

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**FATORES ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE**  
**LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES DE ÁREA URBANA**  
**APÓS APLICAÇÃO DE MEDIDAS DE PROTEÇÃO**  
**INDIVIDUAL**

**Kennya Rozy Real Martins**

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP  
2018

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

**FATORES ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE  
LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES DE ÁREA URBANA  
APÓS APLICAÇÃO DE MEDIDAS DE PROTEÇÃO  
INDIVIDUAL**

**Kenny Rozy Real Martins**  
**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Adj. Cárís Maroni Nunes**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal)

ARAÇATUBA – SP  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP  
Bibliotecária Responsável: Ana Claudia M. Grieger Manzatti - CRB8-6315

M386f Martins, Kennya Rozy Real  
Fatores associados à ocorrência de leishmaniose visceral em  
cães de área urbana após aplicação de medidas de proteção individual /  
Kennya Rozy Real Martins. – Araçatuba: [s.n.],  
2017.  
40 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.

Orientadora: Profa. Dra. Cárís Maroni Nunes

1. Leishmaniose visceral canina 2. Fatores de risco 3.  
Controle 4. Epidemiologia I. Título.

CDD 616.9364



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO: Fatores associados à ocorrência de leishmaniose visceral em cães de área urbana  
após aplicação de medidas de proteção individual

**AUTORA: KENNYA ROZY REAL MARTINS**

**ORIENTADORA: CÁRIS MARONI NUNES**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

  
Prof.ª. Dra. CÁRIS MARONI NUNES

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

  
Prof.ª. Dra. GISELE FABRINO MACHADO

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

  
Prof. Dr. RAFAEL SILVA CIPRIANO

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

Araçatuba, 09 de janeiro de 2018.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**KENNYA ROZY REAL MARTINS**— nascida em 10 de janeiro de 1990, na cidade de Santa Maria- RS, concluiu a graduação em Medicina Veterinária pela Universidade de Cruz Alta- UNICRUZ, em janeiro de 2011. No ano de 2015 ingressou no programa de pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Unesp, campus de Araçatuba. Em setembro de 2017 integralizou os créditos e em 27 de outubro de 2017 foi aprovada no Exame Geral de Qualificação, com o trabalho intitulado “Fatores associados à ocorrência de leishmaniose visceral em cães de área urbana após aplicação de medidas de proteção individual”.

*“Seja a mudança que você  
deseja ver no mundo.”*

***Mahatma Gandhi***

À minha família, meu esposo Maiko, minha mãe Janete, meu irmão Dalmo e a minha filha Gabriela que acompanharam todos os momentos desta jornada acadêmica.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Professora Adjunto Cárís Maroni Nunes, excelente professora e pesquisadora que me proporcionou esta oportunidade, compartilhando momentos de aprendizado e incentivo. Obrigada por tudo!

À Direção da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, ao Programa de Pós-Graduação e a todos os funcionários da unidade, em especial à Isabela.

À CAPES por conceder a bolsa de estudo.

À professora Valéria Marçal Félix de Lima e à professora Silvia Helena Venturoli Perri por nunca recusarem meus pedidos de ajuda. Enfim, meu muito obrigada a todos professores que de alguma forma ajudaram nessa trajetória.

À meu irmão e amigo Dalmo pelo seu apoio, que foi fundamental nesta jornada.

A todos os colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal da FMVA, sempre dispostos a ouvir e ajudar.

À equipe de Serviço de Vigilância Sanitária da Prefeitura Municipal de Panorama- SP.

Ao pesquisador Roberto Hiramoto do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Ao Professor Dr. Rodrigo Martins Soares do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FZEA- USP.

À Maria Fernanda, aluna de iniciação científica da FZEA – USP.

A minha mãe, à minha filha Gabriela, a meu pai e à Rita pelo carinho e compreensão.

Ao meu esposo Maiko pelo companheirismo, paciência e apoio em todos os momentos.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	10
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	10
OBJETIVO.....	15
REFERÊNCIAS.....	15
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	20
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODO.....	23
Área do estudo e população alvo.....	23
Diagnóstico sorológico e molecular.....	25
Análise estatística.....	26
RESULTADO.....	26
DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÃO.....	32
AGRADECIMENTOS.....	32
REFERÊNCIAS.....	33
APÊNDICES.....	38

## **FATORES ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES DE ÁREA URBANA APÓS APLICAÇÃO DE MEDIDAS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL**

**RESUMO** – A leishmaniose visceral (LV), doença que acomete o cão e o homem, é causada por um protozoário intracelular do gênero *Leishmania*. Esta zoonose ocorre em mais de 88 países, ocasionando aproximadamente 300 mil novos casos anualmente no mundo todo. O Brasil ainda encontra dificuldades para que o controle da LV seja alcançado de forma eficiente de forma a evitar que esta enfermidade amplie sua distribuição. Transmitida por flebótomos, essa zoonose dissemina-se com mais facilidade em locais propícios à manutenção do vetor, sendo o *Lutzomyia longipalpis* o mais frequente no Brasil. O cão é o principal reservatório urbano da LV, sendo também acometido por esta doença. Além da presença de cães infectados muitos fatores estão relacionados à ocorrência de LV em áreas urbanas, como acúmulo de lixo, saneamento básico precário e presença de matéria orgânica no peridomicílio, que assim contribuem para a manutenção do vetor. Dessa forma, o controle da leishmaniose visceral em cães se faz necessário, seja por meio de medidas individuais ou coletivas, diminuindo assim sua participação no ciclo epidemiológico da LV. A identificação de fatores de risco que possam estar ligados à ocorrência de LV nos cães é fundamental para um controle mais efetivo desta zoonose.

**Palavras-chave:** epidemiologia, fatores de risco, *Leishmania spp.*, medidas de controle, saúde pública

## **FACTORS ASSOCIATED WITH THE OCCURRENCE OF VISCERAL LEISHMANIOSIS IN URBAN AREA DOGS AFTER THE APPLICATION OF INDIVIDUAL PROTECTION MEASURES**

**SUMMARY** – Visceral leishmaniasis (VL), a disease that affects the dog and the man is caused by an intracellular protozoan of the *Leishmania* genus. This zoonosis occurs in more than 88 countries, resulting in approximately 300,000 new cases annually worldwide. Brazil still finds difficulties on controlling VL in an efficient way to avoid the disease spread. Transmitted by sandflies, this zoonosis is disseminated in areas suitable to maintain the vector, with *Lutzomyia longipalpis* being the most frequent vector in Brazil. The dog is its main urban reservoir, which is also affected by this disease. Besides the presence of the infected dogs many factors are related to the occurrence of VL in urban areas such as litter accumulation, precarious basic sanitation and the presence of organic matter in the peridomicile, thus contributing to the maintenance of the vector. The control of visceral leishmaniasis in dogs is necessary, either by individual or by collective measures, in order to reduce their participation in the VL epidemiological cycle. The identification of risk factors that may be related to the occurrence of VL in dogs is crucial to a more effective control of this zoonosis.

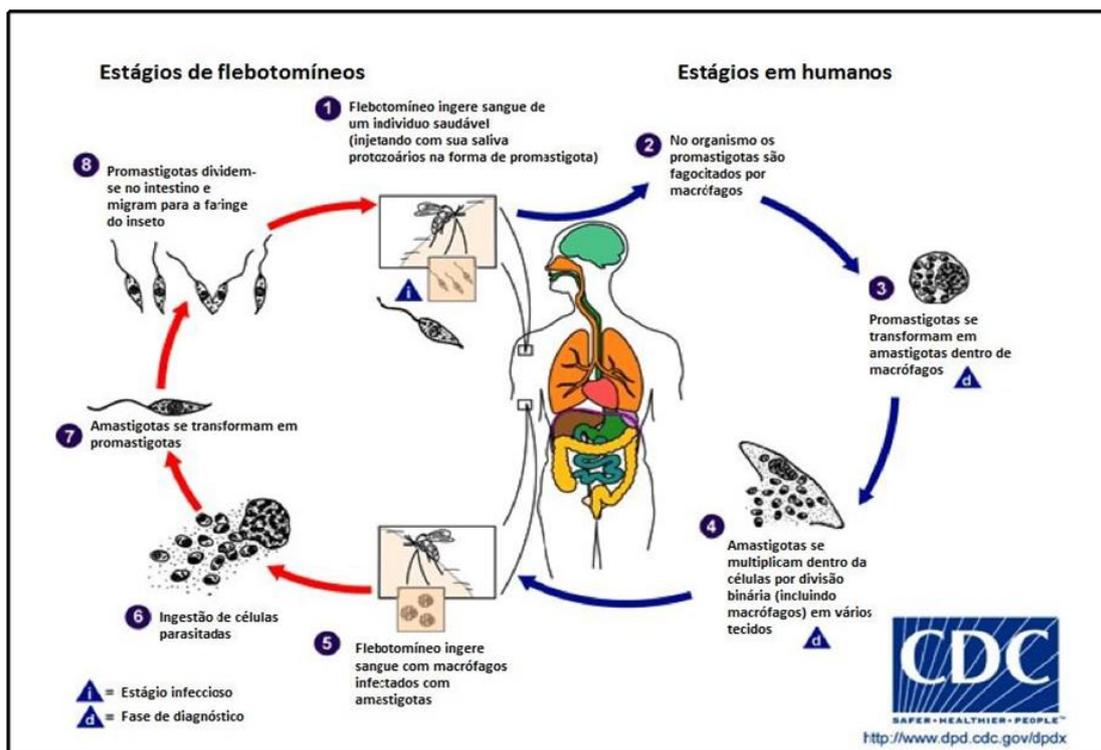
**Keywords:** epidemiology, risk factors, control measures, *Leishmania spp.*, public health

## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

A leishmaniose visceral (LV), doença tropical considerada negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) tem se destacado mundialmente devido a sua ampla distribuição e incidência (WHO, 2013). A LV apresenta cerca de 3.500 novos casos/ano no Brasil, constituindo-se em sério problema à saúde pública. Dentre as doenças tropicais, a LV destaca-se em segundo lugar em relação a taxa de mortalidade (ALVAR et al., 2012) e o Brasil é responsável por 90% dos casos de LV na América do Sul (WHO, 2016).

O agente etiológico da LV no Brasil é a *Leishmania infantum*, protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Este parasita apresenta ciclo de vida alternado entre o hospedeiro vertebrado e o invertebrado (DESJEUX, 2004). É um parasita intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear (SFM) dos vertebrados onde se apresenta na forma de amastigota e, nos invertebrados, na forma promastigota (READY, 2014).

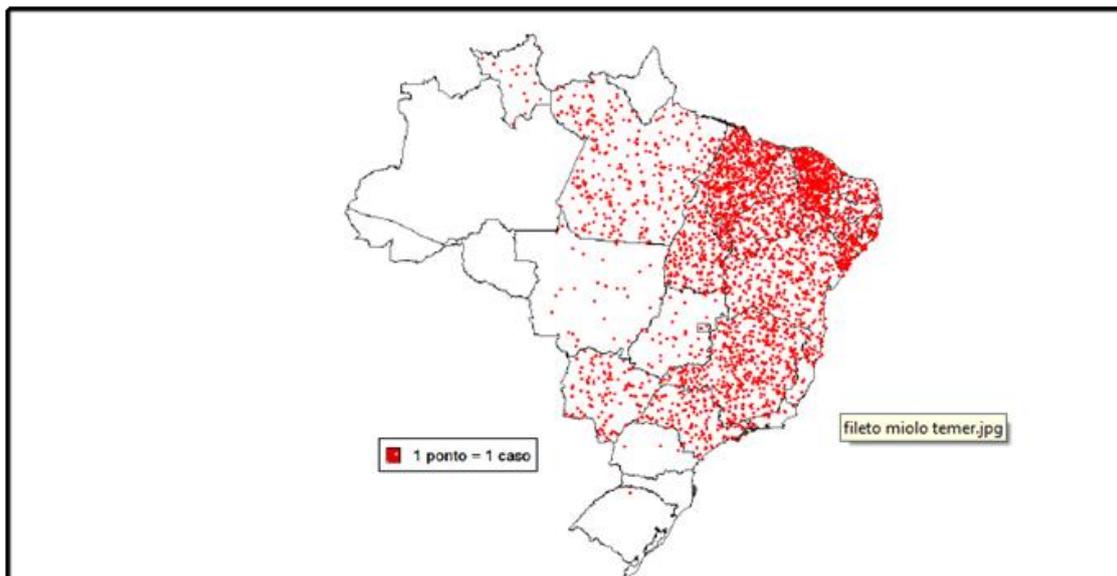
A transmissão desta zoonose para o homem e o cão se dá por meio da picada de flebótomos hematófagos (fêmea) do gênero *Lutzomyia spp.*, sendo o *Lutzomyia longipalpis* o mais importante no Brasil, uma vez que essa espécie se adaptou ao peridomicílio e intradomicílio de ambientes urbanos e rurais (GONTIJO; MELO, 2004). O vetor se infecta ao picar um animal infectado quando formas amastigotas são ingeridas durante o repasto sanguíneo, passam por diferenciação e multiplicação no tubo digestório do flebótomo, resultando na forma promastigota metacíclica, forma infectante para o hospedeiro vertebrado (BATES, 2007). No momento em que outro hospedeiro vertebrado é picado pelo vetor infectado as formas promastigotas são inoculadas na corrente sanguínea, entram nas células fagocíticas mononucleares e se transformam em amastigotas. As formas amastigotas se replicam por divisão binária dentro das células fagocíticas que, quando repletas, se rompem e liberam o parasito no organismo do hospedeiro (PAPADOGIANNAKIS; KOUTINAS, 2015). A Figura 1 apresenta o ciclo de vida da *Leishmania spp.*



**Figura 1** - Ciclo da *Leishmania* spp. Fonte: “Center for Disease Control”, EUA, 2016. (Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/>).

Alguns mamíferos atuam como reservatórios naturais, podendo ser animais silvestres como roedores, marsupiais, primatas e lagomorfos (DESJEUX, 2004). No perímetro urbano o cão doméstico é apontado como principal reservatório, apresentando grande importância no ciclo epidemiológico, pois os casos caninos precedem os casos humanos, tornando o cão doente fonte de infecção para o flebotomo (ROSALES; YANG, 2006).

O ciclo de transmissão da LV, antes considerado apenas de áreas rurais passou a se expandir para ambientes urbanos (GONTIJO; MELO, 2004; MENDES et al., 2000). Assim, desde a década de 80, a LV tem causado epidemias em muitas regiões do Brasil (Figura 2), com destaque para as cidades de Teresina (PI), Natal (RN), Corumbá (MS), Rio de Janeiro (RJ), Araçatuba (SP), Santarém (PA), São Luís (MA), Fortaleza (CE) e Camaçari (BA) (BRASIL, 2016).



**Figura 2-** Distribuição dos casos humanos de leishmaniose visceral no Brasil, por município, 2015. (Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LV-Graficos-e-Mapas.pdf>).

Até o ano de 1990, o estado de São Paulo era considerado livre de casos autóctones de LV, a presença do flebótomo era observada apenas em ambientes rurais e concentrava-se ao Norte do país. No estado de São Paulo, o primeiro registro do vetor *L. longipalpis* ocorreu em Araçatuba, no ano de 1997, e, no ano seguinte, observou-se a ocorrência desta zoonose em cães (COSTA et al., 1997). Em 1999 foi então registrado o primeiro caso humano autóctone do estado no homem (SÃO PAULO, 2006).

Com o novo padrão epidemiológico, o Ministério da Saúde, por meio do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), recomendou a intensificação da aplicação das medidas de prevenção e controle da LV, sendo o diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, o monitoramento e combate ao vetor por meio de inseticidas e do manejo ambiental, e a identificação e eliminação de cães soropositivos, as medidas mais recomendadas (BRASIL, 2016). Além da complexidade para a execução destas atividades, a eliminação do reservatório canino gera controvérsias e é pouca aceita pela população em geral.

A exposição ao flebotomíneo tem sido parcialmente controlada por meio do uso de inseticidas residuais aplicados no interior das casas, quintais e abrigos de animais quando da ocorrência de casos humanos, reduzindo assim os níveis de transmissão desta zoonose. Entretanto, esta atividade é de alto custo e de difícil aplicação, além de encontrar resistência da população alvo para sua aplicação no intradomicílio (GONTIJO; MELO, 2004; WERNECK, 2014).

A leishmaniose visceral em cães (LVC), geralmente se apresenta como uma doença sistêmica, crônica e grave sendo classificada em três formas: sintomática, oligossintomática e assintomática. As manifestações clínicas mais comumente observadas são o aumento dos linfonodos, onicogrifose, lesões cutâneas, emagrecimento, anemia, leucopenia, lesões oculares e glomerulonefrite (SOLANO- GALEGO et al., 2009). O cão assintomático, por não ter sinal clínico visível é considerado uma fonte de infecção importante para o flebótomo por abrigar uma grande quantidade do parasita em sua pele (FIGUEIREDO et al., 2010).

O diagnóstico da LVC pode ser realizado por meio de teste sorológico, citológico e/ou molecular. Dois testes sorológicos, o teste imunocromatográfico de duplo fluxo (TR-DPP-Biomanguinhos<sup>®</sup>) e o teste imunoenzimático (EIE-ELISA-Biomanguinhos<sup>®</sup>), têm sido atualmente utilizados nos inquéritos soroepidemiológicos para a triagem e confirmação da positividade, respectivamente (BRASIL, 2016), permitindo a identificação em massa do reservatório canino.

A biópsia aspirativa de linfonodos para a pesquisa do parasito à citologia é também bastante utilizada por apresentar custo mais acessível que o teste molecular. Quando realizada de aspirado de medula óssea pode resultar em sensibilidade de 98% (MARTIN- SANCHES et al., 2001).

Já na rotina da clínica veterinária o diagnóstico molecular por PCR convencional ou em tempo real, tem sido utilizado com frequência, sendo então possível a identificação da presença de fragmento de DNA do parasita. Para o teste molecular amostras biológicas de aspirado de linfonodo ou de medula óssea têm sido mais frequentemente utilizadas, embora a colheita seja mais invasiva (PEREIRA et al., 2016).

Adicionalmente, a utilização de *swab* conjuntival como amostra biológica tem sido cada vez mais frequente, resultado em sensibilidade acima de 90% (FERREIRA et al., 2014) para diagnóstico da LVC com a vantagem de ser pouco invasiva (FERREIRA et al., 2008; MANNA et al., 2004; PEREIRA et al., 2016).

Até o momento, as medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde brasileiro não causaram o impacto desejável quanto à diminuição da incidência em humanos e a LV vem gradativamente aumentando sua distribuição em várias regiões do país. Outras estratégias além das anteriormente mencionadas, como a imunoprofilaxia e uso de coleira impregnada com inseticida, vêm sendo aplicadas para a proteção individual dos cães e, conseqüentemente, para controlar a LV. As vacinas fabricadas no Brasil, tem como objetivo desencadear resposta imune protetora, sendo que, até o momento, dois fabricantes obtiveram licença para distribuir vacinas contra LVC: a Zoetis<sup>TM</sup> Brasil (Leishmune<sup>®</sup>) e a Hertape Calier S.A. (Leish-Tec<sup>®</sup>) (SILVA et al., 2013).

A Leishmune<sup>®</sup> (Zoetis<sup>TM</sup>) foi a primeira vacina liberada e comercializada no Brasil, sendo classificada como uma vacina de subunidade por ser constituída de uma fração glicoproteica purificada (do inglês, *fucose- manose-ligand* - FML), presente na superfície do protozoário ao longo de todo seu ciclo, e produzida a partir de formas promastigota de *Leishmania donovani*. Este imunógeno induz à produção de resposta humoral e celular ao antígeno total de *Leishmania* e ao antígeno FML (LIMA et al., 2010). No mês de setembro de 2014, esta vacina foi retirada do mercado por não ter preenchido os requisitos com os estudos de fase III relacionados à sua efetividade (BRASIL, 2016).

A vacina Leish-Tec<sup>®</sup> (Hertape Calier) é uma vacina recombinante (antígeno A<sub>2</sub>) que também induz à resposta imune celular e humoral, e assegura alta produção de Interferon gamma e de IgG2, específica contra o antígeno A<sub>2</sub> podendo, inclusive, distinguir animais doentes dos imunizados por meio de teste sorológico específico (SILVA et al., 2013).

Outra estratégia que vem sendo avaliada para uso em massa é o uso da coleira impregnada com deltametrina em cães, a qual tem demonstrado resultados bastante satisfatórios. Esta estratégia revelou ter efeito repelente e inseticida, confirmando ser uma excelente estratégia de aceitação mais fácil e de custo relativamente mais baixo (DAVID et al., 2001), que resulta na diminuição da

prevalência canina. Reithinger et al. (2004) avaliaram o uso da coleira impregnada com inseticida e observaram que, em cinco meses, o colar impregnado com deltametrina reduziu significativamente a soropositividade dos cães, apresentando um resultado satisfatório em regiões onde a taxa transmissão de LVC é alta.

A ocorrência da LVC se intensificou no meio urbano não só pelo aumento da densidade canina, mas também pelas alterações ambientais e pelos processos migratórios de humanos e de cães positivos para os centros urbanos (GONTIJO; MELO, 2004; MENDES et al., 2000). Além disto, alguns fatores ambientais como condições sanitárias inadequadas, ausência de coleta de lixo domiciliar, agrupamento espacial de casos, presença de matéria orgânica e de entulhos nos peridomicílio, que favorecem a manutenção dos flebotomíneos no meio urbano, estão intimamente ligados à realidade de áreas periféricas de grandes centros (COURA-VITAL et al., 2011).

Em regiões endêmicas à verificação tanto da prevalência canina quanto dos fatores de risco associados à LVC são de fundamental importância, permitindo o monitoramento das áreas e auxiliando na escolha das medidas de controle a serem priorizadas. Assim, estudos que identifiquem os fatores de risco que podem estar associados à positividade dos cães e à infectividade aos flebotomíneos são de grande valia para o controle da LV.

O objetivo do presente estudo foi verificar quais fatores de risco relacionados ao meio ambiente (extrínsecos) e/ou ao reservatório canino (intrínsecos) estariam associados à infecção canina em área urbana onde medidas de proteção individual haviam sido anteriormente aplicadas, com intuito de auxiliar na prevenção e controle desta zoonose.

## REFERÊNCIAS

ALVAR, J.; VÉLEZ I.D.; BERNI, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. e 35681, 2012.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10-3, p. 1097-1106, 2007.

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, 2016.

COSTA, A.I.P.; CASANOVA, C.; RODAS, L.A.C.; GALATI, E.A.B. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 6, p. 632–633, 1997.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROAT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; REIS, L. E. S.; BRAGA, S. L.; MORAES, M. H. F.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. 1291, 2011.

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

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

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

FERREIRA, A.L.C.; CARREGAL, V. M.; FERREIRA, S.A.; LEITE, R.S.; ANDRADE, A.S.R. Detection of *Leishmania infantum* in 4 different dog samples by real time PCR and ITS -1 nested PCR. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**, v. 78, p. 418- 421, 2014.

FIGUEIREDO, M.M.; MOURA, E.P.; COSTA, M.M.; IBEIRO V.M.; MICHALIK, M.S.; TAFURI, W.L. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania chagasi)*. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 7, p. 877-887, 2010.

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

LIMA, V.M.F.; IKEDA, F.A.; ROSSI, C.N.; FEITOSA, M.M.; VASCONCELOS, R.O.; NUNES, C.N.; GOTO, H. Diminished CD4+/CD25+ T cell and increased IFN-gamma levels occur in dogs vaccinated with Leishmune in an endemic area for visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, n. 3-4, p. 296-302, 2010.

MANNA, L; VITALI, F.; REALE, S.; CARACAPPA, L.M.; 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 leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.

MARTIN- SANCHES, J.; LOPEZ-LOPEZ, M.C.; ACEDO- SANCHES, C.; CASTRO-FAJARDO, J. J.; PINEDA, J. A.; MORILLAS- MARQUEZ, F. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. **Parasitology**. v.122, n. 6, p.607-615, 2001.

MENDES, W.S.; TROVÃO, J.R.; SILVA, A.A.M. Dinâmica da ocupação do espaço na cidade de São Luís e a leishmaniose visceral. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 3, p. 872, 2000.

PAPADOGIANNAKIS, E.I.; KOUTINAS, A.F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, n. 3-4, p. 94-102, 2015.

PEREIRA, V.F.; BENASSI, J.C.; STARKE-BUZETTI, W.A.; SILVA, D.T.; FERREIRA, H.L.; KEIDE, L.B.; SOARES, R.M.; RUIZ, V.L.A.; OLIVEIRA, T.M.F. S. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival sawb PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 104-106, 2016.

READY, P.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147-154, 2014.

REITHINGER, R.; COLEMAN, P. G.; ALEXANDER, B.; VIERIRA, E. P.; ASSIS, G.; DAVIES, C. R. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 55- 62, 2004.

ROSALES, J.C.; YANG, H.M. Modelo matemático para descrever a transmissão de leishmaniose. **Trends in Applied and Computational Mathematics**, v. 7., n. 2, p. 337-346, 2006.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. **Informe técnico leishmaniose visceral americana**. São Paulo: SES, 2006.

SILVA, K.L.O.; SANTOS, D.P.; COELHO, N.M.D.; SILVA, D.C.; OKAMOTO, A.C.; GAETTI-JARDIM JUNIOR, E. Vacinas contra leishmaniose: uma revisão. **Archives of Health Investigation**, v. 2, n. 4, p. 18-28, 2013.

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**. v. 165, n. 1, p. 1-18, 2009.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 5, p. 851-855, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases**: second WHO report on neglected tropical disease. Geneva: WHO, 2013. p. 67-71. Disponível em: <[http://www.who.int/iris/bitstream/10665/77950/1/9789241564540\\_eng.pdf](http://www.who.int/iris/bitstream/10665/77950/1/9789241564540_eng.pdf)>. Acesso em: 27 ago. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis: informação geral: second WHO report on neglected tropical disease. © **Pan American Health Organization**. Washington: WHO, 2016. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=en)>. Acesso em: 14 dez. 2017.

## **CAPÍTULO 2 - FATORES ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES DE ÁREA URBANA APÓS APLICAÇÃO DE MEDIDAS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL**

**RESUMO** - A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose causada por um protozoário do gênero *Leishmania* (*Leishmania infantum*) e tem no cão seu principal reservatório. Sua transmissão ocorre através da picada do vetor, sendo o *Lutzomyia longipalpis* mais importante no Brasil. Estudos epidemiológicos e a identificação de fatores que podem estar associados à positividade dos cães e à infectividade aos flebotomíneos são de grande interesse para o controle desta doença. Partindo desse pressuposto, o objetivo deste estudo foi avaliar potenciais fatores de risco para LVC em área urbana onde medidas de proteção individual em cães haviam sido anteriormente aplicadas. O estudo foi realizado no município de Panorama, endêmico para LV, localizado no noroeste do estado de São Paulo, Brasil. Considerando-se o resultado do diagnóstico sorológico, observou-se que cães domiciliados na periferia da área urbana apresentaram 5,7 vezes mais chance de serem soropositivos quando comparados aos cães que vivem na região central da cidade. Quando utilizou-se a PCR em tempo real para a identificação do cão infectado, não se observou associação significativa entre o diagnóstico positivo e as variáveis referentes ao peridomicílio, tampouco com aquelas relacionadas às características do cão. Sendo assim, concluímos que a localização periférica dos domicílios revelou-se um potencial fator de risco para a soropositividade à leishmaniose visceral em cães de área urbana endêmica para LVC.

**Palavras-chave:** cães, doença tropical, epidemiologia, medidas prevenção, leishmaniose visceral

## **FACTORS ASSOCIATED WITH THE OCCURRENCE OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN DOGS OF URBAN AREA AFTER THE APPLICATION OF INDIVIDUAL PROTECTION MEASURES**

**SUMMARY-** Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis caused by a protozoan of the genus *Leishmania* (*Leishmania infantum*), it is transmitted by sandflies and the dog is its main reservoir. In Brazil, VL transmission occurs mainly by the bite of the vector *Lutzomyia longipalpis*. Epidemiological studies and the identification of the factors that are related to dog's positivity and its infectivity to sandflies are of great interest for controlling of this disease. Thus, the objective of this study was to evaluate potential risk factors for VL in dogs of urban areas where individual protection measures had been applied. The study was carried out in the town of Panorama, endemic to VL and located in the northwest of São Paulo, Brazil. Regarding the serological diagnosis results we observed that dogs living in the peripheral area of the town had 5.7 times more chance to be seropositive when compared to dogs that lived in the central area. When we used real time PCR to identify the infected dogs no significant association was observed between the positive and the variables related to peridomiciliary areas, neither to those variables related to the dog's characteristics. Therefore, we conclude that the peripheral location of the domiciles have showed to be a potential risk factor for seropositivity to visceral leishmaniasis in dogs of urban area.

**Keywords:** dogs, tropical disease, epidemiology, prevention measures, visceral leishmaniasis

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é um sério problema de saúde pública devido sua ampla distribuição, incidência e letalidade. Essa zoonose é causada por um protozoário intracelular do gênero *Leishmania*, sendo considerada uma das seis zoonoses de maior importância no mundo (DESJEUX, 2004), com distribuição mais intensa em cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. A Organização Mundial de Saúde destaca a LV como uma das dezessete doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2014).

A transmissão da LV ocorre por meio da picada de flebotomíneos fêmeas, sendo o *Lutzomyia longipalpis* o mais frequente no Brasil, o qual se adapta facilmente a ambientes modificados pelo homem, especialmente aqueles associados aos abrigos de animais domésticos (WERNECK et al., 2008).

O cão é considerado o principal reservatório desta zoonose e fonte de infecção para o vetor (ALVAR et al., 2004) possuindo um importante papel na manutenção do ciclo epidemiológico uma vez que os casos caninos precedem os casos humanos (ROSALES; YANG, 2006). Algumas espécies de animais silvestres como raposas e marsupiais (ASHFORD, 2000), bem como primatas, lagomorfos e equinos também podem atuar como reservatórios (SOUZA et al., 2014).

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) pode ser realizado por método sorológico e/ou molecular. O Ministério da Saúde brasileiro tem preconizado duas técnicas para os inquéritos epidemiológicos: o teste imunocromatográfico (TR-DPP<sup>®</sup>) e o teste imunoenzimático EIE-ELISA<sup>®</sup> (BRASIL, 2016). Já na rotina clínica veterinária, o diagnóstico molecular por PCR ou PCR em tempo real (qPCR) tem sido utilizado com maior frequência, demonstrando melhor precisão nos resultados devido à identificação da presença do DNA do protozoário. Para os testes moleculares amostras biológicas como sangue, aspirado de linfonodo e medula óssea têm sido mais utilizadas, embora sejam de colheita mais invasiva. No entanto, o uso de *swab* conjuntival tem sido mais frequente pelo fácil manejo do animal na colheita, com resultados de sensibilidade diagnóstica acima de 90% (PEREIRA et al., 2016).

No Brasil, o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral destaca algumas medidas de prevenção e controle, dentre elas o diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, o monitoramento e combate do vetor por meio de inseticidas e manejo ambiental, e a identificação e eliminação dos casos caninos (BRASIL, 2016).

A urbanização da LV constitui-se num novo padrão epidemiológico que surgiu associado à alterações ambientais como desmatamentos, falta de saneamento em regiões periféricas bem como aos processos migratórios, como à migração da população humana e de cães positivos para cidades. Essas mudanças tornaram possível que o ciclo de transmissão, antes considerado apenas de áreas rurais, pudesse expandir para ambientes urbanos (GONTIJO; MELO, 2004; MENDES et al., 2000).

Para melhor compreensão da ocorrência de LV no meio urbano é primordial a identificação de fatores associados à infecção canina. A ocorrência de LVC nos cães de áreas urbanas pode estar relacionada a fatores extrínsecos tais como a localização do domicílio do tutor, coleta de lixo domiciliar, presença de matéria orgânica e entulhos no peridomicílio, bem como à fatores intrínsecos como o sexo, raça, idade, coloração e tamanho do pelame do cão (COURA-VITAL et al., 2011).

O objetivo do presente estudo foi analisar fatores associados à infecção canina em área urbana em que medidas de proteção individual foram previamente aplicadas, com intuito de auxiliar na prevenção e controle desta zoonose.

## **MATERIAL E MÉTODO**

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no uso de Animais da FMVZ-USP (processo 2370/2011).

### **Área do estudo e população alvo**

O estudo foi realizado na área urbana do município de Panorama, localizado ao longo do rio Paraná, no noroeste do estado de São Paulo

(S20°25'36,47"; O51°20'26,47"), endêmico para leishmaniose visceral (LV) desde 2007, possuindo características de área ruralizada, com presença de casas com bastante vegetação e animais de grande porte vivendo próximo aos domicílios nas áreas mais periféricas. As atividades do município são voltadas para piscicultura e olaria e sua população é estimada em 15.619 habitantes (IBGE, 2017).

Os cães do presente estudo eram procedentes de estudo anterior (Lopes et al., 2017) que avaliaram medidas de proteção individual em 278 cães soronegativos para LVC, domiciliados no município de Panorama, SP (Figura 1). As medidas avaliadas foram o uso da coleira impregnada com deltametrina 4%, (Scalibor®) e/ou vacinação com uma vacina de subunidade (Leishmune®- Zoetis™ Brasil) ou com uma vacina recombinante (Leish-Tec®- Hertape Calier), aplicadas conforme recomendação dos fabricantes. Neste estudo realizado por Lopes et al. (2014), cães foram aleatoriamente selecionados para compor cinco grupos de 42-52 cães, de acordo com as intervenções, além de um grupo controle.



Figura 1- Foto de satélite da cidade de Panorama/googlemaps. (Fonte: LOPES, 2015).

Dois anos após o término do referido estudo, os domicílios onde os cães residiam foram revisitados por nossa equipe para obtenção de informações por meio da aplicação de um questionário (Apêndice 1), contendo informações relacionadas ao cão (pelagem, raça, idade, sexo, tamanho e coloração da pelagem, presença de sinais clínicos), e a fatores extrínsecos (localização do domicílio e condições do peridomicílio). Todos os tutores relataram não terem dado continuidade à aplicação de qualquer medida de prevenção e controle.

Adicionalmente, amostras biológicas de sangue para obtenção de soro (n=105) e esfregaço conjuntival dos cães (n=93) foram colhidas, após consentimento dos tutores, e mantidas a -20°C, até o processamento.

### **Diagnóstico sorológico e molecular**

A presença de anticorpos anti-*Leishmania spp.* foi avaliada por meio do teste imunocromatográfico TR-DPP<sup>®</sup> (Bio-Manguinhos) e do teste EIE-ELISA<sup>®</sup> (Bio-Manguinhos). Estes testes já validados, são utilizados nos inquéritos epidemiológicos para triagem e confirmação, respectivamente. As técnicas foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante e seguindo-se à recomendação do Ministério da Saúde do Brasil.

Adicionalmente, a amplificação de DNA de *Leishmania spp.* foi realizada por meio da PCR em tempo real (qPCR), em amostras de esfregaço (*swab*) de conjuntiva. A extração do DNA foi realizada com o kit *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen<sup>®</sup>), seguindo-se as recomendações do fabricante, após o descongelamento e adição de 500µL de solução salina 0,9%, por 12 horas.

A amplificação de DNA da região conservada do minicírculo do kinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* foi realizada por meio da qPCR segundo Francino et al. (2006), utilizando-se 900nM de cada oligonucleotídeo iniciador (LEISH-1 - 5'- AAC TTT TCT GGT CCT CCG GGT AG - 3' e LEISH-2 - 5' - ACC CCC AGT TTC CCG CC -3'), 200nM de sonda hidrolisada (FAM - 5'- AAA AAT GGG TGC AGA AAT - 3'- BHQ1 *quencher* não fluorescente), 10 µL do *Light Cycler 480 Probes Master*<sup>®</sup> (Roche Diagnostics) 2x concentrado, 3 µL de água ultrapura e 5 µL de DNA da amostra.

A reação foi feita em termociclador *Light Cycler 480II<sup>®</sup> Thermal Cycler* (Roche Diagnostic) em placas *white Light Cycler 480<sup>®</sup>* (Roche Diagnostic) a 95°C, por 10 minutos, e 50 ciclos a 95°C, por 10 segundos, seguido de 50°C, por 60 segundos e 72°C, por 1 segundo.

As amostras foram testadas em duplicata e um controle negativo (água ultra-pura) e um positivo (promastigota de *Leishmania chagasi*, mantidas em cultivo) foram incluídos em todas as reações. Curvas de amplificações foram analisadas pelo programa *Lighcycler 480 SW<sup>®</sup>*, versão 1.5.1. (Roche Diagnostic) empregando-se como critério os resultados do cálculo, de acordo com o manual do programa.

### **Análise estatística**

A diferença da proporção de positividade entre os testes diagnósticos foi avaliada pelo teste de duas proporções. A relação entre as variáveis e o resultado dos diagnósticos para LVC foram analisadas por meio do teste do qui-quadrado e por regressão logística múltipla.

A comparação dos testes sorológicos antes e depois da aplicação de medidas de proteção individual nos cães foi realizada por meio do teste McNemar.

Todos os testes foram feitos com auxílio do Programa SAS<sup>®</sup> (SAS, 2009), considerando-se nível de significância 5%.

## **RESULTADOS**

Do grupo inicial de 278 cães do estudo anterior, no momento da nossa pesquisa, 31% já haviam sido eutanasiados e 25% mudado de endereço.

A soroprevalência observada neste estudo foi de 30,1% (28/93) ao teste TR-DPP<sup>®</sup>, 22,5% (21/93) ao teste EIE-ELISA<sup>®</sup> e, aos dois testes, foi de 22,5% (21/93). A amplificação de kDNA por meio da qPCR em amostras de esfregaço conjuntival foi positiva em 16,1% (15/93) dos cães, não sendo a diferença entre os

resultados dos dois testes estatisticamente significante ( $p=0,2655$ ) ao teste de duas proporções. A positividade concomitante aos testes sorológicos (TR-DPP+ELISA) e molecular (qPCR) foi de 8,2%.

A relação entre as variáveis analisadas e o resultado dos testes sorológicos DPP+ELISA (Tabela 1) mostraram que cães machos ( $p<0,74$ ), de raça definida ( $p<0,42$ ), adultos ( $p<0,71$ ), com pelo curto ( $p<0,07$ ) e claro ( $p<0,20$ ) aparentemente estão mais propensos a positividade para LVC, embora esta associação não seja estatisticamente significante, possivelmente pelo fato de termos um tamanho amostral pequeno.

À análise univariada, a presença de sinais clínicos e a localização dos domicílios apresentaram-se estatisticamente associados à presença de anticorpos anti-*Leishmania* ( $p<0,01$ ), ao teste do qui-quadrado. Entretanto, ao teste de regressão logística múltipla, somente a domiciliação na periferia resultou em fator de risco, revelando 5,7 vezes mais chance dos cães serem soropositivos quando comparados aos que vivem na região central da cidade.

Quando se considerou o resultado da qPCR, maior percentual de positividade para LVC foi observado em cães do sexo feminino ( $p<0,57$ ), de raça não definida ( $p<0,04$ ), adultos ( $p<0,51$ ), de pelo de tamanho médio ( $p<0,76$ ) e escuro ( $p<0,68$ ) com presença de linfadenopatia ( $p<0,06$ ), que vivem com outros animais ( $p<0,07$ ) e nos domicílios localizados na periferia ( $p<0,30$ ).

À análise univariada, os cães positivos à qPCR foram estatisticamente associados ao fato de serem de raça definida ( $p<0,05$ ). Entretanto, à análise multivariada, não se confirmou ser este um fator de risco.

Com o intuito de avaliar se, além do tempo decorrido, as aplicações prévias de medidas de proteção individual poderiam ter influência nos potenciais fatores de risco, comparamos os resultados de sorologia (DPP+ELISA) dos cães durante o estudo anterior com os resultados obtidos dois anos após. A soropositividade dos cães aos 12 meses foi de 11,8% e não se observou associação estatisticamente significante com nenhuma das variáveis avaliadas.

Tabela 1. Variáveis relacionadas aos cães de Panorama- SP (n=93) e peridomicílio segundo a avaliação da presença de anticorpos anti-*Leishmania* por meio de testes imunocromatográfico TR-DPP® e EIE-ELISA® (Bio-Manguinhos) e a presença de kDNA de *Leishmania*, à PCR em tempo real

Variáveis	DPP+ELISA			qPCR	
	n	% pos	p valor*	% pos	p valor*
<b>Sexo</b>					
macho	37	24,3	0,7437	13,5	0,5772
fêmea	56	21,4		17,8	
<b>Raça</b>					
definida	69	24,6	0,4211	11,5	0,0495
Não definida	24	16,6		29,1	
<b>Faixa etária</b>					
adulto	68	23,5	0,7182	17,6	0,5115
idoso	25	20		12	
<b>Tamanho Pelame</b>					
curto	65	27,6	0,0724	15,3	0,7662
médio	28	10,7		17,8	
<b>Coloração Pelame</b>					
escuro	33	15,1	0,2038	18,1	0,6898
claro	60	26,6		15	
<b>Sinais Clínicos</b>					
dermatopatia	79	18,9	0,0125	12,6	0,0604
onicogrifose	8	62,5		37,5	
emagrecimento	4	0		25	
linfadenopatia	1	0		100	
combinação sinais	1	100		0	
<b>Outros animais</b>					
presente	32	21,8	0,9062	25	0,0921
ausente	61	22,9		11,4	
<b>Espécies</b>					
presença de outra	62	22,5	1,0000	11,2	0,0728
mais que uma espécie	31	22,5		25,8	
<b>Localização domicílio</b>					
centro	29	6,8	0,0149	10,3	0,3073
periferia	64	29,6		18,7	
<b>Tipo de Cobertura</b>					
cimento	35	22,8	0,9987	14,2	0,2891
terra	9	22,2		0	
mista	49	22,4		20,4	
<b>Peridomicílio</b>					
árvore	64	23,4	0,9873	18,7	0,1695
esgoto a céu aberto	5	20		40	
entulhos	4	25		0	
variados	20	20		5	

qPCR = PCR em tempo real; adulto=1 a 8 anos, idoso=acima de 8 anos; Não definida=sem raça definida. (\* teste qui-quadrado- significância 0,5%).

## DISCUSSÃO

No presente estudo analisamos variáveis relacionadas aos cães e ao peridomicílio urbano que pudessem ser fatores de risco potenciais para de a positividade à leishmaniose visceral canina (LVC). Tendo em vista que os testes sorológicos identificam a presença dos anticorpos decorrente da exposição ao protozoário ou infecção ativa (LARANJEIRA et al., 2014), enquanto que a qPCR identifica a infecção pela presença de DNA do protozoário até mesmo antes da soroconversão (FERREIRA et al., 2014), optamos por avaliar a relação entre as variáveis e os resultados dos testes de diagnóstico separadamente.

Dentre as variáveis analisadas o sexo masculino, a raça definida e a faixa etária adulta apresentaram-se associadas à maior soropositividade, embora não tenhamos observado diferença estatisticamente significativa. Zivicnjack et al. (2005) e Dantas-Torres et al. (2006) também observaram soroprevalência maior, porém estatisticamente significativa, em cães machos. Possivelmente, por estes estudos terem tamanho da amostra mais adequado, a diferença pode ser revelada. Uma das limitações de nosso estudo foi o pequeno tamanho da amostra (n=93), devido ao fato dos cães serem oriundos de estudo coorte anterior, com perdas no seguimento. Por outro lado, outros autores também relataram que o sexo não pôde ser considerado um fator de risco para LVC (ALMEIDA et al., 2010; SANTOS et al., 2017). Assim, estudos com número maior de cães poderão esclarecer melhor esta associação.

A faixa etária dos cães também foi objeto do presente estudo, embora a infecção em cães mais jovens não tenha sido avaliada visto os cães terem idade superior a dois anos e meio. Observamos que os cães adultos (<8 anos) apresentaram soroprevalência maior que os idosos. Cortes et al. (2012) também relataram que cães entre 5 e 8 anos de idade apresentaram maior risco de exposição à LVC. Entretanto, Lopes et al. (2014) destacaram que a soropositividade foi maior em cães de idade entre 2 a 5 anos e Lopes et al. (2016) observaram que cães com idade superior a 4 anos apresentaram 1,9 vezes mais chance de estarem protegidos da LVC. Em nosso estudo, o resultado associado à esta variável pode ter sido influenciado pelo número de cães adultos remanescentes ser maior do que de idosos.

No que se refere ao tamanho e coloração da pelagem nossa pesquisa revelou maior soropositividade em cães de pelo curto e claro, características que facilitam a picada do vetor. Resultado semelhante foi observado em estudo coorte realizado por Moreira et al. (2003) em cães de Jequié, BA, que apresentaram risco relativo 9,4 vezes maior de infecção quando comparados com animais com pelos longos. Outros autores observaram que cães de pelo curto e que vivem fora do domicílio – variável não avaliada pelo presente estudo - apresentam risco de infecção duas vezes maior do que animais de pelo longo (COURA - VITAL et al., 2013; LOPES et al., 2014).

Uma parte (22,5%) dos cães soropositivos de nosso estudo apresentavam algum sinal clínico, cuja a presença foi significativamente associada à soropositividade ( $p < 0,05$ ), à análise univariada, destacando-se as dermatopatias (84,9%). Porém, quando a presença dos sinais foi avaliada em conjunto com as outras variáveis deste estudo, não se observou significância estatística. Em estudo realizado por Almeida et al. (2012) com análise semelhante às nossas, a presença de sinais clínicos, incluindo as alterações dermatológicas, foram significativamente associados à soropositividade. Tal diferença nos resultados pode estar relacionada ao fato do tamanho da amostra ser três vezes maior do que a da presente pesquisa.

Ao avaliarmos a presença de outros animais no peridomicílio não observamos associação com a soropositividade dos cães de Panorama, SP, embora o compartilhamento do espaço com outros animais como galinhas, porcos, e cavalos tenha sido apontado como fator de risco em outros estudos (ALEXANDER et al., 2002; CURI et al., 2014), possivelmente por favorecer a manutenção do vetor, aumentando assim o risco de infecção.

Quando avaliamos a localização dos domicílios, a região mais periférica na área urbana revelou-se um fator de risco, com chance 5,7 vezes maior dos cães destes locais serem soropositivos quando comparados aos domiciliados no centro. No município de Panorama- SP o ambiente mais favorável para ocorrência de LVC encontra-se na área periférica, próximo ao rio Paraná, com vegetação mais abundante, o que torna o ambiente favorável ao desenvolvimento e manutenção do vetor. Além disto, a população mais periférica de áreas urbanas, em geral, tem condições sócio-econômicas menos favoráveis facilitando assim a

ocorrência de LVC. De fato, os domicílios visitados nesta área eram de características estruturais mais simples, com condições sanitárias nem sempre adequadas, observando-se o acúmulo de lixo e matéria orgânica no peridomicílio (dados não apresentados). Estudo desenvolvido por Leça Júnior et al. (2015) demonstrou que casas em condições similares a estas apresentaram 1,9 vezes mais chance de ter cães com LVC, corroborando com o observado no presente estudo. Além disto, Lopes et al. (2016) demonstraram que a manutenção do peridomicílio limpo, sem matéria orgânica, lixo ou entulhos resultou em proteção 1,4 vezes maior dos cães à LVC. Por outro lado, Santos et al. (2017) não observaram associação entre LVC e a presença de matéria orgânica no peridomicílio. Entretanto, este estudo avaliou somente cães que estavam sob cuidados veterinários e cujos tutores restringiam o acesso ao exterior da residência, o que talvez tenha influenciado o resultado, fato este não presente na nossa pesquisa, pois não haviam restrições domiciliares aos cães.

Cães com raça definida foram significativamente associados à positividade à qPCR, à análise univariada, característica esta que pode estar mais associado às condições sócio-econômicas dos tutores que mantêm seus cães com raça definida em condomínios à beira rio, também localizados na área periférica, mas com cuidados gerais mais adequados do que os cães da população em geral, cujos cães não tem raça definida. Entretanto, quando esta variável foi avaliada simultaneamente com as demais não se mostrou ser um fator de risco.

Maia et al. (2016) usou a mesma técnica de qPCR e avaliaram 230 cães de diferentes locais (centros médicos veterinários, abrigos, fazenda e alguns animais com aptidão diferente a cães de estimação) e observaram que os cães sem raça definida clinicamente saudáveis apresentaram maior prevalência da presença de DNA de *Leishmania infantum* quando comparados aos cães de raça. Os autores associaram a ausência de sintomatologia dos cães sem raça definida a uma potencial resistência inata ao desenvolvimento e progressão da doença. Entretanto, este resultado pode ter sido observado por Maia et al. (2016) pelo fato do “n” amostral da sua pesquisa ter sido 2,4 vezes maior do que o presente estudo.

Quando comparamos os potenciais fatores de risco na mesma população canina de Panorama-SP dois anos antes, não observamos associação

estatisticamente significativa com nenhuma das variáveis avaliadas, considerando-se os resultados de sorologia (DPP+ELISA), possivelmente pelo curto período de tempo decorrido (2 anos após término do estudo prévio) bem como pelo fato das medidas de proteção (coleira repelente e/ou vacinação) terem sido aplicadas por apenas 12 meses. Este é o primeiro estudo que analisou potenciais fatores de risco em cães que haviam sido submetidos à medidas de proteção individual.

## **CONCLUSÃO**

A domiciliação dos cães na região periférica de área urbana revelou-se um fator de risco para a soropositividade à leishmaniose visceral canina, apresentando na área periférica da cidade de Panorama 5,7 vezes mais chance dos cães serem positivos a LV, acontecimento qual não foi possível observar antes de dois anos de exposição.

Diante do resultado do presente estudo, sugere-se aos gestores dos municípios que priorizem as áreas mais periféricas, propiciando estrutura urbana adequada, com implementação/melhoria das condições de saneamento básico, dos serviços de limpeza urbana e da coleta de lixo domiciliar, diminuindo assim o risco de ocorrência da LVC e, por conseguinte, da leishmaniose visceral em humanos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Serviço de Vigilância Sanitária do município de Panorama-SP; aos veterinários Dalmo Claro de Oliveira Filho e Danielly Vieira Bortoletto pelo auxílio na coleta de material biológico; ao pesquisador Dr. Roberto Hiramoto do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo; ao Professor Dr. Rodrigo Martins Soares do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ- USP e à Profa. Dra. Silvia Helena Venturoli Perri, pela análise estatística.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDER, B.; CARVALHO, R.L.; Mc CALLUM, H.; PEREIRA, M.H. Role of domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1480-1485, 2002.

ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V. R. F.; CRUZ F. A. C. S.; DAHROUG 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**, v. 21, n. 4, p. 359- 365, 2012.

ALMEIDA, A.B.P.F.; MENDONÇA, A.J.; SOUSA, V.R.F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1610–1615, 2010.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.

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

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, 2016.

CORTES, S.; VAZ, Y.; NEVES, R.; MAIA, C.; CARDOSO, L.; CAMPINO, L. Risk factors for canine in an endemic Mediterranean region. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2-4, p. 189-196, 2012.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROAT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; REIS, L. E. S.; BRAGA, S. L.; MORAES, M. H. F.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum*

infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. 1291, 2011.

COURA-VITAL, W.; REIS, A. B.; FAUSTO, M. A.; LEAL, G. G. A.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; CARNEIRO, M. Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from in endemic area of Brazil. **Plos One**, v. 8, n. 8, p. e71833, 2013.

CURI, N.H.A.; PASCHOAL, A. M. O.; MASSARA, R. L.; MARCELINO, A. P.; RIBEIRO, A. A.; PASSAMANI, M.; DEMÉTRIO, G.R.; CHIARELLO, A.G. Factors associated with the seroprevalence of leishmaniasis in dogs living around Atlantic forest fragments. **Plos One**, v. 9, n. 8, p. e104003, 2014.

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

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

FERREIRA, A.L.C.; CARREGAL, V. M.; FERREIRA, S.A.; LEITE, R.S.; ANDRADE, A.S.R. Detection of *Leishmania infantum* in 4 different dog samples by real time PCR and ITS -1 nested PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, p. 418- 421, 2014.

FRANCINO, O. ALTET L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3- 4, p. 214- 221, 2006.

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

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **População**. 2017. Disponível em: < <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/panoramal>>. Acesso em: 29 ago. 2017

LARANJEIRA, D.F.; MATTA, V.L.; TOMOKANE, T.Y.; MARCONDES, M.; CORBET, C.E.; LAURENTI, M.D. Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis- endemic area. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 4, p. 563- 571, 2014.

LEÇA JUNIOR, N.F.L.; GUEDES, P.E.B.; SANTANA, L.N.; ALMEIDA, V.A.; CARVALHO, F.S.; ALBUQUERQUE, G.R.; WENCESLAU, A.A.; MUNHOZ, A.D.; SILVA, F.L. Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil. **Acta Tropica**, v. 148, p.115-119, 2015.

LOPES, M.P.; SORTE, E.C.B.; GASPARETO, N.D.; OLIVEIRA, C.M.; ALMEIDA, A.B.P.F.; SOUZA, V.R.F. Soroprevalence and risk factors associated with visceral leishmaniasis in dogs in Jaciara, State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 791-795, 2014.

LOPES, E.G. Estudo de campo para avaliação da efetividade da vacinação e de uso de coleiras impregnadas com inseticidas para o controle da leishmaniose visceral canina, 2015. **Tese (Doutorado)** - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2015.

LOPES, G.P.; OVIEDO-PASTRANA, M.E.; BORGES, L.F.N.M.; FREITAS, A.C.P.; DIAS, E.S.; SILVA, S.R.; HADDAD, J.P.A; FRANÇA-SILVA, J.C.; SOARES, D.F.M. Transmission of visceral leishmaniasis in dogs in a risk area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 6, p.1403-1412, 2016.

LOPES, E.G.; SEVÁ, A.P.; FERREIRA F.; NUNES C.M.; KEID L.B.; HIRAMOTO, R. M.; FERREIRA H.L.; OLIVEIRA, T.M.L.S.; BIGOTTO, M.F.D.; GALVIS-OVALLOS F.; GALATI, E.A.B.; SOARES, R.M. Sorological and molecular diagnostic teste for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiology and Infection**, v. 45, n. 12, p. 2436- 2444, 2017.

MAIA, C.; ALTET, L.; SERRANO, L.; CRISTÓVÃO, J.M.; TABAR, M.D.; FRANCINO, O.; CARDOSO, L.; CAMPINO, L.; ROURA X. Molecular detection of *Leishmania infantum*, *filariae* and *Wolbachia spp.* in dogs from southern Portugal. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 170, 2016.

MENDES, W.S.; TROVÃO, J.R.; SILVA, A.A.M. Dinâmica da ocupação do espaço na cidade de São Luís e a leishmaniose visceral. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 3, p. 872, 2000.

MOREIRA, E.D.; SOUZA, V.M.M.; SREENIVASAN, M.; LOPES, N.L.; BARRETO, R.B.; CARVALHO, L.P. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban: new findings from a prospective study in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.64, n. 4, p. 393-397, 2003.

PEREIRA, V.F.; BENASSI, J.C.; STARKE-BUZETTI, W.A.; SILVA, D.T.; FERREIRA, H.L.; KEIDE, L.B.; SOARES, R.M.; RUIZ, V.L.A.; OLIVEIRA, T.M.F. S. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival sawb PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 104-106, 2016.

ROSALES, J.C.; YANG, H.M. Modelo matemático para descrever a transmissão de leishmaniose. **Trends in Applied and Computational Mathematics**, v. 7., n. 2, p. 337-346, 2006.

SANTOS, H.D.; GALVÃO, S.R.; DIAS, F.E.F; RIBEIRO, T.M.P.; NEGREIROS FILHO, O.; SOUSA, S.A.P.; MINHARRO, S. High frequency of visceral leishmaniasis in dogs under veterinary clinical care in an intense transmission

area in the State of Tocantins, Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, p. e20160260, 2017.

SAS. **SAS**: Software de Business Analytics and Business Intelligence: version 8. Cary: SAS Institute Inc., 2009. (software).

SOUZA, T.D.; TURCHETTI, A.P.; FUJIWARA, R.T.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. **Veterinary Parasitology**, v. 200., n. 3-4, p. 233-241, 2014.

WERNECK, G.L.; PEREIRA T.J.C.F.; FARIAS G.C.; SILVA F.O.; CHAVES, F.C.; GOUVÊA, M V.; COSTA, C.H.N.; CARVALHO, F.A.A. Assessment of the effectiveness of control strategies for visceral leishmaniasis in the city of Teresina, state of Piauí, Brazil: baseline survey results – 2004. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 2, p. 87-96, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**: Magnitude of the problem. 2014. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html)>. Acesso em: 27 ago. 2017.

ZIVICNJACK, T; MARTINKOVIC, F.; MARINCULIC, A; MRLJACK, V.; KUCER, N.; MATIJATKO, V.; MIHALJEVIC, Z.; RAFAJ, R.B. A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. **Veterinary Parasitology**. v. 131, n. 1-2, p. 35–43, 2005.

## APÊNDICE 1

DATA  
 AVALIAÇÃO Nº 1  
 R.A.:

**CASA**

arvore

cimento

grama

terra

esgoto

entruino

materia organica

animais na casa

galinha

gato

cao

equino

porco

localização

centro

periferia

proximo a mata

proximo ao rio

**CÃO**

pelagem curta

pelagem media

pelagem longa

pelagem escura

pelagem clara

pelag bicolor(E/C)

idade

raça

tem casinna propria

vive fora de casa

vive dentro e fora

dorme fora de casa

alterações cutaneas

dermatite ulcerativa

pelame opaco

alopecia perocular

alopecia generalizada

ulcerações

onicogrirose

demais alterações

ceratoconjuntivite

caquexia

magro

anemia

intraoemopatia

emagrec. Progr.

alergias

coleira

vacina 1º

vacina 1º e 2º

vacina 3x

DATA  
 AVALIAÇÃO Nº 2  
 R.A.:

**CASA**

arvore

cimento

grama

terra

esgoto

entruino

materia organica

animais na casa

galinha

gato

cao

equino

porco

localização

centro

periferia

perto mata

proximo ao rio

**CÃO**

pelagem curta

pelagem media

pelagem longa

pelagem escura

pelagem clara

pelag bicolor(E/C)

idade

raça

tem casinna propria

vive fora de casa

vive dentro e fora

dorme fora de casa

alterações cutaneas

dermatite ulcerativa

pelame opaco

alopecia perocular

alopecia generalizada

ulcerações

onicogrirose

alterações oculares

ceratoconjuntivite

caquexia

magro

anemia

intraoemopatia

emagrec. Progr.

alergias

coleira

vacina 1º

vacina 1º e 2º

vacina 3x