

Ebivaldo Gonçalves Brito Filho

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA-LVC,
EM CAMPINA GRANDE-PB/BRASIL:
AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E
DIAGNÓSTICA**

**Botucatu/SP
2013**

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu
Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA-LVC,
EM CAMPINA GRANDE-PB/BRASIL:
AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E
DIAGNÓSTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Doenças Tropicais da
Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista – UNESP,
para a obtenção do título de Mestre em
Doenças Tropicais.

Aluno: Ebivaldo Gonçalves Brito Filho
Orientador: Prof. Dr. Hélio Langoni
Co-orientadora: Profa. Dra. Marcia Almeida Melo

**Botucatu/SP
2013**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os estudantes da região Norte e Nordeste que não tiveram a mesma oportunidade de estar aqui e todas as comunidades que lutam pela afirmação de mais de 30% da população brasileira.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida maravilhosa que tenho, pelas promessas realizadas hoje, passos que me conduziram até aqui, pelas pessoas que conheci e pelas experiências que vivi.

Agradeço a minha mãe por ser uma mulher incrível, sempre compreensiva, dedicada e chefe de família.

Ao meu pai, por compreender os dias em que estive ausente e apoio.

Às minhas irmãs, Polianne, Larissa e Elaine, por todo carinho e pela alegria que é reencontrá-las cada vez.

À amiga Andreia Vieira, incentivadora da minha vinda para Botucatu, pela amizade e convívio.

À amiga Juliana Medeiros pelos momentos juntos nas adversidades da vida.

Ao professor Helio Langoni, orientador no verdadeiro sentido da palavra, pelo apoio, credibilidade e paciência de aceitar orientar-me em um momento onde encontrava-me inexperiente na vida acadêmica e ter me ajudado a amadurecer neste sentido.

À Profa. Márcia Melo, pelas ideias construtivas, por toda ajuda e paciência.

Ao amigo Guido Wanderley pela amizade e ajuda na parte laboratorial nos fins de semana.

Aos residentes da área de Zoonoses e Saúde Pública: Carla Coiro, Raissa, Daniela Barbosa, e Anelise, pela disponibilidade e auxílio durante a execução do experimento.

À amiga Dulce pela ajuda e carinho.

Ao Rodrigo Costa, Virginia Bodelão e Marcela Troncareli por todas as explicações e ajuda laboratorial.

Ao Amigo Alexandre Redson por toda ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (NUPEZO -FMVZ),

À Daniela Mercuri por toda sua singularidade, pelas palavras de carinho, incentivo e conselhos, por ser uma mulher forte e política que me referenciou a acreditar em um Brasil que foi idealizado lá atrás.

Em especial ao Amigo Marcio Theodorovicz por todos os momentos de compreensão, apoio, atenção e delicadeza.

A todas as pessoas que sempre me incentivaram, que dedicaram algum momento da sua vida para permitir a realização deste trabalho, auxiliando de maneira pessoal ou profissional, e que por um simples descuido não foram mencionadas aqui.

Meus mais sinceros agradecimentos.

QUADRO DE TABELAS

Tabela 1a.	Associação das variáveis epidemiológicas estudadas com os resultados da pesquisa de anticorpos para <i>Leishmania major</i> , pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI).	34
Tabela 1b.	Associação das variáveis epidemiológicas estudadas com os resultados da pesquisa de anticorpos para <i>Leishmania major</i> , pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI).	35
Tabela 2.	Associação da variável condição social dos proprietários (escolaridade e renda) com os resultados da pesquisa de anticorpos para <i>Leishmania major</i> pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI).	37
Tabela 3.	Estimativa $\pm$ erro padrão (EST $\pm$ EP) e intervalo de confiança 95% (IC95%) da avaliação estatística para as técnicas sorológicas e pesquisa de DNA de <i>Leishmana</i> spp. pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), considerando-se a RIFI com antígeno de <i>L. major</i> como prova padrão-ouro	39
Tabela 4.	Carga parasitária por <i>Leishmania chagasi</i> nos animais positivos na sorologia ou PCR convencional.	41

QUADRO DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição dos casos de Leishmaniose Visceral Humana na Paraíba, de acordo com o ano de referência, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação.	14
Figura 2.	<i>Lutzomia longipalpis</i> .	16
Figura 3.	Ciclo da leishmaniose visceral	17
Figura 4.	Localização geográfica da cidade de Campina Grande no Estado da Paraíba.	24
Figura 5.	Gráfico de Comparação dos resultados do ELISA realizado no ano de 2008 e 2012 na cidade de Campina Grande-PB.	31
Figura 6.	Imagem representativa dos bairros de Campina Grande, com a localização dos animais sororeagentes.	32

LISTA DE ABREVIATURAS

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

DNA – Deoxyribonucleic acid

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid

ELISA – Enzyme Linked Immunossorbent Assay (Ensaio Imunoenzimático)

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

kDNA – DNA do Cinetoplasto

LIT – Liver Infusion Tryptose

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

LVH – Leishmaniose Visceral Humana

NNN – Neal, Novy, Nicolle

OMS – Organização Mundial de Saúde

PB – Paraíba

PBS – Phosphate Buffer Solution

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia pela Polimerase).

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

RNA – Ribonucleic Acid

SFM – Sistema Fagocitário Mononuclear

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 –	INTRODUÇÃO	12
2 –	OBJETIVOS	23
3 –	MATERIAL E MÉTODOS	24
4 –	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5 –	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6 –	CONCLUSÕES	43
7 –	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
8 –	ANEXOS	51

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma zoonose que acomete canídeos, constituindo-se um grave problema de saúde pública, tendo em vista que é o cão a principal fonte de infecção da doença para humanos no ciclo doméstico. A proximidade do cão tem sido referenciada como um importante fator de risco para a doença. É endêmica em diversas regiões do Brasil, incluindo o Estado da Paraíba. Em Campina Grande-PB, no período de dezembro de 2011 a fevereiro de 2012 foi realizado inquérito soroepidemiológico para *Leishmania* spp. em cães por meio de sorologia e pesquisa do DNA do parasita pela biologia molecular, enfocando a sua distribuição geográfica e correlacionando os fatores de riscos e socioeconômicos. Dos 391 cães estudados, 33% apresentaram resultado positivo para a pesquisa de anticorpos para leishmania spp. na RIFI e 4,34% ao ELISA, e 2% para a pesquisa de DNA do parasita no sangue pela PCR. Houve diferença estatística significativa para contactantes ($P=0,02$) e ($OR=4,1$). A RIFI com antígeno de *L. major*, mostrou-se como um bom teste confirmatório, podendo ser utilizado como contra prova do ELISA, que apresentou sensibilidade de 39,4%. A associação entre os dois testes e a co-positividade foi de apenas 52%, necessitando de outra prova confirmatória. Já para a confirmação de negatividade na RIFI, o ELISA foi considerado seguro, apresentando um índice de 96,7%. O uso da PCR de sangue total apresentou baixa sensibilidade e baixa concordância com a RIFI, não sendo indicado como teste primário e mostrou-se eficiente na contra prova. Os estudos mostram que a LVC tem-se adaptado à zona urbana, portanto de forma endêmica, concluindo-se que a diversidade de provas diagnósticas, melhora a detecção de animais positivos, aspecto excelente para o controle da LVC em determinadas áreas, além de evitar a eutanásia de cães falsos positivos.

Palavras-chave: Calazar, Diagnóstico, cão, zoonoses, fatores de risco.

ABSTRACT

The Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a canidae zoonosis, which infects dogs and other mammals, as humans, becoming a serious public health problem, owing the fact that dogs are the main source infection disease for human on domestic cycle. The closeness to dogs has been referenced as an important disease risk factor. This illness is endemic in several regions from Brazil, including the Paraíba state. In the period of December 2011 to February 2012, in Campina Grande, Paraíba, was conducted a seroepidemiological survey to *Leishmania spp.* in dogs, through serology study and research from the DNA of the parasite by the molecular biology. This study had a focus on the geographical distribution, correlating the socioeconomic and risk factors. From the 391 studied dogs, 33% showed a positive result to antibodies of *Leishmania spp.* by IFAT test, 4.34% by ELISA and 2% by PCR with detection of the parasite DNA in the animal blood. There was significant statistical difference to contactants ($P = 0.02$) and (OR = 4.1). The IFAT with *L. major* antigen, proved to be a proper confirm test that could be used as counterproof to ELISA test, which presented 39.4% of sensitivity. The combination of these two tests and its co-positivity was only 52%, which required another confirmatory test. However, for the negativity confirmation of IFAT, the ELISA test was considered reliable, with a 96.7% index. The use of PCR with total blood, showed low agreement and sensitivity with IFAT test, therefore not indicated as primary test, however efficient as counterproof. This research shown that CVL has adapted to urban areas, thus as endemic form and it concludes that a variety of diagnostic tests improves the detection of positive animals, becoming an excellent aspect to CVL control in certain areas, besides preventing euthanasia of false positives dogs.

Keywords: kalazar, diagnosis, dog, zoonosis, Risk factors.

1 INTRODUÇÃO

O interesse pelo estudo das zoonoses, enfermidades comuns ao homem e aos animais, aumentou acentuadamente nos últimos anos, sugerindo maior interesse, conhecimento e relacionamento entre profissionais da área da saúde. Algumas dessas zoonoses apresentam-se como doenças ocupacionais, despertando nos médicos veterinários e profissionais de áreas afins grande preocupação pela exposição constante a fonte de infecção¹.

1.1 Histórico

As leishmanioses são consideradas zoonoses podendo acometer humanos, quando participam do ciclo de transmissão do parasita. A leishmaniose humana foi descrita pela primeira vez na Grécia em 1835 e mais tarde na Índia em 1869. Por causar aumento de pigmentação na pele e consequente febre, recebeu o nome de Kala-jwar ou Kalazar, que significa febre negra². Anos depois, William Boog Leishman e Charles Donovan isolaram o protozoário do baço de um soldado indiano e de uma criança, respectivamente³. Ronald Ross classificou o gênero *Leishmania* em homenagem a Leishman e Donovan, assim o agente causador do calazar foi denominado *Leishmania donovani* no velho mundo^{4, 5}.

Em 1937, Evandro Chagas foi o primeiro a observar a doença no cão e em humanos, e a infecção do flebótomo *Lutzomyia longipalpis*, classificando o parasita como *Leishmania chagasi* nas americas⁶. Em 1956, Deane aponta o cão e a raposa como reservatórios naturais do parasita em áreas endêmicas e caracteriza a doença como zoonose⁷.

1.2 Epidemiologia

A leishmaniose visceral (LV) é uma importante zoonose pela sua morbimortalidade e rápida expansão geográfica, estabelecendo assim, novas áreas endêmicas⁸. Ocorre em 47 países e tem como agente etiológico três espécies: *Leishmania donovani* na Índia e leste da África; *Leishmania infantum*

na China, Ásia central, Europa e África; *Leishmania chagasi*, na América do Sul e Central⁹.

No Brasil, a doença apresenta ampla distribuição territorial, com aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados. Atualmente vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte, mudando seu perfil epidemiológico, antes eminentemente rural. Sua distribuição geográfica abrange as regiões Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Nordeste, sendo esta última a que apresenta a maioria dos casos notificados no país¹⁰.

Estudos recentes têm mostrado aumento da prevalência da Leishmaniose Visceral canina (LVC) em cidades do Nordeste. No Estado da Paraíba, Porto¹¹ encontrou prevalência de 7,2% no município de Patos, e Nóbrega¹² 19,6% em animais do Centro de controle de Zoonoses (CCZ) em João Pessoa. Vidal¹³ em sua pesquisa em cães domiciliados da Cidade de Campina Grande encontrou prevalência de 3%. Em outros locais, Almeida¹⁴ encontrou prevalência de 3,4% em cães de áreas urbanas por meio de inquérito soroepidemiológico em Cuiabá, Mato Grosso e em Garanhuns, Agreste de Pernambuco, Santos¹⁵ encontrou 16% de soropositividade.

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), foram registrados 128 casos de Leishmaniose Visceral Humana (LVH) entre os anos de 2007 a 2011 no estado da Paraíba¹⁶. Observando-se que houve um aumento no número de notificação dos casos (figura 1).

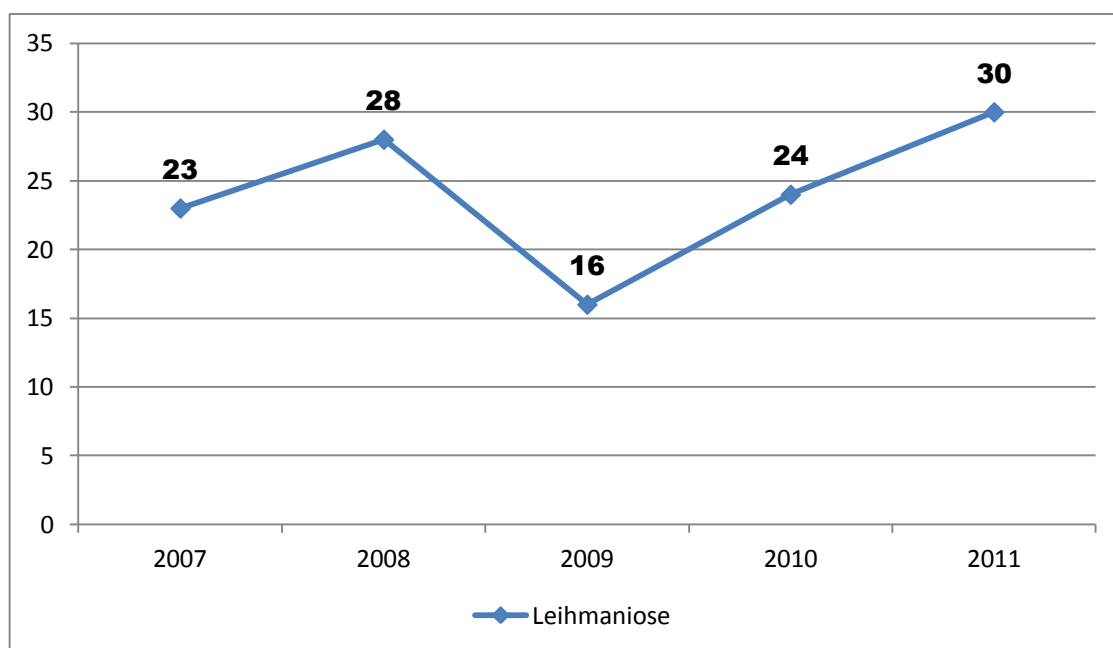


Figura 1. Distribuição dos casos de Leishmaniose Visceral Humana na Paraíba, de acordo com o ano de referência, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação.

1.3 Agente etiológico

As leishmanioses são causadas por protozoários pertencentes ao reino Protista, filo Protozoa, subfilo Sarcomastigophora, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*¹⁷. A classificação das espécies é baseada em características morfológicas, isoenzimáticas, localização nos tecidos do hospedeiro, patogenicidade e tipo de lesão que produz, além de critérios clínicos e epidemiológicos. Atualmente são conhecidas 30 espécies de *Leishmania*, sendo aproximadamente 20 patogênicas para o homem¹⁸. A partir desses critérios, três espécies causam a leishmaniose visceral: a *Leishmania donovani*, a *Leishmania infantum*, e a *Leishmania chagasi*¹⁹.

1.4 Ciclo Biológico e Forma de Transmissão

As leishmanias são parasitas heteroxenos, completam seu ciclo de vida em dois hospedeiros, um vertebrado (canídeos, roedores, humanos) e o outro invertebrado, sendo dípteros hematófagos pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, com várias espécies no Velho Mundo, e o gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo ²⁰.

O vetor da leishmaniose visceral no Novo Mundo é a *Lutzomyia longipalpis*, mosquito de 2 a 3 mm, de hábitos peridomésticos e intradomiciliares²¹, com vasta distribuição nos climas quentes e temperados ²². Nas Américas é conhecida a existência de pelo menos 400 espécies de flebotomíneos, das quais cerca de 40 foram relatadas como possíveis vetores de *Leishmania*²³.

No Brasil, a distribuição geográfica de *Lu. longipalpis* é ampla e cresce em expansão territorial. É encontrada em quatro das cinco regiões geográficas: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste. São conhecidos popularmente como birigui, tatuira e mosquito-palha, caracterizados pelo pequeno porte, com corpo e patas cobertas de cerdas; mantêm as asas em posição vertical quando em repouso, de atividade noturna predominante, e as fêmeas apresentam maior importância epidemiológica por serem hematófagas. Com o desmatamento e a urbanização, esses vetores têm sido encontrados em ambiente peridomiciliar e domiciliar^{24, 25}.



Figura 2. *Lutzomyia longipalpis*. (Brasil, 2006)

A *Lu. longipalpis*, vetor consagrado da LV no Brasil, possui hábito de vôo crepuscular abrigando-se em locais úmidos e sombrios, desenvolvendo-se em solo úmido com matéria orgânica em decomposição. Apenas as fêmeas são hematófagas, com hábitos alimentares ecléticos, podendo se alimentar em diferentes espécies de mamíferos e aves encontrados no peridomicílio, tais como suínos, cães, galinhas, eqüinos, bovinos, roedores ²⁶, podendo ainda picar o homem tanto dentro do domicílio como fora dele ^{26, 27}.

Tendo como principal vetor *Lutzomyia longipalpis*, recentemente, *Lutzomyia cruzi* foi também incluído como vetor no Estado de Mato Grosso do Sul, onde foi encontrado em área urbana, tanto no intra como no peridomicílio²⁸. A infecção do vetor ocorre quando a fêmea suga o sangue do mamífero contaminado ingerindo as formas amastigotas de *Leishmania* spp. existentes no interior dos macrófagos. Na porção média do tubo digestivo do inseto, as amastigotas se reproduzem por divisão binária, transformam-se em promastigotas, e estas se multiplicam rapidamente até originarem as promastigotas metacíclicas infectantes; esta fase dura de 3 a 4 dias ²⁹.

No repasto sanguíneo, as fêmeas dípteras, inoculam junto à saliva as formas promastigotas metacíclicas infectantes no novo hospedeiro, que são fagocitadas pelos macrófagos, e no interior de um vacúolo transformam-se em amastigotas e multiplicam-se até rompê-los. As amastigotas são fagocitadas por novos macrófagos e ocorre a disseminação hematogênica para os tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) como linfonodos, fígado, baço e medula óssea^{17, 29}.

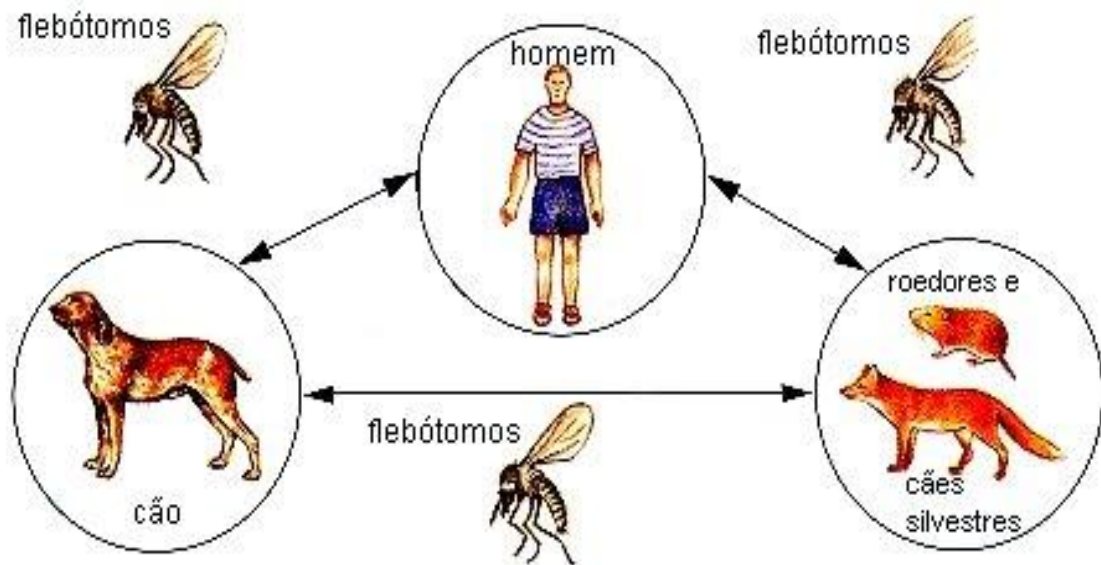


Figura 3. Ciclo da leishmaniose visceral. (Brasil, 2006)

Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos e, embora a infecção seja mais comumente encontrada em roedores e canídeos, também é conhecida entre edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos e primatas, dentre estes, os humanos¹⁸.

O cão vem sendo apontado como reservatório da doença urbana e como hospedeiro doméstico, sendo provavelmente o mais importante reservatório natural relacionado com casos humanos por habitarem o mesmo domicílio^{30, 31}. Além disso, esse reservatório tem um papel fundamental na expansão da doença em áreas endêmicas³², devido a elevada ocorrência de infecções inaparentes e oligossintomáticas nestes animais, associada ao intenso parasitismo cutâneo, fazendo dele uma fonte de infecção preferencial para o vetor²⁴.

No Brasil, Deane³³ estudando o calazar em Sobral, no Ceará, já apontava, precocemente, o papel importante do cão, não só como reservatório doméstico da doença, mas como elo essencial na manutenção da cadeia epidemiológica da leishmaniose visceral. Ao longo dos anos, fortes evidências somaram-se aos achados de Deane, o que corrobora para que cães assintomáticos, possam ser possíveis fontes de infecção para flebotomíneos²⁷, e que cães soropositivos, mesmo assintomáticos, apresentam intenso parasitismo cutâneo por formas amastigotas³⁴.

1.5 Características clínicas

A leishmaniose visceral é a forma mais grave das leishmanioses, sendo de evolução crônica, sistêmica e fatal, se não tratada. Clinicamente as manifestações apresentadas por humanos e pelo cão doente são muito similares, apresentando sinais inespecíficos como febre irregular, anemia, perda de peso progressiva e caquexia²⁴.

Nos caninos esta é uma doença sistêmica crônica que pode levar o animal à morte. A sintomatologia apresentada depende do tipo de resposta imune expressa pelo animal infectado. O diagnóstico clínico baseado na sintomatologia característica é difícil de ser realizado, pois a doença no cão apresenta evolução lenta, sendo grande o número de cães sem sinais clínicos³⁵. Este quando infectado pode apresentar-se como assintomático; oligossintomáticos, quando há presença de linfadenopatia, leve perda de peso e alterações dermatológicas; e sintomático, onde alguns ou vários sinais comuns da doença são evidentes, como alterações dermatológicas incluindo alopecia, descamação, hiperqueratose, espessamento da pele e nódulos intradérmicos no focinho, orelhas e coxins, bem como linfadenopatia, esplenomegalia, emagrecimento acentuado, uveíte e ceratoconjuntivite³⁶.

A Leishmaniose Visceral Humana (LVH) é uma doença crônica e debilitante, caracterizada pela infecção do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM). A infecção é expressa por episódios febris associados à hepatoesplenomegalia grave, emagrecimento, anemia, micropoliadenia,

podendo ocorrer manifestações intestinais e fenômenos hemorrágicos. A doença leva a um quadro de emagrecimento progressivo, edema, queda dos cabelos e outras manifestações associadas².

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da LVC é difícil, principalmente devido à grande ocorrência de animais assintomáticos, sendo os exames laboratoriais indispensáveis para o diagnóstico seguro. Estes compreendem métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares.

De um modo geral, o diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública, devido à inexistência de testes com alta sensibilidade e especificidade simultânea, baixo custo e de fácil implantação e operacionalização na rotina dos serviços. Várias técnicas podem ser utilizadas, devido aos avanços que têm ocorrido nos últimos anos, no entanto nenhum dos testes disponíveis apresenta 100% de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da LVC ³⁷.

1.6.1 Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico parasitológico é o método de certeza e se baseia na demonstração do parasita obtido de material biológico de punções hepática, esplênica, de medula óssea, de linfonodos e biópsia ou escarificação de pele. O exame parasitológico é classicamente utilizado para confirmar a LVC pela demonstração direta do parasita. Os mais utilizados são o exame microscópico de esfregaços por aposição de tecidos, o isolamento do parasita em meios de cultura e a inoculação em hamster ³⁸. Tendo em vista a possibilidade de reação cruzada com doença de chagas, é necessário fazer uma avaliação epidemiológica e clínica do animal, juntamente com os achados laboratoriais para que se possa concluir que se trata de leishmaniose³⁹.

1.6.2 Diagnóstico Sorológico

Devido à maior rapidez e menor custo, os testes sorológicos são os mais empregados pelos programas de controle sendo seu uso recomendado em inquéritos caninos amostrais ou censitários para avaliar a soroprevalência

canina. Os testes utilizados são o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) ⁸.

A RIFI é considerada “padrão ouro” entre os pesquisadores europeus, principalmente porque, a princípio, nos países do Mediterrâneo, não há preocupação com reações cruzadas, contrariamente aos países do Novo Mundo⁴⁰. Sua especificidade pode ser prejudicada devido à presença de reações cruzadas com *Trypanossoma cruzi*^{38, 39, 41, 42} e *Erlichia canis*⁴³, mas ainda assim é amplamente utilizado em levantamentos epidemiológicos visando a detecção da infecção em cães^{41, 44}.

O ELISA é um método automatizado e a sua precisão está relacionada ao tipo de antígeno de *Leishmania* spp. utilizado, obtendo-se melhores resultados com antígenos totais do parasita ⁴⁵.

Normalmente animais doentes manifestam uma intensa resposta imune humoral, apresentando altos níveis de IgG anti-*Leishmania* spp. O ELISA é utilizado para triagem de cães cujos níveis de anticorpos circulantes são desconhecidos e a RIFI para confirmação de resultados positivos triados pelo ELISA, podendo também ser utilizado sozinho na rotina diagnóstica³⁸. Para Alves e Bevilacqua⁴² a RIFI é o teste adequado para os inquéritos sorológicos caninos por ser de fácil execução, rápido e barato, além de apresentar alta sensibilidade de 90 a 100% e especificidade de 80%.

1.6.3 Diagnóstico Molecular

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) é uma técnica que torna possível identificar e amplificar o DNA do cinetoplasto do parasita, constituindo assim, uma nova metodologia para o diagnóstico da LVC, já que apresenta sensibilidade e especificidade próximas a 100%⁴⁶. A amplificação de fragmentos de kDNA de *Leishmania* pela PCR pode ser realizada a partir de diferentes tecidos, bem como de aspirado de linfonodos, medula óssea e de leucócitos de sangue periférico ⁴⁷.

O uso de sangue periférico tem a vantagem de ser um procedimento de coleta fácil, menos invasivo, porém resulta em menor sensibilidade devido à dependência da parasitemia dos animais infectados ⁴⁸.

Os resultados não efetivos obtidos no controle da LV, associados ao caráter descontínuo das políticas de saúde, têm suscitado debates nos órgãos responsáveis pelo controle da doença. Por isso novos estudos para o aprimoramento dos métodos devem evoluir, a fim de proporcionar nova visão sobre essa importante doença no cenário brasileiro, que infelizmente ainda é considerada “negligenciada”, como tantas outras parasitoses, desde que estes órgãos atuem de forma criteriosa na qualificação dos profissionais, juntamente com os demais segmentos da sociedade, buscando o desenvolvimento de métodos diagnósticos eficazes e estratégias que permitam a rápida identificação quer seja dos vetores, quer seja dos reservatórios visando antecipar possíveis surtos dessa doença.

2 OBJETIVOS

A busca do cão sorologicamente positivo, nem sempre sintomático, constitui uma ferramenta útil na redução da incidência da Leishmaniose Visceral em humanos. Na tentativa de chegar a um aprimoramento dos métodos diagnósticos, considerando-se a expansão da LVC e a sua importância como problema de saúde pública, são objetivos do presente estudo:

1. Realizar inquérito soro-epidemiológico em cães domiciliados na cidade de Campina Grande-PB/Brasil;
2. Identificar os fatores de risco relacionados com a infecção canina na região estudada;
3. Avaliar a sensibilidade diagnóstica entre as provas de RIFI, ELISA e PCR e comparar estes métodos para o diagnóstico da LVC.
4. Avaliar a carga parasitária pela PCR quantitativa (qPCR) nos animais positivos sorologicamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do estudo

No período de dezembro de 2011 a fevereiro de 2012 foi realizado inquérito soro-epidemiológico e biomolecular em cães na cidade de Campina Grande que localiza-se no agreste paraibano, na parte oriental do Planalto da Borborema, com área de 599,6 km². Está a uma altitude média de 555 metros acima do nível do mar, a 125 km da capital, João Pessoa, sendo o segundo maior município do estado, com uma população de 385mil habitantes, segundo dados do IBGE 2010.

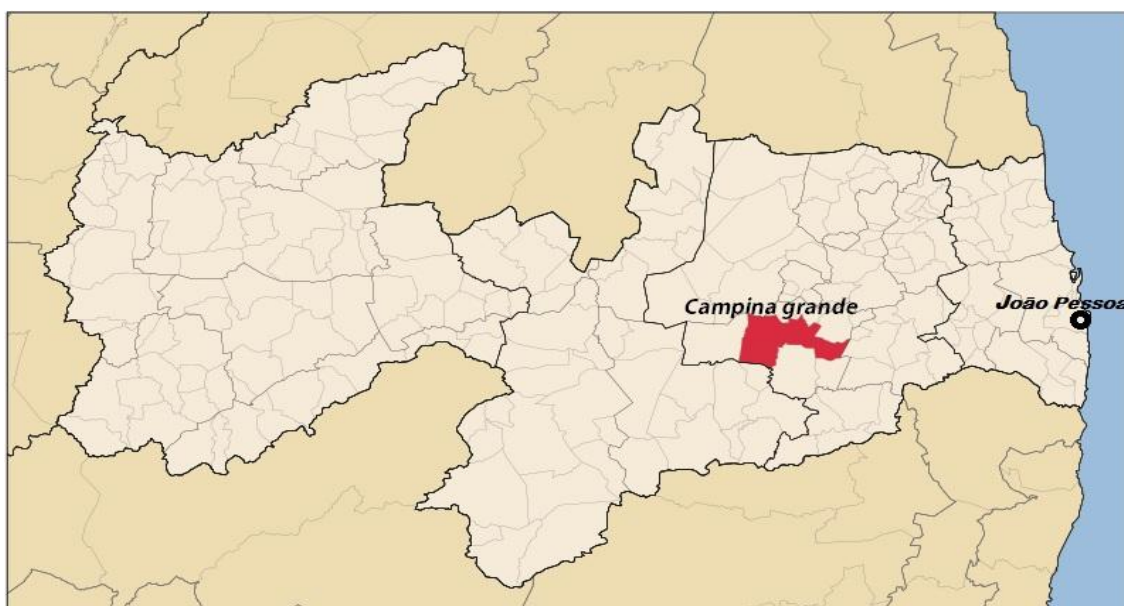


Figura 4. Localização geográfica do município de Campina Grande no Estado da Paraíba. (Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Campina_Grande)

A vegetação predominante é a caatinga. Por situar-se em uma região alta, o seu clima é agradável, o relevo é levemente ondulado principalmente na parte Norte da cidade, sendo o Centro uma das áreas mais altas. Existem dois açudes urbanos, parques e diversas praças.

Para se determinar o cálculo do número de amostras (n), considerando-se uma população humana de 385 mil habitantes no município Campina Grande, segundo o último censo do IBGE em 2010, e uma proporção da

população humana em relação à canina de 7:1, com limite de confiança de 5% e frequência esperada de 50% para uma população estimada de 40000 cães, o programa calculou uma amostra de 380 animais, sendo a coleta de 391 amostras acima do mínimo.

3.2 Animais estudados

Foram estudados 391 cães, selecionados ao acaso, sem predileção por sexo, raça ou idade, de propriedade privada, sendo 195 machos e 196 fêmeas, todos provenientes de zona urbana dos quais 277 não tinham raça definida e 114 pertenciam às raças Poodles, Cockers, Rotweilers, Pit bulls, Pastores alemães, Dobermans, Dálmatas, Pinshers, Husks siberiano e Weimaraners do município de Campina Grande/PB.

Previamente a coleta foi preenchido um questionário em entrevista realizada com o proprietário do animal para verificar os fatores de risco associados com a doença (Anexo1), assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. (Anexo 2)

3.3 Obtenção de amostras

As amostras de sangue foram obtidas por punção veno-jugular, em cães de pequeno porte, ou por punção veno-cefálica, em cães médio e de grande porte ou agressivos. Foram utilizadas seringas e agulhas descartáveis, para colheita de cinco a dez mililitros de sangue por animal, acoplada a um tubo a vácuo com o anticoagulante EDTA para a realização da PCR, e sem anticoagulante com gel ativador de coágulo para sorologia.

As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos de vidro, identificados individualmente e vedados com tampa de borracha. Os tubos foram acondicionados em estantes e mantidos em caixa de isopor, contendo gelo reciclável, até a chegada ao laboratório, depois foram congelados a -20°C até o momento da realização da extração de DNA.

Para a obtenção das amostras de soro, os tubos foram centrifugados a 1600 *g* durante 10 minutos. As amostras de soro foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL, identificados individualmente, e congeladas a -20°C para posterior realização das técnicas sorológicas.

3.4 Provas sorológicas

A pesquisa de anticorpos para *Leishmania* spp. foi realizada pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), de acordo com Camargo⁴⁹ e pelo ELISA S7[®] recombinante.

3.4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A técnica de RIFI foi realizada nos Laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses (NUPEZO) – Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública FMVZ UNESP-Botucatu. Utilizou-se microplacas para a diluição dos soros, pipetando-se 190 µl de solução salina tamponada de fosfatos (PBS) 0,01M pH 7,2 e 10 µl do soro testado no primeiro orifício, homogeneizando-se, perfazendo a diluição 1:20.

Foram distribuídos 100 µl de PBS em outras cinco cavidades e a partir da primeira diluição, transferiu-se 100 µl para o orifício seguinte, homogeneizando-se, repetindo até a quinta cavidade, desprezando-se os últimos. Essas diluições forneceram títulos 20, 40, 80, 160, 320, 640 e assim sucessivamente. Da mesma forma foram diluídas amostras de soros controles positivos e negativos. O antígeno utilizado foi preparado no NUPEZO, a partir de formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. major*, mantidas em tubos rosqueados contendo 10 ml de meio LIT e cinco ml de meio NNN, realizando-se os repiques para manutenção da amostra semanalmente. As lâminas foram preparadas pipetando-se 10 µl da suspensão antigênica de promastigotas em cada um dos orifícios, retirando-se em seguida por aspiração, restando somente uma fina película sobre cada orifício. As lâminas foram secas em

temperatura ambiente, e mantidas em laminário à -20°C , até o momento do uso, por período máximo de duas semanas.

Em lâminas fixadas com o antígeno de *L. chagasi* e *L. major*, distribuiu-se 10 μl de cada diluição nos orifícios, incubando-se a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. A seguir, foram lavadas em coplin com PBS 0,01M 7,2 por 10 minutos, duas vezes consecutivas, secando-se em estufa. O conjugado espécie-específico foi diluído, segundo seu título pré-estabelecido, em solução de Azul de Evans a 20 mg% previamente diluída em PBS 0,01M pH 7,2 1:5. Foram distribuídos 10 μl de conjugado para cada diluição, incubando-se novamente a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Procedeu-se nova lavagem em coplin com PBS 0,01M pH 7,2 como anteriormente. Após secas, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 8,5, cobrindo-se com lamínula 24mmX60mm, examinando-se em microscópio de imunofluorescência no aumento 40X. Após a leitura dos controles, foi procedido o exame das amostras em teste, considerando como título final, a maior diluição do soro onde ainda havia fluorescência completa na borda de pelo menos 50% das promastigotas. O título usado para o ponte de corte $\geq 1:40$.

3.4.2 ELISA S7[®]

A técnica do ELISA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, Patos/PB. Utilizou-se o *kit* ELISA S7[®], do Biogene Indústria e Comércio Ltda, que utiliza um polipetídeo recombinante de *L. chagasi*, representando a fração carboxi-terminal da HSP70, denominado S7. O Kit é autorizado pelo Ministério da Agricultura no diagnóstico do calazar canino (sensibilidade entre 92 a 98% e especificidade de 96 a 100%). A técnica foi realizada de acordo com instruções do fabricante Biogene Ind. e Comercio LTDA. (Anexo 3)

3.5 Provas de biologia molecular

3.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir das amostras de sangue coletadas com EDTA, de modo a expor o DNA do parasita. A extração e purificação de DNA de todas as amostras foram realizadas utilizando-se kit de extração Illustra™ blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare Life Sciences, EUA), conforme instrução do fabricante, e a concentração de DNA determinada no aparelho NanoVue™ (GE Healthcare Life Sciences, EUA). O material genético extraído foi armazenado a -20°C, até o momento da realização das provas biomoleculares.

3.5.2 Reação em cadeia pela polimerase convencional (cPCR)

Cada microtubo de 0,2µL recebeu um mix de cPCR composta por tampão de PCR 1X (10mM Tris HCl pH 8,0, 50mM KCl), 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 10µmol de cada primer, 0,5U Platinum Taq DNA polymerase, 10ng amostra (2µL), em um volume total de 25µL. Todas as amostras foram pesquisadas para a presença de DNA de *L. chagasi*.

Para a amplificação de DNA de *L. (L.) chagasi* foram utilizados os primers LC14 250-273 (5' CGCACGTTATATCTACAGGTTGAG3') e LC15 416-439 (5' TGT TTGGGATTGAGGTAATAGTGA3')⁵⁰ direcionados para o gene *Leishmania chagasi* kinetoplast minicircle DNA" (AF169138.1 [GenBank]) amplificando um região de 170 pb. Para estes primers, utilizou-se um pré-aquecimento a 94°C por 4min, 40 ciclos a 94°C por 30s, 59°C por 30s, e 72°C por 30s, e uma extensão final a 70°C por 10min, como descrito por Lachaud et al.⁵¹

Todas as amplificações foram realizadas no termociclador MasterCycler EP gradient (Eppendorf, EUA). Controles positivos de *Leishmania* spp. e *L. (L.) chagasi*, água ultra pura e amostra de *Trypanosoma cruzi* (controles negativo) foram amplificados juntamente com as amostras. A identificação dos produtos amplificados foi realizada em eletroforese em gel de agarose 1,5%. Para isso, alíquotas de 8 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2 µL de solução de azul de bromofenol, e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose, contendo em tampão Tris-borato-

EDTA (TBE) 0,5X (Life Technologies, EUA), contendo 0,1mg/mL brometo de etídio, e visualizado em analisador de imagens GelDoc-IT™ Imaging System (UVP, EUA) utilizando-se o software VisonWorks®LS.

3.5.3 PCR quantitativa (qPCR): determinação de carga parasitária

A qPCR foi realizada utilizando-se o aparelho StepOne™ Plus Real Time PCR System (Life Technologies, EUA). O mix de reagentes foi composto por 12,5µL Power SYBR®Green PCR Master Mix (Life Technologies, EUA), 1 µL de cada primer de *L. chagasi* (5 µM), 2 µL DNA alvo (10ng) e 8,5 µL água ultrapura (Gibco). A curva padrão foi gerada utilizando-se diluições seriadas de DNA de cepa de *L. chagasi* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV), de 10^6 a 10^0 parasitas.mL⁻¹. As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 min, 50 ciclos a 95°C for 15 s, 60°C por 1min, seguido por uma curva de dissociação. Todas as amostras foram analisadas em triplicada utilizando-se placas MicroAmp 96-well, específicas para qPCR, e controles negativos. Os dados foram coletados e analisados com Step One™ Software v2.1 (Life Technologies, EUA).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de soroprevalência e biomoleculares foram comparados ao sexo, idade, manejo de criação e raça. Foram tabulados em planilha Excel. A associação entre os resultados da pesquisa de anticorpos para *Leishmania major* e os dados epidemiológicos referentes aos animais estudados e condição social de seus proprietários foi analisada pelos testes de Qui-quadrado (χ^2) ou Exato de Fischer, adotando-se um nível de significância (α) de 5%⁵².

A correlação entre os títulos de anticorpos na RIFI utilizando-se os antígenos *L. major* e *L. chagasi*, analisada pelo coeficiente de correlação de Spearman (r_s). Estatísticas associadas à performance dos resultados obtidos pela RIFI-*L.chagasi*, ELISA e PCR foram calculadas tendo a RIFI-Lm como padrão-ouro, utilizando-se a planilha descrita por Mackinnon (2000). Todas as análises foram realizadas utilizando-se os programas Epi Info 3.5.1 e BioEstat 5.0

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 33 (8,4%) animais positivos na RIFI, 17 (4,3%) no ELISA e 8 (2,0%) na PCR. Comparando-se com os resultados de (3%) obtido por Vidal (2008) ¹³ na mesma cidade também em área urbana, verifica-se um aumento na prevalência. Embora ainda mantenha algumas características rurais, esta zoonose está se urbanizando cada vez mais^{37, 54}, aspecto que deve ser considerado na epidemiologia da doença, e que coloca em pauta a discussão das estratégias de controle empregadas. Segundo Bonates⁵⁵, esta mudança se deve principalmente à participação do cão como reservatório domiciliar.

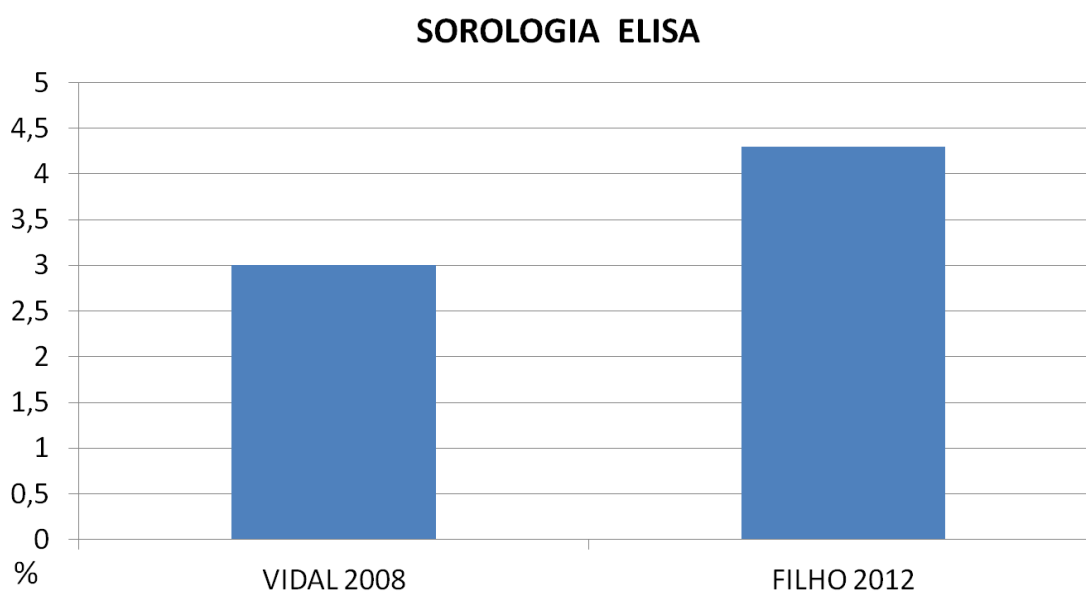


Figura 5. Comparação dos resultados do teste de ELISA realizado no ano de 2008 e 2012 na cidade de Campina Grande-PB

Os animais sororeagentes apresentados no presente estudo residiam em 11 bairros pertencentes à área urbana da cidade de Campina Grande. O maior número de casos foi evidenciado nos bairros Palmeira, Dinamérica e Bodocongó, que são Bairros periféricos, os quais apresentam áreas com problemas sócio-econômicos.



Figura 6: Imagem representativa dos bairros de Campina Grande, com a localização dos animais sororeagentes. (Adaptado de: http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Bairros_de_Campina_Grande.svg)

Foram encontrados cães sororeagentes nos bairros Conjunto Cinza e Novo Horizonte que consideramos neste estudo pertencentes aos bairros de Malvinas e José Américo, respectivamente, pelo fato desses bairros ainda não terem sido mapeados oficialmente e pela sua proximidade aos bairros citados.

Nos bairros das Malvinas, Jeremias, Dinâmica e Bairro das Cidades, também pertencentes à periferia do município, observou-se a presença de lixo

a céu aberto, esgoto e o hábito de criar animais como galinhas, bois, porcos e cavalos.

Os resultados obtidos com relação à prevalência de anticorpos para *Leishmania* spp. e os fatores de risco associados encontram-se na Tabela 1. Apenas um animal apresentava sinais clínicos compatíveis com a doença caracterizados por alopecia, esplenomegalia, desnutrição e distúrbios oftálmicos (conjuntivite e opacidade da córnea).

Tabela 1a. Associação das variáveis epidemiológicas estudadas com os resultados da pesquisa de anticorpos para *Leishmania major* pela RIFI. Botucatu-2012

Variável		N	RIFI ^a	Variável (%); IC95% ^b	OR (IC95%) ^c	P ^d
Sexo	Macho	195	14	7,2; 4,4–11,7	1,4 (0,6–2,9)	0,24 ^e
	Fêmea	196	19	9,7; 6,3–14,7		
Raça	Pura	114	9	7,9; 4,2–14,3	1,1 (0,5–2,5)	0,49 ^e
	SRD	277	24	8,7; 5,9–12,6		
Idade (ano)	Jovem (≤ 1 ano)	54	4	7,4; 3,0–17,6	1,2 (0,4–3,5)	0,51 ^e
	Adulto (> 1 ano)	337	29	8,6; 6,1–12,1		
Idade (meses)	6-12 meses	54	4	7,4; 3,0–17,6	-	0,78 ^f
	12-24 meses	81	5	6,2; 2,7–13,7		
	24-48 meses	92	7	7,6; 3,8–14,9		
	48-60 meses	86	8	9,3; 4,8–17,3		
	> 60 meses	78	9	11,5; 6,2–20,5		
Contato com outros animais	Não	77	2	2,6; 0,8–9,0	4,1 (1,0–17,6)	0,02 ^e
	Sim	314	31	9,9; 7,1–13,7		
Quantidade de contactantes	Nenhum	59	1	1,7; 0,4–8,9	-	0,00 ^f
	Somente um	207	13	6,3; 3,7–10,5		
	Dois ou mais	125	19	15,2; 10,0–22,5		
Criação	Domiciliar	307	23	7,5; 5,1–11,0	-	0,27 ^f
	Semi-domiciliar	79	10	12,7; 7,1–21,8		
	Solto	5	0	0,0; 0,0–0,0		

Legenda: ^a Título ≥ 40 ; ^b Frequência de animais positivos baseada nas variáveis estudadas (intervalo de confiança = 95%); ^c OR: Odds ratio; ^d P: valor de P para $\alpha = 5$; ^e Teste Exato de Fisher; ^f Teste de Qui-Quadrado

Tabela 1b. Associação das variáveis epidemiológicas estudadas com os resultados da pesquisa de anticorpos para *Leishmania major* pela RIFI. Botucatu-2012

Variável		N	RIFI ^a	Variável (%); IC95% ^b	OR (IC95%) ^c	P ^d
Ambiente	Terra	80	7	8,8; 4,4–17,0	-	0,91 ^f
	Cimento	178	16	9,0; 5,6–14,1		
	Ambos	131	10	7,6; 4,2–13,5		
Desinfecção	Diária	326	25	7,7; 5,3–11,1	-	0,08 ^f
	Semanal	46	8	17,4; 9,1–30,8		
	Quinzenal	15	0	0,0; 0,0–0,0		
	Mensal	3	0	0,0; 0,0–0,0		
Carrapatos	Não	36	1	2,8; 0,7–14,2	3,5 (0,5–26,2)	0,17 ^e
	Sim	355	32	9,0; 6,5–12,5		

Legenda: ^a Título ≥ 40 ; ^b Frequência de animais positivos baseada nas variáveis estudadas (intervalo de confiança = 95%); ^c OR: Odds ratio; ^d P: valor de P para $\alpha = 5$; ^e Teste Exato de Fisher; ^f Teste de Qui-Quadrado

Em relação ao sexo, não foi observada diferença significativa ($P=0,24$). Porém, entre as fêmeas, a soropositividade foi maior, sendo que das 196 cadelas, 19 foram positivas na RIFI (9,7%) enquanto dos 195 machos, apenas 14 (7,2%) foram positivos, corroborando com os achados de Barbosa et al. (2010)⁵⁶ que não encontraram diferença significativa, entretanto com prevalência maior nas fêmeas. Por outro lado, Amóra et al.⁵⁷ encontraram maior prevalência em machos, porém sem diferenças significativas. É de se esperar que não ocorram diferenças significativas com relação ao sexo, pois as chances de infecção são iguais, independente do sexo.

Não houve diferença estatística significativa ($P \geq 0,05$) quanto à idade e manejo de criação corroborando com Barbosa et al.⁵⁷ e Amóra et al.⁵⁷. No presente estudo, cães com idade inferior e superior a 12 meses apresentaram 7,4% e 8,6% de prevalência, respectivamente, sem diferença significativa concordando com Arias et al.⁵⁸ e Almeida et al.¹⁴, porém discordando de Silva

et al.³¹ e Dantas-Torres et al.⁵⁹, que obtiveram maior prevalência em cães jovens, com diferença significativa ($P < 0,05$).

Dos 391 animais, 277 eram sem raça definida (SRD) e 114 eram de raça pura, encontrando uma positividade na Rifi-Lm de 8,7% e 7,9% respectivamente. Não foi encontrada diferença estatística significativa, no entanto, isso não é fator epidemiológico relevante, pois o vetor não tem predisposição racial.

Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) quanto às variáveis ambiente (terra, cimento ou ambos), alimentação (ração comercial, comida caseira ou ambos), situação socioeconômica (escolaridade e renda). No entanto, no presente estudo encontrou-se diferença significativa nos cães que tinham contato com outros animais ($P = 0,02$) e ($OR = 4,1$), significando que cães que apresentam contato com outros animais possuem 4,1 chances a mais de apresentarem títulos para RIFI-Lm. Quando se estratifica os resultados diversificando o número de contactantes caninos sem contato com nenhum outro tipo de animal a prevalência foi de 1,7%. No caso de contato com apenas um animal de 6,3% e 15,2% quando havia contato com dois ou mais animais, com $P < 0,05$. Estes resultados corroboram com Amóra et al.⁵⁷, que também observaram que a presença de outros cães facilita a manutenção da infecção entre esta espécie, o que aumenta ainda mais o risco de contaminação dos humanos³⁷.

A associação da variável condição social dos proprietários (escolaridade e renda) com os resultados da pesquisa de anticorpos para *Leishmania major* pela (RIFI) está apresentada na tabela 2.

Tabela 2. Associação da variável condição social dos proprietários (escolaridade e renda) com os resultados da pesquisa de anticorpos para *Leishmania major* pela (RIFI). Botucatu-2012

Variável		N	RIFI ^a	Variável (%); IC95% ^b	OR (IC95%) ^c	P ^d
Escolaridade	Analfabeto	20	1	5,0; 1,2–23,8	-	0,76 ^f
	1º grau incompleto	62	8	12,9; 6,7–23,5		
	1º grau completo	46	2	4,3; 1,3–14,5		
	2º grau incompleto	75	7	9,3; 4,7–18,1		
	2º grau completo	102	8	7,8; 4,1–14,7		
	3º grau incompleto	20	1	5,0; 1,2–23,8		
	3º grau completo	66	6	9,1; 4,3–18,5		
Renda	< 2 salários mín.	197	20	10,2; 6,7–15,2	-	0,56 ^f
	2-4 salários mín.	130	10	7,7; 4,3–13,6		
	5-6 salários mín.	38	2	5,3; 1,6–17,3		
	> 6 salários mín.	26	1	3,8; 0,9–19,0		

Não houve significância estatística ($P>0,05$) quanto à prevalência de cães que viviam em ambientes onde se realizava limpeza diária, em relação aqueles de domicílios onde a limpeza era realizada semanal, quinzenal ou mensalmente. Sabe-se que a limpeza evita o acúmulo de matéria orgânica o que dificulta a proliferação de flebotomínios transmissores, que necessitam de matéria orgânica para o seu ciclo.

A comparação dos resultados obtidos pela RIFI com antígeno de *Leishmania major* apresentou melhor resultado comparado a RIFI com antígeno de *Leishmania chagasi* com eficiência de 98%, seguido pelo ELISA com 93,9% e 90% com os resultados da PCR, porém a sensibilidade para este último foi de apenas 3%, assinalando 97% de falso negativo no mesmo animal. O nível de concordância Kappa (κ) entre os testes foi de 86,8%, 49,1% e 1,6% RIFI com o antígeno *L. chagasi*, ELISA e a PCR, respectivamente,

demonstrando moderada a ligeira associação entre os testes. A concordância entre os resultados positivos e negativos produzidos por cada método foi melhor na RIFI com o antígeno de *L. chagasi*.

A Correlação entre os resultados dos títulos de anticorpos obtidos pela RIFI-Lm e pela RIFI-Lc foi forte, apresentando o Coeficiente de Spearman (r_s) de 0,8683 e valor de ($P < 0,0001$).

Os resultados do ELISA e da PCR foram concordantes em 96,7% e 94,7% respectivamente, quando as amostras foram negativas na RIFI *L. major*. Esses achados diferem de Cabral⁶⁰ em relação a PCR, que encontrou 88,7% de concordância positiva da PCR com a sorologia e 52,8% de concordância negativa entre estas mesmas técnicas diagnósticas.

Pode acontecer de métodos sorológicos apresentarem reações cruzadas com anticorpos contra *Ehrlichia canis* e tripanossomídeos, diversos estudos corroboram com estas suspeitas^{38, 39, 42, 43}, porém no presente estudo não foi investigada esta possibilidade. A eliminação de cães sororeagentes ainda é um assunto muito polêmico, apesar de resultados sorológicos serem determinantes para eutanásia dos animais³⁸, por isso a importância da realização da confirmação etiológica antes da eliminação do cão.

Os valores de acurácia entre as provas de RIFI, ELISA e PCR encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Estimativa $\pm$ erro padrão (EST $\pm$ EP) e intervalo de confiança 95% (IC95%) da avaliação estatística para as técnicas sorológicas e pesquisa de DNA de *Leishmania* spp. pela PCR, considerando-se a RIFI com antígeno de *L. major* como padrão-ouro. Botucatu-2012.

Estatística	RIFI-Lc		ELISA		PCR	
	EST $\pm$ EP	IC95%	EST $\pm$ EP	IC95%	EST $\pm$ EP	IC95%
Sensibilidade	87,9 $\pm$ 5,7	71,8 – 96,6	39,4 $\pm$ 8,5	22,9 – 57,9	3,0 $\pm$ 3,0	0,0 – 15,8
Especificidade	98,9 $\pm$ 0,6	97,2 – 99,7	98,9 $\pm$ 0,6	97,2 – 99,7	98,0 $\pm$ 0,7	96,0 – 99,2
Eficiência*	98,0 $\pm$ 0,7	96,0 – 99,1	93,9 $\pm$ 1,2	91,0 – 96,0	90,0 $\pm$ 1,5	86,7 – 92,8
Valor preditivo positivo	87,9 $\pm$ 5,7	71,8 – 96,6	76,5 $\pm$ 10,3	50,1 – 93,2	12,5 $\pm$ 11,7	0,3 – 52,7
Valor preditivo negativo	98,9 $\pm$ 0,6	97,2 – 99,7	94,7 $\pm$ 1,2	91,9 – 96,7	91,6 $\pm$ 1,4	88,4 – 94,2
Falso positivo	1,1 $\pm$ 0,6	0,3 – 2,8	1,1 $\pm$ 0,6	0,3 – 2,8	2,0 $\pm$ 0,7	0,8 – 4,0
Falso negativo	12,1 $\pm$ 5,7	3,4 – 28,2	60,6 $\pm$ 8,5	42,1 – 77,1	97,0 $\pm$ 3,0	84,2 – 99,9
Kappa (κ)	86,8 $\pm$ 4,6	77,7 – 95,8	49,1 $\pm$ 8,8	31,8 – 66,4	1,6 $\pm$ 4,7	N.D. – 10,8
Concordância positiva	87,9 $\pm$ 4,3	79,5 – 96,2	52,0 $\pm$ 8,6	35,2 – 68,9	4,9 $\pm$ 4,7	N.D. – 14,1
Concordância negativa	98,9 $\pm$ 0,4	98,1 – 99,7	96,7 $\pm$ 0,7	95,4 – 98,0	94,7 $\pm$ 0,8	93,1 – 96,4

A ausência de DNA de *Leishmania* spp. nas amostras de sangue total sinaliza discordância entre a PCR e a RIFI, com baixa sensibilidade da PCR neste tipo de amostra, provavelmente pelo baixo número de parasitas usualmente presentes no sangue^{48, 61, 15}. Além disso, diferentemente de uma maior sensibilidade da PCR verificada em outros tipos de amostras, no sangue há evidências da interferência de inibidores (grupos heme) da Taq, além do que em amostras de sangue total a maior detecção do DNA do parasita depende da fase de parasitemia do animal¹⁵.

A sensibilidade e a especificidade da PCR dependem de vários fatores, incluindo os oligos, o protocolo de extração do DNA e o tipo de amostra. A vantagem de usar sangue periférico é que a coleta é menos invasiva do que punção da medula óssea, baço ou aspirado de linfonodo, e as amostras estão

prontas para serem utilizadas. Por outro lado, o nível de parasitismo no sangue periférico tende a ser menor do que na medula óssea, baço ou aspirado de linfonodo, além do sangue poder conter inibidores que podem alterar a sensibilidade da PCR⁶².

A RIFI com *L. major*, preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo Ministério da Saúde, considerada como padrão ouro, mostrou-se um bom teste confirmatório e de triagem, podendo ser utilizado em inquéritos epidemiológicos. O ELISA, considerado bom para confirmação cuja especificidade no presente estudo foi de 98,9% mostrou sensibilidade de 39,4%, considerada baixa, inferior à descrita na bula do produto.

A associação entre estes testes e a co-positividade indica a eutanásia do animal de acordo com o Ministério da Saúde, porém no presente estudo este índice foi de apenas 52%, indicando a necessidade de outra prova confirmatória. Já para a confirmação de negatividade na RIFI, o ELISA foi considerado seguro, apresentando concordância negativa de 96,7%, porém menor que a RIFI que foi de 98,9%. O uso da PCR de sangue total apresentou baixa sensibilidade e baixa concordância com a RIFI, não sendo indicado como teste primário mostrando-se eficiente somente para fins de identificação da espécie, genotipagem e epidemiologia molecular; uma vez que com o DNA detectado, mesmo que em poucos animais, pode-se estudar o genoma do parasita na região pesquisada.

Tabela 4. Carga parasitária por *Leishmania chagasi* nos animais positivos na Sorologia e/ou PCR convencional. Botucatu-2012.

Amostra	qPCR (parasitas.mL ⁻¹)	Ct	Threshold	Slope	R ²	Eff%
42	7	30,98				
59	268	27,73				
65	45	29,65				
68	551	27,02				
90	104	28,34	0,03763	-3,240	0,992	109,232
312	18	30,01				
322	1	31,03				
352	97	28,99				
364	2	31,00				
Mediana	45	29,650	-	-	-	-
P25-P75	7-102	28,34- 30,74	-	-	-	-

Os animais que apresentaram resultado positivo na sorologia, na cPCR ou em ambos foram submetidos a quantificação parasitária pela qPCR que apresentou uma mediana de 45 parasitas por mililitros de sangue. O baixo número de amostras positivas na qPCR pode estar associado à ausência do parasita neste tecido e a baixa sensibilidade do teste utilizado para a detecção do mesmo .^{48, 61}

Considerando-se o pequeno número de amostras positivas à qPCR, não nos possibilitou discussão com relação aos títulos sorológicos dos animais positivos, confrontando-se com a carga parasitária, fato que nos sugere a continuidade deste estudo com maior número de animais positivos, para melhor interpretação dos resultados.

A prevalência de anticorpos antileishmania spp. em cães de Campina Grande, Paraíba, aumentou comparando-se com os resultados de Vidal¹³, mostrando que a LVC tem-se adaptado à zona urbana, portanto de forma endêmica, chamando atenção de órgãos públicos para o adequado controle da doença. Este trabalho é pioneiro na investigação da LVC por meios de diversificadas técnicas laboratoriais neste município. Outros trabalhos devem ser conduzidos continuamente, visando à investigação sistemática da doença nesta cidade e em regiões circunvizinhas. A pesquisa científica, realizada em parceria com os órgãos atuantes em saúde pública, assim como a divulgação de seus resultados são fundamentais à compreensão das ocorrências epidemiológicas e tomadas de decisão quanto ao controle da LV, que anualmente acomete milhares de pacientes humanos e caninos no país.

Espera-se que os resultados deste estudo sirvam como um alerta às autoridades de saúde pública local em relação à manutenção das ações de vigilância epidemiológica.

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a associação de provas diagnósticas, melhorou a detecção de animais positivos, aspecto excelente para o controle da LVC em determinadas áreas, além de evitar a eutanásia de cães falso-positivos.

Os resultados do presente estudo mostram a ocorrência de LVC no local estudado, confirmando o processo de urbanização desta doença, alertando que cães assintomáticos, assim como os que apresentem linfadenopatias e dermatopatias, devem ser investigados quanto à presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. no município de Campina Grande, Paraíba, evitando-se assim a inclusão humana no ciclo da doença.

7. REFERÊNCIAS

- 1- Langoni H, Vasconcelos CGC, Nitsche MJT, Olbrich SRLR, Carvalho LR, Silva C. Fatores de risco para zoonoses em alunos do curso de medicina veterinária, residentes e pós-graduandos. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, 2009; 12(2): 115-21.
- 2- Marzochi M.CA, Coutinho SG, Souza WJ, Amendoeira MR. Leishmaniose Visceral (Calazar). Jornal Brasileiro de Medicina, 1981; 41(5):61-84.
- 3- Leishman WB. On the possibility of the occurs of trypanosomiasis in India. British Medical Journal, 1903;(1):1252-4.
- 4- Pessoa SB, Martins AV. Parasitologia médica. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988; 872.
- 5- Rey L. Bases da Parasitologia Médica, 2^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001; 349.
- 6- Badaró R, Duarte MIS. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESE, R.; FOCACCI, R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu, 1996;2: 1234-59.
- 7- Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Tese Doutorado – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo-SP, Brasil, 1956, 162p.
- 8- Oliveira LS. de, et al. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. Ciência Animal Brasileira. 2005;6(1): Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/345/320>>. Acesso em: 20 set. 2012.
- 9- Camargo JB, Troncareli MZ, Ribeiro MG, Langoni H. Leishmaniose visceral canina: Aspectos de saúde pública e controle. Clínica Veterinária. 2007;(71):86-92.

- 10- Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral. Brasília, DF; 2006. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- 11- Porto ML. Soroprevalência e fatores de risco para leishmaniose visceral canina em Patos, Paraíba, Brasil. Patos, PB. Monografia de Conclusão de Curso de Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Campina Grande, 2010.
- 12- Nóbrega GD. Levantamento de casos de leishmaniose visceral em raposas (*Cerdocyon thous*), cães (*Canis lupus familiares*) e humanos no município de João Pessoa, Paraíba, Brasil. Monografia de Conclusão de Curso de Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Campina Grande, 2010.
- 13- Vidal IF. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina em Campina Grande, Paraíba, Brasil. 2008. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, PE.
- 14- Almeida ABPF, Faria RP, Pimentel MFA, Dahroug MAA, Turbino NCMR, Sousa VRF. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2009;42(2):156-9.
- 15- Santos JML, Torres FD, Mattos MRF, Lino FRL, Andrade LSS, Souza RCA, Brito FLC; Brito MEF, Filho SPB, Mattos LS. Prevalência de anticorpos antileishmania spp em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2010;43(1):41-5.
- 16- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saude. Departamento de Vigilancia Epidemiológica. Leishmaniose visceral – Sistema de Informações de Agravos e Notificação – Sinan Net. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/leishvi/bases/leishvb_rnet.de> Acesso em 08 dez. 2012.

- 17- Urquhart GM, Armaour J, Dungam JL, Dunn AM, Jennings FW. Parasitologia Veterinária. 2ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998;190-2.
- 18- Ashford RW. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology. 2000;30:269-1281.
- 19- Marzochi, MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cadernos Saúde Pública. 1994;10(2):359-75.
- 20- Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramello C, Llano R, Velez ID. Binomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. J Med Entomol 1996; 33: 278-85.
- 21- Santa-Rosa ICA, Oliveira ICS. Leishmaniose Visceral: breve revisão sobre uma zoonosereemergente. Clín Vet. 1997; 11: 24-8.
- 22- Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) brazileinsis*. Veterinary Parasitology, v. 149, p. 139-146, 2007.
- 23- Lainson R, Rangel EF 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100: 811-827.
- 24- Feitosa MM, Ikeda FA., Luvizotto MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). Clínica Veterinária, n. 28, p. 36-44, 2000.
- 25- Prata A, Silva LA. Calazar. In: COURA, J. R. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005;1:713-32.
- 26- Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, Fiúza JA, Gonçalves CM, Paula KM, Dias ES. Aspects of the ecology and

behaviour of phlebotomines in endemic area for visceral leishmaniasis in State of Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(5):421-5.

27- Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias CL, Dias ES. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. Vet Parasitol. 2007;147(1-2):67-76.

28- Gallati EAB, Nunes VLB, Rêgo Jr. FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista de Saúde Pública. 1997;31: 378-90.

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

30- Savani ESMM, Schimonsky BV, Camargo MCGO, D'auria SRN. Vigilância da leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. Revista de Saúde Pública, São Paulo. 2003;37(2):260-2.

31- Silva AVM, Paula AA, Cabrera MAA, Carreira JCA. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2005;21(1):324-28.

32- Santos GPL, Samavria A, Marzochi MCA, et al. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba. 2005;38(2):161-6.

33- Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. O Hospital. 1955;47:75-87.

- 34- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis Res Vet Sci. 2006;81(1):68-75.
- 35- Alvar, J.; Canavate, C. & Guitierrez-Solar, B. (1997). Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Rev. Clin. Microbiol., 10:298-319.
- 36- Ettinger SJ, Feldman EC. Tratado de Medicina Interna Veterinária–Doenças do Cão e do Gato. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004;1(2):437-8.
- 37- Gontinjo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Revista Brasileira de Epidemiologia. 2004;7(3):338-49.
- 38- Brasil. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf>. Acesso em 20 set. 2012.
- 39- Troncarelli M Z, Machado JG, Camargo LB, HOFFMANN JL, Camossi L, Greca H, Faccioli PY, Langoni H. Associação entre resultados sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e de tripanossomíase canina, pela técnica de imunofluorescência indireta. Veterinária e Zootecnia.2008;15(1):139-46.
- 40- Gradoni L. 2002. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., Sevilha. Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum. Sevilha: [s.n.], 7-14.
- 41- Costa CH, Pereira HF, Araujo MV. 1991. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. Rev. Soc. Brás. Med. Trop. 1991;24(1):21-5.
- 42- Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da

epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2004;20(1):259-65.

43- Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Da Silva ES, Schallig H, Gontijo CMF. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. Vet. Parasitol. 2007; 146: 235-41.

44- Genaro O. Leishmaniose Visceral Canina Experimental. Tese 146p. (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.1993

45- Luvizotto MCR. Diagnóstico da Leishmaniose visceral canina (LVC). Manual Técnico-Leishmune. Seção III, Fort dodge. 2004.

46- Ikeda-Garcia FA, Feitosa MM. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Clínica Veterinária. São Paulo. 2006; ano XI (62):32-8.

47- Ikononopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Veterinary Parasitology*. 2003;113(2):99-113.

48- Fisa R, Rieira C, Gállego M, Manubens J, Portus M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology*. 2001;99(2):105-11.

49- Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev. Int. Med. Trop. São Paulo. 1966;(8): 227-34.

50- Langoni H, Richini-Pereira VB, Kikuti P, Marson PM, Da Silva RC. enviado. A new single, specific and sensitive quantitative and qualitative PCR for *Leishmania (L.) chagasi* in dogs. How specific are the others existing primers? International Journal for Parasitology. 2012.

- 51- Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J. Clin. Microbiol. 2002;40:210-15.
- 52- Triola MF. Introdução à estatística. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC. 2005; 682.
- 53- Ayres M, Ayres JR, M.; Ayres DL, Santos AS. BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. 2007;364.
- 54- Monteiro EM. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba. 2005;38(2):147-52.
- 55- Bonates A. Leishmaniose visceral (Calazar). Vet News, Rio de Janeiro. 2003;61:4-5.
- 56- Barbosa DS, Rocha AL, Santana AL, Sousa CSF, Dias RA, Costa-Junior LM, Abreu-Silva AL. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. Ci. Anim. Bras. 2010;11(3):653-59.
- 57- Amóra SSA, Santos MJP, Alves ND, Costa SCG, Calabrese KS, Monteiro AJ, ROCHA MFG. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Ciência Rural. 2006;36:1854-59.
- 58- Arias JR, Monteiro P, Zicker F. The re-emergence of visceral leishmaniasis in Brasil. Emerging Infectious Diseases. 1996;2:145-6.
- 59- Dantas-Torres F, Brito MEF, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. Veterinary Parasitology. 2006;140:54-60.
- 60- Cabral AWD. Estudo comparativo entre o diagnóstico por técnicas sorológicas e da PCR para a detecção de *Leishmania* spp. 2007. p.56.

Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista – UNESP, Instituto de Biociências, Botucatu – SP.

61- Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM.; Morte RD. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. Vet Parasitol 2004; 125:251-62.

62- Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia) spp.* in dog blood and bone marrow. J. Clin. Microbiol. 2000;38: 748-51.

ANEXO 1

ANEXO 2

ANEXO 3

ANEXO 4

ANEXO 5