC devido às variações hormonais e imunológicas que ocorrem nos períodos de estro e gestação (FELICIANO et al., 2012; SILVA et al., 2017). Seixas et al. (2012) referem relação incipiente entre o sexo e a soropositividade para LVC, e sugerem mais estudos para elucidar tal fato. Ainda, referências afirmam não haver predisposição sexual

na LVC (ALMEIDA et al., 2010; BARBOSA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

Em contraste com o observado, Azevedo (2019) e Lago et al. (2018), apontaram os machos com maior predisposição a infecção. Cloots et al. (2020) demonstraram em humanos, que o sexo masculino é um fator de risco para LV, e não apenas pelos valores socioculturais, existem diferenças biológicas relacionadas ao sexo que desempenham papel importante na patogênese desta doença.

A influência dos hormônios sexuais no sistema imunológico e na patogênese da LV foi avaliada por Lezama-Davila et al. (2007), mulheres tratadas com testosterona apresentaram agravamento dos sintomas da LV, enquanto os homens após a orquiectomia ou antes da puberdade estariam mais protegidos. Ainda, já havia sido demonstrado o papel da testosterona no estímulo à captação de *Leishmania donovani* por macrófagos, e o consequente aumento das taxas de infecção "in vitro", em contrapartida, a administração de estrogênio exógeno aumentando a atividade leishmanicida em macrófagos de camundongos machos e fêmeas (ZHANG et al., 2001). Outros estudos mostraram que a expressão de genes em células imunes, também pode ser dependente do sexo (JANSEN et al., 2014).

Neste estudo a maior taxa de soropositividade encontrada foi em fêmeas, porém todas assintomáticas e de região classificada como indene, na literatura os estudos que avaliam a predisposição sexual, seja em humanos ou cães, são na maior parte, realizadas em áreas endêmicas e com pacientes sintomáticos. Também, extrapolando para a espécie canina as ações hormonais supra citadas, hipoteticamente as fêmeas não castradas e machos castrados estariam menos suscetíveis a LVC.

Levando-se em consideração o estado de saúde dos animais, estes foram classificados em dois grupos: os cães clinicamente sadios

65,6% (328/500) e 34,4% (172/500) aqueles que os tutores referiram um ou mais sinais clínicos, portanto considerados doentes. Dos cães doentes, parte já possuía diagnóstico definitivo da doença em curso e outra parte recebeu suspeita diagnóstica no momento da avaliação clínica. Dentre esses animais foi possível diagnosticar doenças consideradas comuns, já que fazem parte do cotidiano da clínica de pequenos animais, tais como: gastroenterites bacterianas e virais, hemoparasitoses, dermatopatias, artropatias, intoxicação exógena, insuficiência renal, doenças do sistema genitourinário (urolitíases, cistites, metrites, piometra, hiperplasia prostática, tumor venéreo transmissível, distocias), neoplasias, cinomose, acidente ofídico, cardiopatias, periodontites, otites, hepatopatias, diabetes, entre outras, no entanto, em nenhum dos animais foi considerada a suspeita de LVC, portanto, a doença não foi incluída na lista de diagnósticos diferenciais.

Os animais doentes mostraram maior índice de soropositividade para LVC, na RIFI 17% (29/172) dos cães doentes foram reagentes com titulação 1:40 e 4% (7/172) com título 1:80, e 5,5% (9/172) soropositivos no ensaio ELISA. Acredita-se que os cães doentes foram mais suscetíveis a LVC por estarem com o sistema imunológico debilitado, neste sentido hemoparasitoses transmitidas por carrapatos e a leishmaniose são infecções potencialmente crônicas que podem ser detectadas simultaneamente em cães, essas doenças são incidentes na clínica de pequenos animais. Para a maioria dos casos de hemoparasitoses transmitidas por carrapatos os agentes etiológicos envolvidos são a *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, sua transmissão ocorre pela picada do carrapato contaminado. Os sinais clínicos são inespecíficos e variáveis, o que representa um desafio para o clínico (XAVIER, 2011). Nyarko et al. (2007) descreveram sinais clínicos mais intensos em cães coinfectados com *Anaplasma phagocytophilum* e *Leishmania* spp, revelando sinergismo entre esses patóge-

nos, porém o impacto da coinfeção *Ehrlichia canis* e *Leishmania* spp ainda precisam ser elucidados. Mekusas et al. (2008) sugeriram que a erliquiose é provavelmente um fator contribuinte para o estabelecimento da LVC. Távora et al. (2007), afirmaram que apesar das provas sorológicas serem confiáveis e terem bons níveis de sensibilidade e especificidade, podem apresentar reação cruzada entre hemoparasitoses e LVC. Ainda, nos cães, tanto a LVC quanto as hemoparasitoses demonstram sinais clínicos similares e inespecíficos, como febre, apatia, anorexia, perda de peso e anemia, tornando mais difícil sua distinção (MACHADO et al., 2007; NAKAGHI et al., 2008).

De conformidade com a vacina antirrábica e/ou vacina polivalente canina, os animais foram agrupados em vacinados 64,8% (324/500) e não vacinados 35,2% (176/500). Os cães não vacinados demonstraram maior taxa de soropositividade para LVC em relação aos vacinados. Pelo ensaio ELISA 6,5% (11/176) dos animais não vacinados foram soropositivos e pelo método RIFI, 12% (21/176) desses animais foram positivos com título 1:40 e 5% (9/176) com titulação 1:80. De acordo com os resultados obtidos, pode-se considerar que os cães que não possuíam vacina antirrábica e/ou vacina polivalente canina foram mais suscetíveis à infecção por LVC do que os vacinados, tal observação provavelmente esteja relacionada ao estado imunológico e sanitário desses animais, considerando que os cães que não receberam o esquema vacinal básico (vacina polivalente canina e antirrábica) dificilmente tiveram ou terão acesso a produtos para controle de endoparasitos e ectoparasitos, e até mesmo acesso à cuidados veterinários, tais fatos associados ainda com a falta de conhecimento dos tutores sobre doenças de caráter zoonótico, em particular a LVC. Ademais, durante a execução deste estudo pôde-se constatar que dos 500 cães avaliados, apenas 0,2% (1/500) havia recebido vacina contra LVC, considerada ferramenta importante na prevenção da doença, portanto medidas de incentivo e conscientização relacionadas

à importância da vacinação devem ser abordadas nessas microrregiões.

Durante a avaliação clínica que precedia a coleta de sangue para a análise sorológica, foi verificada a presença de carrapato nos cães, desta forma, foi possível constatar que 44% (220/500) apresentavam infestação por carrapato e 56% (280/500) dos cães não apresentavam carrapato no momento da avaliação clínica. Dos cães positivos para LV no ensaio ELISA 5% (11/220) estava com carrapato. Para RIFI, 14% (31/220) dos animais com carrapato foram soropositivos para LVC com titulação 1:40 e 4,5% (10/220) com título 1:80. Com base nos resultados observados, pode-se afirmar que a soropositividade para LVC foi 3,5 vezes maior nos animais com carrapato, portanto esta variável está associada à maior soroprevalência da doença, dados que corroboram com Silva et al. (2018), que observaram índice de soropositividade de 3,8 vezes maior nos cães parasitados por carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*. Para Bernardino et al. (2020), nos cães que apresentavam infestação por carrapatos a prevalência para LV foi 0,82 vezes maior, e relaciona tal fato à falhas nos cuidados primários dos animais por seus tutores.

Existem relatos de infecção de carrapatos com *Leishmania* spp., porém seu papel ainda não está bem definido na transmissão da LVC (DANTAS-TORRES et al., 2010; MORAIS et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; TROTTA et al., 2012;). Viol et al. (2016) investigaram o papel dos carrapatos na transmissão da LVC aplicando as técnicas de imunohistoquímica e PCR nos intestinos, ovários e glândulas salivares de *Rhipicephalus sanguineus* coletados de cães positivos e negativos para *Leishmania* spp ao exame citopatológico.

Dentre as controvérsias apresentadas pela literatura, Dantas-Torres et al. (2010) descreveram sobre a transmissão transovariana experimental de *Leishmania infantum* em carrapatos, mas não foi

possível associar com o índice de soropositividade para LVC, ainda, que os carrapatos podem ingerir vários tipos de patógenos durante o repasto sanguíneo (*Ehrlichia* spp, *Anaplama* spp, *Babesia* spp, *Leishmania* spp e *Hepatozoom* spp), o que não significa que eles possam transmiti-los. A infecção experimental em hamsters alimentados com macerado de *Rhipicephalus sanguineus* sabidamente infectados com amastigotas de *Leishmania* spp. constitui tema de pesquisa realizada por Coutinho et al. (2005). Existe também a hipótese de que o carrapato não esteja diretamente envolvido na transmissão da LVC, mas que ele sirva como um importante marcador ambiental para a presença de outros vetores, pois locais com criadouros de carrapatos também podem ser ambiente favorável para mosquitos, como o flebotomíneo transmissor da LVC (SILVA et al., 2018).

Neste estudo 71% (355/500) dos cães avaliados residiam na zona urbana, 14,4% (72/500) na zona rural e 14,6% (73/500) dos animais tinham acesso tanto à zona urbana quanto a rural, quando associados os resultados da sorologia pelos ensaios de ELISA e RIFI à variável epidemiológica ambiente, não foram obtidos resultados estatisticamente significativos que possam respaldar que a incidência da doença nas regiões estudadas foi maior nos animais de zona urbana, rural ou naqueles que tinham acesso a ambas.

No Brasil, a LVC apresenta ampla distribuição territorial, inicialmente essa doença era descrita como restrita ao ambiente rural, mas a partir da década de 90, com as diversas alterações ambientais, entre elas o aumento do desmatamento e a expansão dos centros urbanos, ocorreu sua urbanização e conseqüentemente o crescimento de áreas urbanas endêmicas (LAINSON; RANGEL, 2005; MONTEIRO et al., 2005).

Barbosa et al. (2010), citam que cães que vivem em municípios localizados próximo às matas têm maior probabilidade de serem soropositivos; devido à presença de animais silvestres e muitas vezes

condições sanitárias insatisfatórias favorecendo abundância de vetores.

Os resultados observados no presente estudo divergem dos relatados por Azevedo (2019) e Oliveira et al. (2010) nos quais identificaram que cães de área urbana apresentaram maior soroprevalência para LV em relação aos cães de área rural. Amóra et al. (2006) não evidenciaram diferença significativa na soropositividade de cães do meio urbano e rural, corroborando com este estudo.

Silva et al. (2018) citam que a ruralização das áreas suburbanas tende a homogeneizar os fatores de risco das áreas rurais, já que hoje em dia comumente acontece nos ambientes peridomiciliares das periferias urbanas o convívio de cães com outras espécies animais, como frangos, suínos, equinos e gambás, sendo esse convívio elemento importante para a casuística da LVC e da LVH, pois contribuem para a manutenção da população de flebotomíneos no peridomicílio. Ainda Silva et al. (2018) relatam que o ambiente peridomiciliar é uma variável epidemiológica importante de ser avaliada. Em contrapartida, o convívio dos cães com outras espécies animais nas regiões próximas aos domicílios pode ser benéfico em relação à casuística da LVC, já que esses animais também serão possíveis alvos de flebotomíneos, privando os cães de serem picados, podendo limitar o ciclo de transmissão da doença (MOREIRA et al., 2003; SILVA et al., 2005).

No que se refere à faixa etária, os animais foram divididos em três grupos, cães até um ano, correspondendo a 10,2% (51/500), cães com idade entre um a sete anos 51,8% (259/500) e 38% (190/500) cães com mais de sete anos. A idade não foi considerada variável epidemiológica significativa para a infecção por LVC nas microrregiões avaliadas.

De acordo com Almeida et al. (2010), Azevedo (2019), Barbosa et al. (2010), Oliveira et al. (2010); Seixas et al. (2012) e, a faixa etária não apresenta significância estatística para soropositividade em

cães, corroborando com o presente estudo. Em contrapartida, Silva et al. (2018) relatam que cães adultos têm maior predisposição à infecção, o que pode estar associado à variação no período de incubação da doença. Dias et al. (2018) referem maior soropositividade em cães com idade entre dois a oito anos e relatam também que os animais com idade menor ou igual a um ano não apresentaram soropositividade para LVC, fato que pode estar relacionado à janela imunológica dos animais filhotes. Devido ao período de latência da infecção, os cães podem ser contaminados quando filhotes, porém só se apresentarão reagentes nos testes sorológicos quando adultos, justificando assim a baixa soropositividade nos animais com menos de um ano de idade (BELO et al., 2013). A hipótese de que os filhotes são frequentemente mantidos dentro dos domicílios e dessa forma, menos expostos a picada do flebotomíneo (MARCONDES; NAZARETIAN, 2013). Os cães com idade menor que dois anos tem predisposição sete vezes maior à soropositividade para LVC do que os maiores que dois anos (FIGUEIREDO et al., 2014).

Participaram deste estudo cães de três portes distintos, sendo 37,8% (189/500) animais de pequeno porte, pesando até 10kg, 38% (190/500) de médio porte, com peso entre 11 a 25kg e 24,2% (121/500) de grande porte, com peso superior a 25kg. O porte do cão não exerceu influência na soropositividade para LVC.

Segundo Coura-Vital et al. (2011) o porte do cão não se demonstrou fator de risco significativo à infecção por LVC, corroborando com os resultados deste estudo, porém maior soropositividade foi encontrada associada aos cães de grande porte (COSTA et al., 2018). Os cães de médio e grande porte têm maior predisposição à doença por serem utilizados como cães de guarda e viverem nos ambientes peridomiciliares, dessa forma são mais suscetíveis à picada do flebotomíneo, já que os cães de pequeno

porte frequentemente habitam no interior dos domicílios em contato mais íntimo com as famílias e portanto mais protegidos dos mosquitos vetores (PENAFORTE et al., 2013).

De acordo com o comprimento da pelagem, os animais deste estudo foram classificados em dois grupos, sendo cães de pelagem curta 74,8% (374/500) e de pelagem longa 25,2% (126/500). De acordo com Belo et al. (2013) o comprimento da pelagem pode ser considerado um fator de risco importante à infecção por LVC, pois cães de pelagem curta, de certa forma estariam mais expostos a picada do mosquito, devido a maior facilidade do flebotomíneo alcançar e inocular o protozoário e também pela maior produção de gás carbônico, que segundo a Associação Brasileira de Controle de Vetores e Pragas (ABCVP), é uma substância atrativa aos flebotomíneos; já Barbosa et al. (2010) demonstram que o comprimento da pelagem não exerceu influência na soropositividade da LVC, corroborando com este estudo. Costa et al. (2018) observaram maior soroprevalência da LV em cães de pêlo curto, porém sugerem mais estudos para validação dessa variável epidemiológica.

Em relação à coloração da pelagem, os cães foram agrupados em pelagem clara 48% (240/500) e pelagem escura 52% (260/500). A coloração da pelagem não se mostrou uma variável epidemiológica relevante para a soropositividade da LVC. Cães com pelagem clara possuem maior sensibilidade cutânea, dessa forma hipoteticamente estariam mais suscetíveis à picada do flebotomíneo e consequentemente à infecção por LVC, porém em estudo realizado em São Luiz no estado do Maranhão, Barbosa et al. (2010) concluíram que a coloração da pelagem não exerce influência na soroprevalência para LVC, corroborando com o presente estudo.

Sabe-se atualmente que existem vários produtos para o controle de ectoparasitos em cães, entre eles estão disponíveis no mercado pipetas de inseticida para uso tópico, coleiras impregnadas com inse-

ticidas e até mesmo comprimidos de administração oral. Tendo em vista a importância da ação preventiva da infestação por ectoparasitos (pulgas e carrapatos), bem como ação repelente contra o flebotômico transmissor da LVC, os animais deste experimento foram classificados em cinco grupos, a saber: cães que não faziam uso de método preventivo contra ectoparasitos 45,6% (228/500); os que faziam uso de pipetas de inseticida para uso tópico 24,2% (121/500); aqueles com coleiras impregnadas com inseticida 0,4% (2/500); os que utilizavam comprimidos de administração oral 12,85% (64/500) e ainda os que utilizavam tanto as pipetas de inseticida quanto os comprimidos 17% (85/500). Neste estudo as formas de prevenção contra ectoparasitos avaliadas não demonstraram influência significativa sobre a soroprevalência da LVC. Segundo Bernardino et al. (2020), o controle ineficaz de ectoparasitos foi observado como fator de risco para LVC, citam ainda que este fato deve servir para alertar os tutores para a necessidade de protocolos adequados de controle.

Embora reduzida porcentagem de animais fazendo uso da coleira impregnada com inseticida (0,4% - 2/500), essa metodologia constitui-se ferramenta importante na prevenção da LVC, o que pôde ser observado nos ensaios ELISA e RIFI, visto que os animais encoleirados foram soronegativos em ambos os testes sorológicos realizados. Nesse sentido, Bersusa et al. (2018) enfatizam que das medidas de prevenção contra ectoparasitos em cães, com enfoque no flebotômico vetor da LVC, a coleira impregnada com inseticida é considerada como a medida mais eficaz e indicada pelo MAPA no controle da transmissão da doença. As coleiras impregnadas com deltametrina têm efeito prolongado por conter piretróide sintético com ação lipofílica, dissolvendo-se na camada de gordura do subcutâneo da pele dos cães, se espalhando por todo o corpo e assim protegendo contra picadas de insetos vetores, desta forma a deltametrina é classificada como inseticida capaz de repelir o *Lutzomyia longipalpis* (BERSUSA et

al., 2018). Ademais, Courtenay et al. (2019) avaliaram o uso de coleiras impregnadas com inseticidas em cães de áreas rurais endêmicas e demonstraram que seu uso reduziu em 50% a incidência de LV infantil nas regiões estudadas. Ainda, redução na soroprevalência foram observadas em 76% das propriedades rurais onde os cães faziam uso da coleira em comparação com propriedades rurais controle.

Neste estudo foi possível identificar cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral em municípios anteriormente classificados em silencioso não receptivo não vulnerável em municípios silencioso receptivo vulnerável e provavelmente em municípios onde existe transmissão canina, de conformidade com Hiramoto et al. (2019).

Diante do exposto, a difusão de conhecimento sobre a leishmaniose visceral canina e seu caráter zoonótico proporcionado à população, aos agentes de saúde e médicos veterinários por meio de palestras e material impresso educativo certamente trará maior conscientização como também abrirá caminho para investigações e medidas de controle futuras.

6 CONCLUSÕES

Este é o primeiro relato da ocorrência de *Leishmania* spp. em cães provenientes das microregiões de Ourinhos e Avaré, consideradas regiões endêmicas.

A análise das variáveis epidemiológicas como o sexo, estado de saúde, vacinação e a presença de carrapatos estiveram associadas à soroprevalência da LVC, o que permite concluir que fatores inerentes à espécie e ambientais constituem fatores de risco.

REFERÊNCIAS

- AKHTARDANESH, B.; SHARIFI, I.; MOHAMMADI, A.; et al. Feline visceral leishmaniasis in Kerman, South east of Iran: Serological and molecular study. **J Vector Borne Dis**, p. 96–102, 2017.
- ALMEIDA, A.B.P.F.; MENDONÇA, A.J.; SOUSA, V.R.F.; Prevalence and epidemiology of visceral leishmaniasis in dogs and humans in the city Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Cien Rural**, Santa Maria, v.40, n.7, jul. 2010.
- AMÓRA, S.S.A.; SANTOS, M.J.P.; ALVES, N.D.; et al. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Cien Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p. 1854-1859, nov./dez. 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CONTROLE DE VETORES E PRAGAS (ABCVP) <https://www.abcvp.com.br/>. Acesso em: 06 jun. 2020.
- AZEVEDO, J. S. **Estudo retrospectivo de casos de leishmaniose visceral canina atendidos em um hospital veterinário de uma área endêmica para a doença**. 2019. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Araçatuba – SP, 2019.
- BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infec diseases of the dog and cat**, Philadelphia: Elsevier Saunders, 4. ed, p. 768-784, 2015.
- BARATA, R.A.; SILVA, J.C.F.; SILVA, J.C.; et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral. **Rev Inst Med Trop**, v. 39, p. 421-425, 2013.
- BARBOSA, D.S.; ROCHA, A.L.; SANTANA, A.A.; et al. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Ani Brasil**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 653-659, jul./set. 2010.
- BELO, V.S.; STRUCHINER, C.J.; WERNECK, G.L.; et al. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. **Vet Parasitol**, v. 195(1-2), p. 1-13, 1 jul. 2013.

BERNARDINO, M.G.S.; ANGELO, D.F.S.; SILVA, R.B.S.; et al. High seroprevalence and associated factors for visceral leishmaniasis in dogs in a transmission area of Paraíba state, Northeastern Brazil. **Braz J Vet Parasitol**, 29(2), 2020.

BERSUSA, A.A.S.; TOMA, T.; ARAÚJO, B.; et al. Coleira impregnada com deltametrina para cães na prevenção da transmissão de leishmaniose visceral por flebotomíneos: um parecer técnico-científico. **Instituto de Saúde**: São Paulo, 2018.

BORJA, L.S.; SOUSA, O.M.F.; SOLCA, M.S.; et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. **Vet Parasitol**, 229, 110–111, 2016.

BRASIL. *Guia de Vigilância em Saúde* [online]. Brasília: Ministério da Saúde; 2016 Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/18/Guia-LV-2016.pdf>. Acesso em: 25 maio 2019.

CARDIM, M.F.M.; GUIRADO, M.M.; DIBO, M.R.; et al. Leishmaniose visceral no estado de São Paulo, Brasil: análise espacial e espaço-temporal. **Rev Saude Publica**, 50:48, 2016.

CASANOVA, C.; COLLA-JACQUES, F.E.; HAMILTON, J.G.C.; et al. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* chemotype populations in São Paulo State, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, 9, 2015.

CLOOTS, K.; BURZA, S.; MALAVIYA, P.; et al. Male predominance in reported Visceral Leishmaniasis cases: Nature or nurture? A comparison of population-based with health facility-reported data. **PLoS Negl Trop Dis**, 14(1), 2020.

COSTA, D.N.C.C.; BLANGIARDO, M.; RODAS, L.A.C.; et al. Canine visceral leishmaniasis in Araçatuba, state of São Paulo, Brazil, and its relationship with characteristics of dogs and their owners: a cross-sectional and spatial analysis using a geostatistical approach. **Vet Research**, 14:229, 2018.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M.J.; VELOSO, V.M.; et al. Prevalência e fatores associados à infecção por *Leishmania infantum* em cães de uma área urbana do Brasil, identificada por métodos moleculares. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5 (8), p. 1-10, 2011.

COURTENAY, O.; BAZMANI, A.; PARVIZI, P.; et al. Insecticide-impregnated dog collars reduce infantile clinical visceral leishmania-

sis under operational conditions in NW Iran: A community-wide cluster randomised trial. **PLoS Negl Trop Dis**, 13 (3), 2019.

COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.; et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v.128, p.149–155, 2005.

CURI, N.H.A.; PASCHOAL, A.M.O.; MASSARA, R.L.; et al. Fatores associados à soroprevalência da leishmaniose em cães que vivem ao redor de fragmentos da Mata Atlântica. **PLoS One**, v. 9 (8), p. 1-11, 2014.

DANTAS-TORRES, F.; MARTINS, T.F.; PAIVA-CAVALCANTE, M.; et al. Transovarial passage of *Leishmania Infantum* DNA in Artificially Infected *Rhipicephalus Sanguineus*. **Exp Parasitol**, v. 125(2), p.184-185, 2010.

DIAS, R.C.F.; THOMAZ-SOCCOL, V.; PASQUALI, A.K.S.; et al. Variables associated with the prevalence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in dogs on the tri-border of Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. **J Vet Parasitol**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 338-347, july./sept. 2018.

FELICIANO, M.A.R., AQUINO, A.A., COUTINHO, L.N. et al. Imunologia na gestação de cadelas: revisão de literatura. **Revta Bras Reprod Anim**, 36:158-162, 2012.

FIGUEIREDO, M.J.F.M.; SOUZA, N.F.; FIGUEIREDO, H.F.; et al. Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. **Ciência Ani Brasil**, Goiânia, v.15, n.1, p. 102-106, jan./mar. 2014.

FRAGA, D.B.M.; PACHECO, L.V.; BORJA, L.S.; et al. The rapid test based on *Leishmania infantum* chimeric rK28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. **PLoS Negl Trop Dis**, 10 (1), 2016.

GOODMAN, L. A. Simultaneous confidence intervals for contrast among multinomial population. **Annals of Mat Stat**, v. 35, p. 716-725, 1964.

GOODMAN, L. A. On simultaneous confidence intervals for multinomial population. **Techno metrics**, v. 7, p. 247-254, 1965.

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Servilla, Spain. Salamanca:

Inter vet International bv. Canine Leishmaniasis: mov towards a solution, v. 2, p. 7-14, 2002.

GRIMALDI, G.JR.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L.; et al. Evaluation of a novel chromatographic immuno assay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 106, p. 54-59, 2012.

HIRAMOTO, R.M.; OLIVEIRA, S.S.; RANGEL, O.; et al. Classificação epidemiológica dos municípios do Estado de São Paulo segundo o Programa de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, v. 16, n. 182, p. 11-35, fev. 2019.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades e Estados**: São Paulo. 2019. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sp/>. Acesso em: 05 nov. 2019.

IKEDA, G. F. A.; FEITOSA, M.M. Métodos de diagnóstico de leishmaniose visceral canina. **Clín Vet**, 62:32-38, 2006.

JANSEN, R.; BATISTA, S.; BROOKS, A.I.; et al. Sex differences in the human peripheral blood transcriptome. **BMC Genomics**, 15(1):33. 2014.

JORNAL DIÁRIO DE NOTÍCIAS EXPRESSO PIRAJÚ, de 28 de setembro de 2017, Disponível em: <http://expressopiraju.blogspot.com/2017/09/sucen-visitara-piraju-para-observar.html> Acesso em: 06 jun. 2020.

LAGO, J.; SILVA, J.; BORJA, L.; et al. Infecção Canina Por *Leishmania braziliensis* na Área Endêmica de Corte de Pedra - Bahia. Olinda, PE: **Soc Brasi de Med TroP**, 2018.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, p.811-827, 2005.

LAURENTI, M.D.; ROSSIB, C.N.; MATTA, V.L.R.; et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. **Vet Parasitol**, v.196, p.296-300, 2013.

LEZAMA-DAVILA, C.M.; BARBI, J.; OGHUMU, S., et al. 17-estradiol increases leishmania mexicana killing in macrophages from DBA/2 mice by enhancing production of nitric oxide but not pro-inflammatory cytokines. **Am J Trop Med Hyg**, 76(6):1125–7, 2007.

LIMA, J.T.R.; GENNARI, S.M.; SOARES, H.S.; et al. Serodiagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis in human and canine populations living in Indigenous Reserves in the Brazilian Amazon Region. **Rev Inst Med Trop**, v.50, p. 61-66, 2017.

LUZ, Z.M.P.; SCHALL, V.; RABELLO, A. Evaluation of a pamphlet on visceral leishmaniasis as a tool for providing disease information to healthcare professionals and laypersons. **Cad Saúde Pública**. v. 21, p.608-621, 2005.

MACHADO, J. G.; HOFFMANN, J. L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. **Clín Vet**, v. 71, p. 50-58, 2007.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T.; MOTO, T. F.; PORFIRIO-PASSOS, G.; et al. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. **Vet Parasitol**, v. 223, p. 120-126, 2016.

MARCONDES, M.; NAZARETIAN, C.R. Leishmaniose visceral no Brasil. **J Vet Res Animal Science**, 50(5):341–52, 2013.

MEKUZAS, Y.; GRADONI, L.; OLIVA, G.; et al. Ehrlichia canis and Leishmania infantum co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. **Eur Socie of Clin Microbiol and Infect Diseases**, 30–31, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose visceral**, out. 2017. Disponível em: www.saude.gov.br/sus. Acesso em: 10 out. 2019.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. COORDENAÇÃO DE FISCALIZAÇÃO DE PRODUTOS VETERINÁRIOS. **NOTA TÉCNICA Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA**, 2016.

MONTEIRO, E.M.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T.; et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev Inst Med Trop**, v. 38(2), p. 147-152, 2005.

MORAIS, R.C.S.; GONÇALVES, S.C.; COSTA, P.L.; et al. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Exp Appl Acarol**, 59:473–481, 2013.

MOREIRA, E.D.; JR. E.D.; SOUZA, V.M.M.; et al. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 69(4), p. 393–397, 2003.

MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; GARCIA, J. F.; et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with diferente clinical signs. **Vet Parasitol.**, v. 145, n. 3-4, p. 245-252, abr. 2007.

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M.; et al. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Cien Rural**, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.

NUNES, J.B.; LAURENTI, M.D.; KANAMURA, H.Y.; et al. *Leishmania infantum* infection in dogs from the South ern region of Minas Gerais State, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 58, p. 75, 2016.

NYARKO, E.; BARAT, N.C NIKOLSKAIA, O.V.; et al.; Anaplasma phagocytophilum-Borrelia burgdorferi Coinfection Enhances Chemokine, Cytokine, and Matrix Metalloprotease Expression by Human Brain Microvascular Endothelial Cells. **Clin and Vacc immunol**, Vol. 14 p. 1420–1424, 2007.

OLIVEIRA, L.C.P.; ARAÚJO, R.R.; ALVES, C. R.; et al. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, v. 43(4), p. 512 400-404, 2010.

OLIVEIRA, G.C.; PAIZ, L.M.; MENOZZI, B.D.; et al Antibodies to *Leishmania* spp. in domestic felines. **Braz J Vet Parasitol**. Jaboticabal, v. 24, p. 464-470, 2015.

OLIVEIRA, A.M.; VIEIRA, C.P.; DIBOC, M.R.; et al. Dispersal of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of canine and human visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. **Acta Tropica**, v.164, p. 233–242, 2016.

PENAFORTE, K.M.; BELO, V.S.; TEIXEIRA-NETO, R.G.; et al. Leishmania infection in a population of dogs: an epidemiological investiga-

tion relating to visceral leishmaniasis control. **Vet Parasitol**, 22(4): 592-6, 2013.

PRESTES-CARNEIRO, L.E.; DANIEL, L. A. F.; ALMEIDA, L.C.; et al. Spatiotemporal analysis and environmental risk factors of visceral leishmaniasis in an urban setting in São Paulo State, Brazil. **Parasites Vect**, 12:251, 2019.

SEIXAS, M.M.; JUNIOR MAGALHÃES, J.T.; FRANKE, C.R.; et al. Positivity for canine visceral leishmaniasis: are there canine factors contributing? **Rev Baiana de Saúde Púb**, v. 36, n.2, p.358-367 abr./jun. 2012.

SEVÁ, A.P.; OVALLOS, F.G.; AMAKU, M.; CARRILLO, E.; MORENO, J.; GALATI, E.A.B.; LOPES, E.G.; SOARES, R.M.; FERREIRA, F. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Plos One**, 2016.

SILVA, A.V.M.; PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A.; et al. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21(1), p. 324-328, 2005.

SILVA, J.D.; MELO, D.H.M.; COSTA, J.A.G.; et al. Leishmaniose visceral em cães de assentamentos rurais. **Pesq Vet Bras** 37(11):1292-1298, 2017.

SILVA, R. B. S.; PORTO, M. L.; BARBOSA, W. O.; et al. Seroprevalence and risk factors associated with canine visceral leishmaniasis in the State of Paraíba, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, v. 51, n. 5, p.683-688, 2018.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit Vect**, v. 86, mai. n.4, p.1-16, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; et al. Diagnostic challenges 523 in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. **Tren in Parasitol**, v. 33, Sep. p. 706-717, 2017.

SOUSA-GOMES, M.L.; MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; PELISSARI, D.M.; et al. Co-infection *Leishmania*/HIV in Brazil: Epidemiological, Clinical and Laboratorial Aspects. **Epidemiol Serv Saúde**, Brasília, v. 20, p. 519-526, 2011.

TÁVORA, M. P. F.; PEREIRA, M. A. V. C.; SILVA, V. L.; et al. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para

diagnosticar *Leishmania* sp. em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Rev Inst Med Trop**, v. 40, p. 482-483, 2007.

TRAVI, B.L., CORDEIRO-DA-SILVA, A., DANTAS-TORRES, F.; et al. Canine visceral leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Negl Trop Dis**, 12 (1), 2018.

TROTTA, M.; NICETTO, M.; FOGLIAZZA, A.; et al. Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and *rickettsiae* in ticks removed from dogs living in Italy. **Ticks Tick Borne Dis**, 3:293-296, 2012.

WERNECK GL. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cad saude publica / Minist da Saude, Fund Oswaldo Cruz*, **Esc Nac Saude Publica**, 24:2937-2940, 2008.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. (World Health Organization), 2020. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> Acesso em: 10 jun. 2020.

WOYAMES PINTO, A.J.; RIBEIRO, V.M.; TAFURI, W.L. The Immunochromatography Use in Canine Visceral Leishmaniasis in Brazil: A "Quick Solution" of a Complex Diagnostic? Rapid Test in Dogs with Leishmaniasis. **Annals of Clin Cytol and Pathol**, 2(4): 1033, 2016.

VIOL, M.A.; GUERRERO, F.D.; OLIVEIRA, B.C.M.; et al. Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. **Parasitol Res**, 115(9): 3479- 3484, 2016.

XAVIER M.S. **Estudo de hemoparasitas por evidencias morfológicas, sorológicas e moleculares, com enfase na familia Anaplasmatacea em *Canis familiaris*, na região litoranea do estado do Rio de Janeiro**. 222f. Niteroi, RJ. Tese (Clinica e Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal Fluminense, 2011.

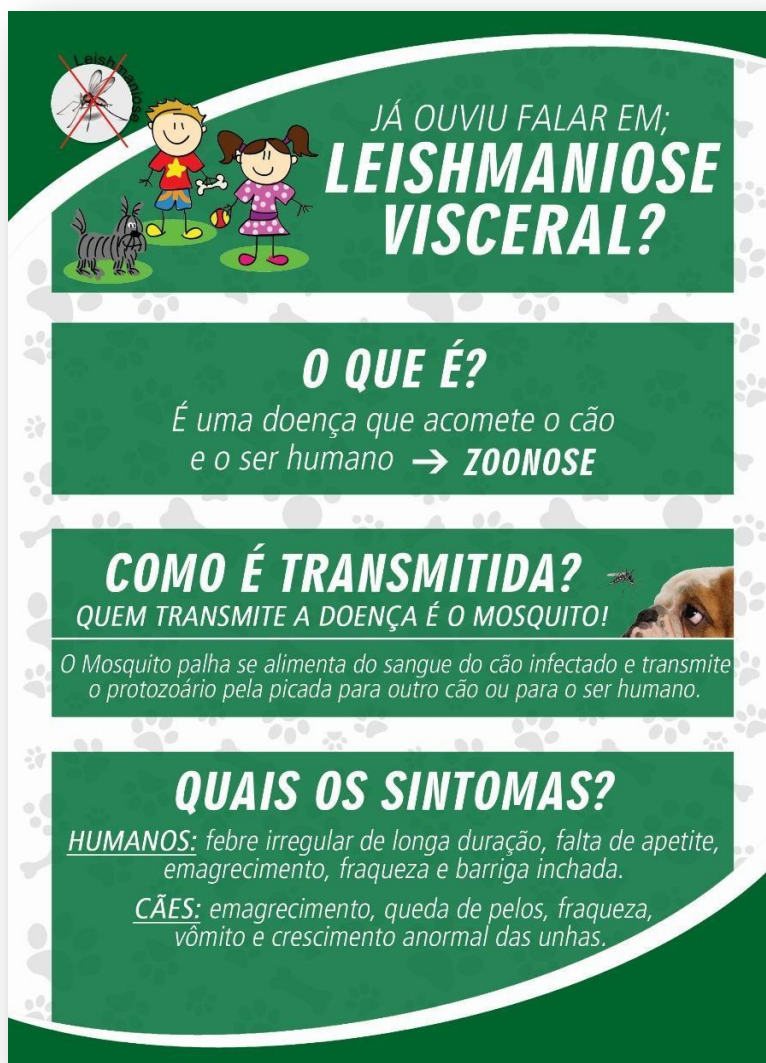
ZHANG, H.; ZHAO, J.; WANG, P.; et al. Effect of testosterone on *Leishmania donovani* infection of macrophages. **Parasitol Res**, 87(8):674-676, 2001.


ZUBEN ,A.P.B.; DONALÍSI, M.R. Difficulties in implementing the guidelines of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Control Program in large cities. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 32, 2016.


APÊNDICE A: QUESTIONÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO DOS CÃES DO EXPERIMENTO

Ficha Individual	
CÃO N°.	_____ Data da coleta: ___/___/___
Cidade onde vive:	_____
Ambiente onde vive o Animal:	Urbana () Rural() Ambas()
Sexo:	M() F() Raça: _____
Porte:	Pequeno() Médio() Grande() Peso: _____Kg
Pelagem:	Curta() Longa()
Tonalidade da pelagem:	Clara() Escura()
Idade:	até 1 ano() 1 a 7 anos() acima de 7 anos()
Animal Vacinado?	SIM() NÃO() (antirrábica e polivalente canina)
Presença de carrapato?	SIM() NÃO()
Faz controle de ectoparasitas?	SIM() NÃO()
Qual?	Tópico() Oral() Coleira()
ANIMAL SADIO() ANIMAL DOENTE()	
Qual doença em curso ou provável diagnóstico?	


APÊNDICE B: MATERIAL EDUCATIVO DESENVOLVIDO PARA CONSCIENTIZAÇÃO DA POPULAÇÃO



 **JÁ OUVIU FALAR EM;
LEISHMANIOSE
VISCERAL?**



O QUE É?
É uma doença que acomete o cão
e o ser humano → **ZOOOSE**

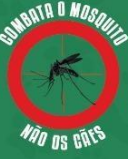
COMO É TRANSMITIDA? 
QUEM TRANSMITE A DOENÇA É O MOSQUITO!

O Mosquito palha se alimenta do sangue do cão infectado e transmite o protozoário pela picada para outro cão ou para o ser humano.

QUAIS OS SINTOMAS?

HUMANOS: febre irregular de longa duração, falta de apetite, emagrecimento, fraqueza e barriga inchada.

CÃES: emagrecimento, queda de pelos, fraqueza, vômito e crescimento anormal das unhas.



**COMO PREVENIR
A DOENÇA?**

MANTER O MOSQUITO LONGE DAS NOSSAS CASAS

- ✓ Limpeza dos quintais
- ✓ Telar janelas e portas
- ✓ Uso de repelente - homem
- ✓ Uso de coleira repelente - cão

VACINAÇÃO DOS CÃES SADIOS


**O QUE FAZER SE MEU CÃO APRESENTAR
ESTES SINAIS CLÍNICOS?**

Leve-o imediatamente ao MÉDICO VETERINÁRIO!

PROTEJA SEU CÃO E SUA FAMÍLIA!

Maiores Informações

Fone: (14) 3356.1842 | 99717.0922
Rua Rio de Janeiro, 493 - Manduri / SP

Clínica Veterinária
**Saúde
Animal**

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Levantamento soroepidemiológico da Leishmaniose visceral canina em área não endêmica", Processo FOA nº 00822-2017, sob responsabilidade de Maria Cecília Rui Luvizotto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 18 de Maio de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 18 de Abril de 2019.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 18 de Maio de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Soroepidemiological survey canine Leishmaniasis in non endemic area", Protocol FOA nº 00822-2017, under the supervision of Maria Cecília Rui Luvizotto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 18, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 18, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 18, 2019.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator