

# Soroprevalência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) canina e fauna de Flebotomíneos (*Diptera: Psychodidae*) em Bela Vista do Paraíso, Paraná

## Seroprevalence of Cutaneous Leishmaniasis (LC) in dogs and identification of vectors (*Diptera:Psychodidae*) in Bela Vista do Paraíso, Parana State

Homero Ribeiro dos Reis<sup>1</sup>; Fabiana Maria Ruiz Lopes-Mori<sup>1</sup>; Célia Rosimarie dos Reis<sup>1</sup>; Roberta Lemos Freire<sup>2</sup>; Elizabete Regina Marangoni Marana<sup>3</sup>; Andreas Lazaro Chryssafidis<sup>4</sup>; André Vieira Tedim<sup>4</sup>; Bruno Bergamo Ruffolo<sup>4</sup>; Felipe Monteiro Bugni<sup>4</sup>; Edilene Alcântara de Castro<sup>5</sup>; Vanete Thomaz-Socol<sup>5</sup>; Luciane Biazzone Nabut<sup>6</sup>; Itamar Teodorico Navarro<sup>2\*</sup>

### Resumo

O trabalho teve como objetivo determinar a soroprevalência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) canina no município de Bela Vista do Paraíso, Paraná, comparar as técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) e identificar as espécies de flebotomíneos presentes, possivelmente envolvidas no ciclo do parasito. Amostras de sangue de 489 cães foram submetidas à pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. pela IFI e ELISA. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram título  $\geq 40$  na IFI e densidade ótica  $\geq 0.174$  no ELISA. Entre as amostras analisadas, 222 (45,4%) foram reagentes pela IFI e 189 (38,7%) pelo ELISA. Comparando-se os testes foram encontradas 176 amostras positivas (36,0%) e 254 negativas (51,9%) para ambas as técnicas. A sensibilidade do ELISA foi de 79,3% e a especificidade foi de 95,1%. O coeficiente global do teste foi de 87,0% com coeficiente Kappa de 0,75. A análise das variáveis para cães com sorologia positiva pela IFI demonstrou diferença significativa em relação à ausência de matas e ausência de convívio com outras espécies animais. Em cães sororeagentes pelo ELISA as variáveis que apresentaram diferença significativa foram o tipo de mata ciliar existente no ambiente, a ausência de lixo, o esgoto a céu aberto e lançado diretamente em rios ou córregos e do lixo lançado em terreno baldio, queimado ou enterrado. O resultado obtido com a captura dos flebotomíneos foi a predominância do *Lutzomyia whitmani* com 79,9% das espécies coletadas. Os resultados demonstraram que a LTA está amplamente disseminada na população canina do município de Bela Vista do Paraíso, e que tanto a IFI como o ELISA podem ser utilizados para o diagnóstico. Deste modo o cão apresenta-se como um elo entre o ciclo silvestre e o peridomiciliar da LTA, podendo tornar-se um sinalizador do agente no ecossistema da doença nesse

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, DMVP, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR. E-mail: centrovvet@uol.com.br; fabiuel@yahoo.com.br; celiarreis@hotmail.com.

<sup>2</sup> Profs. Drs. do Deptº de Medicina Veterinária Preventiva, CCA/UEL. E-mail: rlfreire@uel.br; itamar@uel.br

<sup>3</sup> Médica Veterinária do Deptº de Medicina Veterinária Preventiva, CCA/UEL. E-mail: elizabetemarana@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Bolsista IC/PIBIC-CNPq do curso de graduação do Curso de Medicina Veterinária, CCA/UEL. E-mail: andreas999chrys@yahoo.com.br; vieiratedim@uol.com.br; brunoruffolo@ig.com.br; bugni@pop.com.br.

<sup>5</sup> Prof. Dr. do Deptº de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, UFPR. E-mail: ecastro@ufpr.br; vasocol@ufpr.com.br

<sup>6</sup> Profª Drª. do Deptº de Clínicas Veterinárias, CCA/UEL. E-mail: biazzone@gmail.com

\* Autor para correspondência

ecossistema.

**Palavras chave:** *Leishmania* sp., cães, sorologia, IFI, ELISA, *Lutzomyia*

## Abstract

The aim of this study was to determine the seroprevalence of Cutaneous Leishmaniasis (CL) in dogs of Bela Vista do Paraíso, Parana state, compare the IFA and ELISA techniques and identify the vectors possibly involved in the cycle of the parasite. Were collected blood samples from 489 dogs that were subjected to detection of anti-*Leishmania* sp. by IFA and by ELISA. Were considered positive samples  $\geq 40$  titers in IFA and for ELISA  $\geq 0.174$  optical density. Among the samples analyzed, 222 (45.4%) were positive by IFA and 189 (38.7%) by ELISA. Comparing the tests were found 176 positive samples (36.0%) and 254 negative (51.9%) for both techniques. The sensitivity of ELISA was 79.3% and specificity was 95.1%. The global coefficient of the test was 87.0% with kappa coefficient of 0.75. Analysis of variables for dogs with positive serology by IFA showed significant differences regarding the absence of forests and lack of contact with other animal species. Positive sera by ELISA in dogs variables that showed significant differences were the type of riparian vegetation existing in the environment, the lack of garbage, open sewers and released directly into rivers or streams and garbage thrown on wasteland, burned or buried. The result obtained with the capture of sandflies was the predominance of *Lutzomyia whitmani* with 79.9% of the species collected. The result obtained with the capture of sandflies was the predominance of *Lutzomyia whitmani* with 79.9% of the species collected. The results showed that the LTA is widespread in the canine population of Bela Vista do Paraíso, and both the IFI and ELISA can be used for diagnosis. So the dog appears as a link between wild and peridomestic cycle of CL may become an amplifier of disease in this ecosystem.

**Key words:** *Leishmania* sp., dogs, sorology, IFA, ELISA, *Lutzomyia*

## Introdução

As leishmanioses são zoonoses consequentes do parasitismo por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo que a forma amastigota parasita células do SFM (Sistema Fagocítico Mononuclear) dos hospedeiros vertebrados (homem, animais domésticos e animais selvagens) e a forma promastigota habita o aparelho digestivo do vetor, insetos da subfamília Phlebotominae. São conhecidas cerca de 400 espécies de flebotomíneos, das quais aproximadamente 10% estão envolvidas na transmissão da leishmaniose (YOUNG; DUNCAN, 1994).

As leishmanioses têm distribuição mundial e atingem 88 países dos quatro continentes, exceto Austrália. Duas formas clínicas são conhecidas: a leishmaniose tegumentar (LT) e a visceral (LV) (OMS, 2004). A forma mais comum da LT é a cutânea (LC), que se caracteriza por úlceras de fundo granuloso e bordas salientes de difícil cicatrização. Já a forma cutâneo-mucosa (LCM),

menos frequente, apresenta-se com metástases graves e mutilantes na região nasobucofaringea (MODABBER, 1993). Por fim, a forma cutâneo-difusa (LCD), de ocorrência mais rara, caracteriza-se por maciço comprometimento dérmico de natureza crônica (BRASIL, 2000).

Estima-se em 12 milhões o número de casos de LT existentes, com um acréscimo de 1,5 milhão de novos casos ao ano. Estima-se ainda que 350 milhões de pessoas vivam sob o risco de contrair a infecção nas regiões endêmicas (OMS, 2004). No Brasil, onde a doença recebe as denominações de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA), observam-se as taxas elevadas de leishmaniose, com uma média de 28 mil e dois mil casos por ano de LTA e LVA, respectivamente (BRASIL, 2007). No estado do Paraná a LTA tem sido crescente desde a década de 1980, com cerca de 3.900 casos em humanos entre 2000 e 2004 (BRASIL, 2007). A necessidade de identificação das espécies de *Leishmania* envolvidas,

possíveis vetores e reservatórios nesses novos ecossistemas, reforçam a importância de estudos epidemiológicos.

O objetivo deste trabalho foi conhecer a epidemiologia da LTA em cães do município de Bela Vista do Paraíso, comparar as técnicas de IFI e ELISA e identificar os vetores envolvidos o ciclo do parasito.

## Material e Métodos

### Área de estudo e amostragem

O município de Bela Vista do Paraíso possui 14.678 habitantes (IBGE, 2009) e está localizado na região Norte do Paraná a 429 Km de Curitiba (Latitude: 22°59'49 Sul e Longitude: 51°11'27" W-GR-GH e altitude de 528 metros) e a escolha deste município ocorreu pela constância de casos de LTA em humanos nos últimos anos, sendo a maioria no perímetro urbano. No período de fevereiro de 2000 a junho de 2004 ocorreram 61 casos autóctones de LTA, confirmados pela reação de Montenegro (Intradermoreação: IDR) (SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação) (dados não publicados).

Para o cálculo do tamanho da amostra utilizou-se o programa estatístico Epi Info, versão 6,04 (DEAN et al., 1994) e adotou-se uma prevalência estimada de 50% com precisão de 5% e nível de confiança 95%, em uma população de 3 mil cães, sendo que a estimativa da população canina foi baseada em 20% do número de habitantes do município.

Os 489 cães amostrados foram selecionados em áreas da cidade onde existiam estratos de mata de mata nativa e mata ciliar, no perímetro no urbano. Foram incluídos na amostra os cães com informação de resenha, com proprietários, idade superior a quatro meses e nascidos ou vivendo na área por mais de dois anos. Para cada animal foi preenchido um questionário epidemiológico contendo informações sobre os antecedentes

clínicos e o estado de saúde do momento (com presença de algum sinal sugestivo de LTA ou LV) e os dados ambientais.

### Coleta das amostras e pesquisa de anticorpos

As amostras de sangue dos cães foram coletadas no período de agosto a setembro de 2003, por punção da veia jugular externa, cefálica ou braquial e acondicionadas em tubos de ensaio sem anticoagulante e foram enviadas para o Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná (UFPR) para a realização da IFI, segundo Marzochi et al. (1980) e Mendonça et al. (1988), com a utilização de conjugado anti-IgG canino, marcado com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA CHEMICAL Co. St. Louis, USA) previamente padronizado na diluição de 1:40. O ELISA foi realizado segundo protocolos descritos por Engvall e Perlmann (1972) adaptado para microplacas de poliestireno por Castro, Thomaz-Soccol e Auguir (2001), utilizando conjugado de soro de coelho anti-IgG canino ligado com peroxidase. O antígeno solúvel foi produzido a partir das formas promastigotas de *Leishmania (V) brasiliensis* (cepa MHOM/BR75/M2903).

Para o estabelecimento do ponto de corte (ou discriminativo) do ELISA, foram confrontados os soros de cães provenientes do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, dos quais 20 eram positivos para toxoplasmose, 20 positivos para leptospirose, 20 positivos para leishmaniose, 20 negativos para leishmaniose coletados de cães filhotes da região de Londrina que é considerada área de baixa prevalência para a leishmaniose. O ponto de corte foi realizado com base na média da densidade óptica (D.O.) de todos os soros acrescidos de três desvios padrão, o que resultou em 0.174.

Durante a colheita do sangue os cães foram examinados em busca de lesões cutâneas compatíveis com LTA. Como nenhum animal

apresentou lesões típicas, foram selecionados 22 deles com sorologia positiva para *Leishmania* sp na IFI, ELISA e que apresentaram algum sinal clínico sugestivo da infecção, tais como emagrecimento, alopecia, dermatite, rarefação pilosa. Destes animais, foram puncionados os linfonodos poplíteos e outros que se apresentavam aumentados, após antissepsia com álcool 70%, sedação com acepromazina por via intravenosa e anestesia local com xilocaína a 2%. O material aspirado foi acondicionado em tubos de ensaio contendo meio de cultura NNN e enviado para o Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia Básica da UFPR. O material colhido foi inoculado em meio de cultura específico NNN e mantido em estufa a 24°C.

### *Comparação dos testes*

A avaliação do teste de ELISA (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e acurácia) foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Gart e Burk (1966), comparando-o ao teste de IFI, considerado padrão (OMS, 1990). O desempenho do ELISA também foi verificado aplicando-se a concordância de Kappa (COHEN, 1960; LANDIS; KOCK, 1977). Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa Epi Info (DEAN et al., 1994).

### *Captura dos vetores*

Foram realizadas sete capturas de vetores, entre as 18:00 e 0:00 horas, sendo no domicílio, no

peridomicílio e na periferia de matas periurbanas, no período de outubro de 2000 a agosto de 2003. Foram utilizadas armadilhas luminosas tipo CDC e Shannon (BARRETO, 1943) e aspirador manual. As capturas foram realizadas, junto com a captura do *Aedes aegypti* pela equipe de Entomologia Médica da 17ª Regional de Saúde de Londrina. Após a captura os flebotomíneos foram identificados segundo a nomenclatura de Galati (1995).

### **Resultados**

Das 489 amostras analisadas, 222 (45,4%) foram sororeagentes para IFI e 189 (38,7%) sororeagentes para ELISA. Comparando-se o teste de ELISA com a IFI (teste de referência), foram encontradas 176 amostras positivas (36,0%) e 254 negativas (51,9%) para ambas as técnicas.

A partir da análise das variáveis para cães com sorologia positiva pela IFI houve diferença significativa em relação à ausência de matas ( $p=0,0028$ ) e ausência de convívio com outras espécies animais ( $p=0,0161$ ). Em cães sororeagentes pelo ELISA, as variáveis que apresentaram diferença significativa foram: o tipo de mata ciliar existente no ambiente ( $p=0,0022$ ), a ausência de lixo ( $p=0,0144$ ), o esgoto a céu aberto e lançado diretamente em rios ou córregos ( $p=0,0045$ ) e do lixo lançado em terreno baldio, queimado ou enterrado ( $p=0,0005$ ) (tabela 1).

**Tabela 1.** Resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) em cães e associação com as variáveis ambientais, Bela Vista do Paraíso, Paraná, 2003.

Variáveis	IFI			ELISA		
	Positivos/Total (%)	$\chi^2$	P	Positivos/Total (%)	$\chi^2$	P
<b>Raça</b>						
SRD	196/424 (46,2)	0,65	0,4208	169/424 (39,9)	1,60	0,2060
Definida	26/65 (40,0)			20/65 (30,8)		
Total	222/489 (45,4)			189/489(37,7)		
<b>Sexo</b>						
Macho	127/275 (46,2)	0,09	0,7621	117/275 (42,5)	3,65	0,0559
Fêmea	95/214 (44,4)			72/214 (33,6)		
Total	222/489 (45,4)			189/489 (38,7)		
<b>Idade</b>						
≤ 1 ano	79/188 (42,0)	1,19	0,2747	63/188 (33,5)	3,06	0,0803
> 1 ano	143/301 (47,5)			126/301 (41,9)		
Total	222/489 (45,4)			189/489 (38,7)		
<b>Procedência</b>						
Urbana	211/456 (46,3)	1,59	0,2075	174/456 (38,2)	0,42	0,5182
Rural	11/33 (33,3)			15/33 (45,5)		
Total	222/489 (45,4)			189/489(38,7)		
<b>Presença de Mosquitos</b>						
Ausente	47/98 (48,0)	0,44	0,5054	43/98 (43,9)	1,28	0,2582
Presente	166/381 (43,57)			141/381 (37)		
Total	213/479 (44,47)			189/489 (38,7)		
<b>Controle de Mosquitos</b>						
Tela	0/2 (0,0)	2,06	0,5593	0/2 (0,0)	2,00	0,5731
Repelente de Contato	2/5 (40,0)			2/5 (40,0)		
Protetor Elétrico	0/2 (0,0)			0,2 (0,0)		
Outros	7/21 (33,3)			5/21 (23,8)		
Total	9/30 (30,0)			7/30 (23,3)		
<b>Mata</b>						
Presente	115/290 (39,7)	8,92	0,0028*	104/290 (35,9)	2,06	0,1516
Ausente	107/199 (53,8)			85/199 (42,7)		
Total	22/489 (45,4)			189/489 (38,7)		
<b>Tipo de Mata</b>						
Ciliar	10/22 (45,5)	0,12	0,7250	15/22 (68,2)	9,34	0,0022*
Nativa	105/268 (39,2)			89/268 (33,2)		
Total	115/290 (39,7)			104/290 (35,9)		

*Continuação Tabela 1.***Distância da Moradia**

Até 100 m	95/236 (40,3)	0,08	0,7781	89/236 (37,7)	1,48	0,2240
>100 a 500 m	20/54 (37)			15/54 (27,8)		
Total	115/290 (39,7)			104/290 (35,9)		

**Outros Animais**

Presente	22/70 (31,4)	5,79	0,0161*	28/70 (40,0)	0,01	0,9061
Ausente	200/419 (47,7)			161/419 (38,4)		
Total	222/489 (45,4)			189/489 (38,7)		

**Espécie Animal**

Equinos e Muares	17/52 (32,7)	1,05	0,7886	22/52 (42,3)	1,84	0,6068
Sinantrópicos	1/4 (25,0)			2/4 (50,0)		
Equinos e Sinantrópicos	0/2 (0,0)			0,2 (0,0)		
Silvestres	4/12 (33,3)			4/12 (33,3)		
Total	22/70 (31,4)			28/70 (40,0)		

**Resíduos**

Presente	125/295 (42,4)	2,21	0,1367	100/295(33,9)	5,98	0,0144*
Ausente	93/187 (49,7)			85/187 (45,5)		
Total	218/482 (45,2)			185/492 (38,4)		

**Tipos de Resíduos**

Lixo	39/86 (45,3)	2,10	0,3496	36/86 (41,9)	5,47	0,0649
Folhas	76/175 (43,4)			58/175 (33,1)		
Entulhos	11/35 (31,4)			7/35 (20,0)		
Total	126/296 (42,6)			101/296 (34,1)		

**Destino do Esgoto**

Fossa Séptica	216/477 (45,3)	0,55	0,7583	179/477 (37,5)	10,83	0,0045*
Céu Aberto	4/9 (44,4)			7/9 (77,8)		
Rio ou Córrego	2/3 (66,7)			3/3 (100)		
Total	222/489 (45,4)			189/489 (38,7)		

**Destino do Lixo**

Coleta Pública	214/475 (45,1)	3,63	0,3041	176/475 (37,1)	17,94	0,0005*
Terreno Baldio	2/2 (100,0)			2/2 (100,0)		
Queima	5/11 (45,5)			10/11 (90,9)		
Enterra	1/1 (100,0)			1/1 (100,0)		
Total	222/489 (45,4)			189/489		

**Proprietário**

Com LTA	7/18 (38,9)	0,11	0,7459	7/18 (38,9)	0,05	0,8217
Sem LTA	215/471 (45,6)			182/471 (38,6)		
Total	22/489 (45,4)			189/489 (38,9)		

Os valores obtidos para o ELISA foram: 84,7%, respectivamente. O coeficiente global do sensibilidade de 79,3%, especificidade de 95,1%, teste foi de 87,0% (0,87) e o coeficiente Kappa de valor preditivo positivo e negativo de 93,1% e 0,75 (substancial) (tabela 2).

**Tabela 2.** Comparação dos testes de IFI e ELISA para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp em cães do município de Bela Vista do Paraíso, Paraná, 2004.

Teste sorológico		IFI		
		positivo	negativo	Total
ELISA	positivo	176	13	189
	negativo	46	254	300
	Total	222	267	489

Sensibilidade = 79,3% (IC 95% 73,2 – 84,3); Especificidade = 95,1% (IC 95% 91,6 – 97,3); Valor Preditivo Positivo = 93,1% (IC 95% 88,3 – 96,1); Valor Preditivo Negativo = 84,7% (IC 95% 80,0 – 88,5); Coeficiente Global do Teste = 87%; Coeficiente de Kappa = 0,75 (substancial).

Apesar da punção dos linfonodos em 22 cães, não foi possível isolar o parasito em meio de cultura específico, apesar de serem sororeagentes pelas técnicas de IFI e ELISA.

Os flebotomíneos das sete capturas foram

identificados e representados pelas seguintes espécies: *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia fischeri*, *Lutzomyia pessoai*, *Lutzomyia migonnei*, *Lutzomyia cortelezzi*, *Lutzomyia intermedia*, num total de 711 exemplares (tabela 3).

**Tabela 3.** Resultado da captura de flebotomíneos no perímetro urbano e rural do município de Bela Vista do Paraíso, Paraná, 2000-2003.

Espécies	Capturas													Total	%
	1 <sup>a*</sup>	2 <sup>a</sup>		3 <sup>a</sup>		4 <sup>a</sup>		5 <sup>a**</sup>		6 <sup>a</sup>		7 <sup>a</sup>			
	Total	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F		
<i>Lu. whitmani</i>	67	13	19	5	7	350	60	-	-	4	8	10	25	568	79,9
<i>Lu. fischeri</i>	8	-	-	5	22	0	12	-	-	4	6	11	10	78	11,0
<i>Lu. pessoai</i>	-	5	9	2	10	-	-	-	-	-	-	6	5	37	5,2
<i>Lu. migonnei</i>	-	-	-	5	10	-	-	-	-	-	-	-	-	15	2,1
<i>Lu. cortelezzi</i>	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	1,7
<i>Lu. intermedia</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,1
Total	87	47		66		422		-		22		67		711	100

\* Não realizada sexagem de flebotomíneos

\*\* Uso de inseticida para controle do *Aedes aegypti*

- Espécie não capturada.

## Discussão

No presente estudo foi demonstrada a soroprevalência em cães (45,4%), mesmo que estes vivam em áreas endêmicas e que não apresentem

lesões características, permitindo assim avaliar as condições de risco destes animais para com os seres humanos, ou servindo ainda como animais sentinela para a ocorrência do agente no ecossistema. Padilla et al. (2002) sugerem que os cães são importantes indicadores da ocorrência da LTA humana.

No Estado do Paraná, a LTA (humana e animal) está presente nas regiões norte, noroeste e Vale do rio Ribeira. Nas regiões norte e noroeste, têm sido assinalados casos desde o início de sua colonização, na década de 30. Após a campanha de controle da malária, significativa redução do número de casos foi observada até os anos 80. A partir daí, estas regiões vêm mostrando caráter endêmico (VERZIGNASSI et al., 1988), com aumento significativo no número de casos, além do aumento do número de cidades com casos positivos. Tem-se observado uma tendência de expansão da doença para os próximos anos, apesar de ações profiláticas diretas estarem em andamento. A subnotificação e a dificuldade de diagnóstico, contribuem para que os números oficiais não correspondam com a realidade (BRASIL, 2002).

A IFI é a técnica de referência e a mais utilizada para o estudo de soroprevalência da LTA canina no Brasil (OMS, 1990). Pesquisas realizadas em diferentes regiões do Brasil revelaram taxas de soropositividade variando de 3,2 a 22,32% (AFONSO CARDOSO et al., 1989; GOMES et al., 1990; TOLEZANO et al., 1998). Da mesma forma, no Estado do Paraná, alguns trabalhos de soroprevalência apresentaram coeficientes de 19,0%, 18,2% e 6,6% (CASTRO, 2001; LONARDONI et al., 2006; SILVEIRA et al., 1996).

A prevalência de 45,4% obtida pela IFI neste trabalho é alta quando comparada a outros estudos, demonstrando que o agente está circulando nesta espécie de reservatório animal mesmo que não tenha sido observado cães com lesões cutâneas, sugerindo que este ecossistema deva ser melhor estudado. Tem-se observado que a epidemiologia da LTA varia entre as regiões endêmicas e, neste contexto, pode ser que

em certas regiões o cão não desempenhe papel tão significativo, enquanto que em outras, ele possa atuar como reservatório secundário, mantendo o agente no peri e intradomicílio (IVERSON et al., 1983; SERRA et al., 2003). No Brasil, estudos tem demonstrado ser relativamente comum a presença de cães infectados em áreas endêmicas de LTA, especialmente em ambientes domiciliares (FALQUETO, 1995). Barbosa et al. (1999) alertam quanto à presença, mesmo que baixa, de possíveis fontes de infecção, necessitando de medidas de controle da doença, como, por exemplo, a tentativa de interromper o ciclo domiciliar e peridomiciliar de forma adequada.

Quanto ao teste de ELISA, apesar de amplamente utilizado no diagnóstico da Leishmaniose Visceral canina, poucos trabalhos foram realizados empregando essa técnica para o diagnóstico da LTA em cães. A confirmação da padronização da técnica de ELISA para o diagnóstico da LTA em cães foi realizada por Castro (2001) em um amplo estudo sorológico no Estado do Paraná, e em sete cães com exame parasitológico positivo, dos quais seis foram sororeagentes para o ELISA e cinco para a IFI.

Neste estudo, o resultado obtido foi de 189 (38,7%) cães sororeagentes no ELISA, que apesar de menores que os obtidos na IFI, são maiores que os observados por Castro (2001), quando analisou 371 amostras de soro de cães, sendo 212 oriundos do norte e 159 do sul do Estado do Paraná, obtendo 18,39% de cães sororeagentes no norte e 6,29% no sul. Castro (2001) utilizou amostras de soros caninos oriundos de duas diferentes regiões do estado do Paraná, enquanto que no presente trabalho os soros analisados eram de um ecossistema com alta ocorrência de casos humanos.

Utilizando a mesma metodologia de Castro (2001) (comparação entre o ELISA e a IFI, sendo esta considerada como padrão ouro), mostrou-se que 176 (35,99%) cães foram sororeagentes para ambas, com uma sensibilidade de 79,3% e especificidade de 95,1% para o ELISA. Apesar do

valor encontrado para a sensibilidade ter sido menor que o da especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo encontram-se dentro do IC de 95%. Castro (2001) obteve uma sensibilidade de 85,71% e especificidade de 91,14%.

Não foi possível isolar o parasito nos 22 cães que tiveram os linfonodos puncionados, apesar destes serem sororeagentes para ambos os testes utilizados. Justificam esses achados autores como Aguilar, Fernandez e Deane (1984), Le Pont, Mouchet e Desjeux (1989), Gomes et al. (1990), Yoshida et al. (1990) e Falqueto et al. (1986) que demonstraram dificuldade no isolamento da *Leishmania* sp. de órgãos onde obtiveram isolados apenas das lesões de pele. Da mesma forma, Castro (2001) relata dificuldade no emprego do diagnóstico parasitológico em cães, quando comparou material obtido diretamente das lesões de pele, punção de linfonodos ou de órgãos internos de necropsia. Os autores conseguiram o isolamento apenas de material colhido diretamente das lesões cutâneas, obtendo sete isolados de *Leishmania (Vianna) braziliensis* de 13 cães com lesões de pele. Aliada a essa dificuldade, geralmente é pequeno o número de cães com lesão cutânea que denuncie a possível infecção, sugerindo-se a busca de outras técnicas com melhor sensibilidade para a identificação de animais infectados.

A análise do ambiente em que vive a população de cães estudada foi baseada nas variáveis que apresentaram diferenças significativas pela IFI e/ou ELISA e que possa interferir no ciclo do parasita. Mesmo sendo animais que habitavam o perímetro urbano, pode-se observar que 39,7% dos sororeagentes viviam próximos de algum tipo de mata. Destes, 68,2% viviam próximos a matas ciliares e 33,2 %, próximos a matas nativas ou matas residuais. Iverson et al. (1983), em pesquisa de soroprevalência em 389 cães errantes capturados próximos às matas residuais do município de São Paulo, demonstraram pela IFI, que 19,28% eram sororeagentes para *L. (V.) braziliensis*.

A urbanização da LTA pela *L. (V.) braziliensis* tem que ser analisada em especial nas regiões sudeste e sul do Brasil, pois além do padrão de transmissão silvestre, observa-se que nas áreas de colonização antiga, com grande devastação das matas, os focos de leishmaniose estão restritos a alguns resíduos da cobertura vegetal primitiva (BRASIL, 2000). Esses resíduos, em franco processo de degradação, obrigam as populações de reservatórios silvestres a procurarem o ambiente extraflorestal (peridomiciliar e domiciliar) em busca de alimentos. Processo semelhante ocorre com os vetores, que buscam no homem e animais domésticos a fonte alimentar de sobrevivência (GOMES et al., 1992; MARZOCHI; MARZOCHI; CARVALHO, 1994).

Outras variáveis analisadas como a presença de resíduos, o destino do esgoto e o destino do lixo foram estatisticamente significativas, apresentam influência na epidemiologia da *Leishmania* sp. uma vez que os flebotomíneos se desenvolvem em matéria orgânica e ambientes úmidos e sombreados, particularmente em resíduos de folhas e pedaços de madeira.

Quanto às capturas dos vetores realizadas no perímetro urbano e rural do município, apesar das interferências quanto ao número de espécies capturadas resultantes do combate ao *Aedes aegypti* pela aplicação de inseticida, foi possível observar que as diferentes espécies de vetores da *Leishmania* sp. estavam presentes, sendo mais prevalente o *Lutzomyia whitmani*.

Também Castro (2001), pesquisando flebotomíneos em outras regiões do norte do Estado do Paraná, obteve resultados idênticos quanto às espécies, diferindo apenas nas proporções. Por outro lado, quando Castro (2001) compara com os flebotomíneos capturados na região sul do Estado, no Vale do Ribeira obteve resultados completamente diferentes, sendo o *Lu. intermedia* o mais prevalente, com 60% dos capturados, seguido do *Lu. migonnei*, *Lu. fischeri* e do *Lu. whitmani*. O objetivo inicial do presente trabalho era uma pesquisa de *Aedes aegypti*

por isso alguns ecótopos foram os mesmos, não possibilitando uma análise mais apurada. Gomes et al. (1992) e Marzochi, Marzochi e Carvalho (1994), realizaram estudos da população de flebotomíneos em áreas florestais remanescentes da mata Atlântica da região Sudeste; nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo e observaram que o *Lu. intermedia* era o principal vetor, semelhante ao observado no sul do Paraná.

Castro (2001) ressalta que o *Lu. whitmani* e o *Lu. intermedia*, facilmente adaptados ao peridomicílio e domicílio, são atraídos pelo alimento (homem e animais) e pela luz elétrica e encontram no peridomicílio, matéria orgânica em ambulância para o seu desenvolvimento.

A adaptação de flebotomíneos e reservatórios nos ambientes antrópicos é evidente e tem propiciado a formação de ciclo de transmissão nos ambientes peridomiciliares em zonas rurais e periurbanas, facilitando a infecção do homem e dos animais domésticos, sobretudo cães (AGUILAR et al., 1989; PIRMEZ et al., 1988; YOSHIDA et al., 1990).

A diversidade de reservatórios primário e secundário da LTA, sem dúvida alguma se deve também à diversidade de vetores com tropismo para determinadas espécies de animais. Assim, o estudo das diferentes espécies de vetores de um ecossistema é fundamental para a compreensão do ciclo do parasito.

## Conclusão

Os resultados permitem concluir que a LTA está amplamente disseminada na população canina do município de Bela Vista do Paraíso, com 45,4% de soropositividade e que ambos os testes sorológicos (IFI e ELISA) podem ser utilizados no diagnóstico da LTA canina, apresentando concordância substancial em seus resultados.

O *Lu. whitmani* foi o vetor mais encontrado, num total de 79,9% dos capturados.

O cão apresenta-se como um elo entre o ciclo silvestre e o peridomiciliar da LTA, podendo tornar-se um amplificador da doença nesse ecossistema.

## Referências

- AFONSO CARDOSO, S. R.; MACHADO, M.; COSTA-CRUZ, J. M.; GONÇALVES, M. D. R. F.; STUTZ, W. I. H. Leishmaniose tegumentar canina no município de Uberlândia, Minas Gerais. Diagnóstico clínico e sorológico de cães naturalmente infectados. *Revista Científica de Ciências Biomédicas da Universidade de Uberlândia*, Uberlândia, v. 5, p. 14-21, 1989.
- AGUILAR, C. M.; FERNANDEZ, R.; DEANE, L. M. Study of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. The role of domestic animals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 79, p. 181-195, 1984.
- AGUILAR, C. M.; RANGEL, E. F.; GARCIA, L.; FERNANDEZ, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI, JR.; G.; VARGAS, Z. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 84, p. 19-28, 1989.
- BARBOSA, G. M. S.; MARZOCHI, M. C. A.; MASSARD, C. L.; LIMA, G. P. S.; CONFORT, E. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em cães, no Município de Paraty, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 641-646, 1999.
- BARRETO, M. P. *Observações sobre a biologia, em condições naturais dos flebotomos no Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae)*. 1943. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana*, 2. ed. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 2007. 180 p.
- \_\_\_\_\_. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de controle de Leishmaniose tegumentar americana*. Brasília, 2000. 43 p.
- \_\_\_\_\_. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de controle de Leishmaniose tegumentar americana*. Brasília, 2002. 43 p.
- CASTRO, E. A. *Aspectos epidemiológicos e parasitológicos da leishmaniose tegumentar em duas regiões do Estado do Paraná e o papel do cão na manutenção do ciclo de Leishmania*. 2001. Tese

- (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AUGUIR, C. Standardization of ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) and Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) techniques for canine cutaneous leishmaniasis. In: *International Conference on New Horizons in Biotechnology*, Índia, Trivandrum, p. 228, 2001.
- COHEN, J. A. Coeficient of agreement for nominal scales. *Educational and Measurment*, New York, v. 20, p. 37-46, 1960.
- DEAN, A. G.; DEAN, J. A.; COULOMBIER, D.; BRENDDEL, K. A.; SMITH, D. C.; BURTON, A. H.; DICKER, R. C.; SULLIVAN, K. M.; FAGAN, R. F.; ARNER, T. G. *Epi Info, Version 6: a word processing database, and statistic program for epidemiology on microcomputers*. Atlanta: Center for Diseases Control and Prevention, 1994.
- ENGVALL, E.; PERLAMANN, P. Enzyme linked immunosorbent assay - ELISA. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 109, p. 129-135, 1972.
- FALQUETO, A. *Especificidade alimentar de flebotômíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no estado do Espírito Santo*. 1995. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- FALQUETO, A.; COURA, J.; BARROS, C.; GRIMALDI, G.; SESSA, P.; CARIAS, V.; ALENCAR, J. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no Município de Viana, Estado do Espírito Santo. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 81, p. 155-163, 1986.
- GALATI, E. A. B. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental*, Maracay, v. 35, p. 133-142, 1995. Suplemento 1.
- GART, J. J.; BUCK, A. A. Comparison of screening test a reference test in epidemiologic studies. *American Journal of Epidemiology*, Oxford, v. 83, n. 1, p. 593-602, 1966.
- GOMES, A. C.; COUTINHO, S. G.; PAIM, G. V.; OLIVEIRA, S. M. O.; GALATI, E. A. B.; NUNES, M. P.; CAPINZIK, A. N.; YAMAMOTO, Y. I.; ROTTER, P. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. Avaliação da atividade enzoótica da *Leishmania (Viannia) braziliensis* em ambiente florestal e peridomicilar, região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 32, p. 105-115, 1990.
- GOMES, A. C.; YAMAMOTO, Y. I.; CAPINZAIK, N. A.; AMARAL, N. M. M.; GUIMARÃES, A. J. G. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. Prevalência/incidência da infecção humana nos municípios de Pedro de Toledo e Miracatu, São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 34, p.149-158, 1992.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Estimativa da população em 2009. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 30 out. 2009.
- IVERSON, L. B.; CAMARGO, M. E.; VILLANOVA, A.; REICHMANN, M. L. A. B.; ANDRADE, E. A.; TOLEZANO, J.E. - Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina-urbana do município de São Paulo - Brasil (1979-1982). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 25, p. 310-317, 1983.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement the categorical data. *Biometrics*, Texas, v. 33, p. 59, 1977.
- LE PONT, F.; MOUCHET J.; DESJEUX, P. Leishmaniasis in Bolivia: VI. Observations on *Lutzomyia nuneztovari anglesi* Le Pont & Desjeux, 1984 the presumed vector of tegumentary leishmaniasis in the yungas focus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 84, p. 277-278, 1989.
- LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; ALVES, W. A.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; MEMBRIVE, U. A.; MEMBRIVE, N. A.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; ZANZARINI, P. D.; ISHIKAWA, E.; TEODORO, U. Leishmaniose tegumentar americana humana e canina no Município de Mariluz, Estado do Paraná, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 22, n. 12, p. 2713-2716, 2006.
- MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. C.; SABROZA, P. C.; SOUZA, W. J. S. Reação de Imunofluorescência indireta e intradermorreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudos comparativos dos resultados observados em 1974 e 1978. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 22, p. 149-155, 1980.
- MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitology Today*, Cambridge, v. 10, p. 37-40, 1994.
- MENDONÇA, S. C. F.; SOUZA, W. J. S. D.; NUNES, M. P.; MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G. Indirect immunofluorescence test in New World Leishmaniasis:

- serological and clinical relationship. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 83 p. 347-355, 1988.
- MODABBER, F. Leishmaniasis. In: *Tropical disease research - progress 1991-92: eleventh programme report of the UNDP/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)*. WHO, Geneva, 1993. p. 77-91.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. *Lutte contre les leishmanoses*. Geneva, 1990. (Serie de rapports techniques).
- \_\_\_\_\_. *Lutte contre les leishmanoses*. Geneva, 2004. (Serie de rapports techniques).
- PADILLA, A. M.; MARCO, J. D.; DIOSQUE, P.; SEGURA, M. A.; MORA, M. C.; FERNANDEZ, M. M.; MALCHIODI, E. L.; BASOMBRIIO, M. A. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. *Veterinary Parasitology*, EUA, v. 110, p. 1-10, 2002.
- PIRMEZ, C.; COUTINHO, S. G.; MARZOCHI, M. C. A.; NUNES, M. P.; GRIMALDI, JR. G. Canine american cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *L. braziliensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Oxford, v. 3, p. 52-58, 1988.
- SERRA, C. M. B.; LEAL, C. A.; FIGUEIREDO, F.; SCHUBACH, T. M.; DUARTE, R.; UCHÔA, C. M. A.; SILVA, R. M. M.; MADEIRA, M. F. Leishmaniose tegumentar canina em Morada das Águias (Serra da Tiririca), Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 19, n. 6, p. 1877-1880, 2003.
- SILVEIRA, T. G. V.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; TOLEDO, M. J. O.; BERTOLINI D. A.; ARRAES, S. M. A. A.; FILHO D. V. Investigação sorológica em cães de área endêmica de leishmaniose tegumentar, no Estado do Paraná, Sul do Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 12, p. 89-93, 1996.
- TOLEZANO, J. E.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. M. F. L.; BISUGO, M. C.; CUNHA, E. A.; ELIAS, C. R.; LAROSA, R. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo. Brasil. II. Utilização de antígeno particulado de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em inquéritos caninos em regiões endêmicas. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 57, p. 65-71, 1998.
- VERZIGNASSI, T. G.; PEREIRA, D. S.; TEODORO, U.; MISUTA, N. M.; DIAS, M. L. G. G.; FERREIRA, M. E. M. C.; FRESSATTI, R.; ARISTIDES, S. M. A.. Leishmaniose tegumentar americana: aspectos epidemiológicos no norte do Paraná – Brasil. *Ciência e Cultura*, Campinas, v. 40, p. 884, 1988.
- YOSHIDA, E.; CORREA, F.; MARQUES, S.; STOLF, H.; DILLON, N.; MOMEN, H.; GRIMALDI, JR. G. Human, canine and equine leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in the south-west region of São Paulo state. Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 85, p. 133-134, 1990.
- YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sandflies in Mexico, the west Indies, Central and South America “Diptera: Psychodidae”. *Memoirs of the American Entomological Institute*, USA, v. 54, p. 1-881, 1994.