

EDNEA FREITAS PORTILHO SILVA

**INQUÉRITO SOROLÓGICO DE LEISHMANIOSE CANINA NA
CIDADE DE RIO VERDE -GO**

CAMPO GRANDE

2007

EDNEA FREITAS PORTILHO SILVA

**INQUÉRITO SOROLÓGICO DE LEISHMANIOSE CANINA NA
CIDADE DE RIO VERDE -GO**

**ORIENTADORA: PROFa. DRa. IANDARA SCHETTERT SILVA
COORDENADOR: PROF. DR. CARLOS ALBERTO BEZERRA DE
TOMAZ**

*DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA SAÚDE –REDE
CENTRO-OESTE, CONVÊNIO UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA, UNIVERSIDADE DE RIO
VERDE, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE.*

CAMPO GRANDE

2007

DEDICATÓRIA

Ao Deus Elohim, Adonai, El Roi, que me capacitou e guardou durante todo este período.

Aos meus pais que me orientaram durante toda minha vida, meu pai Edsel Emrich Portilho (*in memória*) que imprimiu em mim o censo de responsabilidade e hombridade, e em especial minha mãe Nair Freitas dos Santos Portilho, uma mulher virtuosa que não mede esforços para minha realização pessoal e profissional.

A minha família esposo Zeile Fonseca da Silva e filhos Edsel Emrich Portilho Neto e Adna Alice Portilho Silva, pela compreensão e estímulo, mesmo nos momentos mais difíceis desta jornada.

A todos que torceram e me auxiliaram de uma forma impar meus irmãos Edsel, Edna, Edwal, cunhados e cunhadas, sobrinhas e sobrinhos. Amo todos vocês e agradeço de todo meu coração. Ebenezer!!!!

AGRADECIMENTO

A Deus. Autor e consumidor da minha fé

À minha família apoio seguro em todos os momentos da minha vida.

À Prof^a Dr^a Iandara Schettert Silva, pela oportunidade e orientação, tonando possível a realização deste trabalho através da sua dedicação, incentivo e confiança.

Ao Prof. Dr Carlos Alberto Bezerra de Tomaz, coordenador deste programa, pelo apoio e incentivo.

Aos professores deste programa que contribuíram imensamente para meu crescimento científico e pessoal.

À reitora de Pós-Graduação Prof^a Dr^a Maria Dolores, que sempre me atendeu e me estimulou e orientou nos momentos de dificuldade.

À Diretora da Faculdade de Biologia Prof^a. Dra. Juliana, pelo apoio e estímulo.

À Secretaria da Saúde, na pessoa do Secretária da Saúde Eduardo Pimenta.

À Bioquímica, Tâmara Guimarães Fonseca Horbilon, no auxílio durante a realização dos exames sorológicos.

Ao quadro de professores, funcionários e alunos da FESURV, pela força e incentivo, ao Prof. Dr.Sérgio Zaidem, a Jucélia (Téc. Laboratório), José Neto (Biólogo) que se posicionaram a frente de batalha comigo, sendo mais que colegas, mas verdadeiros amigos, muito obrigada.

E aos colegas de mestrados que muito me ensinaram, e auxiliaram para que eu chegasse até aqui, sucesso a vocês.

E aos colegas de profissão Murici e Diana, mais que colegas amigos pessoais que muito me ajudaram.

A todos meu muito obrigada e que Deus em Sua imensa grandeza abençoe e guarde a todos vocês.

RESUMO

Com o objetivo de estudar a prevalência da Leishmaniose Visceral Canina no município de Rio Verde –GO, estudou-se a microregião sudeste da cidade, onde foi realizado um inquérito através de prova sorológica por ELISA, devido ao aumento de notificação de Leishmaniose Tegumentar Humana. Realizou-se um inquérito sorológico para investigar leishmaniose tegumentar em cães de cinco bairros com notificação de casos em humanos. Foram investigados 263 cães, dos quais 70 (26,62%) apresentaram títulos significativos de anticorpos através da técnica de Imunofluorescência por ELISA/S7[®], não verificado diferença significativa de incidência por área estudada, sintomatologia, idade ou procedência dos cães, e observada uma diferença significativa quanto ao sexo do animal, sendo 34,78% dos soro positivo machos.

Palavras-chave: Leishmaniose Canina, Inquérito Sorológico Epidemiologia; Zoonose.

ABSTRACT

With the objective to study the prevalence of the Canine Visceral Leishmaniosis in the city of Rio Verde - GO, it was studied Southeastern microregion of the city, where an inquiry through sorologic test for ELISA was carried through, whom had to the increase of notification of Leishmaniosis Tegument Human being. A sorologic inquiry was become fulfilled to investigate tegumentar leishmaniosis in dogs of five quarters with notification of cases in human beings. 263 dogs had been investigated, of which 70 (26.62%) had presented significant headings of antibodies through the technique of Imunofluorescence for ELISA/S7®, not verified significant difference of incidence for studied region, sintomatologic, age or origin of the dogs, and observed a significant difference how much to the sex of animal, being 34.78% of the positive serum male.

Key words *Canine Leishmaniosis; Inquerit Epidemiology; Zoonosis*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Distribuição dos resultados pelos bairros investigados através de ELISA.....	20
TABELA 2: Correlação entre Animais Sintomático e Assintomáticos, conforme soro reagência.....	21
TABELA 3: Prevalência Leishmaniose canina de acordo com a idade e soro reação.....	22
TABELA 4: Comparação Sexo conforme soro reação.....	22
TABELA 5: Comparação Procedência conforme soro reação	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sintomas da leishmaniose canina.....	3
Figura 2: Localização do município de Rio Verde – GO.....	5
Figura 3: Femea do flebotomíneo adulto, engurgitando e engurgitado.....	8
Figura 4: <i>Leishmania</i> nas formas promastogota e amastigota.....	9
Figura 5: Ciclo do protozoário <i>Leishmania sp.</i>	11
Figura 6: Mapa de Rio Verde e áreas estudadas.....	16

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Valores totais dos resultados, conforme distribuição em soro-reagentes, soro-não reagentes e indefinidos.....	19
---	-----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Riscos emergentes.....	6
2.2 Características e evolução da doença.....	7
2.3 Diagnóstico por ELISA.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. Área de estudo.....	15
3.2. Escolha dos bairros.....	15
3.3. Amostra para o inquérito canino.....	16
3.4. Procedimentos.....	17
3.5. Coleta e Processamento.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
6. CONCLUSÃO.....	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA.....	26
APÊNDICE.....	32
OBTENÇÃO DA AMOSTRA DE SANGUE CANINO.....	33
FICHA CLÍNICA.....	35
ANEXO.....	36
KIT PARA DIAGNÓSTICO DO CALAZAR CANINO ELISA/S7®.....	37
PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO E REALIZAÇÃO DO TESTE.....	38
RESULTADOS DO EXAME SOROLÓGICO DE CALAZAR CANINA.....	39

1. INTRODUÇÃO

Assim como em outras regiões brasileiras, no estado de Goiás, na cidade de Rio Verde, existe evidência da leishmaniose visceral canina (LVC), quer clinicamente nos animais, ou a ocorrência da doença no homem.

Vários são os registros da doença no Brasil, sendo que a leishmaniose visceral (LV), na atualidade, tem sido apontada como doença reemergente, caracterizando nítido processo de transição epidemiológica, apresentando incidência crescente nos últimos anos nas áreas onde ocorria tradicionalmente; expansão geográfica para os estados mais ao sul do país e também um franco processo de urbanização em cidades localizadas em regiões distintas, como o Nordeste e o Sudeste. Cidades como Boa Vista e Santarém (Região Norte); Terezina, São Luiz, Natal e Aracajú (Região Nordeste); Montes Claros, Belo Horizonte, Araçá, Sabará, Perdões e Rio de Janeiro (Região Sudeste) e Cuiabá (Região Centro Oeste), já vivenciaram ou vivenciam, recentemente, endemias de leishmaniose visceral humana e canina (ALVES & BELVILACQUA, 2004); Anastácio – MS (AMÓRA *et al.*, 2000); Birigui – SP (VIGILATO *et al.*, 2004); Poxoréo – MT (AZEVEDO *et al.*, 2004); Região Metropolitana do Recife (DANTAS TORRES, 2005); Jaboticabal – SP (SAKAMOTO *et al.*, 2006); Araçatuba – SP (ISHIZAKI *et al.*, 2006); Bauru – SP (LANGONI *et al.*, 2006); Bom Sucesso – MG (SILVA E ROSA, 2005). Tornando-se um importante problema de Saúde Pública, devido à sua incidência e alta letalidade. Nas Américas, 90% dos casos humanos descritos são precedentes do Brasil. (MONTEIRO *et al.*, 2005).

A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos (CASTRO, 1996). A Leishmaniose visceral canina é uma doença que não tem

cura (NUNES *et al.*, 2005). Entretanto, é referido que no Brasil mais de 30% dos cães infectados são assintomáticos. (MOURA *et al.*, 1999)

O cão vem sendo apontado como reservatório da doença, e, como hospedeiro doméstico, é, provavelmente, o mais importante reservatório natural relacionado com casos humanos. Esse hospedeiro apresenta variações no quadro clínico da doença, passando de animais aparentemente saudáveis a oligossintomáticos podendo chegar a estágios graves da doença com intenso parasitismo cutâneo (COSTA *et al.*, 1999; VIGILATO *et al.*, 2004; AZEVEDO *et al.*, 2004). Apesar de ser uma enfermidade sistêmica, no cão, os principais sinais clínicos são dermatológicos. O cão alberga a *Leishmania* em seu tegumento, principalmente na orelha e focinho. (LIMA *et al.*, 2000; TRAVI *et al.*, 2001)

SHAW (2006) e ZANZARINI *et al.* (2005) indagam sobre o verdadeiro papel do cão como fonte de infecção, e analisa situações em que o cão está infetado, sendo um reservatório ou um hospedeiro acidental, pois o cão pode ser contaminado numa área onde existe um ciclo selvático de leishmaniose visceral, e ao retornar para o ambiente onde exista o vetor pode espalhar a infecção para outros cães, iniciando um foco peridoméstico. Em contrapartida, recentemente, foi mostrado que o homem, que não é considerado como fonte de infecções de leishmaniose, quando na fase aguda são infectantes, e que ao se deslocar nesta fase para áreas onde não há infecção em cães, em existindo a presença do vetor ocorre a transmissão da infecção para os cães, se tornando um hospedeiro acidental e não um reservatório primário ou secundário. Ambos definidos por ASHFORD (2000) e SILVA (2006) como aqueles que são capazes de manter o ciclo sozinho.

Segundo SAVANI *et al.* (2003) a identificação de cães infectados e sua eliminação, com as demais medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde, têm contribuído para a redução da infecção humana, pois os casos de

calazar caninos precedem os humanos em áreas urbanas do Brasil. Mesmo assim, não é possível verificar o quanto eficaz possa ser esta medida.

É uma doença grave, que atinge crianças, jovens, adultos ou pessoas imunossuprimidas e, quando não tratada, pode apresentar letalidade de 95%. Em cães, seu principal reservatório doméstico, há uma prevalência significativa, sendo que muitos casos são assintomáticos ou oligossintomáticos (GENARO, 2000; SANCHES & TAPIA, 2005). Segundo o Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose (2003). Classificam-se os sinais clínicos como assintomáticos; oligossintomáticos – perda de peso, pêlo opaco; sintomático - apatia, alopecia, onicogribose, lesões de pele da face e orelha, ceratoconjuntivite. (Figura 1)

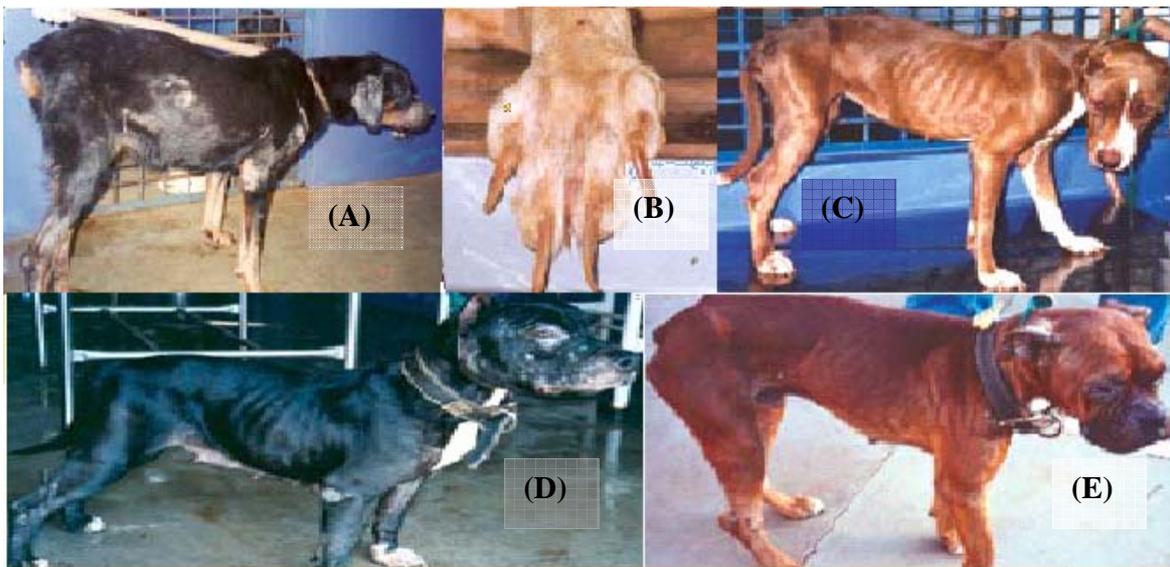


Figura 1: Sintomas da leishmaniose canina

(A)- cão apático, com alopecia e lesões no corpo; (B)- cão com onicogribose (crescimento de unha); (C)- cão apresentando emagrecimento e apatia; (D)- cão com lesões da face e orelha; (E)- cão com emagrecimento, ceratoconjuntivite, lesões de face e orelha.

Fonte: MVCL (2003)

Os diagnósticos precoce, em humanos e caninos, precocemente se fazem necessários por se tratar de uma doença que pode ser fatal para o ser humano, e por ser necessária a adoção de medida de controle específica sobre o reservatório doméstico da doença, incluindo seu sacrifício quando este se encontra infestado. (ALVES & BEVILAZQUA, 2004)

O inquérito soro-epidemiológico por ELISA tem por objetivo investigar o nível sorológico de infestação dos cães por *Leishmania*. Levando-se em conta a relevante importância e interesse em Saúde Pública este inquérito de natureza investigativa, objetiva obter um diagnóstico precoce da situação epidemiológica da enfermidade, identificando dos cães infectados, para o desenvolvimento de uma política preventiva, evitando-se os grandes prejuízos econômicos e de perda da saúde causados por esta antroponose reemergente na cidade de Rio Verde, que se encontra em franco desenvolvimento agroindustrial e, conseqüentemente um grande fluxo migratório das outras regiões do país e também rural-urbana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Ocupando uma área de 8.415,40Km o município de Rio Verde está localizado na microrregião Sudoeste do Estado de Goiás, Centro-Oeste brasileiro. A cidade fica a 220 km de Goiânia, capital do Estado e a 420 km de Brasília, capital do Brasil. A distância de Uberlândia é de 335 km e de São Paulo, 921 km. Suas coordenada são: latitude (S) - 17° 47' 53"; longitude (W) - 51° 55' 53". (PREFEITURA DE RIO VERDE, 2006). (Figura 2)

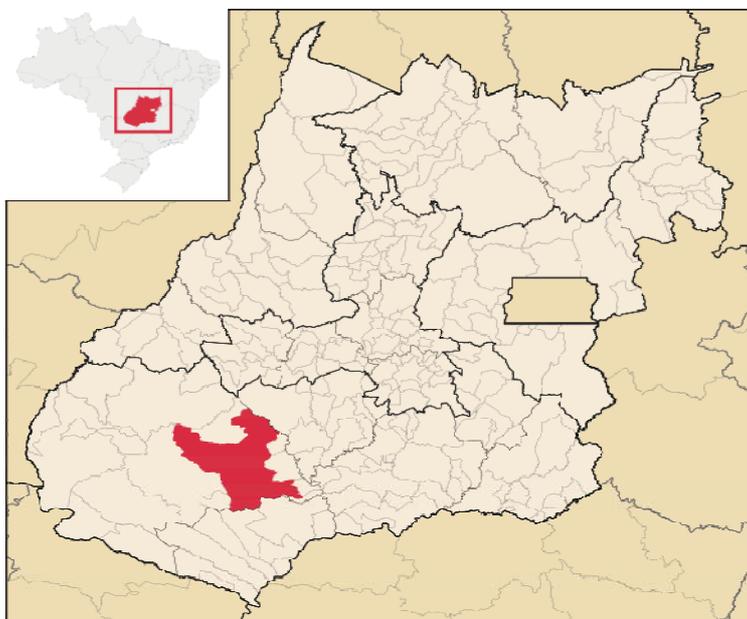


Figura 2: Localização do município de Rio Verde - GO

Fonte: Secretaria Municipal do Meio Ambiente.

Sua população estimada em 2000, era de 134.211 habitantes. Sua topografia é plana, levemente ondulada com 5% de declividade, com altitude média de 748 m, e o clima apresenta duas estações definidas: uma seca de maio a outubro e outra chuvosa no período de novembro a abril. A temperatura média anual varia entre 20° e 35° C. A vegetação é constituída de cerrado e matas residuais. O solo é vermelho escuro (latossolo), com texturas argilosa e areno-argilosa.

2.1 Riscos emergentes:

Novas doenças emergentes ou reemergentes em humanos são causadas por uma grande variedade de espécies animais, tanto domésticos quanto selvagens, sendo reservatórios de patógenos como vírus, bactérias ou parasitas.

As zoonoses emergentes têm implicações diretas e indiretas para Saúde Pública: as implicações diretas são definidas como as que têm consequência para a saúde humana em termos de patologia e mortalidade e as implicações indiretas são as que afetam ou influenciam a doença zoonótica emergente ou a saúde profissional e pública em geral (MESLIN et al., 2000).

MESLIN & STOHR (1997), conceituam emergência e reemergência zoonótica como um tópico de relativa complexidade. A concepção não envolve somente novas ou recentes zoonoses identificadas, mas também agentes já conhecidos que surgem nas regiões, e/ou espécies nos quais não tem sido observadas e agentes desaparecidos, que então reaparecem numa região, desencadeando uma epidemia.

As mudanças demográficas ocorridas nos países subdesenvolvidos a partir dos anos 60, geradas por intenso fluxo migratório rural - urbano, resultaram em

crescimento desordenado de facilidades, em particular, de habitação e saneamento básico (TAUIL, 2001).

Para MESLIN et al. (2000) a efetiva vigilância, prevenção e controle das doenças zoonóticas é um desafio significativo.

As zoonoses continuam representando um importante obstáculo na Saúde Pública em várias partes do mundo, causando gastos consideráveis e perdas para saúde e setores agrícolas. A atividade do médico veterinário, enquanto profissional de saúde pública envolve um grande número de funções que refletem amplamente na comunidade. Programas de controle e eventual eliminação dos animais portadores são necessariamente urgentes (MESLIN & STOHR, 1997).

Sabe-se que na atualidade, as zoonoses constituem os riscos mais freqüentes e mais temíveis que a humanidade está exposta (MIGUEL, 2004), e que o número de espécies de microorganismos que causam infecções humanas é próximo a 1.415, sendo que 868 espécies (61%) são zoonóticas. Das patologias emergentes, 75% são de origem animal. Setores de Saúde Pública estão vigilantes quanto ao surgimento de novas doenças zoonóticas (YAMADA, 2004).

Definir-se-á que zoonoses são doenças ou infecções naturalmente transmissíveis entre as espécies animais e o homem (MELO *et al.*, 2004). Etimologicamente a palavra zoonose é originada do grego, sendo que seu prefixo "zoon" significa animal e o sufixo "nosos", doenças, embora não reflita bem este sentido, em 1966, no 3º Encontro de Peritos em Zoonoses da Organização Mundial de Saúde", chegaram à definição que, zoonoses são as doenças e infecções naturalmente transmissíveis entre os hospedeiros vertebrados e o homem (MIGUEL, 2004).

2.2 Características e evolução da doença:

As Leishmanioses são consideradas principalmente como zoonoses podendo acometer o homem quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antropozoonose. Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (OMS, 2003). Nas áreas endêmicas onde a leishmaniose tegumentar ocorre em crianças e adultos de ambos os sexos, com frequência os cães estão infectados por *Leishmania* sp. (COUTINHO *et al.*, 1985; FALQUETO *et al.*, 1986; NUNES *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2005).

A leishmaniose visceral canina ou calazar canino é uma doença sistêmica grave, de curso lento e crônico, difícil diagnóstico e cura. É uma zoonose e afeta em geral cães sadios (RIBEIRO *et al.*, 2001). É uma infecção sistêmica causada por um protozoário do gênero *Leishmania*. No Brasil, o principal vetor é o *Lutzomyia longipalpis* (Figura 3), sendo o cão doméstico o reservatório mais importante e o homem o hospedeiro final (FUNASA, 1999).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas; é primariamente uma infecção zoonótica, afetando outros animais que não o homem, o qual pode ser envolvido secundariamente.

O modo de transmissão habitual é através da picada de insetos que podem pertencer a várias espécies de flebotomíneos, de diferentes gêneros (*Psychodopygus*, *Lutzomya*), dependendo da localização geográfica. (Figura 3)

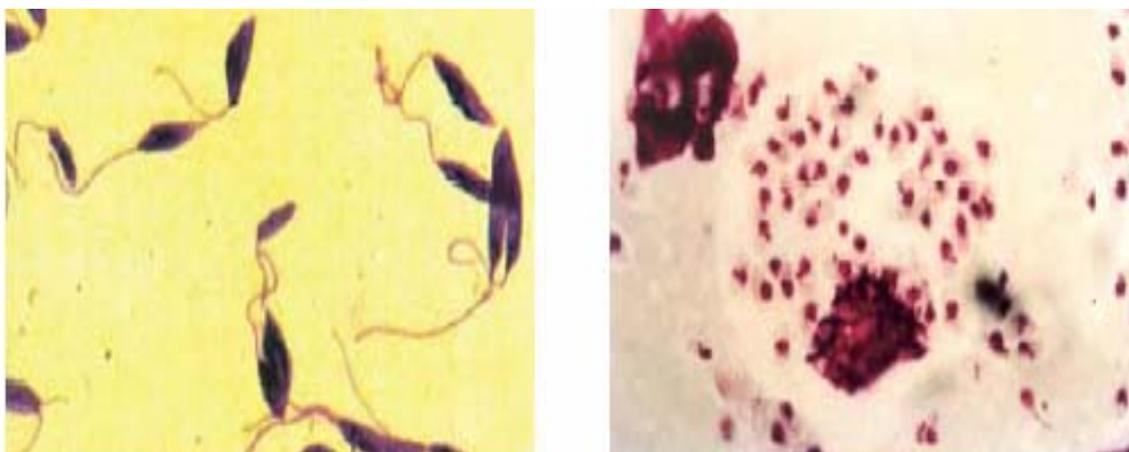


Figura 3: Fêmea do flebotomíneo adulto, ingurgitando e ingurgitado.
Fonte: Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose (2003).

A *Leishmania* é um protozoário pertencente a família Trypanosomatidae com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e em alguns meios de cultura artificiais, e outra aflagelada ou amastigota (Figura 4), como é vista nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (homem e outros animais superiores). O período de incubação da doença no homem é, em média, de 2 meses, podendo apresentar períodos mais curtos (duas semanas), ou mais longos (2 anos). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) inclui a leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM). A LTA, também conhecida como leishmaniose mucocutânea, úlcera de Bauru, ferida brava etc., distribui-se amplamente no continente americano, estendendo-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil tem sido assinalada em todos os estados, constituindo, portanto, uma das afecções dermatológicas que merecem maior atenção, devido à magnitude da doença, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no homem. Além disso, existe o envolvimento psicológico do doente, com reflexos no campo social e econômico. (FUNASA,2000).

A leishmaniose visceral americana (LVA) é um problema de Saúde Pública que tem atingido muitos estados do território brasileiro. Na epidemiologia dessa zoonose, o cão (*Canis familiaris*) atua como o principal reservatório do protozoário

Leishmania chagase em áreas urbanas (PARANHOS *et al.*, 1996; AZEVEDO *et al.*, 2004). Tem tido importância crescente nos últimos anos, na região Sudeste do Brasil, por causa da urbanização da doença. (LANGONI *et al.*, 2006)



A- Forma flagelada ou promastigota

B- Forma aflagelada ou amastigota

Figura 4: *Leishmania* nas formas promastigota (A), encontrada na saliva do vetor e amastigota (B), encontrada no hospedeiro.

Fonte: Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose.

A leishmaniose visceral apresenta amplo espectro epidemiológico no mundo, ocorrendo em vastas áreas tropicais e subtropicais do globo, podendo apresentar-se como zoonose ou antroponose, estas duas últimas quando o homem atua como reservatório no ciclo de transmissão do parasito (PASSOS *et al.*, 1993; VIGILATO *et al.*, 2004).

A infecção usualmente causa uma doença sistêmica crônica, no entanto, dependendo das propriedades do parasito e da imunocompetência do hospedeiro, a evolução pode ser aguda e grave, levando o animal a óbito em poucas semanas. Os sintomas tornam-se evidentes dentro de um período que varia de três meses a vários anos. E alguns animais o desenvolvimento da doença é latente, evoluindo à cura espontânea. (FEITOSA, 2006)

A Leishmaniose Visceral é uma importante endemia brasileira causada pela *Leishmania chagasi*, e transmitida ao homem pela picada do mosquito *Lutzomyia*

longipalpis, e tem como reservatórios, canídeos silvestres e domésticos (NUNES *et al*, 2005).

Este protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, possui um ciclo iniciando pela picada do mosquito infectado durante seu repasto com a forma amastigota. Uma vez no tubo digestivo do inseto, estas formas diferenciam-se e replicam-se em promastigota metacíclica (infectante). Posteriormente, as formas promastigotas migram para a faringe misturando-se com a saliva e é repassado ao novo hospedeiro através da picada do inseto na epiderme do hospedeiro, e fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, diferenciam-se em formas amastigotas, que se multiplicam intensamente por divisão binária. Os macrófagos repletos de formas amastigotas, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário. Não há predisposição sexual, racial ou etária para a infecção. Em modelos experimentais, os promastigotas se convertem em amastigotas nos macrófagos da pele, multiplicam-se e disseminam-se para fagócitos mononucleares através do sistema retículo endotelial. As células parasitadas mostram forte tendência a invadir baço, fígado e medula óssea. (SARIVA, *et al.*, 2006) (FIGURA 5)

. Hoje vários autores confirmam estas afirmativas, segundo o OMS (2003), no Brasil, a Leishmaniose Visceral inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte, tendo apresentado quadros graves de endemias e epidemias, havendo, nos últimos anos, uma propagação crescente da doença por vários estados que antes não possuíam casos de pessoas e nem animais. (ALVES & BEVILACQUA, 2004).

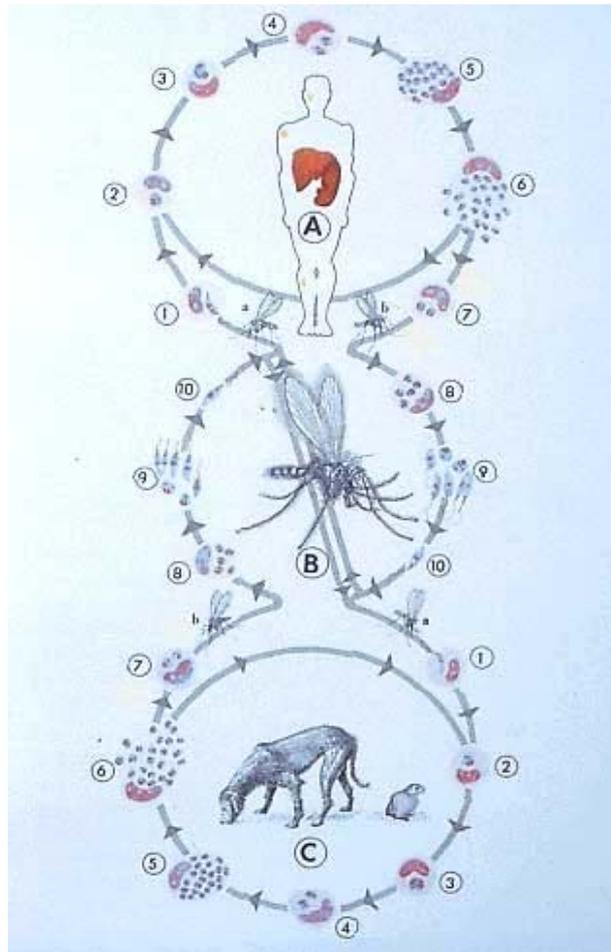


Figura 5: Ciclo do protozoário *Leishmania sp.*

Inicialmente associada a áreas rurais, devido às diversas alterações no ambiente como desmatamentos, urbanização e intenso processo migratório, ocorreu a expansão das áreas endêmicas, levando à urbanização da doença, principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do país (MONTEIRO *et.al.*, 2003). O uso e a ocupação desordenada destas áreas de transição entre as zonas urbanas e rurais são fatores que favorecem a incidência de leishmaniose, pois promove o desequilíbrio ambiental, e a conseqüente introdução do vetor a de mamíferos infectados em locais indenes, isto é, pelas condições precárias de higiene e falta de cuidados específicos com os animais domésticos. (REICHMANN, 2006)

SARAIVA *et al.* (2006); NOGUEIRA *et al.* (2005), consideram a leishmaniose visceral humana ou calazar como uma zoonose canídea, tendo como vetor os mosquitos-pólvora, e agente etiológico *L. chagasi* ou *L. infantum*, mosquito-pólvora através da alimentação em raposas, transmite agente etiológico aos cães, ocorrendo transmissão subsequente para humanos.

O registro do primeiro caso da doença no Brasil ocorreu em 1931, em Boa Esperança - MT (ALENCAR *et al.*, 1991). A seguir, o *Lutzomyia longipalpis* foi incriminado como espécie vetora e foram descobertos os primeiros casos da infecção em cães. NOGUEIRA *et al.*(2005), discorrem sobre uma epidemia grave de leishmaniose visceral canina que propagou-se do estado de Minas Gerais ao estado de São Paulo, em 1999, quando foram divulgados os primeiros casos da doença canina na cidade de Andradina – SP.

Desde então, tem se registrado a doença em vários municípios de todas as regiões do Brasil, exceto na Região Sul (OMS, 2003), por não apresentar condições climáticas ideais para o desenvolvimento do vetor, que se desenvolvem em áreas com alta umidade, calor e disposição de matéria orgânica.

A leishmaniose visceral canina é uma zoonose considerada endêmica em algumas regiões de São Paulo e outras localidades do país (TORRES NETO, 2005).

2.3 Diagnóstico por ELISA:

O método utilizado para o diagnóstico sorológico de Leishmaniose Canina Visceral foi a Reação de ELISA (*enzyme-linked immunisorbent assay*) que está baseado no reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos fixados, revelados através de uma proteína conjugada a uma enzima (Peroxidase)

permitindo a visualização da reação antígeno anticorpo para diagnóstico sorológico de leishmaniose.

O método sorológico ELISA mostra boa reatividade (NASCIMENTO et al, 2005).

No Brasil, os testes mais utilizados são RIFI e ELISA, sendo considerados, sobretudo este último, o teste de escolha para inquéritos populacionais (MARZOCHI *et al.*, 1981 e REY,1992). ressaltam o teste de ELISA como o mais utilizado para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral, e consideram o teste como sendo o mais rápido, de fácil execução e leitura, sendo mais sensível e específico. Sua sensibilidade permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos. Os bons resultados do diagnóstico por ELISA para Leishmaniose Visceral Canina é confirmada por EVANS *et. al.* (1990)

PALATNIK-DE-SOUZA *et.al.*(1995), no Rio Grande do Norte, utilizaram a fucose-mannose ligand (FML), uma complexa glicoproteína, como substrato, obtendo 100% de sensibilidade e 96% de especificidade, confirmando utilidade da enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

OMS (2003) explica que o diagnóstico laboratorial ensaio imunoenzimático (ELISA) consiste na detecção de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificadas de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*

CARVALHO *et.al.* (2002), ao compararem a utilização de antígenos recombinantes (antígenos purificados) e antígenos brutos, obtiveram uma maior sensibilidade dos antígenos purificados. Além disso, são mais fáceis de obter, e já se encontram disponíveis para o diagnóstico humano e canino.

AZEVEDO (2004), realizou avaliação epidemiológica de leishmaniose canina em Poxoréu-MT e concluiu que a detecção de DNA de amostras de sangue periférico através de reação em cadeia da polimerase (PCR) não se revelou um bom instrumento diagnóstico para vigilância epidemiológica da Leishmaniose Visceral Canina devido a baixa sensibilidade e especificidade apresentadas.

SANCHEZ & TAPIA (2005), realizaram um inquérito no estado de Nueva Esparta-Venezuela, através de diagnóstico sorológico mediante ELISA e antígenos rk39, que demonstraram alta sensibilidade frente a *L. chagase* na população canina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo:

O município de Rio Verde está localizado na microrregião Sudoeste do Estado de Goiás, Centro-Oeste brasileiro. Situado sob as coordenadas, latitude (S) - 17° 47' 53"; longitude (W) - 51° 55' 53", ocupa uma área de 8.415,40 km².

Sua topografia é plana, levemente ondulada com 5% de declividade e altura média de 748 m. O clima apresenta duas estações bem definidas: uma seca (maio a outubro) e outra chuvosa (novembro a abril).

3.2 Escolha dos bairros:

Para o presente inquérito, foram escolhidos bairros da cidade conforme incidência de casos de Leishmaniose tegumentar e visceral humana, notificados na Secretaria Epidemiológica do Município.

Os bairros estudados foram agrupados em áreas. (Figura 5)

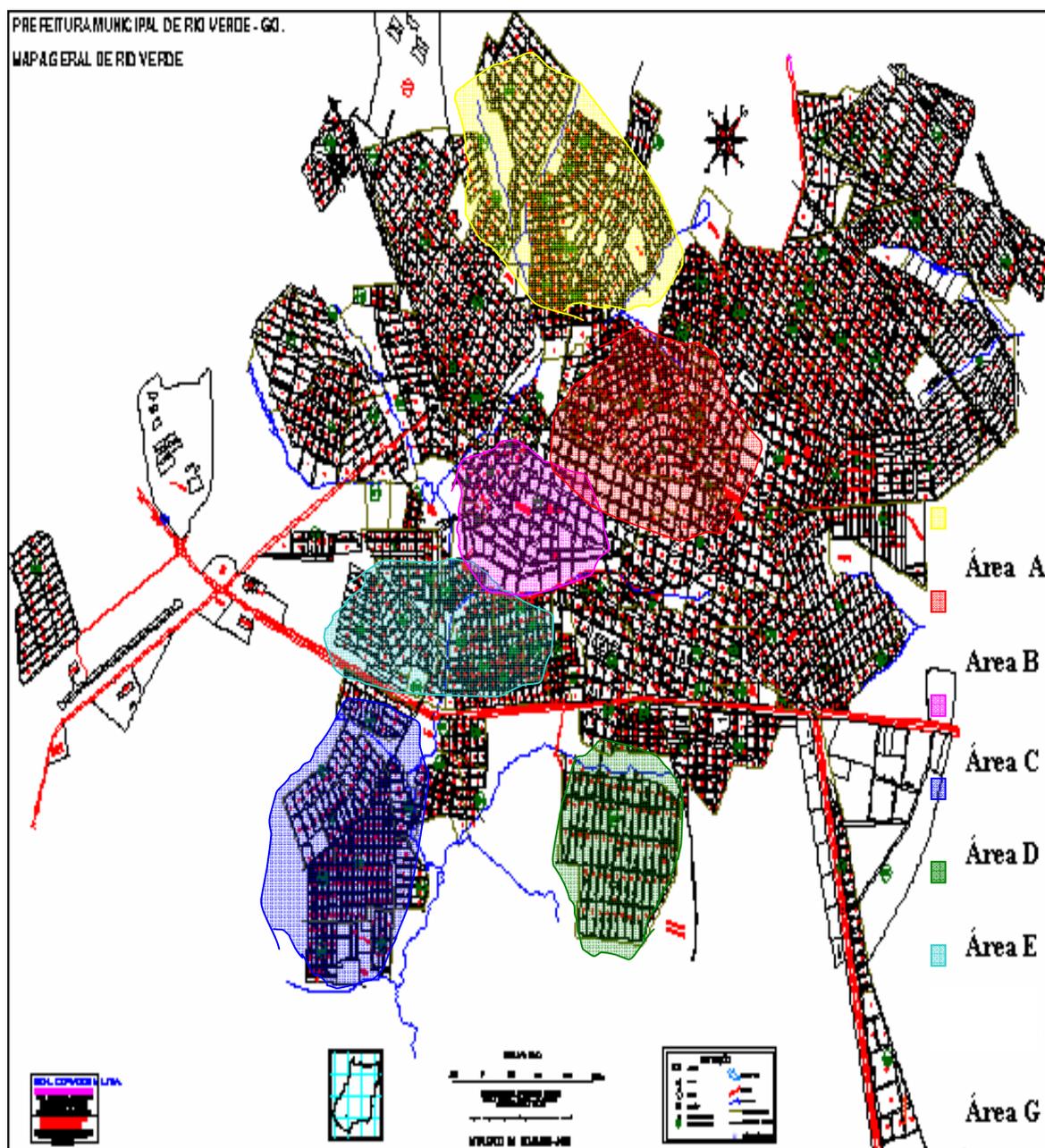


Figura 6: Mapa de Rio Verde e áreas estudadas.

Área A: Bairro Dom Miguel, Setor Pauzanes, Vila Borges, Bairro Popular; **Área B:** Prolongamento Jardim América, Jardim América, Jardim Goiás, Jardim Cruvinel; **Área C:** Centro, Jardim Marconal, Setor Oeste; **Área D:** Bairro Promissão, Setor Serra Dourada, Setor Santa Cruz I e II; **Área E:** Gameleira, Vila Multirão, Vila Mariana, Jardim das Margaridas; **Área F:** Vila Amália, Vila Rocha, Jardim Adriana, Vila Carolina

3.3. Amostra para o inquérito canino:

Foram estudados 263 cães, dos bairros considerados endêmicos, ou próximos a ocorrências da doença em humanos.

Em cada bairro foram escolhidas casas de forma aleatória para a realização da coleta de sangue canino.

A amostra foi calculada a partir da população canina, considerando-se a representatividade em 95%, dos animais pertencentes a área pesquisada.

3.4 Procedimentos:

Foi realizado o teste qui-quadrado em nível de 1% de probabilidade para comparar proporções entre os resultados do diagnóstico de sorologia obtidos e as variáveis estudadas, onde:

$$X^2_c = \sum \frac{(F0 - FE)^2}{FE}$$

Sendo F0: Frequência Observada; e FE: Frequência Esperada.

Para fins de demonstração de erro, considerou-se o desvio padrão de 0,01.

3.5 Coleta e processamento:

Foi realizado inquérito canino com preenchimento de protocolos, onde eram anotados os dados referentes a informações gerais, procedência e exame físico dos animais, durante a abordagem e coleta de materiais, observando-se a temperatura do animal, emagrecimento, exame das mucosas, incidência de

epistaxe, oncogribose, descamação de pele, erosões e ulcerações nas pontas de orelhas ou focinho, presença ou não hiperqueratose, lesões oculares, alopecia, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia. (Apêndice A).

Após prévia autorização do proprietário ou responsável, imobilizou-se o animal para coleta da amostra de sangue possui de 3ml, obtidos através de punção da veia cefálica, safena ou jugular, com seringa descartável de forma lenta, evitando-se hemólise. Em seguida, transferiu-se o sangue puncionado cuidadosamente para tubos de vidro a vácuo, mantendo-o à temperatura ambiente até a retração do coágulo, e após armazenados em embalagem de isopor com gelo. (Apêndice B)

Todas as amostras de sangue foram levadas devidamente acondicionadas ao Centro de Atendimento Integrado a Saúde (CAIS), onde foram centrifugadas e armazenadas a -18°C , para posterior verificação pela reação de ELISA/S7¹.

Para o desenvolvimento do exame sorológico realizou-se a sensibilização das placas, segundo as orientações laboratório Biogene. (Anexo B)

Após o desenvolvimento do exame sorológico, o soro controle reagente apresentou DO de 0,369 e valores de controle não reagentes de 0,84 e 0,58, confirmados pelo critério de validação do laboratório Biogene, onde a D.O. do controle reagente deve ser sempre superior a 0,300 e os valores dos controles não reagentes devem ser sempre abaixo de ,0100.

¹ Tem como base um peptídeo recombinante que permite a detecção de anticorpos nas fases mais precoces da infecção, conferindo alta especificidade e sensibilidade, revelado através de uma proteína conjugada a uma enzima (Peroxidase). Cada placa do kit realiza 96 reações. O kit para Diagnóstico do Calazar Canino é produzido pela Biogene Indústria e Comércio Ltda ME, à Rua Costa Sepúlveda, 749, Engenho do Meio – Recife – PE CEP 50.730-260. Fone/Fax: 81 -3453.2502 ou 9168.9072, E-mail: servio@biogene.ind.br.

O cálculo do ponto para análise foi feito a partir da média das D.Os. do soro não reagentes, somado ao fator $R= 0,142$, determinando assim a amplitude da zona cinza (faixa de indeterminados) e subtraído do ponto de corte $0,03$. (Anexo I)

A média dos soros controle negativo ou não-reagente $0,071$, e os valores para diagnóstico sorológico das amostras foram valor de corte $0,213$ e zona cinza, indeterminados, de $0,183 - 0,213$. (Anexo III).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 263 caninos investigados, 70 (26,62%) dos cães foram soro-positivos à reação de ELISA/S7[®] (Biogene), 35(13,30%) cães apresentaram resultado indeterminado, e 158 (60,45%) animais não foram reagentes à reação de ELISA/S7[®] (Biogene) (GRÁFICO 1).

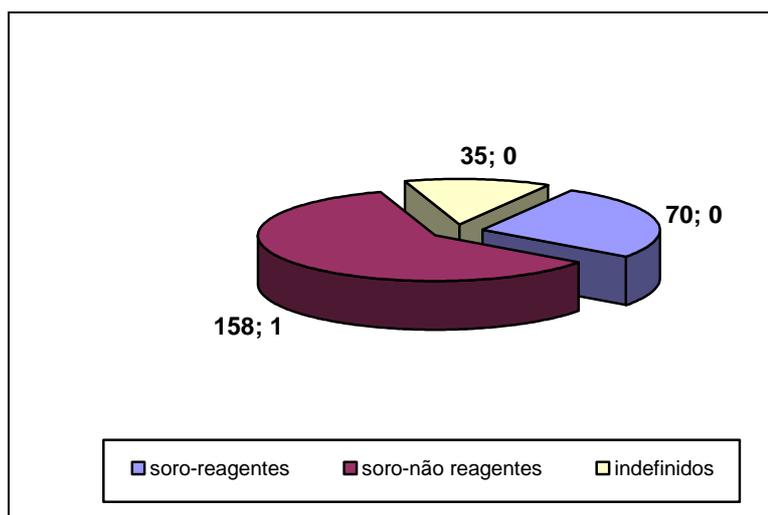


GRÁFICO 1: Valores totais dos resultados, conforme distribuição em soro-positivo, soro-negativo e indeterminados.

Foram definidos percentuais para os resultados observados em cada área, onde foi aplicado o teste qui quadrado, para verificação de diferença significativa entre os valores observados em cada área e entre as áreas.

TABELA 1: Distribuição dos resultados pelos bairros investigados através de ELISA.

RESULTADOS	ÁREA A	ÁREA B	ÁREA C	ÁREA D	ÁREA E	ÁREA F
SP	12	21	7	9	3	18
SN	30	53	18	9	13	35
IND	3	5	7	12	4	4

SP- SORO POSITIVO; SN- SORO NEGATIVO; IND- INDETERMINADOS
 $\chi^2_c = 21,8$ ^{NS}

A prevalência de acordo com os bairros pesquisados (TABELA 1) demonstraram que na área A, foi de 27,9 % de cães soro-reagente, 65,11% cães não-reagentes e 7 % cães indeterminados, em uma amostra de 43 animais.

Na área B, o diagnóstico encontrado foi de 26,2 % dos cães soro-positivos, 65,0 % cães soro negativos e 8,8 % cães indeterminados, em uma amostra de 80 cães.

Na área C , o diagnóstico encontrado foi de 21,2 % dos cães soro-positivo, 48,4 % cães soro negativos e 30,3 % cães indeterminados, em uma amostra de 33 cães.

Na área D, o diagnóstico encontrado foi de 27,6 % dos cães soro-positivo, 27,6 % cães soro negativo e 44,8 % cães indeterminados, em uma amostra de 29 cães.

Na área E, o diagnóstico encontrado foi de 15,0 % dos cães soro-positivo, 60,0 % cães soro negativo e 25,0 % cães indeterminados, em uma amostra de 20 cães.

Na área F, o diagnóstico encontrado foi de 31,0 % dos cães soro-positivo, 60,4 % cães soro negativo e 8,6 % cães indeterminados, em uma amostra de 58 cães.

Considerando-se que não há um senso canino na cidade de Rio Verde e que as residências que permitam a coleta de sangue de cada bairro, conforme amostra calculada, esta foi representativa e permitiu aferir resultados significativos. Tendo em vista MONTEIRO *et al.* (2005), que relatam um inquérito para diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina, a partir de um censo e análise de cães domiciliados na área urbana dos bairros por eles pesquisados, e consideram também a ocorrência de caso humanas da doença.

NUNES *et al.*(2001) cita que a leishmaniose visceral humana, nem sempre, obedece a uma distribuição espacial paralela à do calazar canino; e que infecções caninas tem sido mais freqüentes que as humanas, normalmente, as precede, associando também a ocorrência humana aos níveis socioeconômico e culturais deficientes.

A partir da ocorrência de casos humanos autóctones de Leishmaniose Tegumentar ou Visceral Humana dos bairros, foi possível identificar os casos positivos da ocorrência de Leishmaniose Visceral canina, o resultado demonstrou que a reação positiva do ELISA independe do bairro.

Dos cães sintomáticos, 28,5% foram soro-positivo, 64,3% foram soro negativo e 14,2% indeterminados.

Dos cães assintomático, 41,5 % foram soro-positivo 13,7 % foram não-reagentes e 20,8 % indeterminados. (Tabela 2)

TABELA 2: Correlação entre Animais Sintomático e Assintomáticos, conforme soro reagência

	SINT	ASS
	n	n
SP	29	41
SN	62	96
IND	16	19

SP- soro positivo; SN- soro negativo; IND- indeterminado
 $X^2_C = 0,53^{NS}$

Ao se relacionar o número de animais com a presença de sintomas (sintomáticos) ou não (assintomáticos), o estudo demonstrou que não houve diferença significativa. Concordando com ZANZARINI (2005) e MOURA *et al.* (1999) que afirmam que a Leishmaniose Visceral Canina é uma doença grave que não tem cura e mais de 30% dos cães infectados são assintomáticos.

Ao se relacionar cães soro negativos à idade, o inquérito obteve 91,4 % dos cães com idade entre 0-2 anos; 50,5 % com idade entre 3-5 anos; e 16,2 % dos cães com idade acima de 5 anos.

Ao se relacionar cães soro positivos à idade, o inquérito obteve 40,4% dos cães entre 0-2 anos, 22,3% com idade entre 3-5 anos e 7,2 % dos cães com idade acima de 5 anos.(Tabela 3)

TABELA 3: Prevalência Leishmaniose canina de acordo com a idade e soro reação

	<u>IDADE</u>		
	0-2 anos	3-5 anos	> 5 anos
	N	n	n
SP	44	20	6
SN	89	53	16
IND	19	11	5

SR - soro POSITIVOS; SNR - soro NEGATIVO; IND – indeterminados
 $\chi^2_c = 1,57^{NS}$

Demonstrando uma independência da prevalência em relação a idade. Já SANTOS *et al.* (2005) observou uma prevalência maior em cães com idade entre 1-5 anos.

Ao se correlacionar sexo e prevalência, obteve-se amostra de cães do sexo feminino e, onde 39,4 % são cães soro positivo, 88,9% soro negativo e 19,7% de indeterminados.(Tabela 4)

A prevalência de cães machos foi de 30,6 % soro positivo, 69,1 % soro negativo e 15,3 % indeterminados.

TABELA 4: Comparação de Sexo conforme soro reação

	SEXO	
	FEMININO	MASCULINO
	n	n
SP	30	40
SN	97	61
IND	21	14

SP - soro reagente; SN- soro negativo; IND- indeterminados
 $X^2_c = 7,01^S$

Nestes resultados a reação depende do sexo. Para SARAIVA (2006), não há predisposição sexual, racial ou etária para a infecção.

TABELA 5: Comparação de Procedência conforme soro reação

	PROCEDÊNCIA	
	ZONA URBANA	ZONA RURAL
	n	n
	59	11
	130	28
	28	7

SP - soro reagente; SN- soro negativo; IND- indeterminados
 $X^2_c = 0,33^{NS}$

Quanto a procedência dos cães da amostra, o inquérito obteve 82,50% dos cães oriundos de outros centros urbanos ou nascidos em zona urbana, e 17,49% dos cães vindos de zonas rurais, mas todos instalados em zona urbana.

Quanto a procedência do animal foram observadas que a soro reação independe da região de procedência urbana ou rural.

GALATI *et al.* (1996) e MONTEIRO *et al.* (2005) consideram importante esta procedência tendo em vista que vários trabalhos de estudos dos vetores estão relacionados à antroponização e/ou preservação da cobertura primitiva, com predomínio principalmente do cerrado.

Considerando a localização dos bairros estudados, observa-se claramente a ocupação de região de mata ciliar, já que esta área é banhada por um córrego, com presença de grande quantidade de matéria orgânica, e temperaturas ideais para o desenvolvimento do vetor. Confirmando as informações da OMS (2003) da não incidência na Região Sul por não apresentar condições climáticas ideais para o desenvolvimento do vetor, que se desenvolvem em áreas com alta umidade, calor e disposição de matéria orgânica.

A prevalência e as características da população e a região, associada à infecção por *Leishmania* é evidenciada por diversos testes, entre eles a sorologia por ELISA, considerados de elevada reatividade por NASCIMENTO *et al.* (2005) e o teste mais sensível por SANTOS *et al.* (2005), utilizados no presente trabalho.

As condições de ocupação demográfica, passando pelas políticas de saúde pública, contribuem para a instalação de zoonoses e determinação de problemas graves à população. A informação e desenvolvimento de inquéritos epidemiológicos e censitários nortearão o caminho de ações públicas de saúde.

6. CONCLUSÃO

Através dos resultados realizados por ELISA/S7[®] pode-se concluir que há um alto índice de prevalência de cães positivos na região, não demonstrando diferença significativa de prevalência entre os bairros estudados, bem como em relação a sintomatologia, a idade ou procedência do cão, com aumento significativo na população canina do sexo masculino. Observou-se, no entanto que a prevalência independe das condições sócio-econômica da população, mas sim da desinformação sobre a doença e seus riscos. Os resultados também mostram que o cão pode ser um importante reservatório doméstico de *Leishmania* sp. à semelhança do que acontece em outras áreas endêmicas do Brasil. No entanto, há necessidade de se ampliar a área de abrangência deste tipo de estudo para melhor conhecimento da epidemiologia da leishmaniose tegumentar, assim sendo, propõe-se a inclusão da cidade de Rio Verde como “nova área em investigação para LV”, por possuir pontos ainda obscuros na epidemiologia a elucidar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemiologia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997, **Cad. Saúde Pública** Rio de Janeiro, jan/fev. 20 (1), 2004.

AMÓRA, S.S.A. *et al.* Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Cienc. Rural**, Dez, 36 (6): 1854-1859, 2006.

Anuário Estatístico do Estado de Goiás- 2003, Secretaria do Planejamento e Desenvolvimento, Goiânia; **SEPLAN**, 2003:816P.IL.

ASHFORD, R.W. The Leishmanioses as emerging and reemerging zoonoses. **Inst. I. Parasitol**; 30:12-13, 1269-81, 2000.

AZEREDO, M.A.A. Epidemiologia da leishmaniose visceral canina em Poxoréu – MT, Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – **Fac. Méd.Vet Zoot**, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 46f. 2004.

BADARÓ, R. Leishmaniose visceral (calazar) In: Veronesi R, focaccia R, organizadores. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu; p.1234-59, 1996.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 120 p. 2003.

CASTRO, A.G. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). Brasília: **Fundação Nacional de Saúde**. 2 : 88 . 1996.

COSTA, S.R. *et al.* T Cell Response of Asymptomatic Leishmania chagasi Infected Subjects to Recombinant Leishmania Antigens. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, 94 (3), 1999.

DANTAS-TORRES, F. Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco **Rev. Soc. Bras. Med. Trop set.-out.**;38(5):444-445, 2005.

EVANS, T.G. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.** 42: 118-23, 1990.

FALQUETO, A; *et al.* Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 81:155-163, 1986.

FEITOSA, M.M. *et al.* Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária** 5 (2): 36-42, 2000.

GALATI, E.A.B. *et al.* Estudo dos flebotomíneos (DÍPTERA, Phlebotomidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ver. Saúde Pública**, São Paulo, apr. 30 (2), 1996

GENARO, O.; Leishmaniose visceral. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM, organizadores. **Parasitologia humana**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu; p. 56-72, 2000.

ISHIZAKI, *et al* Organización Panamericana de la Salud **Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas**. Río de Janeiro, PANAFOTSA, © 152p 2006.

LANGONI, H. *et. al.* Aspectos Epidemiológico na Leishmaniose canina. **1° Fórum sobre Leishmaniose Visceral Canina**. Jaboticabal-SP (23): 69-71, 2006.

LIMA, A.D. *et. al.* A survey of canine visceral leishmaniosis in the city of Recife, Northeastern Brazil. In: **Proceedings of the 45th Annual Meeting**, Salt LaKe City, 2000.

MARZOCHI, M.C.A; *et.al.* Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina, 41(5): 69-84, 1981**

MELO, C. P.C.; *et. al.* Perfil Epidemiológico da Raiva Canina e Felina no Estado do Ceará no Período de 1992 a 2002. **Revisita Oficial de Educação Continuada da Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais**, ed suplementar, maio, p. 87 2004.

MESLIN, FX. Emerging and re-emerging zoonoses. Local and worldwide . **Med.Trop Mars.**; 57 (3 Suppl.): 7-9, 1997.

MESLIN,FX; STOHR,K; HEYMANN,D. Public Health Implications of Emerging Zoonoses. **Rev. Sci. Tech.**, Apr; 19 (1): 310-317, 2000.

MIGUEL, Osmar. A Vigilância Sanitária e o Controle das Principais Zoonoses **Rev. Clin. Vet.** 3 (1) ,2006.

MONTEIRO, E.M. *et. al.* Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Ver. Soc. Brás. Méd. Trop.** Uberaba, mar/abr. 38 (2), 2005.

MOURA, Saulo Teixeira; FERNANDES, Cláudia Gorgulho Nogueira, SILVA, Vanda Coutinho R.R. **Brazilian Journal of Veterinary Research na Animal**. São Paulo, 36 (2), 1999.

NASCIMENTO, M.D.S.B. *et.al.* Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK 39 e CRUDE) e intradermoreação de

Montenegro em áreas endêmicas do Maranhão, Brasil **Cad. Saúde Pública** Rio de Janeiro, nov/dec. 21 (6), 2005.

NOGUEIRA, F.S.; *et. al.* A vacina Leishmune® Bloqueia a Transmissão de Leishmaniose Visceral Canina. Ausência da Parasita Leishmania no Sangue, Pele e Linfonodos de Cães Expostos Vacinados. **Revista Vaccine** 23: 4805-4810. 2005.

NUNES, V.L.B. *et.al.* Estudo dos flebotomídeos (Díptera, Pychodidae), em área de leishmaniose tegumentar no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ver. Saúde Pública.** São Paulo, Apr. 30 (2), 1996.

NUNES, Vânia Lúcia Brandão *et al.* Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, 34 (3), 2001.

OMS – Organização Mundial de Saúde - 2003

PALATNIK-DE-SOUZA, C.B. *et.al.* *Leishmania donovani* surface glyconjugate GP36 is the major immunogen component of the fucose-mannose ligand (FML) **Acta Trop.** Mar, 53(1):59-72, 1993..

PARANHOS, M.S. *et.al.* A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniosis due to *Leishmania cahgasi* **Amer. J. Trop. Med.Hyg.** 55:39-44, 1996.

PASSOS, V.M.A. *et.al.* Epidemiological aspects ou american cutaneous leishmaniosis in a periurban área of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 88 (1): 103-110,1993.

Prefeitura Municipal. Secretaria de Planejamento 08/11/2006.

REICHMAN, Organización Panamericana de la Salud **Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas**. Río de Janeiro, PANAFTOSA, ©. 152p. 2006

REY,L. **Bases de Parasitologia Medica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: Leishmaniose cutânea e mucocutâneas do novo mundo. Laishmaniose visceral ou Calazar. p.46-65, 1992.

RIBEIRO, Vitor Márcio e MICOLOLICK, Suzan Marques. **Leishmaniose, Estratégia de Controle**. Revista Nosso Clínico nov/dez 4 (24): 10- 2001.

Rocha, R.D.R. *et al.* Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Dez, 35 (6), 2002.

SAKAMOTO, *et.al.* Incidência de Leishmaniose canina na cidade de Jaboticabal – SP **1º Fórum sobre Leishmaniose Visceral Canina**. Jaboticabal-SP (23): 69-71, 2006.

SANCHES, M.A. & TAPIA, F.J. Imunologia de la leishmaniasis visceral canina. **Boletin de Malariologia y Salud Ambiental**, agosto-diciembre, XLV (2), 2005.

SANTOS, G.P.L. *et.al.* Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período de 1992 e 1993. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba mar/abr. 38 (2), 2005.

SAVANI, E.S.M.M. *et al.* Surveillance of American visceral leishmaniasis in dogs from a non-endemic area, Brazil **Rev. Saúde Pública**. São Paulo Apr. 37(2), 2003.

SAVANI, E.S.M.M. *et al.* Ocurrence of co-infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a dog in the state of Mato

Grosso do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, 100 (7), 2005.

SHAW, J.J. *et. al.* A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 83: 783-784, 2006.

SILVA, A.V.M. *et.al.* Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 21: 324-328, 2005.

SILVA , M.R & ROSA, I.C.A.S. Levantamento de Leishmaniose visceral canina em Bom Sucesso – MG **Acta Scientiae Veterinariae**. 33(1): 69- 74, 2005.

TAUIL, PL. **Urbanização e Ecologia de Dengue**. Caderno Saúde Pública, 17 (supl): 99-102, 2001.

TRAVI, B.L. *et.al.* Canine visceral leishmanioses in Colômbia: relationship infestivity for sand flies. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** 64: 119-124, 2001.

VIGILATO,M.A.N. Distribuição espacial de Leishmaniose visceral canina e humana no município de Birigui-SP. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – **Fac. Méd. vet. Zoot**, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 69f. 2004.

YAMADA, **Zoonoses**. Uirusu. 2004 jun, 54 (1):17-22.

ZANZARINI, P D *et al.* Leishmaniose tegumentar americana canina em municípios do norte do Estado do Paraná, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, nov./dez.,21(6): 1957-1961, 2005.

APÊNDICE

Apêndice A: OBTENÇÃO DA AMOSTRA DE SANGUE CANINO

OBTENÇÃO DE SORO CANINO

COLETA

De uma maneira geral, a coleta do sangue dos cães é realizado nas áreas endêmicas. Para tanto, deve-se organizar ainda no laboratório o seguinte material:

- a) Mordaças ou focinheiras para contenção do animal.
- b) “Pau de couro” para contenção de animais maiores.
- c) Tubos de vidro ou microtubos plásticos para colocação das amostras.
- d) Seringas de 3 ou 5 ml.
- e) Agulhas 25 X 7 ou 25 X 8
- f) Luvas de procedimento.
- g) Etiquetas auto-adesivas ou canetas para retroprojeter para identificação dos tubos.
- h) Canetas esferográficas
- i) Álcool iodado.
- j) Álcool puro.
- k) Algodão e gaze.
- l) Estantes.
- m) Recipiente para coleta do lixo produzido e material perfurante.
- n) Ficha epidemiológica.

A coleta de sangue a vácuo não é adequada para cães, muitas vezes o vácuo contido no tubo pode colabar a veia ou mesmo rompe-la.

Serão necessárias no mínimo duas pessoas para a coleta, uma delas deve ter as duas mãos livres, para a realização da punção e as outras somente para a contenção do animal.

A punção deve ser feita na veia de uma das patas anteriores de preferência, porém as patas traseiras também podem ser utilizadas. Os cuidados

para evitar a lise das células durante a coleta devem ser redobrados uma vez que existem maiores possibilidades de que isso ocorra durante este procedimento. Nunca se deve puxar o êmbolo da seringa com muita insistência quando há pouca fluência de sangue, pois esta veia colaba (se fecha) com muita facilidade e o tempo de coagulação do sangue dos cães é mais curto. Havendo grande dificuldade para coleta, deve-se buscar outra veia.

Os cuidados com a transferência do sangue para o tubo são os mesmos observados para o sangue humano, bem como a identificação.

Os tubos devem ser colocados em estantes dentro de uma bolsa ou maleta que permita a sua manutenção em posição adequada e deve ficar a temperatura ambiente até que haja retração do coágulo. Caso o tempo de permanência no campo seja muito longo, pode-se transferi-lo para uma caixa de isopor com gelo reciclável até a chegada ao laboratório.

Chegando ao laboratório os procedimentos são os mesmos para sangue humano.

Apêndice B: FICHA CLÍNICA

Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Rede Centro –
Oeste, convênio UNB/FESURV.

**Ficha clínica para amostras de material canino para realização de exame de
Leishmaniose Visceral Canina**

Sorologia

Parasitologia

Identificação

Data: ____/____/____

Nome: _____
 Idade: _____ Sexo: _____
 Pelagem: _____ Raça: _____
 Proprietário: Sim Não
 Endereço Atual: _____
 Bairro: _____ Município: _____
 Telefone: _____
 Endereço Anterior: _____
 Procedência: _____ Zona Rural Zona Urbana

Exame Clínico

Temperatura: _____ °C

Emagrecimento: Sim Não

Mucosas:

Epistaxe: Onicogribose: Descamação:

Erosões e Úlceras (pontas de orelha/focinho) Hiperqueratose Lesões Oculares

Alopecia: 1 Peri-orbital 2. Localizada 3. Generalizada

Hepatomegalia Esplenomegalia Linfadenopatia

Outros Sinais:

Médico

Veterinário/CRMV _____

ANEXOS

Anexo I: KIT PARA DIAGNÓSTICO DO CALAZAR CANINO ELISA/S7®

Crterios de Validação

As Densidades Ópticas (D.O.) dos controles não reagentes devem ser sempre inferiores a 0,100. E as D.Os do controles reagentes devem ser sempre superiores a 0,300.

Cálculo do Ponto de Corte

Calcular a média aritmética das D.Os. do soros não reagentes e somar ao fator $R = 0,142$. Para determinação da amplitude da zona cinza (faixa de indeterminados) subtrair do ponto de corte 0,03.

Socorro Técnico

Em caso de dúvidas entrar em contato com o suporte no telefone (81) 9168.9072 ou por e-mail servio@biogene.ind.br.

Resp. Téc. Ana Cláudia Campos
Médica Veterinária CRMV - PE - 3201

Produzido e Fabricador por:

Biogene Indústria e Comércio Ltda ME

Rua Costa Sepúlveda, 749

Engenho do Meio - Recife - PE

CEP 50.730-260

CGC.: 69.951.234/0001-10

Insc. Est. : 18.2.001.0198256-0

Fone/Fax: 81 - 3453.2502 ou 9168.9072

E-mail: servio@biogene.ind.br

MAPA Licença nº. 7434/2000

Indústria Brasileira



Validade e data de fabricação na embalagem



www.biogene.com.br | www.biogene.com.br | www.biogene.com.br

Kit para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7®

Para uso veterinário

Descrição

A reação de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é baseada no reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos fixados em um suporte plástico. Este reconhecimento é revelado através de uma proteína conjugada a uma enzima (Peroxidase) permitindo a visualização da reação.

O ELISA/S7® tem como base um peptídeo recombinante, produzido por engenharia genética, que permite a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção. O emprego desse antígeno no kit para o diagnóstico do calazar canino - ELISA/S7® confere alta especificidade e sensibilidade ao teste, sendo único no mercado.

Apresentação

O kit é composto de uma placa de ELISA e de todos os reagentes necessários a realização de 96 reações.

Produto	Volume	Conservação
Solução de coleta	25 ml	- 20°C
Solução S7	10 ml	- 20°C
Soro controle reagente	10 µl	- 20°C
Soro controle não reagente	10 µl	- 20°C
Solução Citrato	10 ml	4°C
Conjugado (Ptn - A PO)	3 µl	4°C
Revelador (TMB)	100 µl	4°C
Água Oxigenada (H ₂ O ₂)	50 µl	4°C
Solução de lavagem (PBS 10x)	50 ml	4°C
Tween 20	200 µl	4°C
Solução de parada (H ₂ SO ₄ - 2N)	10 ml	T.A

A estabilidade de todos os reagentes é de seis meses

Anexo II : PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO E REALIZAÇÃO DO TESTE

Observações

- a) Usar sempre luvas
- b) As lavagens devem ser feitas utilizando-se picetas, dirigindo-se o jato de tampão diretamente no fundo do poço.
- c) As soluções devem ser despejadas invertendo-se a placa de uma só vez.
- d) Pode haver formação de cristais na Solução de Lavagem 10x. Neste caso é só proceder uma pequena agitação.
- e) É necessário um segundo soro controle não reagente (não fornecido no kit), para o cálculo do ponto de corte.

Procedimentos

1. Preparo dos tampões de lavagem

- a) O tampão de lavagem PBS está concentrado 10X. Diluir uma parte de PBS em nove partes de água destilada.
- b) Para o PBST é só acrescentar em uma parte do PBS 0,05% de Tween 20 (ex: para 400ml de PBS acrescentar 200µl de Tween).

2. Sensibilização e neutralização da placa

- a) Distribuir 100 µl por poço da solução S7 na placa.
- b) Incubar *overnight* à 4°C (geladeira) ou 4 horas em T.A.
- c) No dia seguinte desprezar a solução S7.
- d) Lavar 3 vezes com tampão PBST.
- e) Distribuir 100 µl por poço de uma solução composta de PBST + 2% de leite em pó desnatado.
- f) Incubar por 30 minutos a T.A.
- g) Após incubação desprezar a solução e lavar a placa duas vezes com PBST.

A placa sensibilizada e neutralizada pode ser utilizada imediatamente ou ser embalada seca em papel alumínio e estocada no freezer (-20°C) por períodos de até 2 meses sem perda de suas características. No momento do uso deixar a placa descongelar por pelo menos 15 minutos a T.A.

3. Diluição dos soros

Os soros controles e amostras em testes devem ser diluídos em solução de coleta (1:100) e incubados por pelo menos 4 horas a T.A. ou 12 horas na geladeira (4°C).

O título da reação é de 1:100.

4. Realização dos testes

- a) Lavar a placa uma vez com tampão PBST.
- b) No primeiro poço (A1) colocar 100µl de PBST. Este é o branco para o leitor de ELISA (indispensável em alguns equipamentos).
- c) Distribuir 100µl de cada um dos soros controles, previamente diluídos, nos poços: B1 e D1 não reagente e C1 reagente.
- d) Distribuir 100µl por poço dos soros em teste, previamente diluídos.
- e) Incubar por 30 minutos a T.A.
- f) Lavar a placa 3 vezes com PBST.
- g) Distribuir 100µl por poço da solução do conjugado (Proteína - A PO). Esta solução deve ser preparada na hora diluindo 1µl do conjugado em 10ml de PBST. Descarte a sobra desta solução.
- h) Incubar por 30 minutos a T.A.
- i) Lavar a placa 3 vezes com PBS (sem o Tween 20).
- j) Distribuir 100µl por poço da solução de revelação. Esta solução também deve ser preparada na hora acrescentando em 10ml de Tampão Citrato 100µl de TMB e 50µl de Água Oxigenada.
- k) Incubar a placa por 20 minutos no escuro (ex.: dentro de uma gaveta).
- l) Acrescentar duas gotas da solução de parada.
- m) Efetuar a leitura em leitor de ELISA a $\lambda = 450 \text{ nm}$.

- O ELISA/S7® também pode ser executado com amostras de sangue. Neste caso 250µl da solução de coleta deve ser distribuído em um tubo eppendorff e apenas 2 gotas de sangue (~30 µl) acrescentadas nesta solução.

- Nesta solução o sangue pode ser conservado por até 5 dias na geladeira (NÃO CONGELAR).

- As amostras de sangue podem ser centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos para que o coágulo seja totalmente separado da solução.

- Em caso de hemólise acentuada, após a centrifugação o sobrenadante deve ser transferido para um novo tubo e incubado por 20 minutos a 56°C (neutralização).

- O sobrenadante do tubo pode ser aplicado diretamente na placa para realização do teste. Neste caso, deve-se respeitar o período de incubação de pelo menos 4 horas em contato com a solução de coleta. A diluição deve ser feita acrescentando-se 25µl deste sobrenadante em 75µl de PBST (previamente colocado no poço).

Anexo III: RESULTADOS DO EXAME SOROLÓGICO DE CALAZAR CANINA

PLACA 1:

Organon Teknika Reader 230S
Version 1.23
QUICK MODE - NORMAL MEASUREMENT

Date: 17-NOV-2006

Time: 16:34:27

Page# 1

Measurement Filter : 450 nm
Reference Filter : - nm
Shaking : YES
Shaking Duration : 5 sec
Shaking Intensity : MEDIUM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	.095	.094	.118	.193	.095	.211	.126	.223	.098	.211	.171	.241	A
B	.094	.454	.126	.218	.311	.205	.202	.271	.158	.270	.216	.269	B
C	.369	.159	.221	.143	.163	.091	.211	.126	.208	.118	.136	.175	C
D	.058	.130	.297	.188	.187	.208	.154	.245	.310	.271	.172	.288	D
E	.155	.111	.156	.177	.119	.174	.134	.124	.332	.208	.292	.133	E
F	.166	.239	.430	.232	.319	.123	.213	.197	.378	.212	.162	.214	F
G	.066	.113	.313	.208	.153	.152	.236	.122	.269	.227	.276	.148	G
H	.131	.116	.145	.216	.219	.177	.209	.196	.256	.181	.251	.157	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

PLACA 2:

Organon Teknika Reader 230S
Version 1.23
QUICK MODE - NORMAL MEASUREMENT

Date: 17-NOV-2006

Time: 16:40:02

Page# 1

Measurement Filter : 450 nm
Reference Filter : - nm
Shaking : YES
Shaking Duration : 5 sec
Shaking Intensity : MEDIUM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	.312	.219	.107	.094	.065	.051	.062	.063	.075	.076	.069	.094	A
B	.494	.189	.188	.126	.077	.084	.083	.094	.095	.098	.120	.142	B
C	.338	.235	.305	.123	.059	.091	.071	.069	.090	.122	.072	.150	C
D	.365	.121	.197	.071	.104	.090	.061	.073	.130	.095	.258	.147	D
E	.283	.094	.318	.064	.061	.054	.085	.084	.075	.128	.315	.140	E
F	.292	.127	.308	.082	.069	.060	.060	.193	.112	.335	.098	.163	F
G	.260	.098	.331	.212	.103	.060	.075	.110	.108	.125	.092	.175	G
H	.391	.076	.267	.076	.124	.123	.077	.086	.134	.087	.168	.122	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

PLACA 3:

Ornanon Teknika Reader 230S
Version 1.23
QUICK MODE - NORMAL MEASUREMENT

Date: 17-NOV-2006

Time: 16:46:57

Page# 1

Measurement Filter : 450 nm
Reference Filter : -- nm
Shaking : YES
Shaking Duration : 5 sec
Shaking Intensity : MEDIUM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	.088	.198	.184	.092	.094	.127	.118	.075	.118	.095	0.000	0.000	A
B	.098	.143	.183	.127	.212	.207	.363	.190	.272	.215	0.000	0.000	B
C	.180	.161	.201	.107	.191	.214	.224	.137	.318	.154	0.000	0.000	C
D	.111	.161	.213	.116	.177	.325	.212	.291	.146	.191	0.000	0.000	D
E	.102	.096	.180	.062	.373	.130	.231	.275	.187	.067	0.000	0.000	E
F	.210	.151	.259	.131	.250	.344	.421	.223	.179	.066	0.000	0.000	F
G	.124	.219	.167	.129	.168	.086	.161	.117	.264	.064	0.000	0.000	G
H	.111	.200	.123	.132	.143	.157	.243	.169	.725	.066	0.000	0.000	H

Teste:	<u>Calazan Canino</u>	Data:	<u>17.11.06</u>
Lote:	<u>04/06</u>	Média dos controles negativos:	<u>0,071</u>
Fabricante:	<u>Bioagene</u>	Média dos controles positivos:	<u>0,369</u>
Validade:	<u>01/07</u>	CUT-OFF:	<u>0,213</u>
Técnico Responsável:	<u>Bãmas</u>	Zona cinza:	<u>0,183 - 0,243</u>
1	A	<u>Branco</u>	<u>0,045</u>
1	B	<u>CN</u>	<u>0,084</u>
1	C	<u>CP</u>	<u>0,369</u>
1	D	<u>CN</u>	<u>0,058</u>