

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**FATORES DE RISCOS ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA NA ÁREA DE CINTURÃO VERDE DE ILHA
SOLTEIRA, SP.**

Julio Cesar Pereira Spada

Médico Veterinário

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**FATORES DE RISCOS ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA NA ÁREA DE CINTURÃO VERDE DE ILHA
SOLTEIRA, SP.**

Julio Cesar Pereira Spada

Orientador: Prof^a. Dr^a. Wilma Aparecida Starke Buzetti

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – Unesp, Câmpus de Ilha Solteira, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

S732f Spada, Julio Cesar Pereira.
Fatores de riscos associados à leishmaniose visceral canina na área de
Cinturão Verde de Ilha Solteira, SP. / Julio Cesar Pereira Spada. -- Ilha Solteira:
[s.n.], 2014
106 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Produção Animal, 2014

Orientador: Wilma Aparecida Starke Buzetti
Inclui bibliografia

1. Elisa. 2. Leishmania infantum. 3. Lutzomyia longipalpis. 4. Pcr. 5. Rifi.

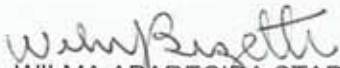
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: FATORES DE RISCOS ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA
ÁREA DE CINTURÃO VERDE DE ILHA SOLTEIRA, SP

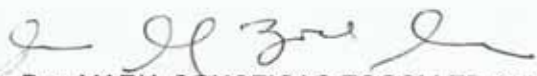
AUTOR: JULIO CESAR PEREIRA SPADA

ORIENTADORA: Profa. Dra. WILMA APARECIDA STARKE BUZETTI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal, Área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. WILMA APARECIDA STARKE BUZETTI

Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Profa. Dra. MARIA CONCEICAO ZOCOLLER SENO

Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Profa. Dra. CARIS MARONI NUNES

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

Data da realização: 11 de março de 2014.

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 002/2011/CEUA, referente ao projeto de pesquisa "DISTRIBUIÇÃO DA ENTOMOFAUNA FLEBOTOMÍNEA (*Diptera: Psychodidae*) E ESTUDO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREA DO CINTURÃO VERDE DE ILHA SOLTEIRA, SP", sob a responsabilidade da Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Engenharia da UNESP/Ilha Solteira, em reunião ordinária realizada em 09 de maio de 2011.

Ilha Solteira, 09 de maio de 2011



Profa. Dra. Rosemeire da Silva Filardi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIO CESAR PEREIRA SPADA – Nascido em 30 de janeiro de 1989, no município de Tupã, Estado de São Paulo. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina (FCAA), em janeiro de 2007, sendo bolsista integral pelo Programa Escola da Família do Governo do Estado de São Paulo. No ano de 2008 trabalhou no cargo de Líder de Higienização no Frigorífico JBS/FRIBOI no município de Andradina estado de São Paulo. Em 2009, na Fundação Educacional de Andradina (FEA) trabalhou como Monitor de Farmacologia. Estagiou na área de Obstetrícia e Reprodução Animal na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Araçatuba, em agosto de 2011. Obteve o título de Médico Veterinário em dezembro de 2011. Iniciou o Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal-UNESP-Campus de Ilha Solteira, em março de 2012.

“Nunca se deve engatinhar quando o impulso é voar.”

“Evitar o perigo não é, á longo prazo, mais seguro do que se expor a ele. A vida é uma aventura ousada ou não é nada.”

Helen Keller

DEDICATÓRIA

Á minha querida mãe **Sueli de Fátima Pereira Spada** (*in memoriam*), que em vida sempre foi a pessoa que mais me apoiou, que me ensinou a dar os primeiros passos, que enxugou todas as minhas lágrimas, que presenciou meus primeiros tombos e que me fez levantar, e me ensinou que cair é fácil e levantar é vitorioso. Obrigado pelos conselhos. Uma coisa é certa, para sempre a senhora estará em meu coração, me acompanhando e cuidando de mim em todos os momentos. TE AMO!

Ao meu pai **Carlos Cesar Spada**, por seu amor, apoio e compreensão, meu amigo e companheiro, exemplo de determinação que sempre tenta clarear meus caminhos, a quem devo muito do que sou e do que sei.

Á minha irmã **Fernanda Pereira Spada**, minha amiga, confidente e companheira, por sempre estar me apoiando em todos os momentos, fazendo da minha vida muito mais completa e divertida.

Ao meu amigo e irmão (de consideração) **Diogo Tiago da Silva** (Firmeza), por me apoiar e me ensinar a maior parte das análises do projeto. Além de um excelente profissional é um amigo que posso contar sempre. Nas horas boas e nas horas ruins.

Á minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Wilma Aparecida Starke Buzetti** por compartilhar comigo a sua amizade e seus conhecimentos. Obrigado por me aceitar como seu orientado, me dar conselhos e oferecer estímulos para com seus orientados. Sou grato por tudo e feliz por ter sido orientado por uma profissional tão competente e tão importante para o meio científico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS, por ter me guiado e permitido chegar até aqui.

Meus singelos agradecimentos a todas as pessoas e instituições descritas abaixo, que sem elas não seria possível o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Profº. Drº Ricardo Velludo Gomes de Soutelo, pela amizade, conselhos e por acreditar em mim, sem ele não estaria no presente programa de Mestrado, que hoje considero minha segunda casa.

À instituição FAPESP, que financiou todo o projeto de pesquisa, sem ela não teríamos tal qualidade e quantidade de dados analisados.

À Profª. Drª Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira, pela parceria, ajuda com materiais e processamento de amostras de sangue e suabe conjuntival e realização do PCR das mesmas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo USP, Campus de Pirassununga.

Ao Profº. Drº Hélio Ricardo da Silva do Laboratório de Geoprocessamento da UNESP-Campus de Ilha Solteira, pelo apoio na confecção dos mapas com a localização das propriedades visitadas .

A Profª. Drª Gláucia Amorim Faria do Departamento de Matemática – UNESP – Campus de Ilha Solteira, pela amizade, co-orientação e pela análise estatística dos fatores de riscos.

A Profª. Drª Mara Lúcia Martins Lopes do Departamento de Matemática UNESP Campus de Ilha Solteira, pela análise estatística da comparação dos métodos diagnósticos.

Ao Marcelo Buzutti, graduando de Agronomia da UNESP – Campus de Ilha Solteira,, sem ele não seria possível a confecção dos mapas com a localização das propriedades visitadas.

Ao intercambiário e estagiário Henry Alexander Cardoso Luna, de onde????pela amizade e companheirismo.

À Prefeitura Municipal de Ilha Solteira, pelo fornecimento do mapa para a localização das propriedades.

À Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA) pelo apoio com os animais e por ceder o espaço para a captura dos vetores.

A todos os proprietários do Cinturão Verde, que nos receberam e participaram do projeto, nos autorizando coletar o material biológico de seus animais e instalar as armadilhas para a captura dos vetores durante um ano.

À Pesquisadora Científica da Sucen de Araçatuba, Dra. Lilian Aparecida Colebruso Rodas e a Médica Veterinária Dr^a Kennya Rozy de Araçatuba, pela ajuda na identificação dos insetos flebotomíneos

À SUCEN de Araçatuba, por disponibilizar espaço físico e material para identificação dos vetores.

À equipe do laboratório LIP AIS: Diogo Tiago da Silva, Andrea Gonçalves, Maria Luana Alves, Marina Flóro, Suellen Souza Moreira e Juliane Mayara Matos, pelo apoio, pela amizade e pelos momentos de descontração.

À minha família pelo apoio e acolhimento nas horas difíceis

Aos meus irmãos de República: Camilo Carranza, Marcos Vinicius Alves de Oliveira, Paulo Sergio, Henry Luna Cardozo, Alex Donaire, Leandro Duvale, Lucas Guarniere

Marteli, Flavio Franzin, Edisson Chavarro Mesa, Jorge Ivarra e Vinicius Tahell Guissi, que me apoiaram nas horas difíceis e deram varias risadas juntos.

Aos meus amigos e estagiários: Fernanda Pereira Spada, Ademir Gouveia, Maisa Lazzari, Raymes Bruno, Caio Brugnaro, Bruno Giglio Bernardone e Cassio Henrique, pela colaboração e amizade de todos.

Aos cães que foram de suma importância para a pesquisa, meu respeito e gratidão

Á todos agradeço e dedico este trabalho.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	34
2.1	OBJETIVOS GERAIS	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1	ÁREA DE ESTUDO	35
3.2	AMOSTRAGEM DE ANIMAIS	37
3.3	COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	37
3.3.1	ANAMNESE E EXAME CLÍNICO	37
3.3.2	SANGUE	38
3.3.3	SUABE CONJUNTIVAL.....	38
3.3.4	ASPIRADOS DE LINFONODOS POPLÍTEO	38
3.4	MÉTODO PARASITOLÓGICO DIRETO (PA)	39
3.5	MÉTODO SOROLÓGICO ELISA	39
3.6	REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)	41
3.6.1	PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DE <i>L. INFANTUM</i>	41
3.6.2	PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO DE <i>L. INFANTUM</i> E MONTAGEM DAS LÂMINAS.....	41
3.6.3	REALIZAÇÃO DO MÉTODO RIFI	42

3.7	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	42
3.8	LEVANTAMENTO DO VETOR FLEBOTOMÍNEO (<i>LU. LONGIPALPIS</i>). ..	43
3.9	LEVANTAMENTO DE DADOS PARA A ANÁLISE DOS FATORES DE RISCOS	48
3.10	ASPECTOS ÉTICOS.....	48
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
4	RESULTADOS.....	50
4.1	SINAIS CLÍNICOS	50
4.2	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	52
4.2.1	EXAME PARASITOLÓGICO DIRETO.....	52
4.2.2	MÉTODOS SOROLÓGICOS.....	52
4.2.2.1	ELISA indireto e RIFI	53
4.2.3	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	58
4.2.3.1	PCR do suabe conjuntival	58
4.2.4	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS UTILIZADOS	59
4.3	LEVANTAMENTO DE FLEBOTOMÍNEOS.....	64
4.4	AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO	68
5	DISCUSSÃO	76
6	CONCLUSÕES	87

Referências	88
Anexos.....	109
1 Termo de consentimento	110
2 Questionário	111

FATORES DE RISCOS ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA ÁREA RURAL DO CINTURÃO VERDE DE ILHA SOLTEIRA, SP.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma zoonose parasitária causada pelo protozoário *Leishmania infantum* transmitido principalmente pela picada do vetor flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*. O presente estudo objetivou avaliar a prevalência da LVC em cães, a distribuição de flebotomíneos e os fatores de riscos associados à doença, em uma área rural periurbana denominada por Cinturão Verde, localizada do município de Ilha Solteira, SP. Dessa forma, amostras de 250 cães, incluindo aspirados de linfonodos, de sangue e de suabe conjuntival foram coletadas para a realização dos exames parasitológico direto (PA), sorológico (ELISA e RIFI) e PCR (suabe conjuntival). A positividade dos cães para LVC foi de 31,6% (79/250) à RIFI, 28,8% (72/250) ao teste ELISA, 25,2% (63/250) ao PA e 20,4% (49/240) à PCR. A concordância entre os métodos, quando analisada pelo índice Kappa ($p \leq 0,05$), foi considerada excelente entre ELISA x RIFI (94,5%), moderada entre ELISA x PA (81,7%) e entre RIFI x PA (78,3%), mas foi baixíssima entre PCR e os demais testes analisados. Os flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* foram capturados com auxílio de armadilhas luminosas do tipo CDC ("Center for Disease Control and Prevention"), colocadas mensalmente no peridomicílio das propriedades rurais do Cinturão Verde, no período de setembro/2012 a agosto/2013, com três coletas em três dias consecutivos por mês. O número de flebotomíneos capturados totalizou 65 machos e 25 fêmeas em 12 meses. O maior número de flebotomíneos capturados foi nos meses de dezembro/2012, fevereiro/2013, maio/2013 e julho/2013. Os fatores de riscos associados à LVC foram determinados estatisticamente pela análise univariada, os quais foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) para os cães de porte grande, mostrando serem estes os mais susceptíveis à LVC, além da presença de galinhas nas propriedades e o desconhecimento da população local a cerca da doença. Pela presença dos casos de LVC nos cães amostrados e também de *Lu. longipalpis*, maior atenção deve ser dada a essa doença no Cinturão Verde.

Palavras chaves: ELISA. *Leishmania infantum*. *Lutzomyia longipalpis*. PCR. RIFI.

RISK FACTORS ASSOCIATED WITH CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN THE RURAL ÁREA OF “CINTURÃO VERDE” FROM ILHA SOLTEIRA, SP.

ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a parasitic zoonosis caused by *Leishmania infantum*, which is transmitted by the bite of Phlebotominae insect of the *Lutzomyia longipalpis* species (sandfly). This study aimed to survey the prevalence of CVL in dogs, the distribution of sand flies and the risk factors associated with the disease in a rural area called “Cinturão Verde”, located in the municipality of Ilha Solteira, SP. Thus, samples of lymph node aspirates and blood were collected from 250 dogs for ELISA and indirect fluorescence antibody test (IFAT) and direct parasitological (PA) exams. In addition, conjunctival swab samples were also collected for Polymerase Chain Reaction (PCR). 79/250 (31.6%) dogs were positive by IFAT; 72/250 (28.8%) by ELISA; 63/250 (25.2%) by PA and 49/240 (20.4%) by PCR. The concordance of methods when statistically analysed two by two by the Kappa indexes ($p \leq 0.05$) were considered of excellent agreement between ELISA and IFAT (94.5%), moderate between ELISA and PA (81.7%) and between IFAT and PA (78.3%), but when PCR was compared with the other tests, the agreement indexes were very low. *Lu. longipalpis* were captured with the help of CDC (Center for Disease Control and Prevention) light traps, placed three consecutive times per month in the rural peridomiliary properties of the “Cinturão Verde”, from September/2012 to August/2013 in 100 % of the properties visited. The parasite density ranged from 01 to 12 per month including males and females, totaling 64 males and 25 females over 12 months. The largest number of insects captured was in December 2012, February/2013, May/2013 and July/2013. The univariate statistical analysis of risk factors associated with CVL revealed that the big size-dogs, the presence of chickens in the properties as well as the lack of knowledge by the rural population about the CVL disease were considered indicators to predict infection by *Leishmania* spp ($p \leq 0.05$). By the presence of CVL cases and the presence of *Lu longipalpis*, more attention must be given during the epidemiological surveys in order to improve the control programs of the disease in the studied rural area in “Cinturão Verde”, SP, Brazil.

Keywords: ELISA. IFAT. *Leishmania infantum*. *Lutzomyia longipalpis*. , PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número (N) e porcentagem (%) de cães positivos e negativos ao exame parasitológico direto (PA) de acordo com a classificação em sintomáticos e assintomáticos. Cinturão Verde, Ilha Solteira, SP, 2014.....	52
Tabela 2 -	Resultado da análise dos soros de referência negativa pelo ELISA (n = 161 cães).	53
Tabela 3 -	Resultado da análise dos soros de referência negativa pelo ELISA (n = 89 cães).	53
Tabela 4 -	Níveis ELISA ¹ (NE ¹) relacionados à primeira amostragem (N=161 cães).....	54
Tabela 5 -	Níveis ELISA ² (NE ²) relacionados à segunda amostragem (N= 89 cães).....	54
Tabela 6 -	Resultado do exame ELISA indireto em cães do Cinturão Verde, Ilha Solteira, SP, 2014	55
Tabela 7 -	Número (N) e porcentagem (%) de cães positivos e negativos para LVC de acordo com os métodos sorológicos utilizados (ELISA indireto ou RIFI). Cinturão Verde de Ilha Solteira, SP, 2014	57
Tabela 8 -	Número (N) e porcentagem (%) de cães positivos e negativos aos métodos sorológicos ELISA indireto e RIFI de acordo com a classificação em sintomáticos e assintomáticos. Cinturão Verde, Ilha Solteira, SP, 2014	57
Tabela 9 -	Número (N) e porcentagem (%) de cães positivos e negativos ao exame de PCR de suabe conjuntival de acordo com a classificação em sintomáticos e assintomáticos. Cinturão Verde, Ilha Solteira, SP, 2013	58
Tabela 10-	Análise comparativa (dois a dois) dos métodos de diagnóstico para LVC em cães (número/porcentagem; Nº./%): ELISA indireto; RIFI; parasitológico (PA) e PCR (suabe), realizado em um total 240 cães classificados em assintomáticos (A) e sintomáticos (S), da área rural denominada Cinturão Verde do município de Ilha Solteira, SP	63

Tabela 11	Relação de flebotomíneos <i>Lutzomyia longipalpis</i> (machos e fêmeas) capturados ao longo de 12 meses nas 12 propriedades localizadas na área de Cinturão Verde. Ilha Solteira, SP, 2014.	69
Tabela 12	Análise de correlação univariada de variáveis relacionadas aos fatores de riscos associados à soropositividade de cães para Leishmaniose Visceral Canina, como base fatores inerentes ao cão (N = 250 cães) na área de Cinturão Verde. Ilha Solteira, SP, 2014.....	71
Tabela 13	Análise de correlação univariada de variáveis relacionadas aos fatores de riscos associados à soropositividade de cães para Leishmaniose Visceral Canina, como base os fatores ambientais (N = 250 cães) na área de Cinturão Verde. Ilha Solteira, SP, 2014.....	73
Tabela 14	Análise de correlação univariada de variáveis em relação aos fatores de riscos relacionados à soropositividade de cães para Leishmaniose Visceral Canina e ao conhecimento do proprietário sobre a doença (N = 250 cães) na área de Cinturão Verde. Ilha Solteira, SP, 2014....	73
Tabela 15	Análise de correlação univariada, relacionada a presença dos mosquitos vetores capturados durante 12 meses em armadilhas instaladas em propriedades localizadas na área rural de Cinturão Verde, no município de Ilha Solteira, SP..	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa de localização da cidade de Ilha Solteira, SP e a demarcação da área do Cinturão Verde pelas linhas amarelas.....	36
Figura 2 -	Foto ilustrando a localização das armadilhas luminosas CDC para captura da espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i> , nas propriedades visitadas da área rural “Cinturão Verde” de Ilha Solteira estado de São Paulo.	45
Figura 3-	Locais de instalação das armadilhas luminosas do tipo CDC para a captura da do vetor flebotomíneo da espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i> na área rural do Cinturão Verde de Ilha Solteira.	47
Figura 4 -	Cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral, apresentando sinais clínicos, como alopecia em região frontal (A), magreza extrema (B), onicogribose (C) e sem sinais clínicos (D) . Cinturão Verde, Ilha Solteira, SP, 2014...	51
Figura 5 -	Número de cães positivos ao ELISA indireto de acordo com os níveis ELISA (NE) e o ponto de corte ≥ 2 , Ilha Solteira, SP, 2014 (N= 161).....	55
Figura 6-	Número de cães positivos ao ELISA de acordo com os níveis ELISA (NE) ao ponto de corte $N \geq 3$, Ilha Solteira, SP, 2014. (N= 89).....	56
Figura 7-	Número total de cães positivos isoladamente no ELISA indireto ou na RIFI (ELISA + RIFI), somente para ELISA, somente para RIFI e simultâneos para ELISA x RIFI (N= 250 cães).....	59

Figura 8- Número de cães positivos pela sorologia (SORO) e pelo parasitológico (PA); ou seja, SORO + PA, somente SORO ou PA e simultâneos (SORO/PA). (N= 250 cães)..	61
Figura 9- Número total de cães positivos pela sorologia (ELISA e/ou RIFI) + PCR-suabe, somente pela sorologia ((SORO) ou pelo PCR-suabe e simultâneo pela sorologia x PCR-suabe.(N= 240 cães).	61
Figura 10- Número total de cães positivos (PCR-suabe + PA), somente pela PCR-suabe e PA e simultâneos pelos métodos PCR-suabe x PA.(N= 240 cães).	62
Figura 11- Contagem mensal de insetos da espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i> coletados e identificados na área rural do Cinturão Verde de Ilha Solteira, durante o período de setembro de 2012 a abril de 2013, comparados com dados de temperatura média mensal (Cº) e precipitação pluviométrica (mm). Dados climáticos obtidos da Estação Meteorológica da Área de Hidráulica e Irrigação da UNESP-Campus de Ilha Solteira.	67
Figura 12- Peridomicílio de propriedades visitadas durante a coleta de material biológico no período de outubro/2012 á janeiro/2013, na área rural do Cinturão Verde de Ilha Solteira.	75

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários pertencentes ao filo Sarcomastigophora, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). O gênero *Leishmania* é constituído por 30 espécies que infectam vertebrados de diferentes ordens, principalmente de répteis e mamíferos e que são transmitidas por vários invertebrados hematófagos da família Psychodidae (LAINSON, 1983).

As espécies causadoras de leishmaniose visceral são: *L. (Leishmania) donovani*, na Índia, Bangladesh, Nepal e Paquistão; *L. (Leishmania) infantum*, na região do Mediterrâneo (Europa e África) e *L. (Leishmania) chagasi* em diferentes países da América (Novo Mundo) (LAINSON, 1983; SHAW; LAISON, 1987). Segundo Gontijo e Melo (2004), não se pode afirmar se a LV foi introduzida recentemente no período da colonização europeia e, portanto causada pela *L. (L.) infantum* ou há milhares de anos antes, juntamente com a introdução dos canídeos e assim ser classificada como *L. (L.) chagasi*. Recentemente a taxonomia da espécie causadora de leishmaniose visceral nas Américas foi revista e sugeriu-se o uso de *L. (L.) infantum chagasi*, pois diversos estudos não conseguiram distinguir entre *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* sendo o principal vetor *Lutzomyia longipalpis* (MAURÍCIO et al., 1999; MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000; KUHLS et al., 2005; QUISPETINTAYA et al., 2005). No entanto, um estudo ainda mais recente, revelou baixa heterogeneidade entre ambas as espécies considerando-as como sendo sinónimas e assim *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) foi considerada ser o agente causador de LV no Novo Mundo com regiões endêmicas estendendo do sul dos Estados Unidos até ao norte da Argentina (KUHLS et al., 2011).

As leishmanioses constituem um grupo de doenças com grande diversidade epidemiológica e clínica (tegumentar e visceral). A leishmaniose visceral é considerada uma parasitose de caráter zoonótico e uma das mais importantes doenças em saúde pública em cerca de 80 países da Ásia, África e América Latina (ASHFORD et al., 1992). A leishmaniose está distribuída em regiões de clima tropical e subtropical de todo o mundo (ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004) incluindo a Oceania (Austrália) em casos registrados em cangurus (DOUGALL et al., 2009).

Leishmaniose cutânea autóctone foi também recentemente relatada em bovinos na Suíça (LOBSIGER et al., 2010) demonstrando novos hospedeiros e conseqüente expansão da doença. A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, infectando células da linhagem dos monócitos/macrófagos por meio da fagocitose. Este parasita apresenta duas formas principais: promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e tem forma alongada com um flagelo longo, esta forma pode ainda ser classificada como promastigota procíclica ou metacíclica, há também outra forma, que é aflagelada denominada de amastigota com formato redondo ou oval, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2007; OLIVER; GREGORY; FORGET, 2005). Apesar de apresentarem distribuição diferencial ao longo do tubo digestivo nos vetores, elas assumem forma flagelada indistinguível entre as espécies (SHAW; LAINSON, 1987).

A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos é pela picada de fêmeas infectadas de dípteros hematófagos da família Psychodidae pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, no Velho e no Novo Mundo, respectivamente. Sendo o gênero *Lutzomyia* subdivido em 15 subgêneros, 15 grupos e mais de 400 espécies (DEANE; DEANE, 1955; YOUNG; DUNCAN, 1994). A espécie *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* é considerada a principal transmissora do parasita. Essa espécie de vetor alimenta-se de uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, como aves, mamíferos silvestres e ou domésticos e até mesmo o homem (BRASIL, 2006). Além da espécie *Lutzomyia (L.) longipalpis*, Gallati et al. (1997) incriminaram a espécie *Lutzomyia (L.) cruzi*, no Mato Grosso do Sul, também como vetor da LV.

A atividade dos flebotomíneos é crepuscular e noturna. No intra e peridomicílio, a *Lu. (L.) longipalpis* é encontrada, principalmente, próximas a uma fonte de alimento. Durante o dia, estes insetos ficam em repouso, em lugares sombreados e úmidos, protegidos do vento e de predadores naturais. A identificação de uma espécie vetora e a determinação da taxa de infecção natural do vetor pelo agente etiológico, sobretudo nas regiões endêmicas, são de fundamental importância na entomologia médica (OLIVEIRA-PERERA et al., 2006). Assim a verificação da distribuição da população de vetores em uma região geográfica e os

biomas preferenciais pode auxiliar na identificação de áreas vulneráveis e/ou receptivas para a transmissão da doença. Missawa e Lima (2006) identificaram a ocorrência de *Lu. (L.) longipalpis* nas áreas com bioma de floresta, de transição e de cerrado, enquanto *Lu. (L.) cruzi*, principalmente em municípios com área de pantanal e cerrado.

A importância do vetor na epidemiologia da leishmaniose é o fator que impulsiona os estudos dos flebotomíneos, responsáveis pela transmissão dos protozoários de hospedeiros reservatórios susceptíveis (SARAIVA et al., 2006). Dessa forma, Camargo-Neves et al. (2001) consideraram a necessidade de correlacionar densidade vetorial com os aspectos ambientais, tais como presença de vegetação, raízes, troncos de árvores e matéria orgânica no solo, representando possíveis abrigos e criadouros para o vetor. Além disso, as habitações humanas de má qualidade em locais inadequados, a construção desordenada de abrigos de animais domésticos no ambiente peridomiciliar e a carência de condições mínimas de saneamento básico foram condições consideradas comuns em áreas rurais e periféricas de centros urbanos (MUNIZ et al., 2006) propícias para a criação manutenção dos criadouros dos vetores. Por outro lado, outros fatores, como temperatura, umidade e pluviometria podem também influenciar a população de flebotomíneos, dependendo da área analisada. Assim, Macedo et al. (2008) verificaram que os flebotomíneos apresentaram uma distribuição sazonal associada aos índices pluviométricos e de umidade, com aumento de densidade no período chuvoso do ano.

Em áreas urbanas, o hospedeiro doméstico é o cão *Canis familiaris*, considerado o principal reservatório da infecção para o homem. São identificados como hospedeiros silvestres no Velho Mundo, o chacal, *Canis aureus*; o lobo, *Canis lupus* e a raposa, *Vulpes vulpes*. Na China, refere-se também canídeo, *Nyctereutes procyonides* como reservatório. Na Geórgia e Arzebaijão a infecção acomete os texugos *Meles meles* e a raposa *Vulpes corsak*. No Novo Mundo, a LV tem como hospedeiros silvestres, as raposas, *Dusicyon vetulus* e *Lycalopex vetulus* encontrados no Nordeste brasileiro; o cachorro do mato *Cerdocyon thous*; na Amazônia e São Paulo, o cachorro vinagre *Speothos venaticus* e o gambá, *Didelphis albiventris* e *D. marsupialis* (SILVEIRA et al., 1982; COURTENAY et al., 1996;

BRASIL, 2006; CURI; MIRANDA; TALAMONI, 2006; LUPPI et al., 2008; LIMA et al., 2009; LAURENTI, 2010; TENÓRIO et al., 2011).

As manifestações sintomáticas dos cães com LVC ocorrem de forma variada. As alterações cutâneas comumente observadas são dermatites com excessiva descamação e despigmentação que normalmente se desenvolve na cabeça e se difunde para outras partes do corpo, prurido, pelame seco, queda dos pêlos e áreas de hiperqueratose e lignificação, principalmente em locais correspondentes às saliências ósseas, além de úlceras e pequenos nódulos intradérmicos. Além disso, são observados sinais como apatia, anorexia, êmese, hemorragia intestinal, coriza, edema de membros, blefarite, alopecia (FEITOSA et al., 2000; FERRER, 2002) alterações digestórias, cardiorrespiratórias, renais, locomotoras, hiporexia, onicogribose, emaciação, linfadenomegalia, anemia, pneumonia e comprometimento do sistema urinário e hepático e sinais de alterações neurológicas (FERRER, 1999; FEITOSA et al., 2000).

A ocorrência de casos humanos de LV tem como fator de risco a ocorrência de casos caninos e, embora nem sempre obedeça à distribuição paralela à da LVC, as infecções caninas são mais freqüentes que as humanas e normalmente as precedem (PARANHOS-SILVA et al., 1998). Em Andradina, SP, observou-se o período de 24 meses entre a ocorrência de casos caninos e casos humanos (ROSALES; YANG, 2006).

As estratégias de controle da LV estão baseadas no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, no controle de vetores por meio do uso de inseticidas e na triagem sorológica com posterior eutanásia de cães positivos para leishmaniose (COSTA; VIEIRA, 2001; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001), embora a eliminação dos cães infectados pela eutanásia ainda seja bastante controversa. O custo destas medidas é alto e gera controvérsias quanto à eliminação do reservatório canino. Alguns fatores como o método diagnóstico utilizado, o longo período de tempo entre diagnóstico e eliminação dos cães positivos e a própria implementação desta medida, são fatores que contribuem para seu limitado sucesso (REITHINGER et al., 2002). Além disso, há a reposição canina onde a eutanásia é realizada, uma prática frequentemente utilizada quando a população canina eliminada simplesmente é substituída por outra, possivelmente mais susceptível (MOREIRA

JUNIOR et al, 2001; NUNES, 2007). A eutanásia e a reposição de cães foram avaliadas por Nunes (2007) em um bairro da cidade de Araçatuba-SP por 24 meses, onde observou uma taxa de eutanásia de 60,9%, mas com uma reposição canina de 38,8%, em um curto período de tempo, preferencialmente por filhotes (< 1 ano), dos quais já sintomáticos (20,7%) ou sorologicamente positivos (12,9%) para LVC. Esse estudo mostrou a vulnerabilidade do método da eutanásia quando a população canina é repostada com animais mais susceptíveis em um ambiente ainda propício à contaminação e indicou a necessidade da inclusão de outras medidas de controle, como o desenvolvimento de novas drogas curativas específicas para os cães, além do desenvolvimento de vacinas preventivas mais eficazes.

Em áreas de risco para a doença é essencial o uso de métodos de diagnósticos sensíveis, apresentando altas taxas de positividade que auxiliem no controle da zoonose. No entanto, um dos desafios no controle da LV ainda é o diagnóstico canino, pois parece não haver um único método capaz de isoladamente diagnosticar a infecção em todos os cães. A sensibilidade das técnicas pode variar durante a evolução da doença bem como entre indivíduos, por isso se faz necessário uma combinação de técnicas sorológicas e moleculares para confirmar o diagnóstico da LVC (NUNES, 2007; ASSIS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2010; SILVA et al., 2013).

A LVC pode desenvolver variados sinais clínicos não específicos em cães, assim técnicas laboratoriais são indispensáveis para obter dados de diagnósticos adicionais visando à identificação da infecção (INIESTA et al., 2002). Os métodos para o diagnóstico de leishmaniose, juntamente com os variados sinais clínicos, são essenciais para o controle da doença, uma vez que obtidos os resultados positivos a eutanásia torna-se um método de impedir novas contaminações a outros hospedeiros como o cão e até mesmo o homem. Comumente as técnicas laboratoriais mais empregadas são exames parasitológicos, métodos sorológicos que detectam anticorpos e por métodos moleculares, a exemplo da amplificação de fragmentos de DNA do parasita em amostras biológicas (FERRER, 1999; GONTIJO; MELO, 2004). Pelos métodos parasitológicos, formas amastigotas do parasita podem ser observadas em esfregaços de linfonodo, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia hepática e cutânea e esfregaços sanguíneos corados com

corantes de rotina, tais como Giemsa, Wright e Panótico (BRASIL, 2003), mas podem apresentar baixa especificidade, pois este depende do grau do parasitismo, do tipo de material biológico coletado, da coloração e do tempo e prática de leitura (GONTIJO; MELO, 2004). Segundo Ferrer (1999), a sensibilidade do parasitológico é para 60% em esfregaços de medula óssea e menor do que 30% para aspirados de linfonodo. No entanto,, existem, atualmente, as técnicas imunoistoquímicas que oferecem a vantagem de aumentar a sensibilidade e a especificidade das técnicas parasitológicas por apresentarem facilidades na execução e alto grau de contraste entre os parasitas e as células hospedeiras (FERRER; RABANAL; FONDEVILA, 1988; TAFURI et al., 2004; TASCA et al. 2009; ASSIS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2010).

Queiroz et al. (2010), avaliaram as técnicas de imunoistoquímica (IMIQ) e de PCR em tecidos cutâneos para o diagnóstico da LVC e compararam com os exames parasitológicos em tecidos corados histoquimicamente (HE) e com os testes sorológicos RIFI e ELISA. A eficiência dos testes variou de acordo com a evolução da doença e demonstrou a necessidade das técnicas usando-se IMIQ para confirmação da sorologia e o uso da PCR apenas nos casos suspeitos pela IMIQ para gerar um aumento dos níveis de positividade e contribuir para o controle da LVC.

Com relação às provas sorológicas, destaca-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). A RIFI tem as vantagens de possuir fácil execução, rapidez, baixo custo, e sensibilidade e especificidade adequadas quando comparada a outras técnicas (ALVES; BIEVLACQUA, 2004), enquanto o ELISA tem sua sensibilidade dependente do tipo de antígeno empregado e de mudanças no protocolo experimental padrão (REITHINGER et al., 2002). Algumas pesquisas apontaram para o método ELISA sensibilidades e especificidades variáveis e altas, como as respectivamente citadas a seguir: de 98% e 99% (PARANHOS-SILVA et al, 1996), 85,4% e 87% (QUINNELL et al., 2001), 94% e 90% (ALMEIDA et al., 2005), 100% e 88% (ROSARIO et al., 2005) mas, baixa para Nunes et al. (2007) de 56,1% e 88%, respectivamente.

A RIFI, por outro lado, apresenta sensibilidade e especificidade que variam de 80 a 100% (FERRER, 1999). No entanto, a especificidade da RIFI pode ser

prejudicada devido à ocorrência de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanosomastídeos (ROSÁRIO et al., 2005). Outros trabalhos apresentaram resultados que indicaram a presença de reações cruzadas com *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis* (VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996) pelo exame RIFI. No entanto, reações cruzadas de *L. infantum* pelos métodos ELISA e RIFI com antígenos de *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* foram descartadas na pesquisa de Oliveira et al. (2008), demonstrando que a coinfeção de cães com hemoparasitas e *Leishmania* é bastante freqüente em áreas endêmicas para LVC. Fato esse também evidenciado por (PAULAN et al., 2013).

No Brasil, o teste sorológico RIFI até recentemente era o mais utilizado para o diagnóstico da LVC em larga escala, mas o mesmo vem sendo paulatinamente substituído pelo ELISA em inquéritos populacionais uma vez que apresenta sensibilidade e especificidade semelhantes às da RIFI, com a vantagem da possibilidade de automação (GONTIJO; MELO, 2004).

Os testes sorológicos são baseados na detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania*, pois os animais doentes desenvolvem uma forte resposta imune humoral com altos títulos de IgG anti-*Leishmania* (FERRER, 1999). No entanto, a sorologia apresenta além das reações cruzadas, a ineficiência do diagnóstico no período entre a infecção e a soro-conversão (MANNA et al., 2004). Após as picadas dos flebotomíneos infectados três situações podem ocorrer: a) os cães podem não apresentar anticorpos anti-*Leishmania* nem tampouco parasitas; b) outros podem tornar soronegativos, mesmo com os parasitas em seu organismo e c) outros ainda efetivamente desenvolvem a doença após um período de latência quando os animais são assintomáticos, mas sorologicamente positivos (DYE, 1993; KILLICK-KENDRICK et al., 2002). Segundo Nunes (2007), o tempo médio para os cães inicialmente negativos ao exame parasitológico e ELISA apresentarem pelo menos um sinal clínico compatível com LVC foi ao redor de seis meses.

Pela análise comparativa entre si dos testes sorológicos (RIFI; ELISA) o resultado revelou uma porcentagem de concordância boa, ou seja, de 82%, mas não total, validando a comprovação de que estes dois testes podem apresentar em alguns casos, resultados divergentes no diagnóstico da LVC (ASSIS et al., 2010). Em função de que os testes sorológicos nem sempre são concordantes e nem

sempre é possível detectar amastigotas em tecidos de todos os animais soropositivos, levou Assis et al. (2010) a utilizar uma técnica mais sensível, a PCR elevando o percentual de animais positivos estudados para 91%, onde confirmaram os resultados positivos das outras técnicas e ainda detectaram DNA do parasita em tecidos de 93% dos cães com diagnóstico inconclusivo.

Na tentativa de detectar mais adequadamente a população soronegativa e de ultrapassar as limitações do diagnóstico sorológico, o diagnóstico molecular baseado na amplificação de fragmentos de DNA por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido recomendado por muito pesquisadores (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990; ASHFORD et al., 1995; REALE et al., 1999; QUINNELL et al., 2001; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; LACHAUD et al., 2002; IKONOMOPOULUS et al., 2003; MANNA et al., 2004; NUNES et al., 2007; ASSIS et al., 2010). De acordo com estes autores, as técnicas baseadas na PCR apresentaram a vantagem de serem mais rápidas, mais sensíveis e específicas, particularmente para a detecção de cães assintomáticos.

As amostras clínicas mais comumente utilizadas para a detecção por PCR foram até então aspirados de linfonodos, de medula óssea, de baço, biópsia de pele e de conjuntiva. Amostras de sangue circulante e de suabe da conjuntiva apresentaram a vantagem de serem menos invasivas do que as demais (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; LACHAUD et al., 2002; IKONOMOPOULOS et al., 2003; MANNA et al., 2004; PEREIRA, 2013).

Alguns trabalhos têm obtido resultados satisfatórios para diagnosticar LVC usando amostras de sangue (REALE et al., 1999; IKONOMOPOULOS et al., 2003), enquanto outros apontam que amostras de sangue frequentemente apresentam problemas relacionados com os inibidores de PCR e com a preparação do DNA (REALE et al., 1999; LACHAUD et al., 2002).

Já Solano-Gallego et al. (2001) observaram maior positividade na PCR em amostras de pele de cães (51%) quando comparadas à conjuntiva (32%) e medula óssea (17,8%) e Manna et al. (2004) observaram maior positividade para amostras de linfonodos (99%), quando comparadas às amostras de pele (95%), e de sangue (94%), sugerindo por essa razão a realização da PCR em biópsias de pele em função da coleta ser mais fácil e de ter mais parasitas do que nos linfonodos.

Mais recentemente, no entanto tem aumentado o interesse de vários pesquisadores no sentido de priorizar técnicas menos invasivas para obter material biológico dos animais para diagnóstico molecular da LVC e assim o suabe conjuntival foi testado por Pereira (2013) em inquéritos epidemiológicos, com bons resultados.

Dessa maneira, Pereira (2013) realizou um estudo comparativo entre as técnicas de PCR de sangue (PCR-SG) e PCR de suabe conjuntival (PCR-SC) e observou uma maior sensibilidade e especificidade do suabe em relação ao sangue, além de apresentar maior facilidade de coleta, sendo menos invasiva e dolorosa do que a coleta de sangue. A PCR de suabe teve boa aceitação por parte dos proprietários e até dos cães que não colaboraram durante a coleta de sangue. Conforme análise estatística, a associação entre animais positivos na PCR-SC e a presença de sinais clínicos foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$), e a sensibilidade da PCR-SG em detectar um maior número de animais sem sinal clínico também foi significativa ($p \leq 0,05$). *Leishmania* spp foi também recentemente detectada por meio da PCR do suabe conjuntival e do sangue em gatos e cavalos no estado de São Paulo (BENVENGA, 2013).

Atualmente o Ministério da Saúde recomenda para triagem o teste sorodiagnóstico imunocromatográfico DPP (“Dual Path Platform”), que é um teste rápido, utilizando antígenos recombinantes de proteínas antigênicas de *Leishmania* rK 39 e rK26 e o ELISA como teste confirmatório (BRASIL, 2013). Grimaldi Jr. et al. (2012) verificaram que o teste rápido DPP apresentou alta sensibilidade (98%) para cães com sinais clínicos e alta especificidade (96%) mas, baixa sensibilidade (47%) para cães assintomáticos para LVC, demonstrando sua inabilidade para detectar a doença em cães assintomáticos. Já Silva et al. (2013) sugeriram o teste DPP como uma boa alternativa para a triagem dos cães, uma vez que proporciona um diagnóstico rápido e simples, sem a necessidade da participação de um laboratório especializado. Quinnell et al. (2013) detectaram também baixa sensibilidade (46% a 78%) do teste rápido com o antígeno rK39 para detectar casos clínicos de LVC, e dessa forma não o recomendaram para ser usado em programas operacionais de controle da doença.

No entanto, nenhuma prova diagnóstica quando testada isoladamente identifica adequadamente os cães infectados com LVC (QUINNELL et al., 2001; NUNES, 2007; ASSIS et al., 2010) e por isso, existe sempre a necessidade da associação de técnicas, pois os resultados dos diagnósticos variam muito com a evolução da doença e com a resposta imune desenvolvida pelo cão. Dessa forma, Quinnell et al. (2013) sugerem o desenvolvimento de pesquisas no sentido do desenvolvimento de novas tecnologias para a descoberta de novos antígenos ou o uso de múltiplos antígenos dos testes rápidos para aumentar a sensibilidade dos mesmos em casos assintomáticos da doença em cães.

Com relação à epidemiologia da doença, o primeiro registro de surto de LV no Brasil ocorreu no município de Sobral-CE, em áreas rurais, mas na década de 80 observou-se a mudança na distribuição geográfica com o avanço da doença para áreas urbanas, inclusive para a periferia de grandes cidades, como Teresina, onde se registrou a primeira epidemia urbana da leishmaniose visceral (GONTIJO; MELO, 2004; COSTA et al., 2005; LAINSON; RANGEL, 2005). No decorrer do tempo, a leishmaniose visceral se espalhou pelo Brasil todo e de uma forma endêmica em 19 dos 27 estados do Brasil, além do Distrito Federal, nas regiões Norte, por todo o Nordeste, o Centro-Oeste e a região Sudeste. Em todos os Estados do Brasil tem sido relatada a associação entre a existência de cães infectados e a presença do vetor (MILES et al., 1999; LAINSON; RANGEL, 2005).

Nas últimas décadas, a LV tem ocorrido com grande frequência em áreas urbanas de cidades de grande a médio porte como São Luís-MA, Natal-RN, Aracaju-SE, Cuiabá-MT, Campos Grande-MS, Belo Horizonte-MG e Rio de Janeiro-RJ, apresentando características distintas dos padrões clássicos anteriormente descritos para a área rural (DESJEUX, 2004; GONTIJO; MELO 2004).

No Estado de São Paulo, a presença de *Leishmania* spp. em exames parasitológicos diretos de cães com suspeita clínica de LVC foi detectada em 1998, no município de Araçatuba, sendo posteriormente identificada como *L. (L.) chagasi*. Esse fato, aliado à presença do inseto transmissor, *Lu. longipalpis*, detectado em 1997, confirmou a autoctonia de LVC em cães em território paulista (CAMARGO-NEVES; KATZ, 1999). Em 1999, no mesmo município, foi relatado o primeiro caso humano autóctone no Estado e, em 2001 já eram 57 casos constados, com 03

óbitos, e a partir de então a doença seguiu de forma crescente até o ano de 2004, totalizando 386 casos no estado de São Paulo nas regiões cobertas pelas DRE VI Araçatuba, DRE X Bauru, DRE XIV Adamantina (CAMARGO-NEVES; KATZ, 1999; CRUZ et al., 2007).

A urbanização da LVC já é um fato, mas pouco ainda se conhece sobre a sua epidemiologia. A deterioração do padrão de vida da população humana, a maior densidade populacional para periferia das grandes cidades, degradação do meio ambiente, maior densidade dos flebotomíneos e a presença dos cães infectados foram fatores predisponentes para a implantação desta zoonose (ALENCAR, 1983; BADARÓ, 1986; GONTIJO; MELO, 2004; FRANÇA-SILVA, et al., 2005).

Os principais determinantes dos níveis epidêmicos da leishmaniose visceral nos grandes centros urbanos foram: convívio muito próximo homem/reservatório (cão), aumento da densidade do vetor, desmatamento acentuado e o constante processo migratório (MARZOCHI, 1989). Muitos fatores de risco sobre a ocorrência da LV têm sido listados indicando possíveis interações entre os elos que compõem a cadeia epidemiológica tais como os vetores, os hospedeiros e o ambiente (DYE et al., 1993; GAVAGNI et al., 2002; MONTEIRO et al., 2005; MURRAY, 2005; RONDON et al., 2008). Dessa forma, o conhecimento da distribuição da doença em áreas endêmicas e possíveis associações entre a doença e os fatores determinantes podem auxiliar em estratégias de controle (FRESHE et al. 2010). Nesse contexto, os cães domésticos têm um importante papel na manutenção e disseminação da doença. Por essa razão, os fatores que poderiam estar associados aos riscos desses animais tornarem-se infectados precisam ser bem conhecidos (DANTAS-TORRES, 2009).

Alguns estudos realizados na última década têm mostrado alguns fatores de riscos associados à LV nas regiões urbanas. As más condições de habitação, em especial a falta de coleta domiciliar de lixo e o sistema de esgotos irregulares ou ausentes (COSTA et al., 2005; MORENO et al., 2005), o aumento da densidade populacional de flebotomíneos (FRANÇA-SILVA et al., 2005; MORENO et al., 2005), a criação de pássaros em gaiolas juntamente com presença do vetor (MORENO et al., 2005) e presença de outros animais no peridomicílio, particularmente gambás (CABRERA et al., 2003), galinhas e suínos (MOREIRA JUNIOR et al., 2003).

Com relação à população canina, cães com menos de três ou mais de sete anos de idade apresentou maior risco para LVC, sendo o primeiro grupo mais susceptível que o segundo (MORENO; ALVAR, 2005). Embora todas as raças sejam susceptíveis à LVC, Ibizan Hound, foi a mais resistente (SOLANO-GALLEGO et al., 2000). Cães com pelame curto aparecem apresentar maiores risco de adquirir LVC (FRANÇA-SILVA, 2003; MOREIRA JUNIOR et al., 2003), possivelmente pela maior facilidade de acesso dos flebotomíneos para à picada. O sexo macho do cão foi associado como um fator de risco somente por Dantas-Torres et al. (2006).

Mais recentemente, em um estudo transversal realizado em áreas endêmicas de Cuiabá (MT) ficou constatado uma soroprevalência de 22,1% de cães para LVC, e os animais que viviam em ambiente rural apresentaram risco 1,9 vezes maior de adquirir a infecção dos que aqueles em ambiente urbano. Os fatores relacionados aos hábitos dos animais, tais como o livre acesso à rua e função de guarda além da presença de atividade agrícola foram considerados indicadores para prever a infecção por *Leishmania* spp (ALMEIDA et al., 2012).

Estudos realizados na cidade de Ilha Solteira, SP, área endêmica para LVC, mostraram que em inquéritos sorológicos realizados em cães entre 2003 e 2007, a prevalência da enfermidade subiu de 0,67% a 7,44%. Os resultados mostraram um crescente número de casos de LVC nessa cidade e isso significou a necessidade de uma vigilância sanitária mais atuante e de medidas profiláticas mais eficazes no controle da LVC (NORONHA JUNIOR et al., 2007).

Por meio de técnicas de geoprocessamento em conjunto com as imagens de satélite um estudo realizado em Ilha Solteira, SP, por Paulan et al. (2012), para verificar casos de LVC na área urbana do município de Ilha Solteira, SP, revelou uma prevalência estimada de baixa a média-alta variando de 10% a 14,5%, dependendo do bairro estudado. As áreas com mais densidade de casos para LVC foram os locais próximos de fragmentos de vegetação naturais (zoológico) e próximos do assentamento rural, ou seja, mais distantes do centro da cidade. No entanto, esse estudo revelou ainda que 78% dos casos de LVC estavam localizados fora do raio de 250 m dos fragmentos remanescentes de vegetação natural e assim não indicando nenhuma relação com a LVC, embora alguns casos tenham ocorrido próximos do zoológico onde há vegetação nativa remanescente e casos registrados

de leishmaniose em canídeos silvestres (TENÓRIO et al., 2011). Esse trabalho (PAULAN et al., 2012) reforçou ainda a importância do vetor *Lu. longipalpis* em se adaptar ao ambiente peridomiciliar sem a necessidade da vegetação como papel importante na dinâmica epidemiológica da doença e assim se estabelecer em diferentes ambientes, aumentando a sua dispersão no estado de São Paulo.

Os levantamentos epidemiológicos sobre LVC em Ilha Solteira, SP, tem sido realizados em áreas urbanas, não incluindo a área rural. Em uma recente publicação, Paulan et al. (2013) verificaram dados altos de ocorrência de 37,7% da LVC em uma área rural, o Assentamento Estrela da Ilha, próxima do perímetro urbano, indicando a necessidade de explorar também outras áreas rurais do município, que tivessem semelhante perfil socio-econômico e geográfico, ou seja, incluindo uma população de baixa renda, vivendo em uma área rural no entorno da cidade, próxima ao perímetro urbano.

Devido ao fato do Cinturão Verde apresentar uma população canina e humana considerável, apresentar condições de criação dos vetores transmissores e estar localizado próximo ao perímetro urbano da cidade, faz com que essa área represente um perigo pela manutenção da doença local e da dispersão dessa zoonose do ambiente rural para o urbano se medidas preventivas não forem implementadas.

Nesse sentido, a presente pesquisa teve como objetivo principal, o conhecimento dos fatores de riscos relacionados à LVC, assim como a realização de um levantamento de flebotomíneos vetores em uma área rural denominada por “Cinturão Verde” de Ilha Solteira, SP, onde o conhecimento da prevalência dessa doença, ainda era desconhecido.

2 OBJETIVOS

2. 1 Objetivos Gerais:

Avaliar os fatores de riscos associados à ocorrência de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em cães e realizar um levantamento de *Lutzomyia longipalpis* (flebotomíneo vetor da LVC) em uma área rural do município de Ilha Solteira, São Paulo, denominada por Cinturão Verde.

2. 2 Objetivos Específicos:

- 1) Avaliar a prevalência da LVC por meio de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares;
- 2) Realizar uma análise comparativa dos métodos diagnósticos utilizados;
- 3) Realizar um levantamento de *Lu. longipalpis* por meio de armadilhas luminosas do tipo CDC (“Center for Disease Control and Prevention”) na área estudada;
- 4) Aplicar um questionário para levantamento de dados dos cães, das propriedades e do conhecimento das famílias a respeito desta zoonose a ser utilizado na avaliação de fatores de riscos;
- 5) Observar *in loco* cada propriedade para avaliação das condições físicas e sanitárias das mesmas, como tipo de vegetação, criação de outros animais e culturas agronômicas, presença de lixo e matéria orgânica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

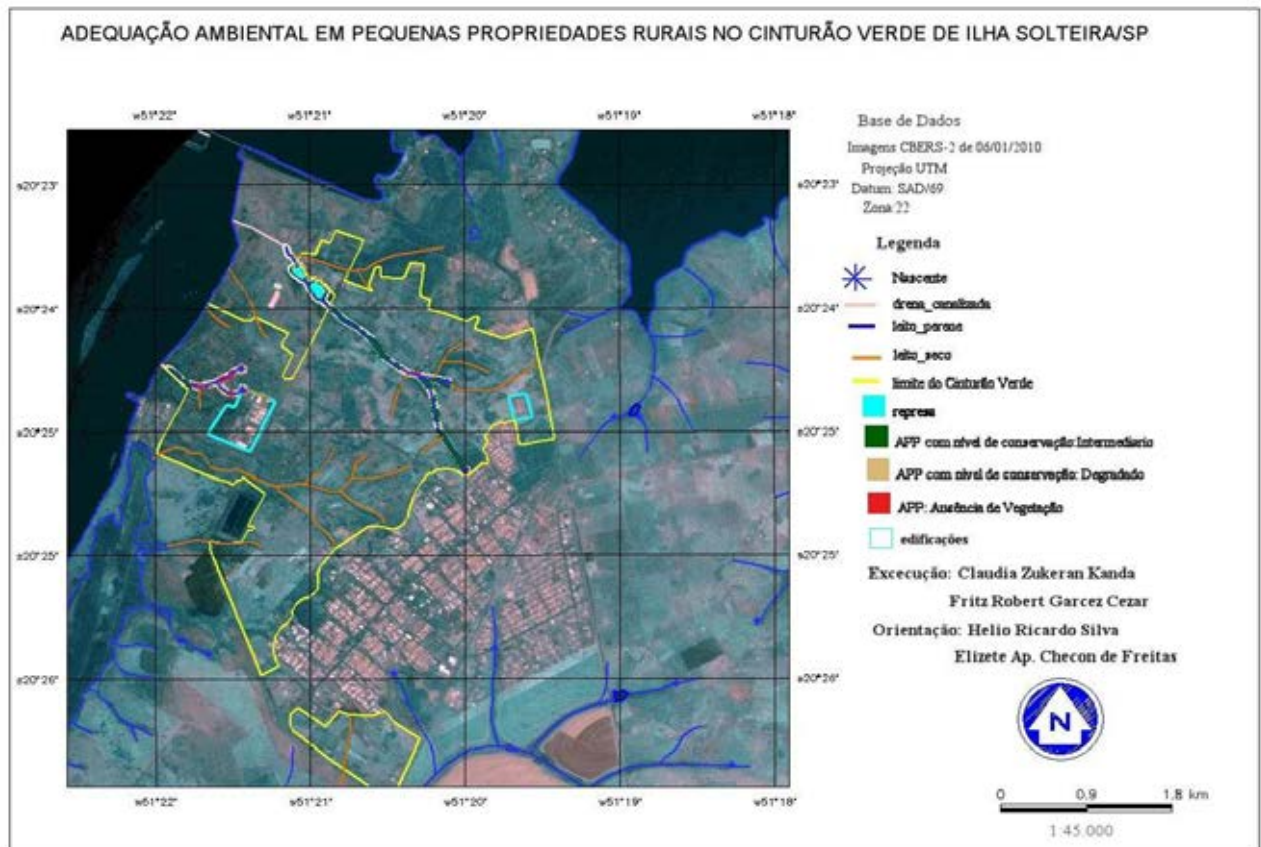
O município de Ilha Solteira está localizado no Planalto Ocidental Paulista a 650 km da capital, na região Noroeste do estado de São Paulo (S 20°25'36,47"; O 51° 20' 26,47"). Possui uma população estimada em 24.176 habitantes (IBGE, 2011). A principal atividade econômica é a geração de energia elétrica através da Usina Hidrelétrica de Ilha Solteira (MARQUES; MANZOLI, 2002).

A vegetação natural remanescente é composta por floresta latifoliada tropical, sendo também chamada de mata úmida e floresta latifoliada semidecídua ou mata seca (SILVA, 1991). A maior parte dessa cobertura original foi eliminada durante a ocupação da área, sendo atualmente a cobertura principal do solo representada pelos campos antrópicos (pastagens) (SILVA et al., 2005).

As características físicas do solo, de acordo com a nova nomenclatura do Sistema Brasileiro de Classificação do Solo, passa a ser um argilossolo vermelho-escuro eutrófico (SILVA et al., 2005) e o clima da região, classificado de acordo com o Sistema Internacional de Köppen, é o tropical úmido, com estação chuvosa no verão e seca no inverno (CENTURION, 1982). As temperaturas médias mensais variam entre 20,5°C (julho) e 26,2°C (fevereiro) e as precipitações médias mensais variam de 20 mm (agosto) a 254 mm (janeiro) (CRUZ et al., 2007).

O município é circundado na parte lateral oeste, parte da região norte e sul por uma área verde denominada "Cinturão Verde" localizado próximo à extensão do perímetro urbano da cidade de Ilha Solteira (Figura 01), que conta com aproximadamente 200 famílias e, entre essas, diversas atividades funcionais são exercidas, desde cultivo de hortaliças à criação de pequenos animais como aves e porcos. O Cinturão Verde ocupa uma área de 880,46 hectares (ha), sendo esta dividida em: área de produção agrícola (563,29 ha); área de reflorestamento (317,68 ha); talvegues (45,65 ha); área de empréstimo (227,39 ha) e reservas enriquecidas (44,12 ha). Toda a extensão do Cinturão Verde é enquadrada em 77 lotes sequeiros (não irrigados) e 14 lotes irrigados.

Figura 1- Mapa de localização da cidade de Ilha Solteira, SP e a demarcação da área do Cinturão Verde pelas linhas amarelas. Fonte: Foto obtida .do Laboratório de Geoprocessamento da UNESP-Campus de Ilha Solteira.



3. 2 Amostragem de Animais

O tamanho da amostra foi estabelecido considerando não somente os 20% de prevalência da leishmaniose nos cães (intervalo de confiança de 95% e precisão de 5%) do Assentamento Rural Estrela da Ilha (LINS et al., 2009), mas também da população de 400 cães (02 cães/família) da área em estudo.. Dessa forma, o tamanho da amostra, com base no método aleatório arbitrário, e com os ajustes da população finita inferior a 2000 cães e no erro amostral de 5 %, foi calculado ser em torno de 250 cães. Para garantir a representatividade do número amostral, definiu-se que a metodologia de coleta do material deveria ser feita de modo que não houvesse concentração de amostras em apenas uma região da área total, mas sim que cobrisse todo o perímetro do Cinturão Verde. Com o auxílio de um mapa fornecido pela prefeitura e de algumas visitas locais no CV, os lotes/propriedades foram determinados. No total, 104 famílias foram visitadas, coletando-se material biológico de todos os cães pertencentes à cada família, sem discriminação da quantidade.

3. 3 Coleta de Amostras Biológicas

3. 3. 1 Anamnese e Exame Clínico

Antes da coleta do material biológico os cães passaram por anamnese médica veterinária para caracterização dos sinais clínicos. A primeira condição observada no animal era o escore da condição corporal, que foi definido como o animal estar normal, magro ou caquético (LAFLAMME, 1997). Após tal caracterização, com a ajuda do proprietário e com o uso de focinheiras, os cães foram contidos fisicamente para aferimento da temperatura corpórea, realização da inspeção da pele e palpação do baço, fígado e linfonodos. As mucosas também foram inspecionadas quanto a sua coloração.

Os cães foram classificados em assintomáticos quando não havia alteração clínica da LVC. Já os cães sintomáticos deveriam apresentar pelo menos um sinal clínico evidente da infecção, como a perda de peso acentuada, alterações dermatológicas (alopecia, descamação, hiperqueratose, espessamento e nódulos

intradérmicos sobre o focinho, orelhas externas e/ou coxins), bem como linfadenopatia, esplenomegalia, uveíte, ceratoconjuntivite e onicogrifose, de acordo com a caracterização da LVC de (FEITOSA et al., 2000).

3. 3. 2 Sangue

Para os procedimentos de coleta do material biológico, os cães foram imobilizados apenas pela contenção manual, com auxílio do proprietário e com o uso de focinheiras para evitar acidentes durante os procedimentos. As coletas de sangue dos cães foram feitas diretamente da veia cefálica ou da veia jugular externa. Com assepsia prévia do local com álcool iodado. Amostras de sangue foram coletadas em frascos à vácuo com e sem anti-coagulante. A amostra destinada para o exame molecular foi congelada em freezer a -80°C até a extração do DNA. A segunda amostra foi colhida sem o anti-coagulante para a obtenção do soro imune. O soro imune foi utilizado para a realização dos exames sorológicos ELISA indireto e imunofluorescência indireta (RIFI).

3. 3. 3 Suabe Conjuntival

Amostras de células foram coletadas, com auxílio de suabes estéreis na conjuntiva ocular de cada cão, tanto no olho do lado direito como no esquerdo. Os suabes coletados foram acondicionados em microtubos plásticos com capacidade de 1,5 ml (livres de DNases e RNases), identificando e mantidos à temperatura de 4°C, para posterior processamento.

3. 3. 4 Aspirados de Linfonodos Poplíteos

Foi feita a tricotomia da região do linfonodo poplíteo direito e/ou esquerdo, e a área a ser puncionada foi delimitada e fixada manualmente. A punção foi executada com uma agulha hipodérmica 25 x 7 acoplada a uma seringa descartável de 5 mL. A agulha foi retirada da seringa, o êmbolo repuxado e a agulha novamente acoplada à seringa para então despejar o material em lâminas de vidro, distribuído

com ajuda de outra lâmina no formato de *squashes*. Após secar ao ambiente, as lâminas foram fixadas em metanol e devidamente identificadas para posterior exame parasitológico direto. Para realização, duas lâminas de cada animal foram preparadas e coradas com Panóptico rápido®, para assim serem submetidas ao exame parasitológico direto por meio da visualização em microscópio óptico, das possíveis formas amastigota presentes em macrófagos livres nestas amostras.

3. 4 Método Parasitológico Direto (PA)

Para o método parasitológico direto (PA), as lâminas foram observadas em microscópio óptico e classificadas em positivas se apresentassem formas amastigotas do parasito e negativas se o parasita não era visualizado em pelo menos 300 campos visuais, na objetiva microscópica de 40x.

3. 5 Método ELISA Indireto

O método ELISA indireto foi realizado de acordo com a técnica descrita por Machado et al. (1997) e adaptado por Oliveira et al. (2008) para *L. infantum*.

O antígeno solúvel bruto de *L. infantum* foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP-Campus de Jaboticabal, produzido a partir de formas promastigotas mantidas em cultivo celular provenientes de amostras de cães naturalmente infectados.

Para execução do ELISA indireto, foram adicionados em cada cavidade da placa de microtitulação com 96 poços de fundo chato, fabricado em poliestireno transparente (Fabricante: Kartell S.P.A., Itália), 100µL do antígeno solúvel bruto de *L. infantum* na concentração de 5µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio a 0,05M, pH 9,6. Após incubação da placa por 8 a 10 horas em câmara úmida a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas, com tampão fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween 20, Sigma). As placas foram bloqueadas com PBS-Tween 20 acrescido de 5% de leite em pó desnatado, em câmara úmida, a 37°C por 90 minutos. Após nova lavagem para retirada do bloqueador, foram adicionados, em duplicata, 100µL dos

soros testes e dos soros de referência positivos e negativos nas suas diluições ideais em PBS-Tween 20, com 5% de leite em pó desnatado. As microplacas foram então novamente incubadas e lavadas. Em seguida, 100µL do conjugado (IgG de coelho anti IgG de cão, acoplada à fosfatase alcalina (SIGMA A-0793) foi diluído 1:4.000 em tampão PBS-Tween 20, contendo 5% de soro de coelho. foi adicionado a cada cavidade da placa, seguindo-se nova incubação e lavagem como as anteriores. O substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8; SIGMA N-9389) foi adicionado, incubando-se a reação por 45 minutos à temperatura ambiente. Decorridos esse período, a leitura da reação foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (EL800 Universal Microplate Reader Bio-TEK Instruments, INC.), a um comprimento de onda de 405 nm. À cada placa, foram adicionadas amostras de cães sabidamente positivos para LVC (controle positivo), provenientes de área endêmica (Ilha Solteira, SP) e amostras de cães sabidamente negativos (controle negativo), provenientes de áreas não endêmicas (Jaboticabal, SP)

Os valores de densidade óptica média (D.O.) dos soros foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variaram de 0 (zero) a 9 (nove). O limite máximo do nível zero foi determinado pela média das D.O. de animais negativos para *L. infantum* acrescido de dois desvios padrão. A partir desse limite, os intervalos entre os outros níveis de ELISA foram definidos por acréscimo de 35%, e o ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor médio das D.O. dos soros de referência negativos, conforme preconizado por (VOLLER; BIDWELL; BARTLETT, 1980).

A atividade imunológica de cada amostra testada foi calculada mediante a determinação do valor A/P (amostra em relação ao positivo), considerando-se os soros de referência negativos (de cães sabidamente negativos de áreas não endêmicas) e positivos (de cães sabidamente positivos de áreas endêmicas para LVC) de acordo com a seguinte equação:

Absorbância média da amostra	-	Absorbância média do soro de referência negativo
$A/P = \frac{\text{Absorbância média da amostra}}{\text{Absorbância média do soro de referência positivo} - \text{Absorbância média do soro de referência negativo}}$		
Absorbância média do soro de referência positivo	-	Absorbância média do soro de referência negativo

3. 6 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

3. 6. 1 Produção de antígenos de *L. infantum*

Para realização da RIFI, foram necessárias lâminas com antígeno de *L. infantum*, que foram obtidas por meio de culturas de parasitos, mantidos no laboratório em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) descrito por (CAMARGO, 1964). A cada cinco dias, parte da cultura foi repicada e parte foi utilizada para preparação dos antígenos e das lâminas de RIFI.

3. 6. 2 Preparação do antígeno de *L. infantum* e montagem das lâminas

O meio de cultura contendo os parasitas foi centrifugado a 735g, por dez minutos, e o sobrenadante descartado. Posteriormente, foram feitas três lavagens dos parasitas com solução de albumina bovina (BSA) a 1%.

Após a terceira lavagem, foi colocada uma solução de paraformaldeído a 4%, por 30 minutos, para a fixação dos parasitas. Após esta etapa, os parasitas foram novamente lavados por três vezes com solução de BSA a 1%, e o “pellet” de parasitas foi ressuspensionado em solução salina tamponada (PBS) até a concentração de 3×10^6 a 4×10^6 parasitos por mL.

Utilizando-se lâminas previamente demarcadas com círculos, foram colocados 10 μ L da suspensão de parasitas em PBS em cada círculo. Após secagem por 6 a 8 horas à temperatura ambiente, as lâminas foram devidamente embaladas

em papel extra-fino e papel alumínio, e conservadas a -20°C , em recipientes hermeticamente fechados, até o momento de uso.

3. 6. 3 Realização do método de RIFI

O método RIFI foi realizado conforme o Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, de Belo Horizonte/MG, para diagnóstico de animais infectados por *L. infantum*, adaptada por (OLIVEIRA et al., 2008).

As lâminas contendo formas promastigotas de *L. infantum* produzidas em laboratório foram retiradas do “freezer” e descongeladas à temperatura ambiente. Em cada círculo contendo o antígeno, foi dispensados 10 μL de cada soro teste diluído na concentração de 1:40. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida e levadas à estufa 37 $^{\circ}\text{C}$, por 30 minutos e, a seguir, submetidas a três lavagens em PBS por imersão, de cinco minutos cada. Após a secagem a temperatura ambiente, os círculos das lâminas foram recobertos com 10 μL do anticorpo anti-IgG de conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (KPK cat nº 02-19-02), diluído a 1:30, em solução de PBS, contendo azul de Evans 1 mg%. As lâminas foram novamente incubadas por mais 30 minutos e depois lavadas, conforme acima descrito. Após a secagem das lâminas, estas foram montadas com lamínula, utilizando-se glicerina tamponada a uma relação de 9:1 de glicerina/tampão carbonato-bicarbonato 0,5M, pH 9,6 e, posteriormente foram observadas em microscópio equipado para fluorescência (Olympus, BX-FLA).

Foram consideradas positivas as reações fluorescentes em amostras com diluição $\geq 1:40$.

3. 7 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A extração do DNA de *Leishmania* spp e o exame PCR foram realizados no Laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, sob a supervisão da Professora Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira, conforme a técnica convencional brevemente descrita a seguir.

A extração do DNA total foi realizado a partir de amostras de suabes da conjuntiva ocular de cães pelo método do *salting out* descrito por John et al. (1991) e por Lahiri; Numberger (1991) com algumas modificações

Para a amplificação do DNA, um par de oligonucleotídeos para o gênero *Leishmania* spp foi usado de acordo com Rodgers et al. (1990): 13A 5'-dGTG GGG GAG GGG CGT TCT-3' e 13B 5'-dATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3', para gerar um fragmento de DNA com 120 pares de base (pb). A mistura da reação consistiu de 1 U de Platinum® Taq polimerase (Invitrogen), 15,25 µL de água ultra pura e tampão para PCR, 1X (1,5 mM MgCl₂), 0,31 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,26 µM de primer "Forward", 0,26 µM de primer "Reverse" e 2,5 µL de extrato de DNA extraído do sangue total ou do suabe conjuntival. Cada reação foi sujeita a 34 ciclos em um termo ciclador, com a quantidade de DNA variando de 50 a 300 ng, em volume final de 25µL. Controles positivos foram amostras de DNA de *Leishmania* extraído de *L. infantum* em meio de cultura (NUNES et al., 2007). Os controles negativos foram amostras de DNA extraído de suabes sabidamente negativos. Produtos amplificados foram sujeitos à eletroforese em gel de agarose a 2%. Brometo de etidium foi utilizado para a visualização da reação em trans-iluminador e esta foi fotografada com uma câmera digital Cyber-shot 7.2 Mega pixels DSC-W70 - SONY.

3. 8 Levantamento do Vetor Flebotomíneo (*Lu. longipalpis*)

O levantamento de flebotomíneos (*Lu. longipalpis*) foi realizado na área rural do Cinturão Verde, Ilha Solteira, SP, utilizando-se a armadilha luminosa do tipo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*), onde foram colocadas em 12 pontos distintos, das 17 às 07 horas, três vezes consecutivas/mês, durante 12 meses (setembro/2012 a agosto/2013). As armadilhas foram colocadas no peridomicílio, em pontos estratégicos, os mais próximos possíveis dos recintos dos animais previamente definidos. Além disso, as mesmas foram colocadas nas propriedades onde também foram coletadas amostras biológicas dos cães para diagnóstico da LVC. As propriedades estudadas foram selecionadas de acordo com Macedo et al. (2008), pelas características sugestivas ao estabelecimento e manutenção de criadouros de mosquitos, ou seja, aquelas residências que possuíam amplo

peridomicílio, com presença de vegetação abundante, principalmente arbustos, com acúmulo de matéria orgânica no solo, presença de animais domésticos (prováveis fontes de alimento para flebotomíneos) como as aves domésticas. Cada armadilha permaneceu no mesmo local durante 12 meses evitando-se assim interferências nos resultados devido à sazonalidade. A captura iniciou-se em setembro de 2012 finalizando em agosto de 2013.

Os flebotomíneos capturados foram agrupados por armadilhas, e data de captura, e anotados em uma planilha (controle do período de maior incidência do vetor) e posteriormente foram separados quanto ao sexo, e identificados quanto à espécie *Lu. Longipalpis* através de caracteres morfológicos da genitália. Além disso, o material coletado foi também enviado para a Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) de Araçatuba, SP, onde foi analisado por especialistas da área entomológica de vetores para a confirmação de nossos dados. .

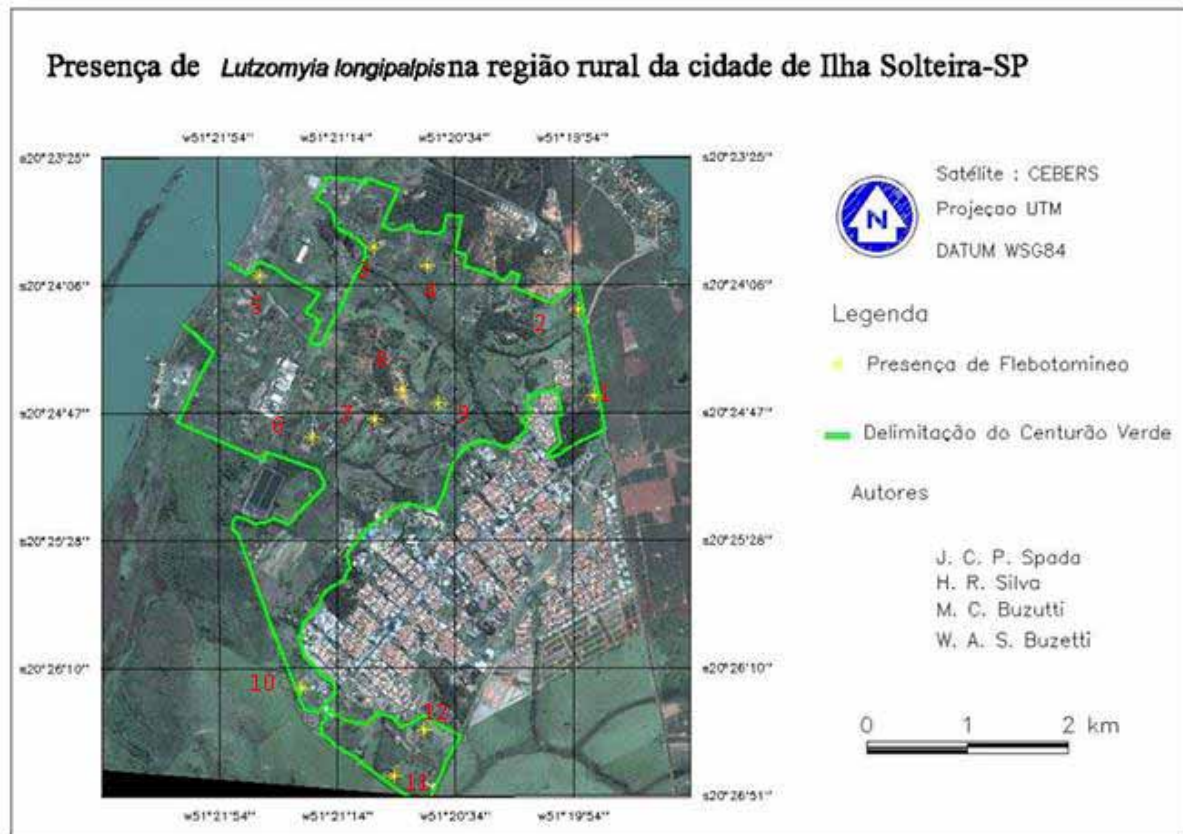
Nas fotos ilustradas na Figura 02, é possível visualizar o tipo de armadilha e o local onde foram instaladas.

Figura 2- Foto ilustrando a localização das armadilhas luminosas CDC para captura da espécie *Lutzomyia longipalpis*, nas propriedades visitadas da área rural “Cinturão Verde” de Ilha Solteira estado de São Paulo. Fonte: Spada, 2014.



Os locais das armadilhas foram identificados com auxílio de aparelho de GPS e um mapa foi elaborado pelo Laboratório de Geoprocessamento da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (SPADA et al., 2013), mostrando os 12 pontos onde as mesmas foram instaladas. A Figura 03 mostra a localização dos pontos onde as armadilhas luminosas foram colocadas na área rural do Cinturão Verde. Os locais visitados foram numerados de 01 a 12 (1= ZOO; 2 = PERI; 3 = PRES; 4 = FUNDO; 5 = RIO; 6 = PAS; 7 = ASSOC; 8 = APAISA; 9 = LOT 1; 10 = CLUBE; 11 = TUNESP E 12 = RM). As marcações amarelas significam as propriedades positivas pelo encontro da *Lu longipalpis*, ou seja, 100% delas, que em algum momento foram detectadas a presença desses insetos vetores.

Figura 3- Locais de instalação das armadilhas luminosas do tipo CDC para a captura da do vetor flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* na área rural do Cinturão Verde de Ilha Solteira. Fonte: Spada et al. (2013).



Variáveis ambientais como precipitação pluviométrica, umidade e temperatura foram obtidas a partir de sensores instalados na Estação Agrometeorológica operada pela UNESP, Campus de Ilha Solteira.

3. 9 Levantamento de Dados para a Análise dos Fatores de Riscos.

Durante as coletas de materiais biológicos dos cães, foi aplicado um questionário para os proprietários ou tratadores dos cães, constando identificação do animal e histórico e observações do ambiente, juntamente com o termo de consentimento dos responsáveis pelos animais (Apêndice 8.1). O questionário com as informações dos proprietários e a observação do ambiente foi importante para a elaboração das planilhas a serem utilizadas na análise dos fatores de riscos da LVC da área em estudo. O questionário foi com base no modelo elaborado por Nunes et al. (2007) com algumas adaptações (Apêndice 8.2).

3.10 Aspectos Éticos

Esse estudo teve seu conteúdo apresentado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da Faculdade de Engenharia da UNESP de Ilha Solteira, em reunião ordinária realizada em 09 de maio de 2011, sob o número Protocolo Nº 002/2011/CEUA.

3. 11 Análise Estatística

Para identificar os fatores de riscos associados à ocorrência da LVC em cães domésticos nas propriedades do Cinturão Verde de Ilha Solteira, SP, foi realizada a análise univariada empregando-se o teste de Qui-quadrado e o teste exato de Fisher, buscando selecionar as variáveis relacionadas com a incidência da doença (significância $p \leq 0,05$). Assim, as variáveis independentes investigadas foram aquelas obtidas das respostas dos questionários (Apêndice A) aos proprietários e à observação do ambiente e a presença de flebotomíneos. A variável

dependente foi a positividade dos cães para LVC. Dessa forma, foram elaboradas três planilhas, uma foi com dados dos cães (idade, sexo, etc), outra com dados do ambiente (vegetação, outras espécies de animais, etc) e finalmente outra para avaliar conhecimento dos proprietários a cerca da LVC. Essas análises foram realizadas no programa R versão 2.15.3 (R CORE TEAM, 2013).

Os métodos diagnósticos foram submetidos à análise estatística usando também o programa R versão 2.15.3 (R CORE TEAM, 2013). O índice de concordância entre os métodos foram avaliados dois a dois de acordo com o índice Kappa no intervalo de confiança de 95% e ao nível de significância de 5%, sendo classificados de acordo com Landis Junior e Koch (1977), em: valor de Kappa $\kappa < 0.19$ como concordância baixíssima, $0.20 \geq \kappa \leq 0.39$, como baixa; $0.40 \geq \kappa \leq 0.59$, como moderada, $0.60 \geq \kappa \leq 0.79$, como boa e $0.80 \geq \kappa \leq 1.0$, como excelente.

Para analisar a associação entre a positividade dos cães frente aos diferentes testes diagnósticos (RIFI, ELISA, PCR e parasitológico) dentro do grupo sintomático e assintomático, utilizou-se a análise estatística do método Qui-quadrado de Pearson e teste exato de Fisher com nível de significância de 5% usando o programa R (R CORE TEAM, 2013).

4 RESULTADOS

4. 1 Sinais Clínicos

Para esse estudo, foram visitadas 104 propriedades rurais da área do Cinturão Verde de Ilha Solteira, onde se coletou sangue e aspirado de linfonodos de 250 cães e suabe conjuntival de 240 cães.

Na ocasião da coleta de sangue de material biológico, esses animais foram examinados clinicamente e classificados de acordo com os sinais clínicos evidentes para LVC em sintomáticos e assintomáticos. Dessa forma, 58/250 (23,2%) animais apresentaram pelo menos um sinal clínico e assim foram classificados em sintomáticos. Esses sinais clínicos foram caracterizados como caquexia, alterações dermatológicas, como alopecia, lesões dérmicas ulcerativas, descamações, crostas, enfartamento ganglionar, lesões perioculares e oculares e onicogribose. A Figura 04 ilustra cães positivos com LVC com alguns dos sinais clínicos citados acima. Dos cães examinados, 192/250 (76,8%) não manifestavam qualquer sintomatologia clínica sugestiva de LVC e assim classificados como assintomáticos.

Figura 4- Cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral, apresentando sinais clínicos, como alopecia em região frontal (A), magreza extrema (B), onicogrifose (C) e sem sinais clínicos (D) . Cinturão Verde, Ilha Solteira, SP, 2014. Fonte: Spada (2014).



4. 2 Métodos Diagnósticos

4. 2. 1 Exame Parasitológico Direto

Constatou-se que dos 250 cães avaliados, 63/250 (25,2%) encontravam-se positivos, apresentando formas amastigotas de *L. infantum* dentro do citoplasma das células mononucleares (macrófagos) ou, ainda, algumas foram visualizadas dispersas e livres fora das células.

Na Tabela 01 há uma relação de cães positivos e negativos ao exame parasitológico de acordo com seu quadro clínico (sintomático ou assintomático) direto. Como pode ser observado, embora o maior índice de prevalência de cães negativos encontrava-se no grupo dos cães assintomáticos 166/192 (66,4%), havia cães assintomáticos positivos e sintomáticos negativos, com cães assintomáticos positivos 26/192 (13,5%) em menor quantidade do que cães sintomáticos positivos 37/58 (63,8%).

Tabela 1- Número (N) e porcentagem (%) de cães positivos e negativos ao exame parasitológico direto (PA) de acordo com a classificação em sintomáticos e assintomáticos. Cinturão Verde, Ilha Solteira, SP, 2014.

Número (N) e porcentagem (%) de cães positivos e negativos ao exame parasitológico direto de acordo com o sinal clínico					
Método	Sintomáticos (N = 58)		Assintomáticos (N = 192)		Positivos (Total) N = 250
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
PA	37 (63,8)	21 (36,2)	26 (13,5)	166 (66,4)	63 (25,2%)

PA= Exame parasitológico direto

4. 2. 2 Métodos Sorológicos

Para os exames sorológicos foram coletados amostras de sangue sem anti-coagulante para obtenção do soro de 250 cães da área rural do Cinturão Verde de Ilha Solteira, SP e foram efetuados dois métodos, O ELISA indireto utilizando-se o antígeno solúvel bruto e a reação de RIFI.

4. 2. 2. 1 ELISA indireto e RIFI

O exame sorológico ELISA indireto foi realizado em duas etapas, inicialmente coletou-se amostras sanguíneas de 161 e em seguida de 89 cães e dessa forma, as padronizações do ELISA dessas duas amostragens foram realizadas separadamente. Dessa forma, os pontos de corte foram diferentes nessas duas análises e os resultados do ELISA dos soros de referência negativa para a padronização do ELISA e o cálculo do ponto de corte, segundo a metodologia já descrita, podem ser visualizados na Tabela 02 e Tabela 03, respectivamente. O ponto de corte foi calculado como sendo no valor DO de 0,263 e $NE \geq 2$ (intervalo da DO de 0,264 - 0,355) para os primeiros 161 cães. Para os outros 89 cães o ponto de corte foi calculado como sendo o valor DO de 0,3802 e $NE \geq 3$ (intervalo da DO de 0,348 - 0,469). Já os valores dos Níveis ELISA (NE) estão nas Tabelas 4 e Tabela 5, respectivamente para a primeira e segunda padronização do ELISA.

Tabela 2- Resultado da análise dos soros de referência negativa pelo ELISA (N= 161 cães).

Identificação dos Cães	Absorbância (D.O.) dos soros de referência negativa		
	DO 01	DO 02	Média
Cão 01	0,178	0,180	0,179
Cão 02	0,087	0,079	0,083
Cão 03	0,100	0,140	0,120
Cão 04	0,120	0,115	0,118
Cão 05	0,048	0,044	0,046
Cão 06	0,110	0,062	0,086
Média Geral			0,105
Desvio Padrão			0,0451

Tabela 3- Resultado da análise dos soros de referência negativa pelo ELISA (N= 89 cães).

Identificação dos Cães	Absorbância (D.O.) dos soros de referência negativa		
	DO 01	DO 02	Média
Cão 01	0,168	0,13	0,149
Cão 02	0,168	0,197	0,1825
Cão 03	0,152	0,145	0,1485
Cão 04	0,14	0,117	0,1285
Cão 05	0,152	0,152	0,152
Cão 06	0,168	0,13	0,149
Média Geral			0,1521
Desvio Padrão			0,0193

Tabela 4- Níveis ELISA¹ (NE¹) relacionados à primeira amostragem (N=161 cães)

Níveis ELISA1 (NE1)	
NE	Intervalo
0	0,195
1	0,196 - 0,263
2	0,264 - 0,355
3	0,356 - 0,479
4	0,480 - 0,647
5	0,647 - 0,874
6	0,875 - 1,180
7	1,181 - 1,593
8	1,594 - 2,151
9	2,152 - 2,904

N= 161 cães. Ponto de corte: NE $\geq$ 2

Tabela 5- Níveis ELISA² (NE²) relacionados à segunda amostragem (N= 89 cães)

Níveis ELISA (NE)	
NE	Intervalo
0	0,191
1	0,192 - 0,257
2	0,258 - 0,347
3	0,348 - 0,469
4	0,470 - 0,634
5	0,635 - 0,855
6	0,856 - 1,155
7	1,156 - 1,559
8	1,560 - 2,105
9	2,106 - 2,842

N= 89 cães. Ponto de corte: NE $\geq$ 3

Do total de 250 cães examinados no Cinturão Verde, 72/250 (28,8%) encontravam-se sorologicamente positivos com anticorpos anti-*Leshmania* pelo ELISA, dos quais, 55/161 (34,2%) na primeira etapa das amostragens e 17/89 (19,10%) na segunda (Tabela 06). A Figura 05 e a Figura 06 demonstram a distribuição em número desses animais positivos de acordo com os níveis ELISA, respectivamente para a primeira e a segunda amostragem. No primeiro, nota-se que a maioria dos cães positivos encontrava-se no nível NE= 3 (13/55, 23,6%) seguidos pelos níveis 2, 7, 5, 4 e 6. Já na segunda amostragem (Figura 06) a maioria encontrava-se positivo no nível NE= 5 (7/17; 41,17%), seguidos pelos níveis 3, 4 e 6.

Tabela 6- Resultado do exame ELISA indireto em cães do Cinturão Verde, Ilha Solteira, SP, 2014.

Números (N) e Porcentagens (%) de Cães Positivos						
Método	N = 161		N = 89		Total	
ELISA	N	%	N	%	N	%
	55	34,2	17	19,10	250	28,2

Figura 5- Número de cães positivos ao ELISA indireto de acordo com os níveis ELISA (NE) e o ponto de corte ≥ 2 , Ilha Solteira, SP, 2014 (N= 161).

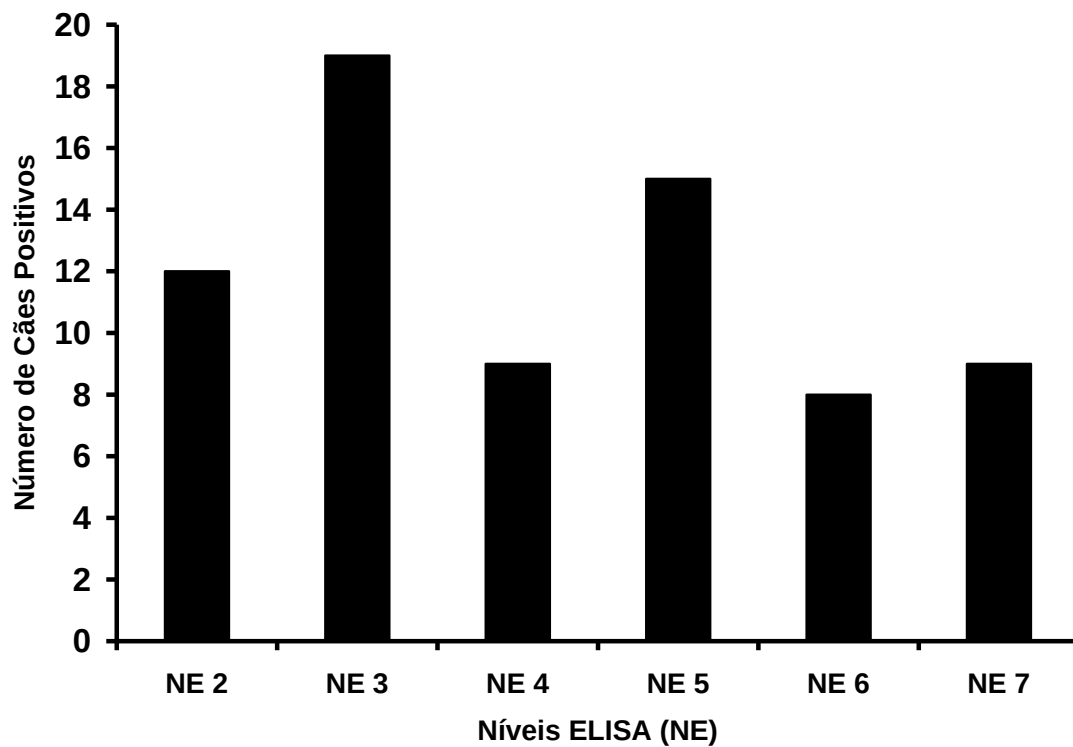
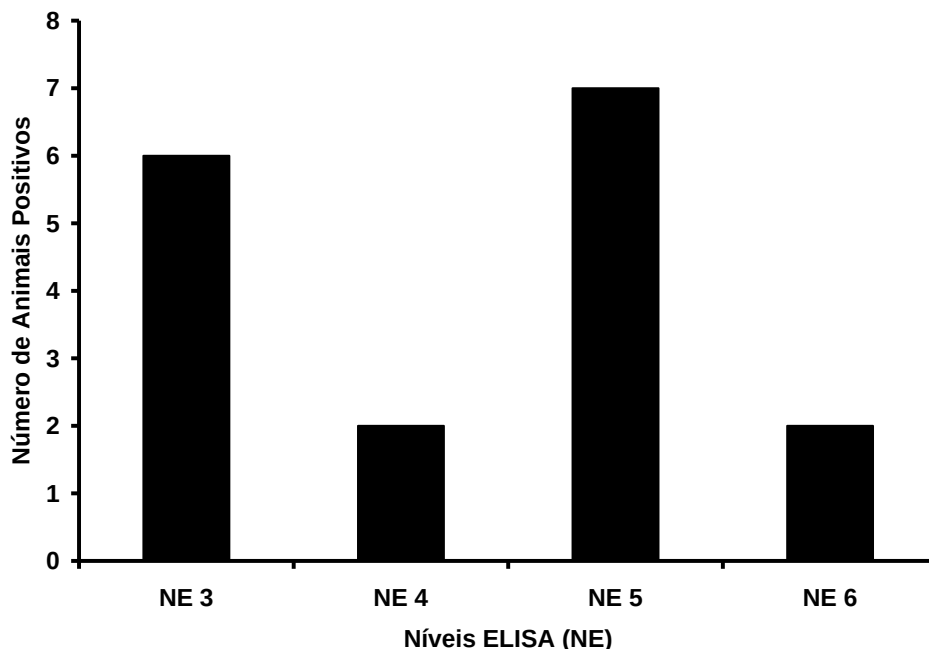


Figura 6- Número de cães positivos ao ELISA de acordo com os níveis ELISA (NE) ao ponto de corte $N \geq 3$, Ilha Solteira, SP, 2014. (N= 89).



A RIFI foi realizada utilizando-se lâminas preparadas a partir de promastigotas mantidas em meio de cultura e o ponto de corte foi estabelecido em 1/40. Dos 250 cães procedentes do Cinturão Verde, 79 deles (31,6%) mostraram-se positivos pela RIFI e 72 (28,8%) pelo ELISA indireto (Tabela 07).

A Tabela 08 apresenta uma relação de cães positivos e negativos de acordo com seu quadro clínico (sintomático ou assintomático) e o exame sorológico realizado. Como pode ser observado, embora o percentual de cães negativos encontrasse no grupo dos cães assintomáticos tanto para ELISA (150/192; 78,1%) como para RIFI (146/192, 76,0%), havia cães assintomáticos positivos e sintomáticos negativos para ambos os exames realizados, mas com cães assintomáticos positivos (21,9% e 23,9%) em menor quantidade do que cães sintomáticos positivos (51,7% e 56,8%) para ELISA e RIFI, respectivamente.

Tabela 7- Número (N) e porcentagem (%) de cães positivos e negativos para LVC de acordo com os métodos sorológicos utilizados (ELISA indireto ou RIFI). Cinturão Verde de Ilha Solteira, SP, 2014

Número (N) e porcentagem (%) de cães positivos e negativos para LVC		
Resultado	ELISA	RIFI
	N (%)	N (%)
Positivos	72 (28,8)	79 (31,6)
Negativos	178 (71,2)	171 (68,4)
Total	250 (100)	250 (100)

Tabela 8- Número (N) e porcentagem (%) de cães positivos e negativos aos métodos sorológicos ELISA indireto e RIFI de acordo com a classificação em sintomáticos e assintomáticos. Cinturão Verde, Ilha Solteira, SP, 2014.

Número (N) e porcentagem (%) de cães positivos e negativos aos métodos ELISA e RIFI					
Sinal Clínico	Sintomáticos (N = 58)		Assintomáticos (N = 192)		Positivos N = 250
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	
Métodos	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
ELISA	30 (51,7)	28 (48,3)	42 (21,9)	150 (78,1)	72 (28,8)
RIFI	33 (56,9)	25 (43,1)	46 (23,9)	146 (70,1)	79 (31,6)

4. 2. 3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4. 2. 3. 1 PCR do suabe conjuntival

Para o diagnóstico do exame PCR de suabe conjuntival, foram utilizados 240 cães provenientes do Cinturão Verde, município de Ilha Solteira, SP. Após a realização desse exame, constatou que dos 240 cães, apenas 49 deles (20,42%) mostraram-se positivos.

Na Tabela 09 há uma relação de cães positivos e negativos de acordo com seu quadro clínico (sintomático ou assintomático) e o exame PCR de suabe conjuntival. Como pode ser observado, embora o maior índice de cães negativos estivesse no grupo dos assintomáticos 143/182 (78,6%), havia cães assintomáticos positivos e sintomáticos negativos, mas com cães assintomáticos positivos 39/182 (21,4%) em maior quantidade do que sintomáticos positivos 10/58 (17,2%).

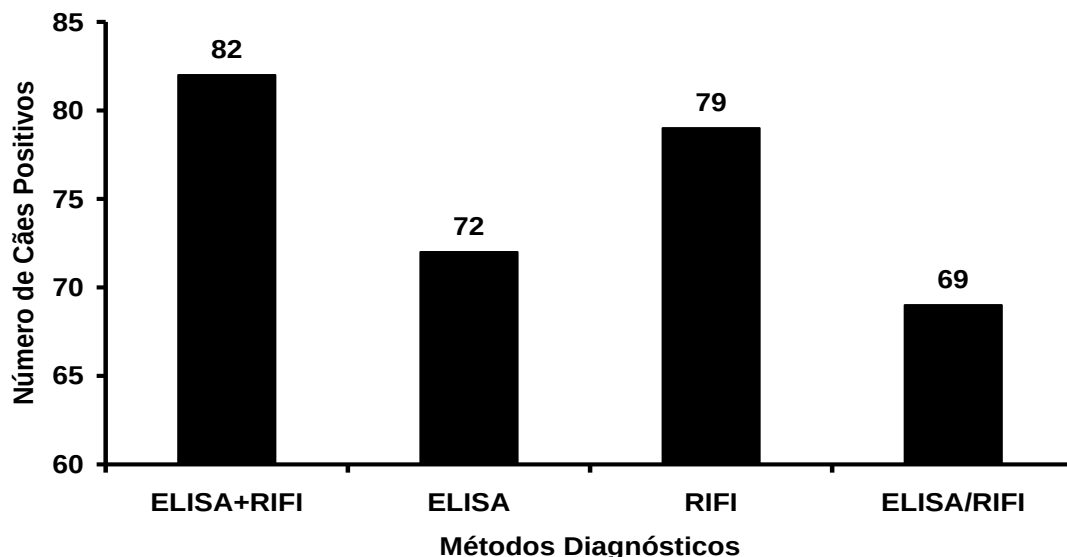
Tabela 9- Número (N) e porcentagem (%) de cães positivos e negativos ao exame de PCR de suabe conjuntival de acordo com a classificação em sintomáticos e assintomáticos. Cinturão Verde, Ilha Solteira, SP, 2013.

Número (N) e porcentagem (%) de cães positivos e negativos ao exame de PCR de suabe conjuntival					
Sinal Clínico	Sintomáticos (N = 58)		Assintomáticos (N = 182)		Positivos (Total) N =240
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	
Método	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
PCR	10 (17,2)	48 (82,8)	39 (21,4)	143 (78,6)	49 (20,4)

4. 2. 4 Análise Comparativa entre os Métodos Diagnósticos Utilizados.

A Figura 07 ilustra o resultado da comparação entre os dois testes sorológicos (ELISA e RIFI). Assim, verificou-se que os cães positivos isoladamente ou pelo método ELISA indireto ou pela RIFI (ELISA + RIFI) foi de 82/250 (32,8%). Já o resultado simultâneo de positivos (concordantes positivos) foi de 69/250 (27,6%). O número de concordantes negativos foi de 168 (67,2%). O resultado dos dois testes divergiu em apenas 13 animais (5,2%), significando um alto índice de concordância entre os dois métodos e maior confiabilidade nessas duas técnicas diagnósticas utilizadas. Dos 13 animais em que os testes sorológicos foram discordantes, 10 eram positivos pela RIFI (dos quais, 5 deles foram positivos também pelo PA e 1 pela PCR, mas 4 somente na RIFI) e somente 3 pelo ELISA; 2 confirmados pelo PA e 1 pelo PCR e PA conjuntamente.

Figura 7- Número total de cães positivos isoladamente no ELISA indireto ou na RIFI (ELISA + RIFI), somente para ELISA, somente para RIFI e simultâneos para ELISA x RIFI (N= 250 cães).



A Figura 08 mostra os dados comparativos dos exames sorológicos (SORO), RIFI ou ELISA com o parasitológico (PA). Quando se faz a comparação SORO + PA, observa-se que 97/250 (38,8%) dos animais foram positivos em um ou outro teste. Desses animais, 82/250 (32,8%) eram positivos somente para o teste SORO e 63/250 (25,2%) eram positivos somente pelo teste PA. Por outro lado, 48/250 (19,2%) animais eram positivos simultaneamente para ambos os testes (SORO/PA), porém, com discordância de 49 animais (19,6%) entre esses dois testes. Além disso, 153 (61,2%) animais foram simultaneamente negativos por SORO e PA.

A Figura 09 ilustra a quantidade de animais positivos, comparando o resultado dos exames sorológicos (SORO) com o suabe conjuntival (PCR-suabe) para o resultado de 240 animais. Quando se fez a comparação SORO + PCR-suabe, observou-se que 108 (45%) dos animais eram positivos em um ou em outro teste, sendo que 78 (32,5%) desses animais eram positivos somente aos testes SORO e 49 (20,4%) somente à PCR-suabe. Além disso, 22 (9,2%) animais eram positivos simultaneamente em ambos os testes (SORO/PCR-suabe). O grau de discordância entre esse dois teste foi de 86 (35,8%). O número concordantes negativos na comparação desses dois métodos foi de 132 (55%) de cães.

A Figura 10 mostra uma análise comparativa entre o resultado dos exames PCR de suabe conjuntival (PCR-suabe) e o parasitológico (PA), tomando-se como base 240 cães. Quando se faz esta comparação, observa-se que 92 (38,3%) dos animais eram positivos em um ou no outro teste (PCR-suabe + PA), onde 49 (20,4%) desses animais eram positivos no teste PCR-suabe e 62 (25,8%) no teste PA. Desses animais, 19 (7,9%) eram positivos simultaneamente para ambos os testes (PCR-suabe/PA). O grau de discordância foi de 73 (30,4%) animais. Os animais negativos simultaneamente nos dois métodos foram de 148 (61,7%).

Finalmente, com base nos quatro métodos estudados, 79/250 (31,6%); 72/250 (28,8%); 63/250 (25,2%) e 49/240 (20,4%) dos cães, foram respectivamente positivos para RIFI, ELISA, PA e PCR-suabe. Além disso, 114/250 (45,6%) dos cães não mostraram-se positivos em nenhum método, mas 18,8%, 15,6%, 12,8% e 5,6% dos animais foram positivos em pelo menos um, dois, três e quatro métodos respectivamente.

Figura 8- Número de cães positivos pela sorologia (SORO) e pelo parasitológico (PA); ou seja, SORO + PA, somente SORO ou PA e simultâneos (SORO/PA). (N= 250 cães).

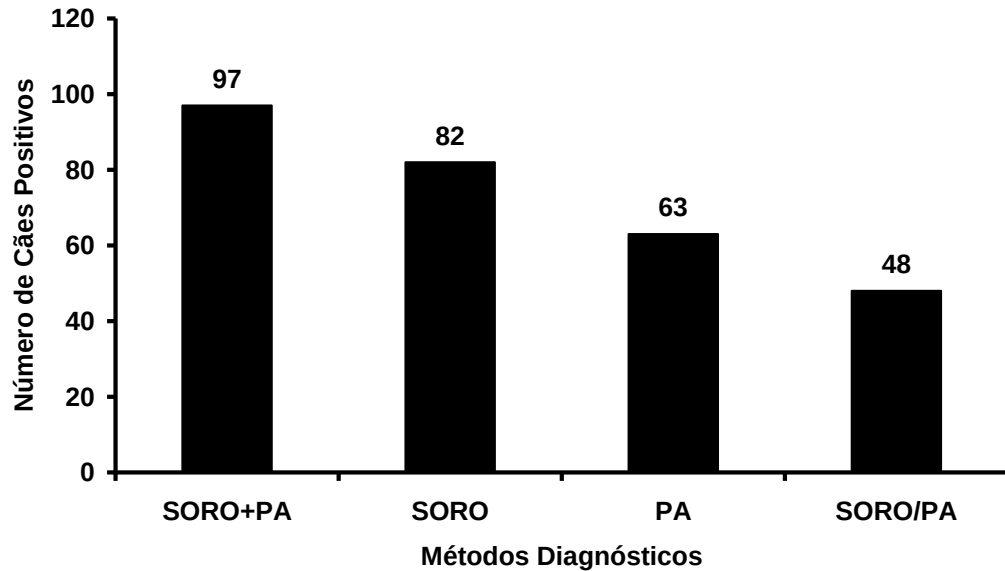


Figura 9- Número total de cães positivos pela sorologia (ELISA e/ou RIFI) + PCR-suabe, somente pela sorologia ((SORO) ou pelo PCR-suabe e simultâneo pela sorologia x PCR-suabe.(N= 240 cães).

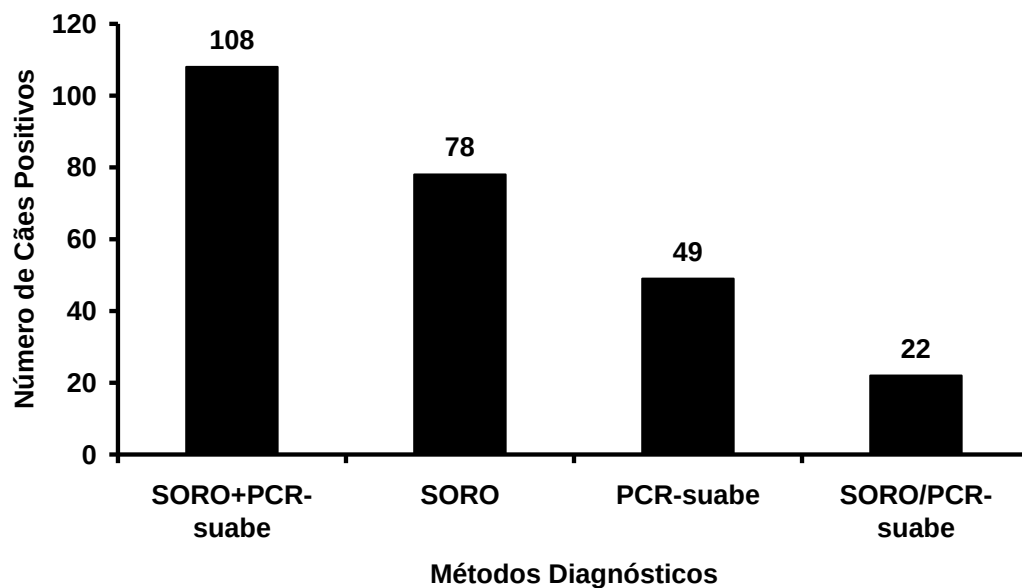
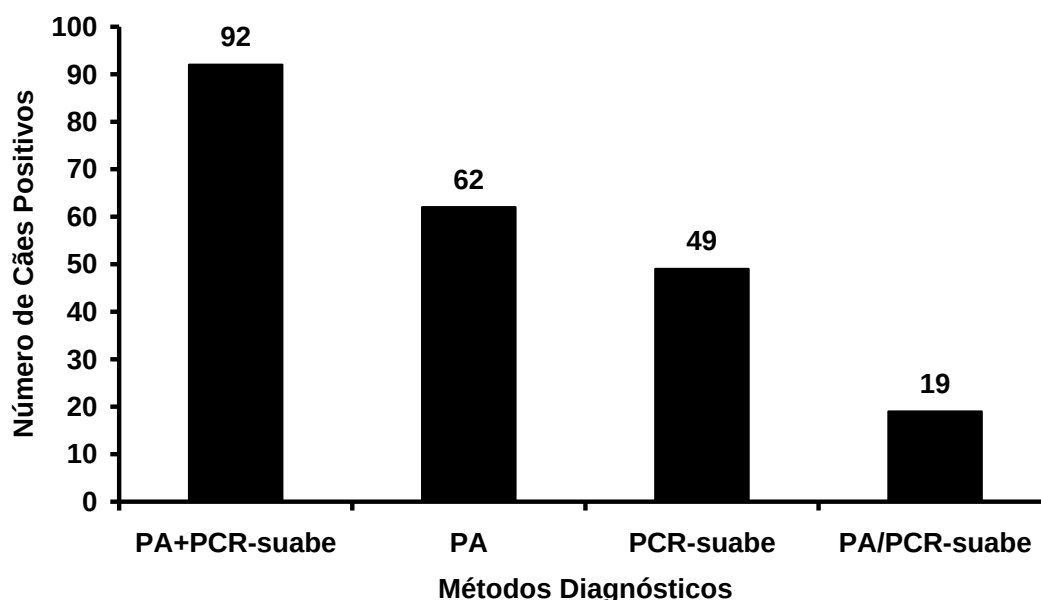


Figura 10- Número total de cães positivos (PCR-suabe + PA), somente pela PCR-suabe e PA e simultâneos pelos métodos PCR-suabe x PA.(N= 240 cães).



Na Tabela 10, estão os dados da análise estatística comparativa dos diferentes métodos diagnósticos usados na presente pesquisa (ELISA, RIFI, PCR do suabe conjuntival e PA) quando comparados dois a dois, de acordo com o índice Kappa, ao nível de 5% de significância. Essa análise foi realizada tanto para o grupo sintomático quanto para o assintomático, embora não houvesse diferença significativa no resultado comparativo entre ambos os grupos. O resultado mostrou uma excelente concordância entre os dois métodos sorológico (ELISA x RIFI) com 94,5% e $k = 0,8706$ de concordância. A análise comparativa entre os dois testes sorológicos e o parasitológico foi considerada de concordância moderada: ELISA x PA (81,7%; $k = 0,5362$) e RIFI x PA (78,3%; $k = 0,5013$). No entanto, quando se comparou o resultado do exame PCR do suabe conjuntival em relação aos outros testes, o nível de concordância foi baixíssimo, ou seja, variando de $\kappa = 0,0361$ a $k = 0,1480$, tanto no grupo sintomático como no assintomático (Tabela 10).

Tabela 10- Análise comparativa (dois a dois) dos métodos de diagnóstico para LVC em cães (número/porcentagem; N^o./%): ELISA indireto; RIFI; parasitológico (PA) e PCR (suabe), realizado em um total 240 cães classificados em assintomáticos (A) e sintomáticos (S), da área rural denominada Cinturão Verde do município de Ilha Solteira, SP.

Relação de concordâncias entre os métodos de diagnóstico analisados dois a dois (números /%)					
Técnicas		A (N = 182)	S (N = 58)	Índice Kappa (κ)	Total (N = 240)
ELISA x RIFI	P	36/19,78	29/50,00	0.8706	65/27,08
	N	138/75,82	24/41,38		162/67,50
	D	8/4,4	05/8,62		13/5,42
	T	182/100	58/100		240/100
	κ	0.8268	0.8719	Excelente	
ELISA x PCR	P	11/6,04	06/10,34	0.0699	17/7,08
	N	116/63,74	24/41,38		140/58,33
	D	55/30,22	28/48,28		83/34,59
	T	182/100	58/100		240/100
	κ	0,0941	0.0558	Baixíssima	
ELISA x PA	P	17/9,24	26/44,83	0.5362	43/17,92
	N	136/74,73	17/29,31		153/63,75
	D	29/15,93	15/25,86		44/18,33
	T	182/100	58/100		240/100
	κ	0.4483	0.4778	Moderada	
RIFI x PCR	P	11/6,04	06/10,34	0.0361	17/7,08
	N	112/61,54	21/36,21		133/55,42
	D	59/32,42	31/53,45		90/37,50
	T	182 / 100	58/100		240/100
	κ	0.0635	0,0196	Baixíssima	
RIFI x PA	P	16/8,79	28/48,28	0.5013	44/18,33
	N	128/70,33	16/27,59		144/60,00
	D	38/20,88	14/24,14		52/21,67
	T	182/100	58/100		240/100
	κ	0.3689	0.4981	Moderada	
PCR X PA	P	12/6,59	07/12,07	0.1480	19/7,91
	N	130/71,43	18/31,03		148/61,67
	D	40/21,98	33/56,90		73/30,42
	T	182/100	58/100		240/100
	κ	0.2493	0.0363	Baixa/Baixíssima	

*(κ) = Índice Kappa; (P) = Cães Positivos; (N) = Cães Negativos; (D) = Cães Discordantes e (T) = Total N = 240 cães

4. 3 Levantamento de Flebotomíneos

Os dados referentes à captura dos vetores estão apresentados na Tabela 11. Verificou-se que os locais em que os mosquitos foram coletados em maior densidade e/ou quantidades foram a APAISA (Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira) e RIO (local próximo do Rio Paraná), além de outros locais esporádicos, como PAS, FUNDO e CLUBE. Dessa forma, em 12/12 (100%) das propriedades visitadas, constatou-se a presença do mosquito vetor da leishmaniose. A densidade parasitária variou de 01 a 12 machos, com média mensal de 5 ± 4 e 0 a 07 fêmeas, com média mensal de 02 ± 2 , totalizando 65 machos e 25 fêmeas em 12 meses (Tabela 11).

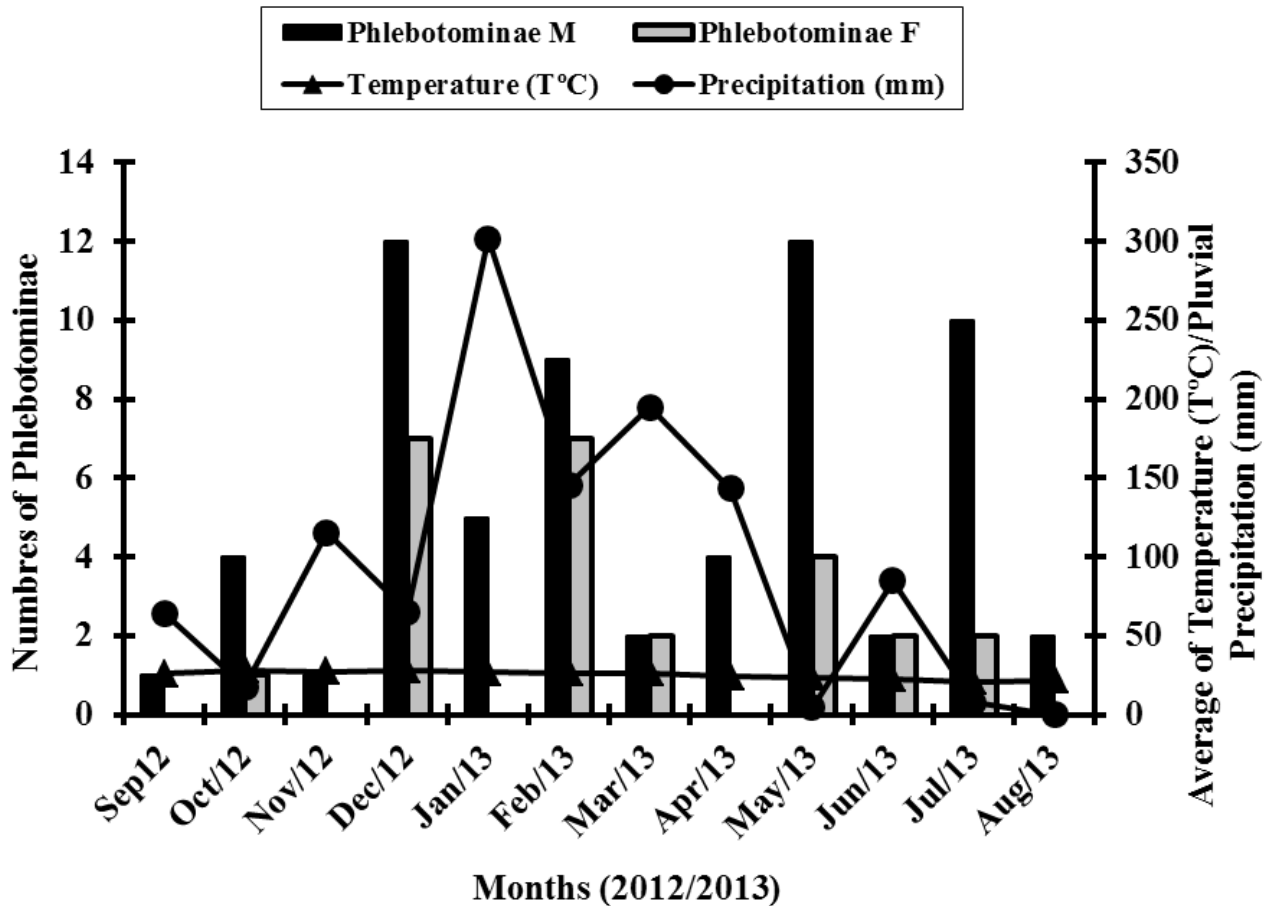
Tabela 11- Relação de flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* (machos e fêmeas) capturados ao longo de 12 meses nas 12 propriedades localizadas na área de Cinturão Verde. Ilha Solteira, SP, 2014.

Mês/Ano	Número de insetos vetores (<i>Lutzomyia longipalpis</i>) coletados mensalmente em 12 propriedades diferentes.												Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Set/12	0	0	0	0	0	0	1M	0	0	0	0	0	1M
Out/12	0	0	0	0	5M 1F	0	0	0	0	0	0	0	5M 1F
Nov/12	0	0	0	0	1M	0	0	0	0	0	0	0	1M
Dez/12	0	0	2M 1 F	0	4M 1F	0	0	5M 5F	0	0	1M	0	12M 7F
Jan/13	0	0	0	0	4M	1M	0	0	0	0	0	1M	6M
Fev/13	0	0	0	2M 2F	5M 3F	0	0	1F	2M	1F	0	0	9M 7F
Mar/13	0	0	0	0	2 M 2 F	0	0	0	0	0	0	0	2M 2F
Abr/13	0	0	0	0	2M	0	0	2M	0	0	0	0	4M
Mai/13	3M	0	2 M	0	7 M 2 F	0	0	1 F	0	0	0	0	12M 3F
Jun/13	1F	0	0	0	2 M 1F	0	0	0	0	0	0	0	2M 2F
Jul/13	0	5M 1F	0	0	4M	1M	0	1F	0	0	0	0	10M 2F
Ago/13	0	0	0	0	1 M	0	0	0	0	0	0	0	1 M
Total	3M 1F	5M 1F	4M 1F	2M 2F	36M 10F	2M	1M	7M 8F	2M	1F	1M	1M	65M 25F

*M=Machos; F= Fêmeas

A Figura 11 ilustra contagem total mensal de insetos da espécie *L. longipalpis* correlacionada com os dados de temperatura média mensal (C°) e precipitação pluvial (mm). Os dados climáticos foram obtidos da Estação Meteorológica da Área de Hidráulica e Irrigação da UNESP-Campus de Ilha Solteira, durante o período de setembro de 2012 a agosto de 2013. É possível observar um aumento no número de *L. longipalpis* nos meses de dezembro/2012, fevereiro/2013, maio/2013 e julho/2013 e declinou levemente nos meses subsequentes (janeiro/2013, março/2013, abril/2013, junho/2013 e agosto/2013). A precipitação máxima foi observada no mês de janeiro (301,7 mm), embora com leve declínio nos meses subsequentes (variando de 143 a 0 mm). Por outro lado, a temperatura média mensal, variou de 28,1°C (mês de outubro/2012) a 22°C (mês de agosto/2013), tendo sido a temperatura máxima de 41,8°C observada no mês de outubro/2012.

Figura 11- Contagem mensal de insetos da espécie *Lutzomyia longipalpis* coletados e identificados na área rural do Cinturão Verde de Ilha Solteira, durante o período de setembro de 2012 a abril de 2013, comparados com dados de temperatura média mensal (C°) e precipitação pluviométrica (mm). Dados climáticos obtidos da Estação Meteorológica da Área de Hidráulica e Irrigação da UNESP-Campus de Ilha Solteira.



4. 4 Avaliação dos Fatores de Risco

Nas Tabelas 12, 13 e 14 estão as informações obtidas durante as visitas nas propriedades rurais da área do Cinturão Verde de Ilha Solteira, nas quais, foram aplicados questionários respondidos pelos proprietários e pelas observações diretas do ambiente, para se conhecer possíveis fatores que poderiam estar associados aos riscos dos animais contraírem a LVC. Dessa forma, para ser mais didática a análise da coleta de informações, ficou decidido dividir os questionários em três partes. As variáveis relacionadas ao cão (raça, porte, idade, procedência, etc.), podem ser visualizadas na Tabela 12, as variáveis relacionadas ao ambiente (coleta de lixo, material orgânica presente, vegetação, outros animais, etc) estão representadas na Tabela 13 e as informações referentes ao conhecimento do proprietário sobre essa enfermidade estão na Tabela 14.

De todas as variáveis relacionadas ao cão, somente aquela referente ao porte do animal, revelou diferença e foi estatisticamente significativa pela análise de associação univariada ($P= 0,01254$). Assim, o animal de porte grande, seria o mais susceptível à doença, quando comparado aos animais de porte médio ou pequeno, sendo, portanto, uma característica que influenciaria a presença da doença na área estudada.

As demais variáveis listadas na Tabela 12 e descritas a seguir não foram estatisticamente consideradas de risco quanto à susceptibilidade à LVC. A maioria dos cães era proveniente de Ilha Solteira (83,6%) e de raça não definida (SRD) (71,2%) seguida da raça Pintcher (9,6%) e os de raças: Pastor Belga, Pastor Alemão e Boxer (2,4%). As demais raças variaram de 0,8% a 2,5% apenas. A maioria dos cães era adulta, ou seja, com idades superiores a um ano (80,0%), seguidos pelos que se encontravam entre seis meses e um ano de idade (14,8%) e abaixo de seis meses 13 (5,2%). Quanto aos hábitos, a maioria vivia no peridomicílio (98,4%) e não usavam coleira repelente (98,4%). Nenhum relato de vacinação ou tratamento contra LVC assinalado.

Com relação aos hábitos dos cães, 47,6% deles não ficavam presos nas residências, mas perambulam entre as propriedades tanto à noite quanto durante o dia, sem um controle sobre esse fator. Porém, 52,4% eram mantidos

presos por suas famílias em suas propriedades e a grande maioria dos cães (98,4%) dormia fora das casas, no quintal.

Quanto ao ambiente, foram analisadas 15 variáveis que estão listadas na Tabela 13. No entanto, mais uma vez apenas uma variável deu diferença significativa pela análise estatística univariada ao nível de 5% de significância. Essa variável foi a presença de aves, pois havia galinhas em 63,2% das propriedades visitadas ($P= 0,02238$). Mostrando ser outro fator de risco que influenciaria a presença ou a manutenção da LVC no meio rural estudado.

Todas as demais variáveis analisadas não deram diferença estatística no estudo de correlação (Tabela 13). Desses cães, 20,8% encontrava-se em propriedades onde já havia relato de cães eutanasiados por estarem infectados com LVC, mas pelos dados da presente pesquisa, 22,8% dos cães examinados apresentavam sinais clínicos compatíveis com leishmaniose.

Conforme a ilustração da Figura 12, o ambiente, na maioria dos lotes o chão era de terra e sujo 93,6%, com muita matéria orgânica espalhada pelo quintal e com coleta de lixo em 77,2% ou mesmo ausência de coleta de lixo em 22,8% dos lotes visitados onde se encontrava os cães. Além disso, 63,2% dos cães conviviam com aves (galinha), 33,2% com suínos, 32,0% com gatos, 24,0% com equinos e 13,6% com bovinos. A cultura agrônômica mais comum era a plantação de frutas (manga, laranja, banana, entre outras) (22,6%), seguida de tubérculos (mandioca e batata) (22,4%), cereais (milho, feijão) e hortaliças 13,6%. Observou-se que 78,8% dos cães viviam em propriedades que possuíam a presença de matas ou remanescentes de matas.

Na Tabela 14, estão analisadas as variáveis sobre o conhecimento da população a respeito dos perigos da doença LVC aos cães e mesmo aos seres humanos. 60,8% dos cães tinham proprietários que desconheciam que a doença poderia ser transmitida de cães para humanos, fator esse que pela análise univariada, mostrou ter influência nos fatores de riscos para LVC, expressando significância de $P= 0.04869$.

Além disso, 49,2% dos cães possuíam proprietários que desconheciam sobre a presença do vetor na propriedade (49,2%), qual era o vetor transmissor e o seu papel na transmissão da doença, bem como o local de sua criação e reprodução (72,8%). Verificou-se ainda que 27,2% dos cães encontram-se sob a propriedade de pessoas que desconheciam a doença ou que não sabiam como a mesma era transmitida e nem que o cão poderia ser o reservatório da LVC (72,8%). Além disso, 64,4% não sabiam também da importância do mosquito vetor na transmissão da mesma.

Tabela 12- Análise de correlação univariada de variáveis relacionadas aos fatores de riscos associados à soropositividade de cães para Leishmaniose Visceral Canina, com base inerentes ao cão (N = 250 cães) na área de Cinturão Verde. Ilha Solteira, SP, 2014.

Variáveis Cão	Categoria	Total (N = 250)	Positivos (N = 82)	Valor P*
Cidade de Origem	Ilha Solteira	209 (83,6%)	71 (86,6%)	0,1325
	Outra Cidade	41 (16,4%)	11 (13,4%)	
Uso de Coleira Repelente	Não	246 (98,4%)	80 (97,6%)	0,4601
	Sim	4 (1,6%)	2 (2,4%)	
Local Onde Dorme o cão	Intradomicilio	4 (1,6%)	2 (2,4%)	0,4601
	Peridomicilio	246 (98,4%)	80 (97,6%)	
Idade	<6m	13 (5,2%)	3 (3,7%)	0,5018
	6m-1a	37 (14,8%)	10 (12,2%)	
	Adulto	200 (80,0%)	69 (84,1%)	
Porte	Grande	87 (34,8%)	39 (47,6%)	0,01254*
	Médio	95 (38,0%)	25 (30,5%)	
	Pequeno	68 (27,2%)	18 (21,9%)	
Hábito	Preso	131 (52,4%)	37 (45,1%)	0,1074
	Solto	119 (47,6%)	45 (54,9%)	
Raça	Americano	2 (0,8%)	1 (1,2%)	0,4218
	Basset	4 (1,6%)	0 (0,0%)	
	Pastor Belga	6 (2,4%)	3 (3,7%)	
	Boxer	6 (2,4%)	3 (3,7%)	
	Outros	8 (3,2%)	5 (6,1%)	
	Pastor Alemão	6 (2,4%)	3 (3,7%)	
	Pastor Suíço	2 (0,8%)	1 (1,2%)	
	Pincher	24 (9,6%)	6 (7,3%)	
	Pitbull	5 (2,0%)	2 (2,4%)	
	Poodle	4 (1,6%)	0 (0,0%)	
	Rotwailer	5 (2,0%)	1 (1,2%)	
	SRD	178 (71,2%)	57 (69,5%)	
Sexo	Fêmea	105 (42,0%)	28 (34,1%)	0,07879
	Macho	145 (58,0%)	54 (65,9%)	

* Tese do Qui-quadrado (significância $p \leq 0,05$).

Tabela 13- Análise de correlação univariada de variáveis relacionadas aos fatores de riscos associados à soropositividade de cães para Leishmaniose Visceral Canina, com base nos fatores ambientais (N = 250 cães) na área de Cinturão Verde. Ilha Solteira, SP, 2014.

Variáveis	Categoria	Total (N= 250)	Positivo (N = 82)	Valor P *
Relato de cão eutanasiado com a Doença	Não	147 (58,8%)	41 (50,0%)	0,05474
	Sim	52 (20,8%)	22 (26,8%)	
	Não Sabe	51 (20,4%)	32 (23,2%)	
Presença de Gatos	Não	170 (68,0%)	53 (64,6%)	0,4254
	Sim	80 (32,0%)	29 (35,4%)	
Presença de Bovinos	Não	216 (86,4%)	69 (84,1%)	0,4677
	Sim	34 (13,6%)	13 (15,9%)	
Presença de Equinos	Não	190 (76,0%)	58 (70,7%)	0,173
	Sim	60 (24,0%)	24 (29,3%)	
Presença de Suíno	Não	167 (66,8%)	55 (67,1%)	0,9489
	Sim	83 (33,2%)	27 (32,9%)	
Presença de Aves	Sim	158 (63,2%)	60 (73,2%)	0,02238*
	Não	92 (36,8%)	22 (26,8%)	
Coleta de Lixo	Não	57 (22,8%)	20 (24,4%)	0,6754
	Sim	193 (77,2%)	62 (75,6%)	
Presença de Matas	Não	53 (21,2%)	17 (20,7%)	0,8993
	Sim	197 (78,8%)	65 (79,3%)	
Vegetação Diversa	Não	24 (9,6%)	9 (11,0%)	0,606
	Sim	226 (90,4%)	73 (89,0%)	
Cultivo de Cereais	Não	199 (79,6%)	66 (80,5%)	0,8077
	Sim	51 (20,4%)	16 (19,5%)	
Cultivo de Tubérculos	Não	194 (77,6%)	64 (78,0%)	0,9054
	Sim	56 (22,4%)	18 (22,0%)	
Cultivo de Frutas	Não	193 (77,2%)	62 (75,6%)	0,6754
	Sim	57 (22,6%)	20 (24,4%)	
Cultivo de Hortaliças	Não	216 (86,4%)	75 (91,5%)	0,1027
	Sim	34 (13,6%)	7 (8,5%)	
Acúmulo de Matéria Orgânica	Não	16 (6,4%)	8 (9,8%)	0,1298
	Sim	234 (93,6%)	74 (90,4%)	

* Tese do Qui-quadrado (significância $p \leq 0,05$).

Tabela 14- Análise de correlação univariada de variáveis em relação aos fatores de riscos relacionados à soropositividade de cães para Leishmaniose Visceral Canina e ao conhecimento do proprietário sobre a doença (N = 250 cães) na área de Cinturão Verde, Ilha Solteira, SP, 2014.

Variável	Categoria	Total (N =250)	Positivos (N = 82)	P-valor*
Já Houviu falar na doença?	Não	68 (27,2%)	23 (28,1%)	0,8331
	Sim	182 (72,8%)	59 (71,9%)	
Sabe como é adquirida?	Não	182 (72,8%)	61 (74,4%)	0,693
	Sim	68 (27,2%)	21 (25,6%)	
Sabe que pode acometer o homem?	Não	152 (60,8%)	57 (69,5%)	0,04869*
	Sim	73 (39,2%)	25 (30,5%)	
Sabe o papel do cão na transmissão?	Não	182 (72,8%)	63 (76,8%)	0,3172
	Sim	68 (27,2%)	19 (23,2%)	
Já viu o vetor na propriedade?	Não	95 (38,0%)	34 (41,5%)	0,6407
	Sim	32 (12,8%)	10 (12,2%)	
	Não Sabe	123 (49,2%)	38 (46,3%)	
Sabe o papel do vetor?	Não	161 (64,4%)	59 (71,9%)	0,08149
	Sim	89 (35,6%)	23 (28,1%)	

*Teste Qui-quadrado, buscando selecionar as variáveis relacionadas com a incidência da doença (significância $p \leq 0,05$).

A Tabela 15 relaciona a presença do vetor e a positividade dos cães nas propriedades. Pode-se observar que o vetor *L. longipalpis* foi capturado nas 12 propriedades (100%), pelo menos uma vez no mês, durante 12 meses. Porém, 8/12 (66,7%) das propriedades apresentavam cães sorologicamente positivos para LVC, contra 4/12 propriedades (33,3%) que não possuíam cães soropositivos. Quando à análise univariada, o fator presença do vetor e a positividade dos cães, entretanto, não foi significativa ($P = 0,2483$) para a presença de LVC.

Tabela 15- Análise de correlação univariada, relacionada à presença dos mosquitos vetores capturados durante 12 meses em armadilhas instaladas em propriedades localizadas na área rural de Cinturão Verde, no município de Ilha Solteira, SP

Número e % de propriedades em relação à presença do vetor			
	Propriedades com cães soropositivos	Propriedades com presença do vetor	Valor de P*
Sim	8/66,67	12/100	0,2482
Não	4/33,33	0/0	
Total	12/100	12/100	

*Teste do Qui quadrado, com significância ao nível de 5% ($P < 0,05$)

Figura 12- Peridomicílio de propriedades visitadas durante a coleta de material biológico no período de outubro/2012 á janeiro/2013, na área rural do Cinturão Verde de Ilha Solteira. Fonte: Spada (2014).



5 DISCUSSÃO

O município de Ilha Solteira conforme classificação da Superintendência de Controle de Endemias- SUCEN (2006) apresenta transmissão humana e canina e, por isso é recomendada a investigação sorológica de cães em todo o município, além da pesquisa de vetores. No entanto, constatou-se que a região rural do município denominada por Cinturão Verde e localizada no entorno e próxima à área urbana de Ilha Solteira,, local onde foi realizada a pesquisa, não era feita a triagem para a realização de sorologia dos cães como é recomendado pelo Programa de Vigilância e Controle das Leishmanioses. Dessa forma, na tentativa de preencher essa lacuna, realizou-se um levantamento sorológico de casos de LVC e de flebotomíneos vetores dessa doença aos cães, além do conhecimento dos fatores de riscos relacionados à transmissão ou manutenção da doença em cães nessa área rural.

Baseado no fato do cão ser considerado o principal reservatório urbano da doença, e a enzootia canina preceder a ocorrência de casos humanos, além de ter maior prevalência (PARANHOS-SILVA et al., 1998; BRASIL, 2006; ROSALES; YANG, 2006), a identificação, remoção e eutanásia do animal com LV é medida recomendada pelo Ministério da Saúde para o controle da doença (COSTA; VIEIRA, 2001; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001; ALVES; BEVILACQUA, 2004). Dessa forma, é necessário que o diagnóstico seja realizado da melhor forma possível, para que cães com resultados falso-positivos não sejam eutanasiados erroneamente ou que aqueles com resultados falso-negativos permaneçam sendo fontes de infecção no ambiente. Em 2012, os métodos diagnósticos sorológicos da LVC, recomendados pelo Programa de Vigilância e Controle das Leishmanioses, eram o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) como método de triagem e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), (titulação > 1:40) como confirmatório. Mais recentemente, iniciou-se a recomendação do teste rápido imunocromatográfico DPP (“Dual Parth Platform”) como método de triagem, que oferece o resultado em cerca de 20 minutos, sem a necessidade de análise laboratorial e o teste ELISA como confirmatório (BRASIL, 2013). No entanto, Grimaldi Junior et al. (2012) e Quinnell et

al. (2013) detectaram baixa sensibilidade (46-78%) do teste rápido DPP para cães assintomáticos para LVC, demonstrando sua inabilidade para detectar a infecção em cães assintomáticos e dessa forma não o recomendaram para ser usado em programas operacionais de controle da doença. Para o levantamento de casos de LVC e a realização do estudo dos fatores de riscos, na área estudada, embora vários métodos tenham sido estudados, optou-se pelo sorológico (ELISA e RIFI), pela facilidade de execução e disponibilidade em nosso laboratório. Além do mais, pela análise de comparação de métodos pelo índice Kappa, estes dois testes apresentaram índice de concordância considerado alto, ou seja, 94,5% (0,8706) demonstrando grande confiabilidade nos mesmos. Os demais testes utilizados (parasitológico e PCR do suabe conjuntival) foram apenas para uma análise comparativa e complementar ao estudo.

Quando os exames sorológicos foram realizados nos 250 cães do Cinturão Verde, verificou-se a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em 31,6% deles pela RIFI e de 28,8% pelo ELISA. Em outros trabalhos realizados em Ilha Solteira, a soro prevalência dessa doença em cães na área urbana variou de 10 a 14% (PAULAN et al., 2012), em assentamento rural “Estrela da Ilha” de 37,7% (PAULAN et al., 2013) e na Associação Protetora dos Animais (APAISA) de 89% (SILVA et al., 2013).

Durante a coleta de material biológico, os cães foram classificados em sintomáticos e assintomáticos, observando-se que a maioria (76,8%) eram assintomáticos.

No entanto, havia cães assintomáticos sorologicamente positivos e sintomáticos sorologicamente negativos em ambos os testes sorológicos realizados, mas com maior número de cães sintomáticos positivos (51,7% e 56,8%) do que assintomáticos positivos (21,9% e 23,9) para ELISA e RIFI, respectivamente. Com relação ao exame parasitológico PA, 25,2% dos 250 animais apresentou formas amastigotas da parasita nos aspirados de linfonodos, onde a maior positividade, à semelhança do exame sorológico, ocorreu nos animais sintomáticos (63,8%) do que nos assintomáticos (13,5%). De acordo com outros autores, a grande maioria dos cães assintomáticos é negativa nos diferentes testes usados rotineiramente para LVC (ASSIS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2010; QUINNELL et al., 2013). Nesse trabalho, 66,4% a 78,1% dos animais assintomáticos estavam negativos para LVC,

quer seja ao exame parasitológico, quer seja aos sorológicos. De acordo com Ferrer (2002), o número de cães infectados, positivos para LVC, com quadro clínico sintomático é muito maior do que o número de cães portadores de infecções assintomáticas. Entretanto os cães assintomáticos e positivos para LVC, podem ser infectantes para os flebotomíneos numa proporção similar aos sintomáticos (MANNA et al., 2006) e assim igualmente importantes na cadeia epidemiológica da doença.

Em relação ao sorológico (33,2%) o resultado da PCR realizada com suabe conjuntival dos cães apresentou uma positividade inferior, ou seja, de apenas 20,4% (49/240) e interessante, os cães assintomáticos foram os que apresentaram maior positividade (21,4%) do que os sintomáticos (17,2%), mas a diferença não foi estatisticamente significativa. Essa positividade foi levemente superior a obtida por Pereira et al. (2013), ou seja, de 13,1% para PCR do suabe e 13,6% para a RIFI em cães de um inquérito sorológico realizado na área urbana em Ilha Solteira. Já a positividade da RIFI, em nosso trabalho foi de 31,6%, também superior ao de (PEREIRA et al., 2013). Em um estudo realizado por Ferreira et al. (2012), os resultados encontrados para detecção de *L. infantum* em suabe conjuntival foram promissores, pois em cães sintomáticos, a positividade foi de 95% e em assintomáticos de 77,5%, porém cada grupo era composto por 40 cães sabidamente positivos por testes sorológicos e parasitológicos, o que não aconteceu no presente trabalho, onde os animais encontravam-se domiciliados em condições naturais e escolhidos aleatoriamente. Já em outro trabalho a maior positividade da PCR foi em amostra de pele de cães (51%) quando comparadas à da conjuntiva (32%) e medula óssea (17,8%) (SOLANO-GALLEGÓ et al., 2001).

Como nenhuma prova diagnóstica quando testada isoladamente identifica adequadamente os cães infectados com LVC (QUINNELL et al., 2001; NUNES, 2007; ASSIS et al., 2010; SILVA et al., 2014) existe sempre a necessidade da associação de técnicas, pois os resultados dos diagnósticos variam muito com a evolução da doença e com a resposta imune desenvolvida pelo cão e, além disso, o desafio no diagnóstico da LVC continua sendo nos animais do grupo assintomático. Por isso, na presente pesquisa, além dos testes sorológicos, o parasitológico direto e o PCR do suabe conjuntival foram realizados para uma análise comparativa entre esses métodos.

Assim sendo, os métodos sorológicos (ELISA e RIFI), a PCR de suabe conjuntival e o exame parasitológico direto foram comparados, dois a dois, para uma análise estatística de acordo com o índice Kappa ao nível de 5% de significância, sobre o total de 240 cães provenientes do Cinturão Verde. Os dois métodos sorológicos (ELISA x RIFI) apresentaram um excelente índice de concordância (94,5%; $k = 0,8706$), dados esses superiores aos obtidos por Assis et al. (2010) e Silva et al. (2014), ou seja uma concordância variando de 0,72% a 82%. Em acordo com essa pesquisa, a sensibilidade e a especificidade dessas duas provas sorológicas foram relatadas como altas por vários pesquisadores, ou seja variando de 80,4% a 100% (PARANHOS-SILVA et al., 1996; FERRER, 1999; QUINNELL et al., 2001; ALMEIDA et al., 2005; ROSARIO et al., 2005), embora reações cruzadas com doenças causadas por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis* (VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996; ROSÁRIO et al., 2005) tenham sido observadas para o exame RIFI.

Embora o teste PA em linfonodo, na presente pesquisa tenha detectado 33,2% dos cães positivos, na análise comparativa com os dois testes sorológicos, a concordância entre eles foi moderada: ELISA x PA (81,7%; $k = 0,5362$) e RIFI x PA (78,3%; $k = 0,5013$). Esse é um teste sabidamente comprovado ser de alta especificidade, mas baixa sensibilidade, pois depende do grau do parasitismo, do tipo de material biológico coletado, da coloração e do tempo e prática de leitura (GONTIJO; MELO, 2004), onde a sensibilidade do parasitológico foi de 60% em esfregaços de medula óssea e menor do que 30% para aspirados de linfonodos (FERRER, 1999), como efetuado na presente pesquisa. Por isso, esse método não é rotineiramente utilizado nos inquéritos epidemiológicos, mas apenas para suporte no diagnóstico sorológico de rotina ou no acompanhamento de casos suspeitos da doença em clínicas veterinárias, por ser de fácil execução, barato e de rapidez na leitura.

No entanto, quando se comparou o resultado dos animais positivos ao exame PCR do suabe conjuntival com os demais testes (PA ou sorológico) o índice Kappa de concordância foi baixíssimo ($\kappa = 0,0361 - 0,1480$). Esses dados foram discordantes dos de Pereira (2013), que em inquéritos epidemiológicos, observou uma sensibilidade e especificidade da PCR de suabe conjuntival de 58,% e 94,0%

respectivamente. Como a técnica de PCR de suabe conjuntival, é considerada não invasiva, de fácil coleta e bem aceita pelos proprietários, como citado por Pereira (2013), a mesma deve ser incentivada e explorada para novas pesquisas, embora no presente trabalho tenha se mostrado com baixa sensibilidade em detectar animais positivos para LVC.

A importância do vetor na epidemiologia da leishmaniose é o fator que impulsiona os estudos dos flebotomíneos, responsáveis pela transmissão dos protozoários de hospedeiros reservatórios susceptíveis (SARAIVA et al., 2006). Dessa forma, Camargo-Neves et al. (2001) consideraram a necessidade de correlacionar densidade vetorial com os aspectos ambientais. Além disso, as habitações humanas de má qualidade em locais inadequados, a construção desordenada de abrigos de animais domésticos no ambiente peridomiciliar e a carência de condições mínimas de saneamento básico, foram condições consideradas comuns em áreas rurais e periféricas de centros urbanos (MUNIZ et al., 2006) propícias para a criação e manutenção dos criadouros dos vetores transmissores da doença. A área verde denominada “Cinturão Verde” localizada próximo à extensão do perímetro urbano da cidade de Ilha Solteira, conta com aproximadamente 200 famílias e, entre essas, diversas atividades funcionais são exercidas, desde o cultivo de hortaliças à criação de pequenos animais como aves e porcos e ocupa uma área de 880,46 hectares (ha), sendo esta dividida em área de produção agrícola e área de reflorestamento. Segundo Camargo-Neves, et al. (2001), essa área apresenta condições propícias à criação do inseto vetor da LVC, ou seja, resquício ou remanescentes de vegetação nativa e matéria orgânica abundante (presença de vegetação, raízes, troncos de árvores e lixo no solo). Além disso, a presença de animais domésticos no peridomicílio da área estudada pode propiciar excelentes condições bióticas à fauna flebotomínea. Segundo (BRASL, 2006), essa espécie de vetor alimenta-se de uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, como aves, mamíferos silvestres e ou domésticos e até mesmo o homem e há fortes evidências de que a presença de animais domésticos no peridomicílio atrai um grande número de flebotomíneos e contribui para o aumento do risco de transmissão de *Leishmania* spp. Dada à proximidade do Cinturão Verde com o centro urbano de

Ilha Solteira, essa área pode favorecer a disseminação e dispersão do vetor e consequentemente da doença LVC para a cidade.

Pesquisando-se a presença do vetor flebotomíneo da LVC, *L. longipalpis*, durante a coleta mensal no período de setembro de 2012 a agosto de 2013, no Cinturão Verde, constatou-se a presença do mesmo em 12/12 (100%) das propriedades visitadas, em pelo menos em algum mês, durante o ano da pesquisa, comprovando ser essa área propícia à criação do vetor. O local que mais se constatou a presença do vetor, tanto macho como fêmea, foi a propriedade localizada a beira do rio Paraná. Foram capturados 36 machos e 10 fêmeas nesse local. Por esse elevado número de vetores capturados sugere-se que a localização é propícia para a reprodução dos mesmos: piso não pavimentado, sujo, com muito acúmulo de matéria orgânica úmida o ano todo, remanescentes de matas, árvores frutíferas, como jabuticabeiras, mangueiras, laranjeiras, restos de troncos, raízes, animais silvestres e domésticos, como também a presença de galinha para a realização do repasto sanguíneo pelas fêmeas dos insetos. Outro local também bastante propício à criação dos vetores foi a APAISA (Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira), onde se concentra normalmente cães errantes capturados ou entregues pelos proprietários. Nesse local há casos relatados de LVC (SILVA et al., 2014) e foi o segundo lugar em número de vetores coletados.

Analisando-se a curva sazonal de flebotomíneos, com as variações climáticas (temperatura, pluviosidade e humidade), verificou-se neste estudo uma maior abundância desta espécie, após períodos chuvosos. Observou-se um aumento no número de *L. longipalpis* em dezembro/2012, fevereiro/2013, maio/2013 e julho/2013, possivelmente coincidindo com a diminuição da precipitação pluvial nesses meses e declinou levemente nos meses subsequentes (janeiro/2013, março/2013, abril/2013, junho/2013 e agosto/2013), devido possivelmente ao aumento da precipitação pluvial nesses meses, dificultando a captura e as coletas, uma vez que algumas armadilhas ficavam no peridomicílio e sem proteção contra as chuvas. A precipitação máxima foi obtida no mês de janeiro (301,7 mm), embora com leve declínio nos meses subsequentes (variando de 143 a 0 mm). Por outro lado, a temperatura média mensal, não mudou muito nesse período, variando de 28,1°C (mês de outubro/2012) para 22°C (mês de agosto/2013), com temperatura

máxima de 41,8°C obtida no mês de outubro/2012. O que pode ter de fato influenciado na curva de ocorrência dos vetores, seria a precipitação pluvial, pois o aumento da umidade propiciaria a formação/manutenção dos criadouros desses insetos, que preferem a matéria orgânica úmida e quente para a sua reprodução. Araújo et al. (2010) verificaram dados parecidos em diversas regiões do Brasil, onde foi avaliado o aumento da densidade populacional deste vetor durante ou após os períodos de chuva. Já Macedo et al. (2008) verificaram que os flebotomíneos apresentaram uma distribuição sazonal associada aos índices pluviométricos e de umidade, somente durante ao período chuvoso do ano.

No entanto, após a realização da análise estatística univariada para se verificar a associação entre a presença do vetor e a positividade dos cães, essa análise não foi significativa ($P= 0,2483$) para a presença de LVC. Pode se observar que o vetor *L. longipalpis* foi capturado nas 12 propriedades (100%), pelo menos uma vez no mês, durante 12 meses. Porém, 8/12 (66,7%) das propriedades apresentavam cães sorologicamente positivos para LVC, contra 4/12 propriedades (33,3%) que não possuíam cães soropositivos, possivelmente sendo esse o motivo da associação não ser significativa.

A análise dos possíveis fatores de risco associados à soropositividade para leishmaniose visceral foi efetuada através dos dados coletados com os questionários epidemiológicos aplicados aos proprietários dos cães, além da observação *in situ* do ambiente no Cinturão Verde, durante as visitas para coleta de material biológico. Para esse estudo, foram utilizados os resultados dos exames sorológicos ELISA e/ou RIFI para caracterizar o animal como positivo. Bastava o animal ser positivo em apenas um dos testes para ser considerado como soropositivo. Como já discutido anteriormente, o índice de concordância entre esses dois métodos foi excelente e consequentemente também o grau de confiabilidade. Para o estudo da análise dos fatores de riscos foram utilizados amostras de 250 cães.

Com relação ao fator cão, oito variáveis foram analisadas. No entanto apenas uma foi significativa na análise univariada ($p < 0,05$). Essa foi com relação ao porte do animal, ou seja, apenas os animais de porte grande (como por exemplo o Pastor, Rotwailer e outras) estavam correlacionados com susceptibilidade do animal

ser infectado com *Leishmania* ($p= 0,01254$). Dos 82 animais positivos para LVC, 39 (47,6%) se encontravam nesse o grupo. Durante as avaliações epidemiológicas nas regiões sudeste e sul da Espanha, foi observado que a soroprevalência de LVC aumentava gradualmente com o porte do animal sendo esta característica, um fator de risco para a doença (GALVEZ et al. 2010), fato que sustenta nossos resultados. Os cães de médio porte foram os preferidos (38,0%), seguido pelos de grande (34,8%) e de pequeno porte (27,2%), reforçando a hipótese de que por se tratar da zona rural, esses cães além de companhia servem também para guarda da propriedade (SILVA, 1980).

Avaliando os animais presentes no estudo, foi possível verificar que a maioria dos cães dessa área era SRD (71,2%) seguida do Pintcher (9,6%). Na análise univariada dos fatores de riscos, esse grupo de variáveis não apresentou significância ($p= 0.4218$). Borges, Lopes e Dias (2009) verificaram, da mesma maneira, maior frequência de cães SRD, com 46,6% do total de 360 cães examinados. Segundo os autores SOLANO-GALLEGO et al. (2000), todas as raças são susceptíveis à LVC, porém os mesmos definiram o Ibiza Hound, como a mais resistente das raças.

Entre os 250 cães amostrados nesse estudo, havia 145 machos e 105 fêmeas, sendo que a maior positividade para LVC ocorreu também na população de machos 54/82 (65,9%) ao invés das fêmeas 28/82 (34,2%). Esses dados são os mesmos observados por Almeida (2012), no entanto não significou que a doença tivesse predisposição ao gênero. Já Dantas-Torres, Brito e Brandão-Filho (2006), foram os únicos pesquisadores a assinalarem o sexo macho do cão como um fator de risco.

Em relação à idade dos animais, 200 (80,0%) encontravam-se na faixa etária adulta, 37 (14,8%) entre seis meses a um ano e 13 (5,2%) inferior a seis meses. Foi possível observar que a positividade foi maior em animais adultos 69/82 (84,2%), ou seja, acima de um ano de idade. Porém como observado, o maior número de animais encontrava-se acima de um ano na maior parte das propriedades, constatando poucos cães jovens e este dado sugere que havia pouca rotatividade ou reposição de cães nessa área estudada. No entanto, ao contrário de nossa

pesquisa, Batista (2008) verificou uma positividade mais acentuada em cães jovens. Da mesma forma, Moreno e Alvar (2002) constataram que cães com menos de três ou mais de sete anos de idade apresentavam maiores riscos para contrair LVC, sendo o primeiro grupo mais susceptível que o segundo.

Observou-se que durante a noite, dos 82 animais positivos, 2 cães dormiam dentro de casa e 50 no quintal, e que dos 82 cães positivos, 37 ficavam presos e 45 soltos nas propriedades. Batista (2008) observou que o maior número de cães soropositivos possuía habitat semi-domiciliado, justificando pelo fato dos animais estarem no semi-domicílio e mais expostos à ação do vetor. Algumas pesquisas têm demonstrado que cães de áreas endêmicas expostos à noite podem ser picados por centenas de flebotomíneos. Esta exposição contínua pode favorecer a soroconversão e o desenvolvimento da doença, visto que o parasito é continuamente introduzido na pele desses animais (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Quanto ao ambiente, dos 82 animais positivos com LVC, todos conviviam com outros animais (60 com aves, 29 com felinos, 27 com suínos, 24 com equinos e 13 com bovinos). A convivência com outros animais pode aumentar a fonte de alimentação para o vetor e a quantidade de matéria orgânica em ambientes úmidos e sombreados, como chiqueiros e galinheiros favorecendo os criadouros dos flebotomíneos. Na presente pesquisa, a presença de aves (galinhas) em co-habitação com cães, demonstrou ser outro fator de risco que influenciou a presença ou a manutenção da LVC na região rural estudada. Foi observado que dos 82 cães soropositivos, 60 deles conviviam em propriedades que possuíam galinhas ($P=0,02238$). Resultados parecidos foram encontrados por Azevedo et al (2008) onde avaliaram a prevalência da doença em cães em relação à co-habitação com outras espécies; galinhas foi a espécie mais frequente entre os cães positivos, seguida de suínos e equinos. Borges, Lopes e Dias (2009) demonstraram que as aves têm grande potencial em atrair os flebotomíneos, destacando que as galinhas merecem destaque pela sua maior frequência nos domicílios, bem como pelo seu potencial de gerar um ambiente favorável à procriação de flebotomíneos, devido aos resíduos orgânicos produzidos por estes animais. Em outro trabalho, Barboza et al (2009) apesar de observaram a presença de galinhas, suínos e equinos, foi o felino, o mais

presente nas casas de cães soropositivos. Já Nunes (2007), em sua pesquisa não encontrou diferença estatisticamente significativa entre o resultado da sorologia para LVC e a presença de outros animais co-habitando no domicílio urbano.

Mesmo que algumas variáveis analisadas aqui não apresentassem diferença estatística na correlação com os fatores ambientais de risco à leishmaniose algumas delas merecem algum destaque. Verificou-se que 20,8% dos cães amostrados encontravam-se em propriedades com relatos de cães eutanasiados por LVC, significando que a doença está presente nesse meio rural e, que precisa ter uma atenção maior por parte das autoridades sanitárias. Quanto à doença leishmaniose, em nenhuma propriedade houve relato de cães submetidos ao tratamento contra essa doença. Mas pelos dados da presente pesquisa, 26,2% dos cães examinados apresentavam sinais clínicos compatíveis com leishmaniose. Dos 82 cães soropositivos, 20 conviviam em propriedades que não havia coleta seletiva de lixo. Mais recentemente, um estudo transversal realizado em áreas endêmicas de Cuiabá (MT) demonstrou que os cães que viviam em ambiente rural apresentavam risco 1,9 vezes maior de adquirir a infecção dos que aqueles em ambiente urbano (ALMEIDA et al., 2012). Os fatores relacionados aos hábitos dos animais, tais como o livre acesso à rua e função de guarda além da presença de atividade agrícola foram considerados indicadores para prever a infecção por *Leishmania* spp. Os autores Costa et al. (2005) e Moreno et al. (2005) observaram que as más condições de habitação, esgoto a céu aberto, a falta de coleta domiciliar de lixo e o sistema de esgotos irregulares ou ausentes na última década, têm mostrado serem fatores de riscos associados à LV, nas regiões urbanas.

Finalmente, quanto ao conhecimento do proprietário em relação à LVC, verificou-se que 27,2% dos cães encontram-se sob a propriedade de pessoas que desconheciam a doença, que não sabiam como é transmitida (72,8%), da sua gravidade assim como da sua letalidade não só ao seu cão, mas também ao próprio ser humano (60,8%). O fator, desconhecimento da população rural em relação essa doença, mostrou pela análise univariada uma significância capaz de influenciar nos fatores de riscos para a doença, expressando uma significância de $P= 0.04869$. Além disso, grande parte da população rural entrevistada (72,8%) nessa pesquisa assinalou ter desconhecimento sobre o inseto vetor flebotomíneo na transmissão da

leishmaniose e nem que o cão era o principal reservatório doméstico (64,4%). Oliveira et al. (2006) demonstraram uma associação entre LV urbana e renda familiar, após um estudo na região metropolitana de Belo Horizonte, onde as pessoas economicamente carentes tinham menos acesso às informações e consequentemente eram menos esclarecidas. Além disso, quando se relacionou a pergunta sobre o conhecimento da presença do vetor na propriedade, 49,2% dos entrevistados responderam ter total desconhecimento em nosso estudo. Corroborando com a hipótese de que o conhecimento da população sobre LVC é um fator importante na sua prevenção, Moreno et al. (2005) relataram em um estudo realizado na região metropolitana de Belo Horizonte, que a probabilidade da população ser acometida por LVC era seis vezes maior para as pessoas que não conheciam o vetor do que para aquelas que o conheciam.

Esses dados reforçam a hipótese de que as pessoas ainda não possuem conhecimento em relação à doença leishmaniose e como ela é transmitida. Mudanças de atitudes numa população é meta a ser atingida com o tempo, pois envolve variações na cultura, parecendo ser este um importante fator para a dificuldade de se alcançar o controle desta zoonose. Saber algo sobre a leishmaniose visceral, seja em relação às formas de transmissão ou sobre as características do vetor, diminui o risco em 0,79 vezes. No entanto, não conhecer a doença, aumenta o risco de ter leishmaniose visceral em 2,57 vezes (BORGES, 2008).

6 CONCLUSÕES

- ✓ A positividade para LVC dos 250 cães amostrados na área rural do Cinturão Verde de ilha Solteira, SP, variou de acordo com o método de diagnóstico utilizado, sendo de 31,6% pelo exame RIFI, 28,8% pelo ELISA, 25,2% pelo parasitológico direto (PA) e 20,4% pelo PCR de suabe conjuntival
- ✓ Na análise comparativa entre os métodos, os métodos sorológicos apresentaram a concordância entre si, enquanto que a PCR foi o teste que revelou menor concordância com os demais.
- ✓ Os flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* foram capturados em 12/12 (100%) das propriedades visitadas, com maior número de insetos nos meses de dezembro/2012, fevereiro/2013, maio/2013 e julho/2013.
- ✓ Três fatores de riscos estatisticamente significantes ($P \leq 0,05$) associados a LVC na área rural do Cinturão Verde foram identificados: o porte grande dos cães, a presença de galinhas no local e o desconhecimento do proprietário sobre a LVC, principalmente como é transmitida e que o parasita pode infectar o homem.
- ✓ O local mostrou-se propício à criação dos vetores, pela presença dos casos de LCV e também dos insetos vetores.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, J. E. Expansão do calazar no Brasil. **Ceará Medicina**, Fortaleza v. 5, n.01, p. 86-102, 1983.

ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V. R. F.; CRUZ, F. A. C. S.; DAHROUG¹, M. A. A.; FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. F. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n 01 p. 359-365, 2012.

ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 3-4, p. 227-232, 2005.

ALVES, A. W.; BEVILACQUA, P. D.; Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993 - 1997. **Caderno de Saúde Pública** 20, Rio de Janeiro, v. 20 n. 1, p. 259 – 265, 2004.

ARAÚJO, A. I. F.; MARINHO-JÚNIOR, J. F.; CARVALHO, A. W. S.; COSTA, P. L.; SILVA, F. J.; CARVALHO, F. G.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Aspectos ecológicos da entomofauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em área endêmica para Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Pernambuco, Brasil. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX, 10., Recife, 2010. **Anais...** Recife: UFRPE, 2010.

ASHFORD, D. A. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 30, n. 12-13 p. 1269-1281, 2000.

ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M. C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JUNIOR, R. H. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 53, n. 3, p. 251-255, 1995.

ASHFORD, R. H.; SEAMAN, J.; SCHORSCHER, J.; PRATLONG, F. Epidemic visceral leishmaniasis In Southern Sudan: identity and systematic position of the parasites from patients and vectors. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene** London, v. 86, n. 4, p. 379-380, 1992.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; NORONHA-JUNIOR, A. C. F.; NEVES, M. F.; MACHADO, R. Z.; STARKE-

BUZETTI, W. A. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 17-25, jan/mar. 2010.

AZEVEDO, M. A. A.; DIAS, A. K. K.; PAULA, H. B.; PERRI, S. H. V.; NUNES, C. M. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréo, Estado do Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 3, p. 123-127, 2008.

BADARÓ, R.; JONES, T. C.; LORENÇO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. R. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, Cary, v. 154, n. 4 p. 639-649. 1986.

BARBOZA, D. C. P. M.; LEAL, D. C.; SOUZA, B. M. P. S.; CARNEIRO, A. J. B.; GOMES NETO, C. M. B.; ALCÂNATARA, A. C. D.; JULIÃO, F. S.; MOURA, S. A. B.; PERALVA, L. M. P.; FERREIRA, F.; FRANKE, C. R. Inquérito epidemiológico da leishmaniose visceral canina em três distritos sanitários do Município de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, Salvador, v. 10, n. 2, p. 434-447, abr-jun, 2009.

BATISTA, M. G. N. **Levantamento de leishmaniose visceral no município de Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil: soroprevalência de risco e isolamento do agente**. 2008. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização Saúde Pública Veterinária)- Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2008.

BENVENGA, G. U. **Ocorrência de *Leishmania* spp em cães, gatos e eqüinos no Estado de São Paulo**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

BORGES, B. K. A.; LOPES, E. G; DIAS, E. S. Perfil epidemiológico da população canina examinada sorologicamente para leishmaniose visceral em Montes Claros - MG, setembro 2008 a março 2009. In: REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS, 25.; REUNIÃO APLICADA EM LEISHMANIOSES, 13., 2009, Uberaba. **Anais...** Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2009. p. 93.

BORGES, B. K. A.; SILVA, J. A. S.; HADDAD, J. P. A.; MOREIRA, E. C.; MAGALHÃES, D. F.; RIBEIRO, L. M. L.; FIÚZA, V. O. P. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 777-784, abr, 2008.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 180 p.

BRASIL. Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina. (Org.). **Guia de orientação para vigilância de leishmaniose visceral canina**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. Material elaborado por grupo técnico intersetorial. Disponível em: http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/Vetores/leishmanioses/Guia_Basico_de_Orientacao_Leishmaniose_Visceral_Canina.pdf. Acesso em: 6 fev. 2014.

CABRERA, M. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCHI, M. C. A.; XAVIER, S. C.; SILVA, A. V. M.; JANSEN, A. M. Canine visceral leishmaniasis in Barra do Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Uberaba, v. 45, n. 4 p. 790-83, 2003.

CAMARGO M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 6, n.4, p. 117-118, 1964

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; KATZ, G. Ações controle da leishmaniose visceral americana implementadas na região oeste do Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36 n. 2, p. 32-63, 1999.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; POLETTO, D. W.; LAGE, L. C.; SPINOLA, R. M. F.; CRUZ, O. G. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de Leishmaniose Visceral Americana-Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, São Paulo, v. 17, n.5, p. 1263-1267, 2001.

CENTURION, J. F. Balanço hídrico da Região de Ilha Solteira. **Científica**, Jaboticabal, v. 10, n. 1, p. 57-61, 1982.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba v. 34, n.3, p. 223-228, 2001.

COSTA, C. H. N.; WERNECK, G. L.; RODRIGUES JUNIOR, L.; SANTOS, M. V.; ARAÚJO, I. B.; MOURA, L. S.; MOREIRA, S.; GOMES, R. B. B; LIMA, S. S. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Annals of the Tropical Medicine and Parasitology**, Inglaterra, v. 99, n. 3, p. 229-236, 2005.

COURTENAY, O.; SANTANA, E. W.; JOHNSON, P. J.; VASCONCELOS, L. A. B.; VASCONCELOS, A. W. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 90, n. 5, p. 498–502, 1996.

CRUZ, D. S.; CARVALHO, S. L.; LIMA, E. C. F.; COSTA, S. M. A. L.; BUOZO, J. C.; SILVA, H. R.; ALTIMARE, A. L. Avaliação das condições ambientais das margens da área do braço denominado “da anta” do rio Paraná na área de entorno do reservatório de Ilha Solteira-SP. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu: Caxambu, 2007. p. 1-2.

CRUZ, V. P.; TREVELIN, E.; ODORIZZI, R. M. F. N.; KANETO, C. N. Estudo populacional de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), no município de Araçatuba, região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu: Caxambu, 2007. p. 1-2

CURI, N. H. A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian national park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n.1 p. 99–101, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 2, n. 1, 2009. Suplemento 1.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from the urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 1-2, p. 54-60, 2006.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 1, p. 75-87, 1955.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DOUGALL, A.; SHILTON, C.; LOW CHOY, J.; ALEXANDER, B.; WALTON, S. New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. **Epidemiology and Infection**, Inglaterra, v. 137, n. 10, p. 1516-20, 2009.

DYE, C. Leishmaniasis epidemiology: the theory catches up. **Parasitology**, Inglaterra, v. 104, p. 7-18, 1992. Suplemento.

DYE, C.; VIDOR, E.; DEANE, MP. Serological diagnosis of Leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology and infection**, Inglaterra, v. 110, n. 3 p. 647-657, 1993.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERREIRA, S. A.; LEITE, R. S.; ITUASSU, L. T.; ALMEIDA, G. G.; SOUZA, D. M.; FUJIWARA, R. T.; ANDRADE, A. S. R.; MELO, M. N. Canine sin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in na endemic urban área in Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 4 p. 1596, 2012.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1., 1999, Barcelon. **Proceedings...** Barcelona: Hoeschst Roussel Vet., 1999. p. 6-10.

FERRER, L. M. The psthology of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2., 2002, Sevilla. **Proceedings...** Sevilha: Barcelona, 2002. p. 21-24.

FERRER, L.; RABANAL, R.; FONDEVILA, D. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis. **J. Small Anim. Pract.**, Barcelona, v. 29, n. 6, p. 381-388, 1988.

FRANÇA-SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; COSTA, R. T.; MONTEIRO, E. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; VIEIRA, E. P.; PRATA, A.; MAYRIYNK, W.; NASCIMENTO, E.; FORTES-DIAS, C. L.; SILVA, J. C.; DIAS, E. S. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 131, n. 1, p. 213-220, 2005.

FREHSE, M. S.; GRECA JUNIOR, H.; ULLMANN, L. S.; CAMOSSO, L. G.; MACHADO, J. G.; LANGONI, H. Surveillance of canine visceral leishmaniasis in a disease-free area. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 64-66, 2010.

GALLATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; RÊGO JÚNIOR, F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GALVEZ, R.; MIRO, G.; DESCALZO, M. A.; NIETO, J.; DADO, D.; MARTIN, O.; CUBERO, E.; MOLINA, R. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 169, n. 3, p. 327-334, 2010.

GAVGANI, A. S. M.; MOHITE, H.; EDRISSIAN, G. H.; MOHEBALI, M.; DAVIES, C. R. Domestic dog ownership. In Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania Infantum*. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 67, n. 5, p. 511-515, 2002.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI JUNIOR, R. G.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; SANTOS, C. B.; PINTO, I. S.; AZEVEDO, C. T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP^R CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 106, n. 3, p. 54-59, 2012.

HEUSSER JUNIOR, A.; BELLATO, V. ; SOUZA, A. P.; MOURA, A. B.; SARTOR, A. A.; SANTOS, E. G. O. B. ; SILVA, V. L.; Leishmaniose tegumentar canina no município de Balneário Camboriú, Estado de Santa Catarina. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 6, p. 713-718., 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. **Estimativas da população residente nos municípios brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2011**: censo populacional 2010. Brasília: Editora de Brasília, 2010. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2011/POP2011_DOU.pdf>. Acesso em: 6 fev. 2014.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOULIS, V. G. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.

INIESTA, V.; GÓMEZ-NIETO, L.; MOLANO, C.; MOHEDANO, I. A.; CARCELÉM, J.; MIRON, C.; ALONSO, C.; CORRALIZA, I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite Immunology**, Inglaterra, v. 24, n. 3, p. 113-118, 2002.

JOHN, S. W.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C. R. A.; Rapid procedure for extraction genomic DNA leukocytes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 192, n. 2, p. 408, 1991.

KILLICK-KENDRICK, R. The life cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. **Proceedings...** Sevilha: [s.n.], 2002. p. 57-69, 2002.

KUHLS, K.; ALAM, M. Z.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G. E. M.; MAURICIO, I. L.; ODDONE, R.; FELICIANGELI, M. D.; WIRTH, T.; MILES, M. A.; SCHONIAN, G. Comparative microsatellite of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and recent old world origin. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. e1155, 2011.

KUHLS, K.; MAURICIO, I. L.; PRATLONG, F.; PRESBER, W., SCHONIAN, G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, França, v. 7, n. 11-12, p. 1224-1234, 2005.

LACHAUD, L.; MARGCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DREREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002

LAFLAMME, D. P. Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. **Canine Practice**, Santa Barbara, v. 22, n. 3, p. 10-15, 1997.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, Inglaterra, v. 19, n. 19p. 5444, 1991.

LAINSON, R. The American Leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 77, n. 5, p. 569-596, 1983.

LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American Visceral Leishmaniasis, with particular reference to Brazil: A Review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n.8 p. 811-827, 2005.

LANDIS JUNIOR, K. G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Chichester , v. 33, n. 1 p. 159-174, 1977.

LAURENTI, M. D. **Patologias e patogenias das leishmanioses**. 2010. 112 f. Tese (Livre-Docência)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo- USP, São Paulo, 2010.

LIMA, V. M. F.; FATTORI, K. R.; MICHELIN, A. F.; NOGUEIRA, F. S.; SOUSA L. O. Evidence of *Leishmania spp* antibodies and DNA in bush dogs (*Speothos venaticus*) in Brazil. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, Yulee, v. 40, n. 1 p. 91-94, 2009.

LINS, A. G. S.; STARKE-BUZETTI, W. A.; SILVA, D. T.; SOUSA, L. O.; PAULAN, S. C. Identificação de leishmaniose visceral em cães da área Rural de Ilha Solteira-SP In: CONGRESSO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA DA UNESP: EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA E TECNOLOGIAS SOCIAIS ENTRE DIFERENTES SABERES, 5., 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Águas de Lindóia, 2009. 1CD-ROM

LOBSIGER, L.; MÜLLER, N.; SCHWEIZER, T.; FREY, C. F.; WIEDERKEHR, D.; ZUMKEHR, B.; GOTTSTEIN, B. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 169, p. 408-414, 2010.

LUPPI, M. M.; MALTA, M. C.; SILVA, T. M.; SILVA, F. L.; MOTTA, R. O.; MIRANDA, I.; ECCO, R.; SANTOS, R. L. Visceral leishmaniasis in wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 155, n. 1-2, p. 146-151, 2008.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, N. B.; SOUSA, L. C.; LINHARES, F. E.; AMÓRA, S. S. A.; OLIVEIRA, L. M. B. Sazonalidade de flebotomíneos em áreas endêmicas de Leishmaniose Visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 18, n. 2, p. 67-74, 2008.

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R.; VALADÃO, I. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 17-26, 1997.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILLO, V.F.; MICHELE, P.L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A. E.; Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 142, n. 3-4, p. 271-280, 2006.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L. M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.

MARQUES, A. P.; MANZOLI-JUNIOR, W. Rede geodésica do Município de Ilha Solteira – RGMIS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CADASTRO TÉCNICO MULTIFINALITÁRIO, 5., Florianópolis, 2002. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 2002. p.5. Disponível em: <http://geodesia.ufsc.br/Geodesia-online/arquivo/cobrac_2002/015/015.htm>. Acesso em: 9 de jan 2011.

MARZOCHI, M. C. A. A Leishmaniose tegumentar no Brasil. In: AUTOR. **Grandes endemias brasileiras**. Brasília: Universidade de Brasília, 1989.

MAURÍCIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, Inglaterra, v. 119, n. 3, p. 237-246, 1999.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi* (review). **Parasitology Today**, Inglaterra, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MILES, M. A.; VEXENAT, J. A.; FURTADO CAMPOS, J. H.; FONSECA, C. J. A. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: an update. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1., 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona: Barcelona, 1999. p. 46-53.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 4, p. 337-340, 2006.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES –DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudos de flebotômíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.

MOREIRA, JUNIOR, E. D.; SOUZA, V. M. M.; SREENIVASAN, M.; LOPES, N.; BARRETO, R. B.; CARVALHO, L. P. Peridomestic risks factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 69, n. 4 p. 393-397, 2003.

MORENO, E. C.; MELO, M. N.; GENARO, O.; LAMBERTUCCI, J. R.; SERUFO, J. C.; ANDRADE, A. S. R.; ANTUNES, C. M. F.; CARNEIRO, M. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in the urban area of Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 6, p. 456-463, 2005.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MUNIZ, L. H. G.; ROSSI, R. M.; NEITZKE, H. C.; MONTEIRO, W. M.; TEODORO, U. Estudo dos hábitos de flebotômíneos em área rural no sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 6 p. 1087-1093, 2006.

MURRAY, H.W, Advances in leishmaniasis. **Lancet**, Londres, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NORONHA JUNIOR, C. F.; ASSIS, J.; DOBRE, P. R.; QUEIROZ, N.M.G.P.; SILVEIRA, R. C. V.; STARKE-BUZETTI, W. A.; NEVES, M.F. Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em cães do município de Ilha Solteira, SP, Brasil. **Ciência Agrárias e Saúde**, Andradina, v. 7, n. 1, p. 32-367, 2007.

NUNES, C. M. **Avaliação da dinâmica de reposição e susceptibilidade de cães à Leishmaniose Visceral em área endêmica**. 2007. 113 f. Tese (Livre-Docência)-Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araçatuba, 2007.

NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDI, F. P.; PAULA, H. B.; AZEVEDO, M. A. A.; LIMA, V. M. F.; GARCIA, J. F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

OLIVEIRA-PERERA, Y. N.; REBÊLO, J. M. M.; MORAES, J. L. P.; PEREIRA, S. R. F. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* SP na Amazônia maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 6, p. 540-543, nov./dec. 2006.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

OLIVER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune responses: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, Inglaterra, v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005.

PALATINIK-DE-SOUZA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATINIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impacto of canine controle n the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L. A. R.; SANTOS, W. C.; GRIMALDI JUNIOR, G.; PONTES-DE CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA, -DOS-SANTOS, A. J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 55, n. 1, p. 39-44, 1996.

PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E. G.; MELRO, M. C. B. F.; OLIVEIRA, G. G. S.; SANTOS, W. L. C.; CARVALHO, P. L.; SANTOS, A. J. O. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic área for american visceral leishmaniasis. Implication for the disease control. **Acta Tropical**, Inglaterra, v. 69, n.1 p. 75-83, 1998.

PAULAN, S. C.; LINS, A. G. S.; TENÓRIO, M. S.; PENA, H. F. J.; MACHADO, R. Z.; GENNARI, S. M. STARKE BUZETTI, W, A. Seroprevalence rates of antibodies against *Leishmania infantum* and other protozoan and rickettsial parasites in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 12-166, 2013.

PAULAN, S. C.; SILVA, H. R.; LIMA, E. A. F.; FLORES, E. F.; TACHIBANA, V. M.; KANDA, C.; NORONHA JUNIOR, A. C. F.; DOBRE, P. R. Spatial distribution of Canine Visceral Leishmaniasis in Ilha Solteira, São Paulo Brazil. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 765-774, 2012.

PEREIRA, V.F. **Uso de suabe conjuntival na detecção de Leishmaniose Visceral Canina por PCR**. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo- USP, São Paulo, 2013.

QUEIROZ, N. M. G. P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; NUNES, C. M.; SATRKE-BUZETI, W. A. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 34-40, jan/mar. 2010.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; SHAW, M.A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, Inglaterra, v. 122, n. 3, p. 253- 261, 2001.

QUINNELL, R. J.; CARSON, C.; REITHINGER, R.; GARCEZ, L. M.; COURTENAY, O.. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco , v. 7, n. 1, p. e1992, 2013.

QUISPE-TINTAYA, K. W.; LAURENT, T.; DECUYPERE, S.; HIDE, M.; BAÑULS, A. L.; DONCKER, S. de; RIJAL, S., CAÑAVATE, C.; CAMPINO, L.; DUJARDIN, J. C. Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. **Journal of infectious diseases**, Oxford, v. 192, n. 4, p. 685-692, 2005.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing.**, Vienna: R Foundation for Statistical Computing , 2013. ISBN 3-900051-07-0, Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 12 jan 2014

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N. S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, Inglaterra, v. 37, n. 9 p. 2931–2935. 1999.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Inglaterra, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 3, n. 71, p. 267-275, 1990.

RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; FRANKE, C. R.; BARROS, R. S.; OLIVEIRA F. R.; ALCÂNTARA, A. C. et al. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, n. 1-2, p. 24-31, 2008.

ROSALES, J. C.; YANG, H. M. Mathematical modeling of the risk factors for the canine leishmaniasis in human leishmaniosis in western regions of the state of São Paulo, Brazil and in the northeast of the province of Salta, Argentina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 2-6, 2006.

ROSÁRIO, E. Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.

ROSS, R. (1) note on the bodies recently described by Leishman-Donovan and (2) Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, Londres, v. 2, n. 1, p. 1261-1401, 1903.

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

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Ecology and epidemiology: new world. In: PETERS W. ; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. Orlando: Academic Press, 1987. v.1, p. 291-363.

SHAW, J.; ROSA, A. T.; SOUZA, A.; CRUZ, A. C. Transmissão de colaboradores agentes: Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 337-351.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; ABRANTES, T. R.; BARBOSA FILHO, C. J. L.; FIGUEIREDO, F. B. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 195, n. 2, p. 252-253, 2013.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; MELO, N. M. Contribution of molecular technique to the epidemiology of neotropical leishmania species. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 550-552, 2005.

SILVA, D. T.; BUZETTI, W. A. S.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M.; TENÓRIO, M. S.; LOPES, M. L. M. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 17-25, 2014

SILVA, H. R. **Avaliação dos principais fatores do meio físico do município de Pereira Barreto, SP, relacionado com a produção agropecuária, mediante o emprego de imagens aéreas**. Ilha Solteira: UNESP/FE, 1991. (Relatório de Pesquisa, 74).

SILVA, J. A. **Características da população canina e felina de Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil**. 1980. 29 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1980.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; POVO, M. M. A leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of Amazonian visceral Leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Inglaterra, v. 76, n. 6, p.830-832 1982.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; LIULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C. ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, Inglaterra, v. 39, n. 2, p. 560-563, 2001.

SPADA, J. C. P.; SILVA, D. T. ; MARTINS, K. R. R. ; RODAS, L. A. C. ; SILVA, H. R.; BUZETTI, W. A. S. Ocorrência de Flebotomíneos (*Lutzomya longipalpis*) em Área Rural Denominada por 'Cinturão Verde' do Município de Ilha Solteira Estado de São Paulo. **Ars Veterinaria**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 73-74, 2013.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO – SUCEN. **Leishmaniose visceral**. São Paulo: São Paulo 2006. Relatório Disponível em <<http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/viscer.html>>. Acesso em: 16 abr. 2014.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALIK, M. S. M. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, Oxford, v. 1-2, n. 292, p. 17-23, 2004.

TASCA, K. I.; STARKE-BUZETTI, W. A.; TENORIO, M. S.; PAULAN, S. C.; LIMA, F. L.; QUEIROZ, N. M. G. P.; MACHADO, R. Z.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; NEVES, M. F.; NORONHA JUNIOR, A. C. F.; ASSIS, J. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.18, n. 1, p.27 - 33, 2009.

TENÓRIO, M. S.; SOUSA, L. O. ; PAIXÃO, M. S.; ALVES, M. F.; PAULAN, S. C. LIMA, F. L.; JUSI, M. M. G.; TASCA, K. I.; MACHADO, R. Z.; STARKE BUZETTI, W. A. Visceral Leishmaniasis in a captive crab-eating Fox *Cerdocyon thous*. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, Yulee, v. 42, n. 4, p. 608-616, 2011.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 177–185, 1996.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme-linked immunoasorbent assay, p.359-371. In: ROSE N.; FRIEDMAN H. (Ed.) **Manual of clinical immunology**. South Carolina: American Society for Microbiology, 1980. 932 p.

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista- UNESP, Araçatuba, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. **Weekly epidemiological record**, Oxford, v. 77, n. 44, p. 365-372, 2002.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. (Ed.). **Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and 94 South America (Diptera: Psychodidae)**. Flórida: American Entomological Institute, 1994.

Anexos

1 Termo de Consentimento

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FE/UNESP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

A Faculdade de Engenharia da UNESP Campus de Ilha Solteira, por meio de seus pesquisadores e alunos de graduação e pós-graduação buscam investigar aspectos relacionados com a ocorrência de Leishmaniose Visceral Canina na região de Ilha Solteira, SP, por meio do projeto intitulado “FATORES DE RISCOS ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA ÁREA DE CINTURÃO VERDE DE ILHA SOLTEIRA, SP.

”. Essa pesquisa visa a realização de um levantamento epidemiológico e de fatores de riscos da leishmaniose à população canina e humana do município de Ilha Solteira e apresenta extrema relevância para a adoção de medidas de controle adequadas, principalmente de uma região rural, mas próxima do perímetro urbano da cidade.

Para participar do estudo, será realizada a coleta de 1 a 5 ml de sangue venoso canino e aspirado de linfonodo poplíteo, para obtenção de sangue e soro para os exames laboratoriais. Os materiais utilizados na coleta de sangue e aspirado de linfonodos são estéreis e descartáveis e os riscos são mínimos.

Todos os resultados serão fornecidos ao proprietário do cão. Não serão testados medicamentos ou substâncias de qualquer natureza. A participação no estudo não é obrigatória e caso não deseje que seu cão participe ou se quiser abandonar o estudo, receberá a mesma atenção da equipe de pesquisa.

Eu, _____

Declaro que fui informado a respeito dos procedimentos a serem realizados caso meu cão participe do mencionado projeto de pesquisa, fui orientado em relação aos eventuais riscos. Autorizo a coleta de amostra de sangue venoso e punção de linfonodo poplíteo do cão....., sob minha responsabilidade.

.....Assina
tura do proprietário do cão

.....de.....de 20.....

2 Questionário

Número: _____ Data: _____

NOME DO PROPRIETARIO _____

RUA: _____ NUMERO _____

DATA DE AQUISIÇÃO- NASCIMENTO DO ANIMAL: _____

NOME DO CÃO: _____ M () F ()

RAÇA: _____ TAMANHO: () grande () medio () pequeno

PELAME: () curto () longo COR: _____

IDADE: _____ anos () não sabe indicar: () <6m () 6m-1 ano () adulto

CIDADE QUE ANIMAL NASCEU: _____

Ilha Solteira () () outra cidade () não sabe

ORIGEM DO CÃO: () cria própria () presente () comprado () achado na rua

CÃO SAI DE CASA: () sozinho () com dono, solto () com coleira ou corrente () não sai

EM QUE PERÍODO: () dia todo () à noite () dia e noite

ONDE ANIMAL DORME: () dentro de casa () no quintal () na rua

QUANTOS OUTROS ANIMAIS VOCE TEM EM CASA:

() nenhum () não sabe _____ cães machos _____ cadelas _____ filhotes

QUANTOS ANIMAIS JÁ FORAM SACRIFICADOS POR LEISHMANIOSE:

HÁ MOSQUITO DE LEISHMANIOSE NA CASA () sim () não () não sabe

CONDIÇÕES DO QUINTAL: () limpo () sujo () cimentado () terra () jardim

OUTROS ANIMAIS NO QUINTAL:

() galinha.....distancia____m () porco.....distância____m () cavalo.....distância____m

() outros _____

COLETA DE LIXO: () diária () 1 vez por semana () + de uma vez por semana () não há.

HÁ LIXOS NA PROPRIEDADE: SIM(...) NÃO (...)

HÁ A PRESENÇA DE MATAS OU REMASCENTE DE MATAS NA PROPRIEDADE: sim (....) não (...). TRONCOS DE ÁRVORES, VEGETAÇÃO DIVERSA: SIM (....) NÃO (....).

HÁ ACÚMUOL DE MATÉRIA ORGÂNICA: sim (....) não (....).

TIPO DE CULTIVO.....

JÁ OUVIU FALAR NA LEISHMANIOSE VISCERAL: Sim (....) Não(....)

FAZ TRATAMENTO DOS CÃES CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: Sim (....) Não (....). VACINA: Sim (....) Não (....)

SE SIM, SABE COMO É ADQUIRIDA: Sim (....) Não(....). SABE DE SEUS PERIGOS E QUE PODE CONTAMINAR O HOMEM: sim (....) Não(....). COMO:

CONHECE O PAPEL DOS CÃES NA TRANSMISSÃO DA DOENÇA Sim(....)Não (....)

E DOS MOSQUITOS FLEBOTOMÍNEOS: Sim (....) Não (....). ONDE SÃO CRIADOS:.....e como

transmitem:.....