



INFORMAÇÕES SOBRE OS RESULTADOS OBTIDOS, ORIGEM E SEXO DOS CÃES (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*) SUBMETIDOS A TESTE SOROLÓGICO PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL ATENDIDOS NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO SEMIÁRIDO DA UFCG – CAMPUS PATOS/PB.

Erotides Martins Filho¹
Márcia Almeida de Melo²

Introdução: De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose visceral (LV) é considerada uma doença tropical negligenciada de distribuição mundial, popularmente denominada de calazar (Who 2017). A doença apresenta altas taxas de incidência nas Américas, com 96% dos casos ocorrendo no Brasil (Opas 2018), onde é ocasionada pelo protozoário parasita espécie *Leishmania infantum*, (Urquhart et al. 1998, Sundar & Chakravarty 2015;). Nas Américas, a transmissão ocorre através da picada da fêmea infectada de insetos dípteros do complexo *Lutzomyia longipalpis*, (Rangel & Lainson 2003; Ready 2014). O cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório na zona urbana, desempenhando um papel considerável na continuidade do ciclo de transmissão entre o homem e o vetor (Gramiccia & Gradoni 2005). O quadro clínico da LVC é variável, havendo animais assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos; a sintomatologia é multissistêmica e inespecífica, apresentando perda de peso, pelos opacos ou alopecia, apatia, onicogribose, feridas na pele e lesões oculares (Nelson & Couto 2015). Devido à maioria dos cães serem assintomáticos e os sinais não serem patognômicos, o diagnóstico clínico torna-se difícil (Nogueira & Ribeiro 2015). O Ministério da Saúde preconiza o teste DPP® (Bio-Manguinhos) para triagem dos cães infectados e o kit ELISA EIE® (Bio-Manguinhos) como teste confirmatório (Brasil 2014). No Brasil, também há disponível o kit ELISA S7® (Biogene) autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O

¹ Técnico do Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos – PB. E-mail: martinsvet2@bol.com.br

² Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal e do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da UFCG e Coordenadora do Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido da UFCG do Campus Patos – PB. E-mail: marcia.melo@ufcg.edu.br

kit é produzido pela empresa BIOGENE INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA, e utiliza a proteína recombinante HSP70 (o fragmento S7 da HSP 70 – Heat Shock Protein) de *L. infantum* como antígeno (Andrade & Andrade 1995), com especificidade de 94,3% e sensibilidade de 89%, permitindo a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção. Considerando que o Hospital Veterinário da UFCG recebe animais de municípios circunvizinhos ao município de Patos, e levando em consideração a importância epidemiológica da origem dos cães positivos, este trabalho teve como objetivo verificar a procedência dos animais diagnosticados com LVC através do estudo do ELISA S7 por meio das fichas individuais arquivadas no Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido, entre os meses de julho de 2017 e junho de 2019. Dos cães suspeitos de LVC eram coletadas alíquotas de sangue, que eram enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido (BIOMOL/UFCG) onde era obtido o plasma sanguíneo o qual era submetido ao teste ELISA S7®, seguindo as orientações do fabricante e a leitura sendo realizada no leitor de ELISA BIOTEK a 450 nm. Das 687 amostras testadas, 370 (53,86%) foram reagentes, 244 (35,52%) foram não reagentes e 73 amostras (10,62%) apresentaram-se como indeterminadas. A maioria das amostras positivas foram provenientes dos municípios de Patos/PB, Piancó/PB, Mãe d'Água/PB e Gado Bravo/PB, também foram positivas amostras de animais oriundos de alguns municípios dos estados do Ceará, do Rio Grande do Norte, de Pernambuco e de outros municípios paraibanos. Diversos estudos têm sido realizados para a verificação da prevalência em cães, tais estudos são de suma importância devido a LVC se tratar de uma doença zoonótica onde diversos autores vêm encontrando altos índices de incidência de leishmaniose visceral humana. Com base no exposto pode-se concluir que O Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido, da UFCG tem grande importância na realização do diagnóstico da LCV na região do semiárido, seja no estado da Paraíba ou nos estados circunvizinhos.

Material e Métodos: Após o atendimento no setor de Clínica de Pequenos Animais, os cães com suspeita de LVC foram submetidos à coleta de 5 ml de sangue por meio de venopunção jugular, cefálica ou safena, utilizando seringas estéreis de 5 mL e agulha 25x8mm, que foi adicionado a tubos tipo vacutainer contendo citrato de sódio a 4% ou ativador de coágulo. Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido (BIOMOL/UFCG), juntamente com requisição contendo os dados do animal, tais como: número do registro do atendimento, nome, raça, idade, nome do tutor, endereço e quadro clínico. O sangue foi submetido à centrifugação em 2000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos para a obtenção do plasma sanguíneo, que foi armazenado em microtubos de 1,5mL, identificados e estocados a -20°C até a realização do ensaio sorológico. O material foi submetido ao teste ELISA S7®, seguindo as orientações do fabricante. A leitura foi realizada no leitor de ELISA BIOTEK a 450 nm.

Resultados: Durante o período de julho de 2017 e junho de 2019, foram testadas 687 amostras de soro ou plasma canino, dos quais 53,86 % (370/687) foram reagentes ao teste, 35,52% (244/687) foram não reagentes e 10,62% (73/687) foram indeterminados; para estes últimos, orienta-se a realização de um novo ensaio após 30 dias. Entre as amostras positivas, 51,89% (192/370) eram de machos e 48,11% (178/370) de fêmeas. Em relação à procedência, os municípios com o maior número de animais reagentes foram Patos – PB, Piancó – PB, Mãe d'Água – PB e Gado Bravo – PB, com ocorrência de 57,84% (214/370), 5,13% (19/370), 4,05% (15/370) e 1,89% (07/370), respectivamente. Também foram realizados testes em animais oriundos de municípios do Ceará (Várzea Alegre), Rio Grande do Norte (Caicó, Patu, Natal, Jardim de Piranhas, São João do Sabugi e Ouro Branco), de Pernambuco (São José do Egito, Afogados da Ingazeira e Serra Talhada) e de outros municípios paraibanos localizados em diferentes regiões do Estado (Brejo do Cruz, Cacimba de Areia, Campina Grande,

Catingueira, Condado, Desterro, Distrito de Galante, Fagundes, Imaculada, Itaporanga, Jericó, Livramento, Malta, Maturéia, Monteiro, Nazarezinho, Passagem, Paulista, Pombal, Queimadas, Quixaba, Santa Luzia, Santa Terezinha, São José do Bonfim, São Mamede, Sousa, Taperoá, Teixeira e Vista Serrana), com ocorrências variando de 0,27% a 1,62%. Na Paraíba, os animais foram provenientes de 32 cidades com pelo menos uma amostra.

Discussão: No presente levantamento, houve pouca diferença entre a ocorrência de machos e fêmeas reagentes, 51,89% e 48,11%, respectivamente. Nos estudos de Silva, R. et al. (2016), cães machos apresentaram 2,15 mais chances de se infectarem com *L. infantum*, justificado pela maior utilização de cães machos tanto para caça quanto para guarda, com isso aumentando a exposição ao vetor. Todavia, resultados discordantes foram encontrados por Silva, A. et al. (2018) onde o total de fêmeas reagentes foi o dobro do número de machos e por Vannucchi et al. (2016) e Silva, J. et al. (2017), que verificaram que ser fêmea era um fator de risco, devido à provável supressão imunológica por influência de fatores hormonais durante a gestação. Por outro lado, Silva, C. et al. (2013) e Figueiredo et al. (2014) observaram que tanto machos quanto fêmeas estão igualmente expostos ao risco de infecção, que demonstra que não há um consenso em relação à maior ou menor predisposição entre machos e fêmeas. Silva, R. et al. (2016) e Silva, R. et al. (2018), em estudos distintos de prevalência, obtiveram 11,33% e 7,2% de prevalência, na zona rural e urbana, respectivamente. Neste levantamento, o município obteve a maior ocorrência em relação aos demais por ser o que alberga a instituição, uma vez que em Gado Bravo, de acordo com Silva, L. (2018), a prevalência da LVC foi de 18,8%. De acordo com o Governo da Paraíba (2019), entre os anos de 2007 a 2013 foram confirmados cinco casos de LV em humanos em Patos, e, entre os anos de 2016 a 2018, o município apresentou transmissão esporádica da doença, com quatro casos confirmados. Neste mesmo período, o município de Gado Bravo teve três casos humanos confirmados. Os demais municípios dos quais procederam os cães suspeitos, também são endêmicos para leishmaniose. Como exemplo, em Píscó, foram confirmados cinco casos de LV entre 2007 a 2013 e, em Mãe D'água, dois casos foram notificados, sendo um em 2014 e outro em 2015 (Governo da Paraíba 2019). Os estudos de prevalência da infecção em cães são importantes uma vez que a prevalência da infecção canina é indicativa de risco para a infecção humana (Rodrigues et al. 2017). A região Nordeste é a que apresenta os maiores índices de incidências da leishmaniose visceral humana e diversas pesquisas têm sido realizados para a verificação da prevalência em cães (Silva, L. 2018; Silva, R. et al. 2018; Cavalcante 2018; Amóra et al. 2006; Pimentel et al. 2015; Dantas-Torres et al. 2006; Bezerra et al. 2011; Silva e Braga 2008; Abreu-Silva et al. 2008; Barbosa et al. 2009; Fernandes et al. 2016), que apontam índices variando de 0,7% a 51,61%.

Considerações finais: O Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido, da UFCG, contribui significativamente para o diagnóstico da LVC na região do semiárido, seja no estado da Paraíba ou nos estados circunvizinhos. Em sua maioria, os animais suspeitos em função dos sinais clínicos sugestivos da infecção são sorologicamente, positivos.

Referências:

ABREU-SILVA, A.L. et al. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotômíneos em uma área endêmica na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17. p.197-203, 2008.

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. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1854–1859, 2006.

ANDRADE, P.P.; ANDRADE, C.R. Heat shock proteins in visceral leishmaniasis. In: EDEN, V. W. (Ed.). **Stress Proteins in Medicine**. New York, Marcel Dekker Publish, p. 308-326, 1995.

BARBOSA, D.C.P.M. et al. Inquérito epidemiológico da leishmaniose visceral canina em três distritos sanitários do Município de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10. p.434-447, 2009.

BEZERRA, F.Q.G. et al. Inquérito sorológico da leishmaniose visceral canina no município de Ipojuca. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 25, n. 194/195, p. 1533-1535, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portal da Saúde SUS (Sinan/SVS/MS)**. Ministério da Saúde, Brasília. 2014.

CAVALCANTE, J.P. **Casuística de leishmaniose visceral canina no centro de controle de zoonoses do município de Caicó-RN**. 2018. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2018.

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

FERNANDES, A.R.F. et al. Risk factors associated with seropositivity for *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* in dogs in the state of Paraíba, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v. 25. p. 90-98, 2016.

FIGUEIREDO, M.J.F.M.; et al. Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15. p. 102-106, 2014.

GOVERNO DA PARAÍBA. **Plano estadual de ação para intensificação da vigilância e controle da leishmaniose visceral- 2019 A 2020**. Disponível em: <<https://paraiba.pb.gov.br/diretas/secretaria-da-saude/arquivos-1/cib-2019/4-reuniao-ordinaria/anexo-resolucao-ndeg-61-plano-estadual-de-lv.pdf>>. Acesso em 31 ago. 2019.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11–12, p. 1169–1180, 2005.

NELSON, W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1512 p, 2015.

NOGUEIRA, F.S.; RIBEIRO, V.M. Leishmaniose Visceral. IN: JERICÓ, M. M.; NETO, J. P. A.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. 1ªed. Rio de Janeiro: Roca, p.719-733, 2017.

PIMENTEL, D. S. et al. Prevalence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs in an endemic area of Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 48, n. 4, p. 491-493, 2015.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, Cap. 6. p. 291-336, 2003.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147–154, 3 maio 2014. revisiting the paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2014.

RODRIGUES, A.C.M. et al. Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1119–1124, 2017.

SAÚDE, O.P.A. DA. Leishmanioses. **Informe Epidemiológico das Américas**. 2018.

SILVA, A.P.; et al. Prevalência da leishmaniose visceral canina no município de Jaguaribe, Ceará In: CESMEV, Fortaleza. **Ciência Animal**, v. 28. p. 1-4, 2018.

SILVA, C.B.; et al. Seroepidemiological aspects of *Leishmania* spp. in dogs in the Itaguaí micro-region, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22. p. 9-45, 2013.

SILVA, J.D. et al. Leishmaniose visceral em cães de assentamentos rurais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1292–1298, 2017.

SILVA, L.F.F. **Avaliação epidemiológica da leishmaniose visceral canina na Paraíba**. 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2018.

SILVA, R.B.S. et al. Seroprevalence and risk factors associated with canine visceral leishmaniasis in the State of Paraíba, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 5, p. 683–688, 2018.

SILVA, R.B.S. et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 625–629, 2016.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237–252, 2015.

URQUHART, G.M.; et al. **Parasitologia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 273p, 1998.

VANNUCCHI, C.I.; et al. Perfil de proteínas plasmáticas em cadelas gestantes e não gestantes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 8, p. 781-786, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 15 ago. 2019.