



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIA**

**ANÁLISE ECOEPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO
MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU ENTRE 2018 E 2019**

ALAN YEUNG LAW

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná

2022

**ANÁLISE ECOEPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO
MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU ENTRE 2018 E 2019**

ALAN YEUNG LAW

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luiz Tavares

Coorientador: Prof. Dr. Robson Michael Delai

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná

2022

ALAN YEUNG LAW

**ANÁLISE ECOEPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO
MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU ENTRE 2018 E 2019**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Flávio Luíz Tavares (UNILA)

Orientador

Dr. Kelvinson Fernandes Viana (UNILA)

Dr. Leonardo Ferreira (HMCC)

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, 30 de maio de 2022.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

L415

Law, Alan Yeung.

Análise ecoepidemiológica da Leishmaniose visceral canina no município de Foz do Iguaçu entre 2018 e 2019 /Alan Yeung Law. - Foz do Iguaçu, 2022.

90 f.: il., color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu - PR, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luiz Tavares

Coorientador: Prof. Dr. Robson Michael Delai

1. Ecoepidemiologia. 2. Leishmaniose visceral. 3. Diagnóstico molecular. I. Tavares, Prof. Dr. Flávio Luiz. II. Delai, Prof. Dr. Robson Michael. III. Título.

CDU 616.993.1

Dedico este trabalho à família, colegas e amigos, pela paciência e pelo apoio constante para a conclusão dessa dissertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Flávio Luiz Tavares pela amizade, parceria e orientação durante todo o processo de desenvolvimento desta dissertação, ficarei eternamente grato pela oportunidade.

Agradeço a todos os colaboradores do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu (CCZ), principalmente aos médicos veterinários, Carlos Eduardo de Santi, André de Sousa Leandro, Luciana Chiyo e ao biólogo Rosinei Kafka que possibilitaram a realização das coletas das amostras.

Agradeço também a todos os colaboradores do Laboratório de Saúde Única (Centro de Medicina Tropical – Hospital Ministro Costa Cavalcante) pelo apoio e auxílio incansável na rodagem das amostras via PCR em tempo real e análises de dados, agradecendo principalmente ao amigo e diretor do laboratório Robson Michael Delai e seus colaboradores: Andressa Rahyn, Leonardo Ferreira e Vinicius Silveira.

Agradeço à minha família, em especial, a minha amada esposa Renata de Conto Corazza pela paciência e incentivo em todos os momentos. Sem você e as minhas filhas, Monique Corazza Law e Celina Corazza Law, eu não seria ninguém.

Agradeço especialmente ao Erwin Becker Marques pelos constantes auxílios no Programa de Pós-graduação em Biociência.

E por fim, agradeço à Universidade Federal da Integração Latino-Americana pelo apoio em todas as fases desta pesquisa.

LAW, Alan Yeung. 2022. **Análise ecoepidemiológico da leishmaniose visceral canina no município de Foz do Iguaçu entre 2018 e 2019**. Orientadores: TAVARES, Flávio Luiz (orientador); DELAI, Robson Michael (coorientador). 90 f. Dissertação (Mestrado) - PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu.

RESUMO

As leishmanioses são consideradas doenças parasitárias zoonóticas e cosmopolitas, em processo de expansão em diversos continentes. A alta adaptabilidade do agente etiológico a um amplo espectro de hospedeiros mamíferos é observada na forma mais agressiva da doença, a leishmaniose visceral (LV) ou Calazar, causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, e transmitida a seus hospedeiros vertebrados pelo flebotomíneo *Lutzomia longipalpis*. Com características ecoepidemiológicas singulares, embora possa se apresentar insidiosa em parte importante do seu curso natural, a LV é responsável por altas taxas de letalidade quando não tratada. A cidade de Foz do Iguaçu, fronteira com *Ciudad del Este* (Paraguai) e *Puerto Iguazu* (Argentina) apresenta um intenso fluxo de pessoas e animais, o que pode facilitar a circulação de diferentes espécies e cepas de *Leishmania*. Nos últimos anos, a casuística de LV vem aumentando de forma preocupante na população canina da cidade e o primeiro caso humano autóctone foi confirmado no ano de 2015. Atualmente, o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) e os laboratórios de referência estaduais utilizam testes rápidos e sorológicos de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para diagnosticar a enfermidade em cães do município e da região, procedimento indicado pelo Ministério da Saúde. Entretanto, número importante de casos, incluindo-se muitos subclínicos, necessita de confirmação por técnicas que apresentem maior sensibilidade e especificidade diagnósticas. Neste estudo foram averiguados os resultados através da análise de concordância por meio do Coeficiente de Cohen Kappa entre o teste rápido com a confirmação pelo teste de ELISA em relação ao teste molecular via PCR (*polymerase chain reaction*) em tempo real utilizando amostra de sangue total obtido pela demanda espontânea do CCZ, realizando-se um levantamento socioambiental dos tutores dos animais e correlacionando o com a situação epidemiológica desta enfermidade canina. O estudo também elaborou mapa de adequabilidade ambiental baseados nas condições climáticas e avaliou potencial área de ocorrência da zoonose. Através do modelo estatístico verificou-se que não houve concordância entre o teste molecular com os testes sorológicos resultando em um valor $k=0,1675$. Outro ponto analisado refletiu que a permanência do animal em área externa aumenta o risco em mais de cinco vezes de contraírem a doença. Em relação a adequabilidade ambiental, concluiu-se que a cidade apresenta um elevado potencial de ocorrência da leishmaniose visceral canina. O presente estudo visou contribuir com análises ecoepidemiológicas da região e auxiliar no melhor conhecimento sobre as características moleculares do parasita da LV circulante na Tríplice Fronteira, buscando incrementar e validar as opções diagnósticas disponíveis na região.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; diagnóstico molecular; ecoepidemiologia.

LAW, Alan Yeung. 2022. ***Ecoepidemiological analysis of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Foz do Iguacu between 2018 and 2019***. Advisors: TAVARES, Flávio Luiz (advisor); DELAI, Robson Michael (co-advisor). 90 s. Master's thesis (Master's degree) - PPG-BC (Graduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University of Latin American Integration), Foz do Iguacu.

ABSTRACT

Leishmaniasis are zoonotic, cosmopolit and parasitic diseases presenting its casuistic growing in many continents. The high adaptability presented by the etiologic in a wide number of mammal hosts is verified in the most severe form of manifestation, the visceral leishmaniasis (VL) or Calazar, inflicted by the protozoan Leishmania infantum and transmitted by the phlebotomus Lutzomia longipalpis. Presenting singular eco-epidemiological features, VL is responsible for high percentual of lethality when there is no the suitable and correct treatment. The region of Foz do Iguacu, on the Brazilian border of the Triple Frontier – with Ciudad del Este (Paraguay) and Puerto Iguazu (Argentina) – presents an intense circulation of people and animals, and it may promote the circulation of different species and strains of Leishmania. In the last years, VL casuistic has increased and the first autochthonous human case was confirmed in 2015. Nowadays, Center for Zoonosis Control at Foz do Iguacu and reference laboratories in Paraná state has used rapid tests and ELISA serological tests (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) for diagnosis of this disease in dogs of the region. However, an important number of the cases, including many of the subclinical casuistic, need confirmation by exams presenting higher sensibility and specificity. In this study, the results were verified through the analysis of agreement using the Cohen Kappa coefficient between the rapid test with confirmation by the ELISA test in relation to the molecular test via PCR (polymerase chain reaction) in real time using a sample of whole blood obtained spontaneous demand from the CCZ, carrying out a socio-environmental survey of the animals' guardians and correlating it with the epidemiological situation of this canine disease. The study also prepared a map of environmental suitability based on climatic conditions and evaluated the potential area of occurrence of the zoonosis. Through the statistical model, it was verified that there was no agreement between the molecular test and the serological tests, resulting in a value of $k=0.1675$. Another point analyzed reflected that the permanence of the animal in an external area increases the risk of contracting the disease by more than five times. Regarding environmental suitability, it was concluded that the city has a high potential for the occurrence of canine visceral leishmaniasis. The present study aimed to contribute with ecoepidemiological analyzes of the region and to help in the better knowledge about the molecular characteristics of the circulating VL parasite in the Triple Frontier, seeking to increase and validate the diagnostic options available in the region.

Keywords: *visceral leishmaniasis; molecular biology; ecoepidemiologic.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Status da Leishmaniose Visceral no mundo.....	18
Figura 2. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no novo e velho mundo.....	18
Figura 3. Endemicidade dos países da Região Europeia quanto à ocorrência de LV, de acordo com a Organização Mundial de Saúde.....	19
Figura 4. Casos de leishmaniose visceral nos países com maior número de casos, América.....	20
Figura 5. Taxa de novos casos de leishmanioses visceral por 100,000 habitantes por município em um período de 2001-2006 e 2007-2014.....	22
Figura 6. Distribuição de casos autóctones de Leishmaniose Visceral segundo município em 2002, Brasil.....	23
Figura 7. Número de casos e coeficiente de incidência de leishmaniose visceral, Brasil – 1085 a 2002.....	24
Figura 8. Correlação entre incidência de LVH com LVC.....	25
Figura 9. Cão assintomático e cão oligossintomático. Extraído do Manual Técnico de Leishmanioses Caninas (2015).....	26
Figura 10. Teste rápido LVC DDP Bio-maguinhos®. Resultado positivo indicado pela banda de teste.....	28
Figura 11. Comparação dos níveis de anticorpos específicos em diferentes grupos de cães.....	28
Figura 12. Resultados da combinação de teste parasitológico (cultura), sorológico (IIF/EIA) e molecular (PCR) na performance de 155 cães soropositivos eutanasiado pelo programa de controle de leishmanioses de Rio de Janeiro, Brasil. 59% deram negativos em todos os testes.....	30
Figura 13. Interação do fluoróforos com os pares de bases de DNA.....	33
Figura 14. Fluoróforos – Kit PowerUp™ - SUBR® Green Master Mix.....	33
Figura 15. Pirâmide demonstrando as análises clínicas e laboratoriais entre cães soronegativos, PCR positivo, soropositivo e cães sintomáticos.....	34
Figura 16. Intensidade geográfica de cães soropositivos e soronegativos.....	37
Figura 17. Laboratório de Saúde Única (Centro de Medicina Tropical – Hospital Ministro Costa Cavalcante).....	41
Figura 18. QuantStudio 7 Flex – Appliedbiosystems, Laboratório de Saúde Única, Foz do Iguaçu – PR.....	42

Figura 19. Curva ROC para o modelo de regressão logística binária com fatores preditivos em relação a teste rápido e ELISA.....	51
Figura 20. Curva ROC para o modelo de regressão logística binária com fatores preditivos em relação a teste de PCR em tempo real.....	52
Figura 21. Mapas de adequabilidade ambiental (A, C) e potencial de ocorrência (B, D) para Leishmaniose canina.....	53
Figura 22. Áreas potenciais de ocorrência de casos de Leishmaniose canina considerando os diferentes testes de diagnóstico.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Descrição das variáveis biogeoclimáticas obtidas pela base de dados do <i>Worldclim</i>	45
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número, proporção de casos e incidência de LV segundo países, Américas de 2015 a 2017.....	20
Tabela 2. Comparativa entre ELISA e PCR real time em cães avaliado com LVC.....	32
Tabela 3. Frequências absolutas e relativas em porcentagem das variáveis sociodemográficas, teste do Qui-quadrado.....	47
Tabela 4. Frequências absolutas e relativas em porcentagem das variáveis sociodemográficas, teste de Qui-quadrado.....	49
Tabela 5. Concordância entre os testes rápido/Elisa e PCR-RT por meio do coeficiente de concordância de Cohen Kappa.....	49
Tabela 6. Parâmetros obtidos para o modelo criado por meio da aplicação de regressão logística relacionando com os resultados positivo no teste sorológico rápido e ELISA.....	50
Tabela 7. Parâmetros obtidos para o modelo criado por meio da aplicação de regressão logística relacionando com os fatores resultados no PCR em tempo real.....	52
Tabela 8. Locais das variáveis testadas em relação aos resultados dos diferentes testes – positivos e negativos.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CMT	Centro de Medicina Tropical
CNV	<i>Copy number variation</i>
CONESUL	Região mais ao sul do Continente sul-americano
DDP	<i>Dual Path Platform</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EIA	<i>Enzym Immuno Assay</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FA	Frequência Absoluta
FR	Frequência Relativa
GARP	<i>Genetic Algorithm for Rule-set Production</i>
HMCC	Hospital Ministro Costa Cavalcante
IFAT	<i>Indirect Fluorescent Antibody Test</i>
IgG	Imunoglobulina G
IIF	<i>Indirect Immuno Fluorescence</i>
L	Leishmania
LACEN	Laboratório Central do Estado do Paraná
LAT	Latitude
LC	Leishmaniose Cutânea
LONG	Longitude
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral humana
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONG	Organização Não Governamental
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCT-RT	<i>Polymerase Chain Reaction Real Time</i>
PR	Paraná
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIFI	Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido Ribonucleico

ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
TR	Teste rápido
UNILA	Universidade Federal da Integração Latino Americana

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Referencial teórico.....	16
1.1.1. <i>Epidemiologia.....</i>	16
1.1.2. <i>Diagnóstico.....</i>	26
1.1.3. <i>Variáveis Socioambientais e Climáticos.....</i>	35
2. JUSTIFICATIVA.....	38
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivos gerais.....	39
3.2. Objetivos específicos.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. Amostras biológicas.....	40
4.2. Extração de DNA Genômico.....	40
4.3. PCR em Tempo Real.....	41
4.4. Levantamento Socioambiental.....	42
4.5. População Canina Avaliada e Estatística.....	43
4.5.1. <i>Caracterização da amostra.....</i>	43
4.5.2. <i>Avaliação de concordância entre testes.....</i>	43
4.5.3. <i>Regressão logística binária.....</i>	43
4.5.4. <i>Distribuição potencial de ocorrência de casos.....</i>	44
4.5.5. <i>Avaliação das variáveis bioclimáticas em relação aos locais potenciais de ocorrência de casos.....</i>	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1. Variáveis sociodemográficas.....	47
5.2. Avaliação de concordância entre testes.....	49
5.3. Regressão logística.....	50
5.4. Modelos de adequabilidade ambiental e áreas potenciais de ocorrência.....	52
6. DISCUSSÃO.....	56
6.1. Perfil dos Animais domiciliados na cidade.....	60
6.2. Regressão logística dos dados ambientais.....	61
6.3. Modelo associação climática.....	62
7. CONCLUSÃO.....	66
8. REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICES.....	80

Apêndice A – Requerimento de autorização para uso de amostras do banco de soro sanguíneo, de cães analisados para leishmaniose visceral canina, do Programa de Controle de Zoonoses, do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu, bem como informações sobre os resultados destes exames (teste rápido e ELISA).....	80
ANEXOS.....	82
Anexo A – Termo de compromisso para estágio.....	82
Anexo B – Requisição para exame de Leishmaniose Visceral Canina.....	84
Anexo C – Termo de consentimento de uso de amostras e de informações.....	86
Anexo D – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNILA.....	87
Anexo E – Questionário: leishmaniose visceral canina e saúde ambiental.....	88

1. INTRODUÇÃO

1.1. Referencial teórico

1.1.1. Epidemiologia

A leishmaniose visceral humana (LVH) é uma doença endêmica em cinco continentes, com casos humanos relatados em cerca de 54 países (figura 1) localizados em regiões tropicais e subtropicais (MARCONDES & ROSSI, 2013; OMS, 2016). Esta parasitose de natureza zoonótica apresenta-se comumente de forma sistêmica, crônica, grave, que pode acometer pele, mucosas e vísceras, dependendo da espécie do parasita e da resposta imune do hospedeiro (SOUSA *et al*, 2018). Encontra-se entre as seis endemias prioritárias no mundo, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo considerada uma doença negligenciada que, se não tratada, apresenta alta letalidade em humanos (COSTA *et al*, 2018). As leishmanioses fazem parte de um grupo de doenças produzidas pela invasão de parasitas do gênero *Leishmania* ao sistema fagocitário mononuclear de hospedeiros mamíferos. Estas doenças são transmitidas principalmente pelas atividades hematófagas de flebotomíneos fêmeas pertencentes aos gêneros *Lutzomyia*, no novo mundo, e *Phlebotomus*, no velho mundo (RIBEIRO *et al.*, 2018).

O vetor apresenta uma alta adaptabilidade a diferentes ambientes e ainda capacidade de colonizar ambientes urbanos, sendo mais ativo durante as horas crepusculares (BERROZPE *et al.*, 2017). Existem três formas clínicas de leishmanioses difundidas pelo mundo: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose mucocutânea (RAMOS *et al.*, 2018), que envolvem diferentes espécies de parasita e de vetores, sendo por isso também denominadas de complexos. No Brasil, as formas mais comuns são a cutânea e visceral (SILVA *et al.*, 2008). Segundo LUCENA & MEDEIROS (2018), nas Américas, o cão doméstico é considerado o principal elo enquanto reservatório na cadeia biológica do parasita, fundamental para a manutenção no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral em humanos, cães e, eventualmente, em outros hospedeiros mamíferos. Os canídeos de forma geral, sejam eles domésticos ou de vida silvestre, abrigam o protozoário *Leishmania infantum*, atuando como hospedeiro intermediário e provocando uma infecção crônica com um período inespecífico de incubação (LAMATTINA *et al.*, 2019; LYRA *et al.*, 2015).

A doença não é encontrada na Austrália, na Antártida ou nas ilhas do Pacífico (KEVRIC *et al.*, 2015) sendo que na última década, a prevalência de *L. infantum* - forma visceral - aumentou cinco vezes em várias partes do sul da Europa, onde cerca de 2,5

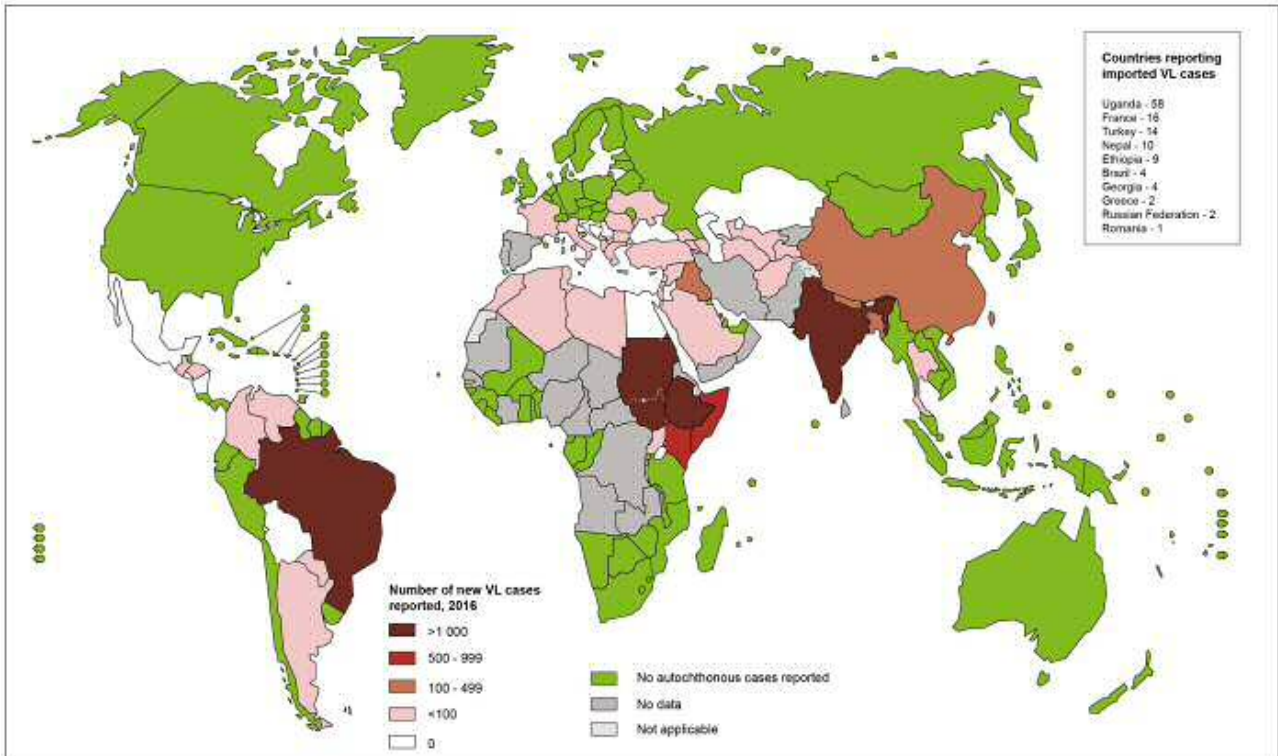
milhões de cães estão infectados com esta forma da parasitose (LE RUTTER *et al.*, 2018). Assim, as leishmanioses (figura 2) do Velho Mundo existem no Hemisfério Oriental e são endêmicas na Ásia, África e sul da Europa enquanto as leishmanioses do Novo Mundo são endêmicas no Hemisfério Ocidental, estendendo-se do centro-sul do Texas à América Central e do Sul, exceto Chile e Uruguai (OMS, 2012).

De acordo com ALVAR *et al.* (2012), mais de 90% da LVH global ocorre em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. Para a Organização Mundial de Saúde (2016), a sua epidemiologia é diversa e complexa, estando presente principalmente na Índia subcontinental e com alta endemicidade no Brasil e no leste africano. Geórgia, Espanha, Albânia, Itália, Turquia, Tajiquistão e Azerbaijão são os países mais comumente afetados na região europeia /asiática (GRADONI *et al.*, 2017). Em diversas outras regiões da Europa (figura 3), não há casos de LVH adquiridos localmente, que incluem Andorra, Áustria, Bielorrússia, Bélgica, República Tcheca, Dinamarca, Estônia, Finlândia, Alemanha, Hungria, Islândia, Irlanda, Letônia, Lituânia, Luxemburgo, Holanda, Noruega, Polônia, República da Moldávia, Federação Russa, Sérvia, Eslováquia, Suécia, Suíça e Reino Unido (GRADONI *et al.*, 2017).

A leishmaniose visceral (LV) apresenta a forma clínica mais grave da desta parasitose, devido às complicações frequentes e ao potencial de evoluir para a morte. Por ser uma zoonose crônica e, frequentemente, fatal, é considerada um grave problema de saúde pública no mundo, sendo reconhecida como uma das dezessete “Doenças Tropicais Negligenciadas” (SILVA *et al.*, 2016).

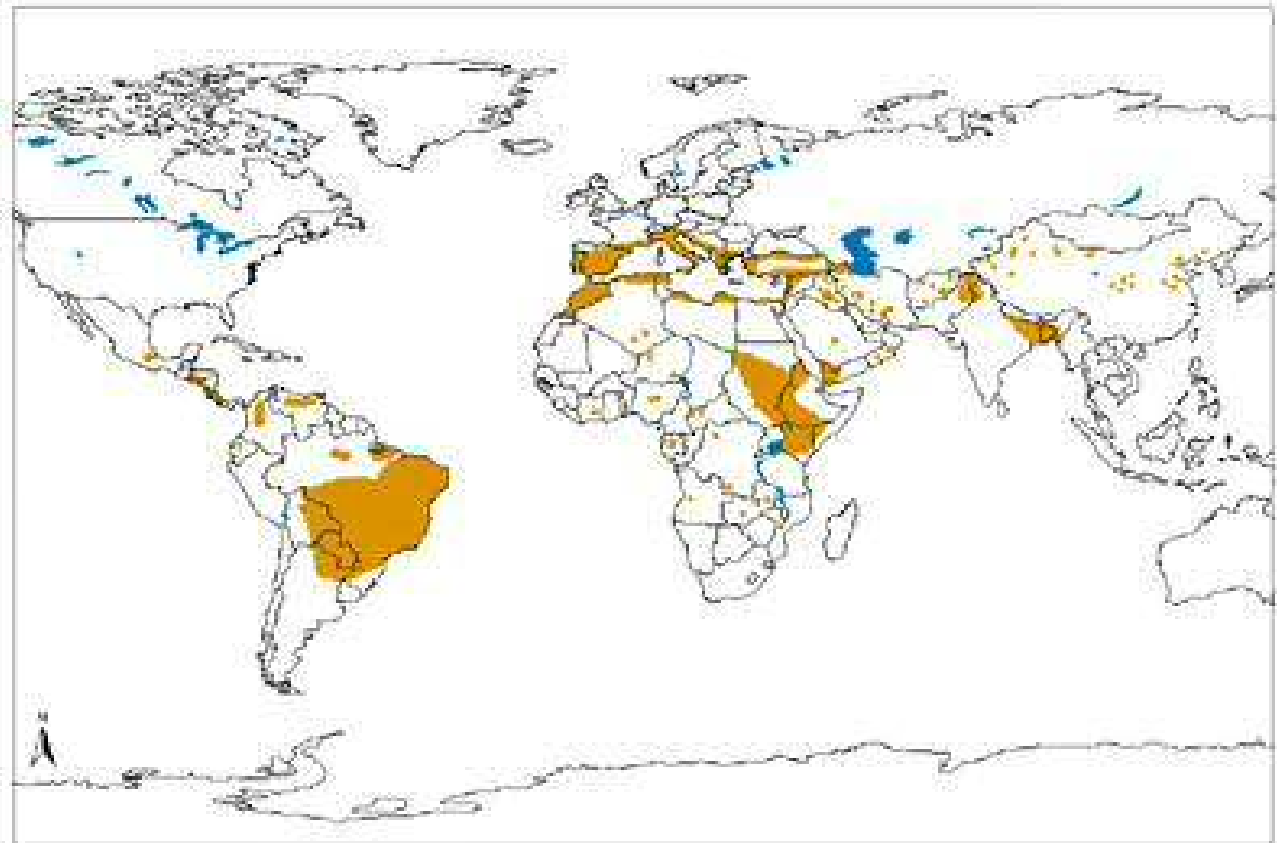
De acordo com PAHO (2017a), os números de casos de leishmaniose visceral se mantiveram estáveis na Região; no entanto, observa-se uma expansão geográfica, principalmente nos países da região do Cone Sul (figura 4), onde em 2015 a LVC se estabeleceu no Uruguai, na fronteira com Argentina, e em 2016 na fronteira com Brasil. Considerando-se as Américas, os casos humanos de LV encontram-se registrados em 12 países; entretanto, 96% dos casos foram reportados no Brasil; regionalmente, esta enfermidade parasitária encontra-se categorizada em três cenários do ponto de vista epidemiológico: países com transmissão em expansão (Argentina, Brasil e Paraguai), países com transmissão estável ou controlada (Colômbia e Venezuela) e países com transmissão esporádica (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México). No período de 2001 – 2017 (tabela 1) foram registrados 59.679 casos novos, resultando em uma média de 3.516 casos por ano, tendo o Brasil como um dos principais países reportados (PAHO, 2019).

Figura 1. Status da LVH no mundo



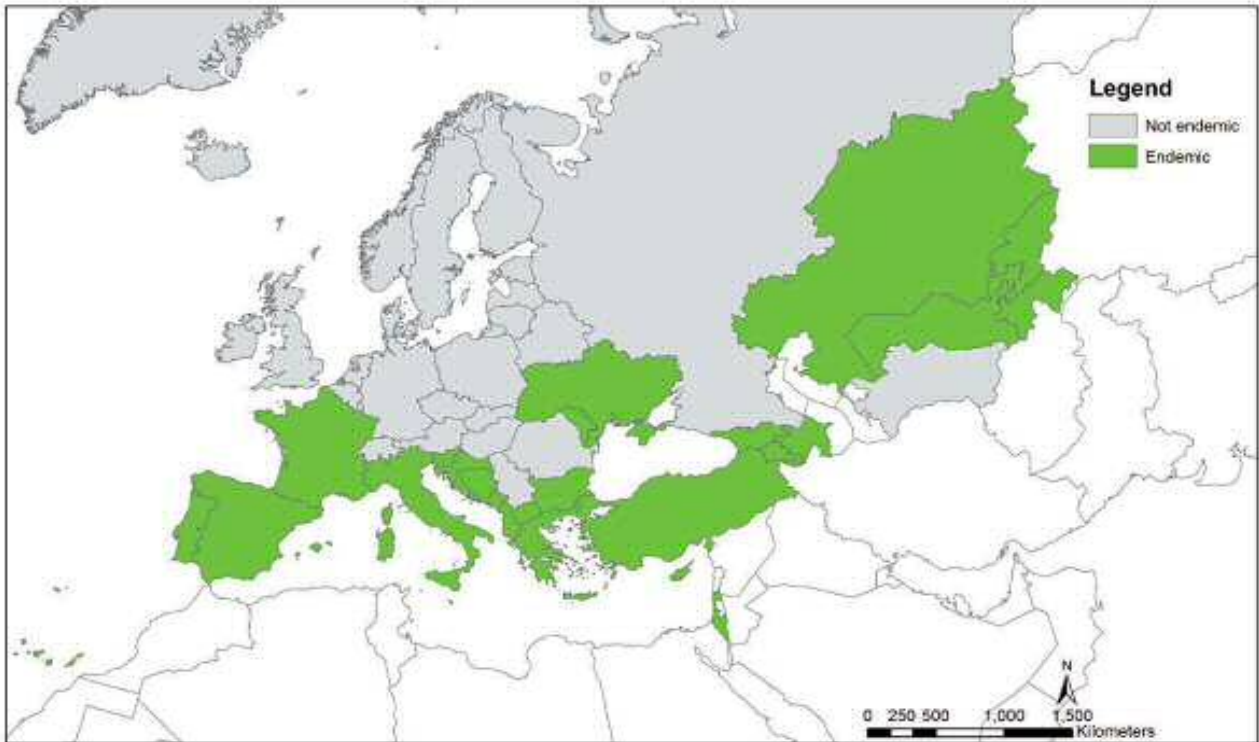
Fonte: OMS (2016).

Figura 2. Distribuição geográfica da LVH no novo e velho mundo



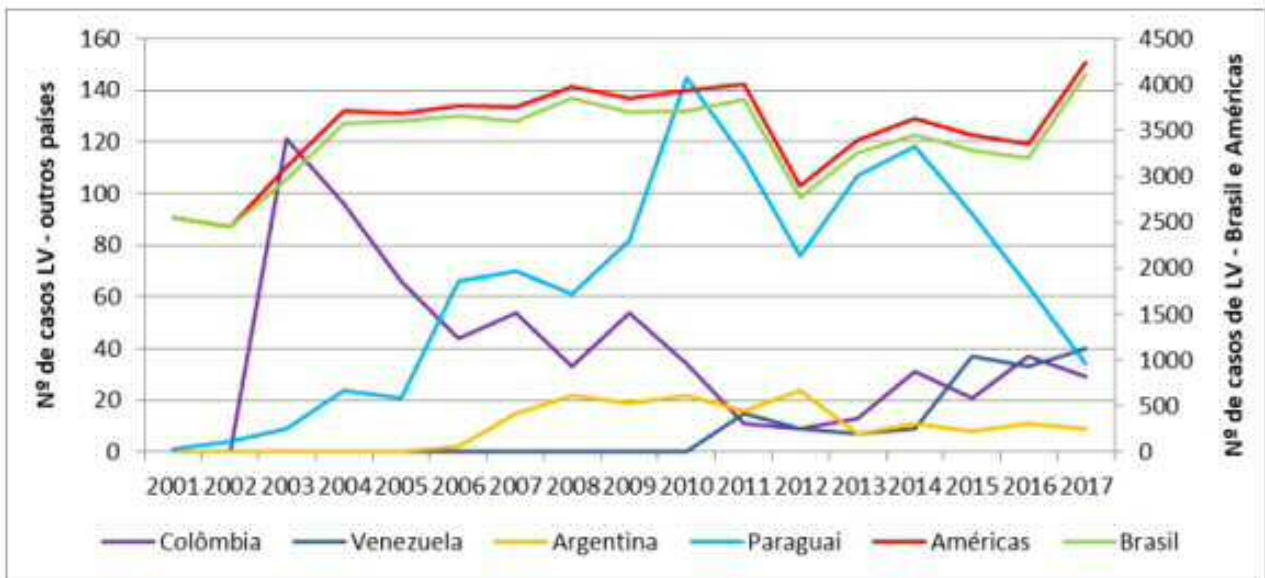
Fonte: OMS (2012).

Figura 3. Endemicidade dos países da Região Europeia quanto à ocorrência de LVH, de acordo com a Organização Mundial de Saúde



Fonte: GRADONI *et al.* (2017).

Figura 4. Casos de leishmaniose visceral humana nos países com maior número de casos, Américas, 2001 – 2017



Fonte: Extraído do PAHO (2019).

Tabela 1. Número, proporção de casos e incidência^{1,2} de leishmaniose visceral humana segundo países, Américas, 2015–2017

Países	2015				2016				2017			
	N°	%	Incid. Pop Risco ¹	Incid. Geral ²	N°	%	Incid. Pop Risco ¹	Incid. Geral ²	N°	%	Incid. Pop Risco ¹	Incid. Geral ²
Brasil	3.289	95.2	4.09	2.54	3200	95.41	4.88	1.55	4114	97.05	5.53	1.98
Paraguai	92	2.7	3.01	2.36	64	1.91	2.42	1.02	34	0.80	2.1	0.53
Venezuela	37	1.1	1.24	0.34	33	0.98	1.03	0.11	40	0.94	1.33	0.13
Colômbia	21	0.6	7.04	0.63	37	1.10	3.54	0.34	29	0.68	3.44	0.06
Argentina	8	0.2	0.89	0.67	11	0.33	0.72	0.03	9	0.21	1.07	0.02
Honduras	6	0.2	2.4	0.34	7	0.21	2.25	0.08	8	0.19	2.48	0.09
El Salvador	0	0.0	0.0	0.0	0	0.00	0.0	0.00	2	0.05	4.4	0.03
Guatemala	2	0.1	1.9	1.9	2	0.06	2.2	0.01	2	0.05	5.4	0.01
México	1	0.0	4.3	0.1	0	0.00	0.0	0.00	1	0.02	5.4	0.00
Total	3.456	100.0	5.07	2.42	3354	100.00	4.51	1.04	4239	100.00	5.23	0.74

Nota explicativa: ¹ Incidência por 100.000 habitantes considerando a população das zonas de transmissão de LV nos países e regiões. ² Incidência por 100.000 habitantes considerando a população total dos países com transmissão de LV.

Fonte: PAHO (2019).

O primeiro caso da epidemiologia de leishmaniose visceral humana (LVH) no continente americano foi diagnosticado em 1913 pelo Dr. Luis Migone, no Paraguai, o qual o médico descreveu através de material necropsiado de um paciente brasileiro oriundo do Mato Grosso, Brasil (ARBO, 2013; RIOS-GONZALES, 2016); posteriormente, neste mesmo ano, um outro paciente que residia no Brasil também foi diagnosticado por FRANCHINI & MONTOVANI (1913 *apud* COSTA *et al.*, 1995) fora do país de origem. De acordo com COSTANZO (2012), nos demais países da região a enfermidade só foi descrita nos seus próprios países de origem após 13 anos (na Argentina) e 20 anos (no Brasil). Embora esta doença seja historicamente limitada aos trópicos e subtropicais, existem vários fatores que contribuem para a sua disseminação em novas áreas, entre eles estão às mudanças climáticas, a urbanização, o desmatamento, o aumento de viagens por motivos turísticos e relacionados ao trabalho, a imigração de países endêmicos, entre outros (SUTHERST, 2004).

O primeiro relato de LVH no Brasil ocorreu em 1934, com o achado de formas amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de tecido hepático de pacientes que morreram com suspeita de febre amarela. Este primeiro surto desta enfermidade ocorreu em Sobral, Ceará (PENNA HA, 1934 *apud* GONTIJO & MELO, 2004).

A partir de meados dos anos 80, foi verificada uma transformação drástica na distribuição geográfica da LVH; esta doença, que antes encontrava-se restrita às áreas rurais da região nordeste brasileira, produziu avanços e expansão para outras regiões indenes, atingindo inclusive a periferia de grandes centros urbanos; em 19 dos 27 estados brasileiros já foram registrados casos autóctones de LVH, sendo a maioria na região Nordeste do país. A partir dos anos 90, os estados do Pará e Tocantins (região Norte),

Mato Grosso do Sul (região Centro Oeste) e Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste) passaram a influir de maneira significativa nas estatísticas da LVH no Brasil (GONTIJO & MELO, 2004; SILVA *et al.*, 2008).

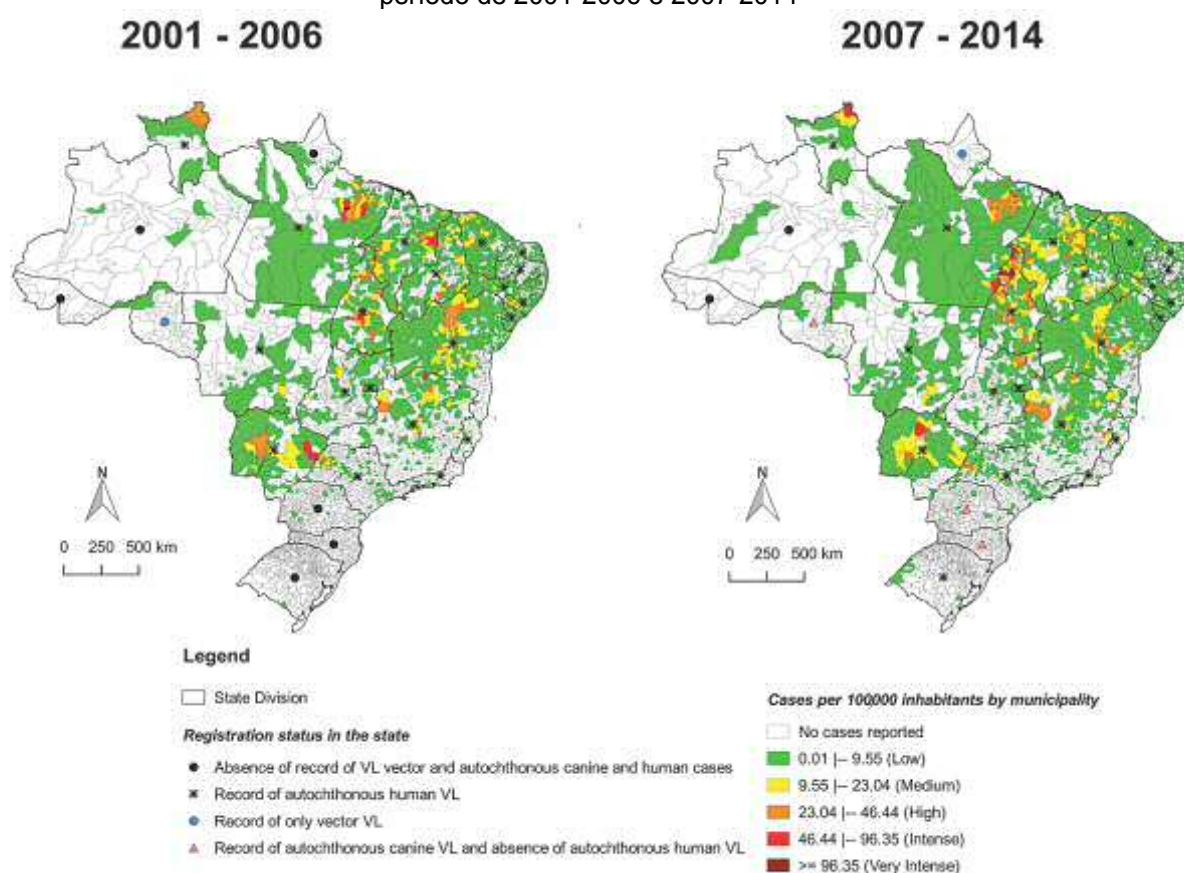
No Paraná, até 2009 (SOCOOL *et al.*, 2009) este estado era considerado uma região livre da transmissão do LV por não ter sido observada/constatada a presença do vetor; entretanto, cães e humanos com sinais clínicos compatíveis com LV vêm sendo observados no Estado do Paraná já em épocas anteriores a esses primeiros relatos. O vetor *Lutzomyia longipalpis* - único vetor comprovadamente apto, até o presente momento, para a transmissão do parasita -, só foi encontrado pela primeira vez na cidade de Foz do Iguaçu em 2012, quando a cidade havia sido decretada como área de risco da doença (SANTOS *et al.*, 2012; SOCCOL *et al.*, 2017; PARANÁ, 2018), sendo que o primeiro caso humano ocorreu em 2015 (CALDART *et al.*, 2018, JUNIOR *et al.*, 2015). Concomitantemente, a LV expandiu seu alcance para os países vizinhos (Argentina e Paraguai), onde foi observado um aumento gradual nas mortes humanas (SOCCOL *et al.*, 2017).

Santa Catarina era considerado um estado indene para LV até 2010, quando foram diagnosticados os quatros primeiros casos autóctones de Leishmaniose Visceral Canina na localidade de Canto dos Araçás, na cidade de Florianópolis e em 2017, surgiu o primeiro caso em humano (GUIA DE ORIENTAÇÃO – SC, 2018).

Em Rio Grande do Sul (BRASIL, 2010), tanto vetor, presença da LVC e LVH foram notificados em 2008 e reportado em 2009 na cidade de São Borja, cidade que faz fronteira com Santo Tomé, na Província de Corrientes, Argentina (SOUZA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.* 2014).

O número de casos de LV nas macrorregiões sulistas aumentaram de área livre em um período de 2001 a 2006 (figura 5) para área com casos autóctones de caso LV humana e canina em 2007 a 2014 (REIS *et al.*, 2017).

Figura 5. Taxa de novos casos de leishmanioses visceral por 100,000 habitantes por município em um período de 2001-2006 e 2007-2014

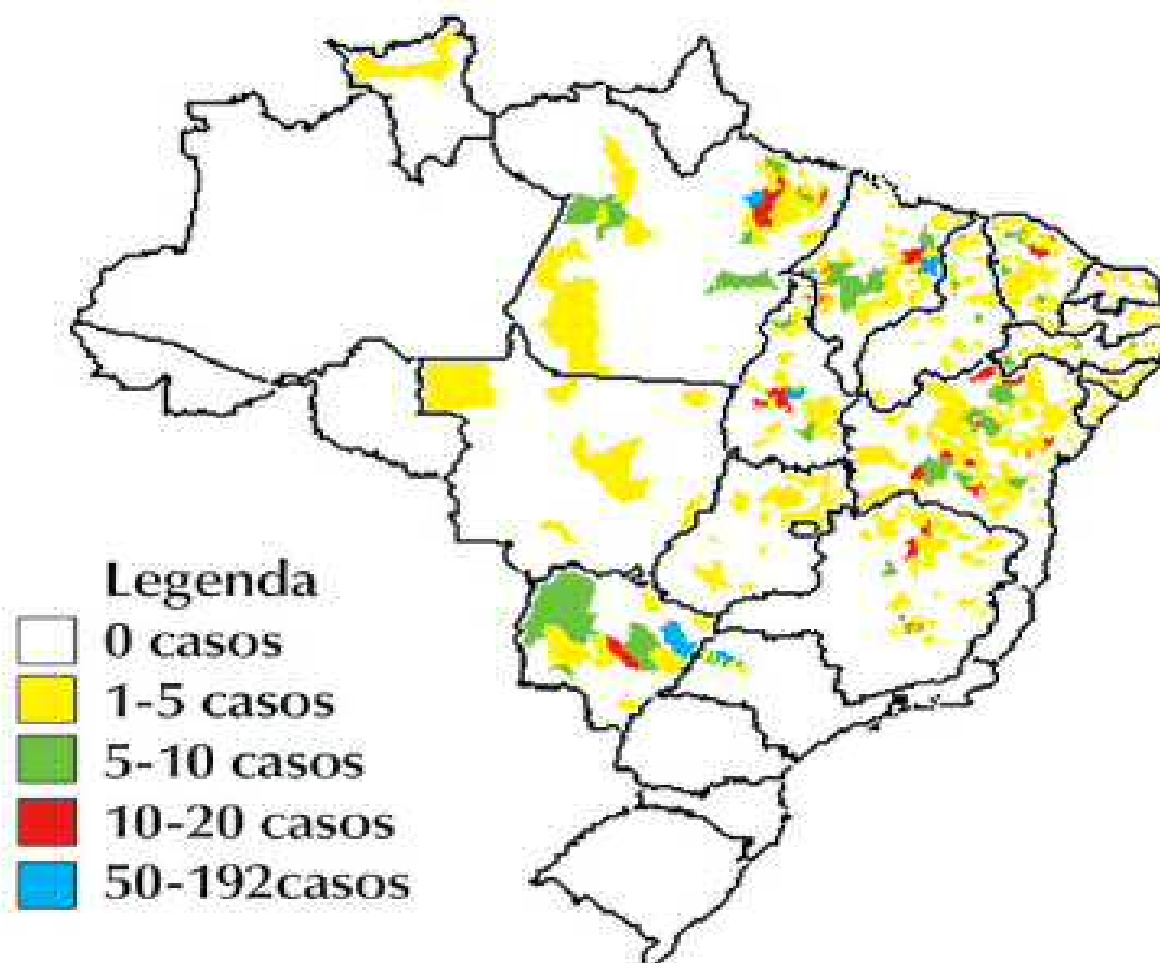


(●) States without vector, autochthonous canine and human VL records in literature; (▲) Rondônia: Silva, 2015²⁸ Paraná: Dias *et al.*, 2013²⁹ Santa Catarina: Figueiredo *et al.*, 2012²⁰; (✱) Amapá: Galardo *et al.*, 2013³¹ Rondônia: Gil *et al.*, 2003³⁰; (*) States with records of autochthonous human cases in SINAN.

Fonte: REIS *et al.* (2017).

Assim, a LVH está distribuída em 21 Unidades da Federação, atingindo as cinco regiões brasileiras; por esta razão, nota-se que ela apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados (GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – VOL3 – 2017). Os aspectos epidemiológicos da LVH no Brasil vêm sofrendo alterações. Inicialmente no Nordeste brasileiro (figura 6) a incidência da doença era associada à pobreza, à subnutrição humana e canina e à áreas rurais e/ou silvestres (SOCCOL *et al.*, 2009), entretanto, o vetor apresenta alta adaptação em diversos ambientes, facilitando a sua distribuição e colonização de ambientes heterogêneos, locais onde não havia a presença do vetor, passa a estar presente (FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; SALOMÓN *et al.*, 2015).

Figura 6. Distribuição de casos autóctones de Leishmaniose Visceral Humana Segundo município em 2002, Brasil



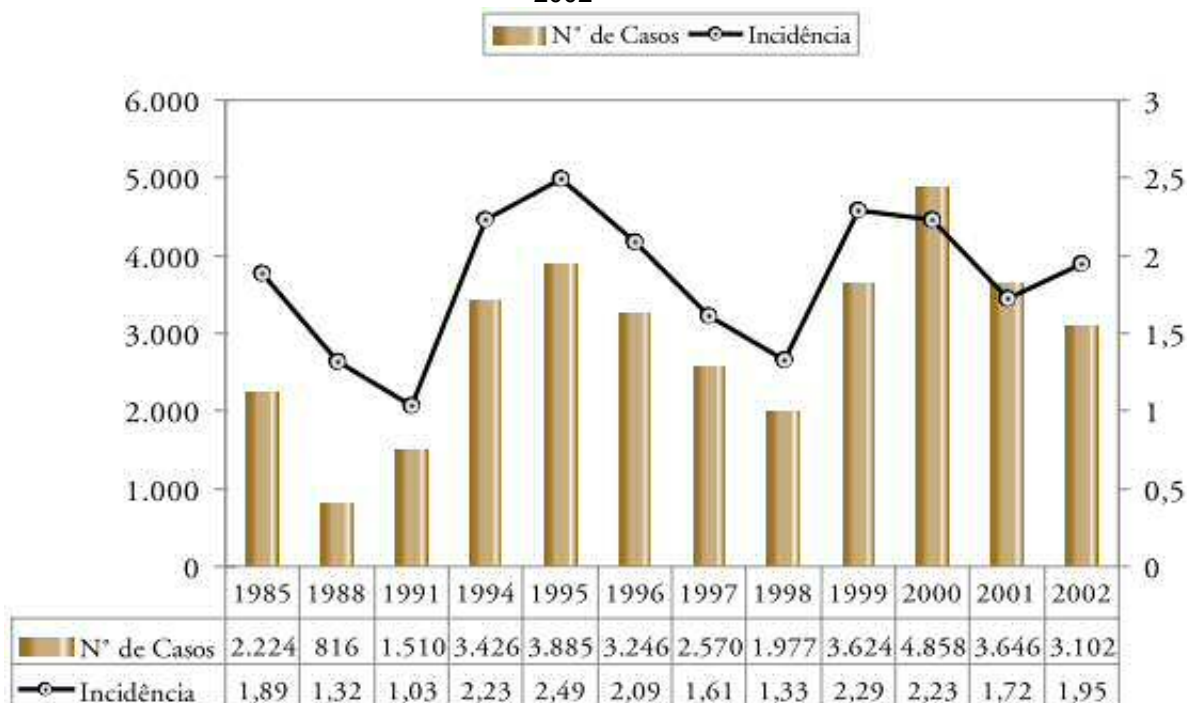
Fonte: MS, 2014.

Gradualmente, a LV espalha-se da área rural para as áreas periurbana e urbana, seguindo a migração das populações (SOCCOL *et al.*, 2017; MARTINS-MELO *et al.*, 2014). A adaptação do vetor (BATES *et al.*, 2015), transporte dos cães infectados por *L. infantum* (LIMA *et al.*, 2018), elevada densidade populacional humana e a falta de uma boa infraestrutura nas regiões tropicais em particular, tem efeito profundo sobre o potencial de transmissão de doenças (GUBLER, 1998). Dados podem ser observados, como na década de 1990, em que aproximadamente 90% dos casos notificados de LVH ocorreram na região Nordeste, e à medida que a doença se expande para as outras regiões, essa situação vem se modificando; em 2012, a região Nordeste foi responsável por 43,1% dos casos do país (GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – VOL3 – 2017).

Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LVH somaram 48.455 casos, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos dez anos, a média anual de

casos no País foi de 3.156 casos, e a incidência de dois casos/100.000 habitantes (figura 7).

Figura 7. Número de casos e coeficiente de incidência de leishmaniose visceral humana, Brasil – 1985 a 2002



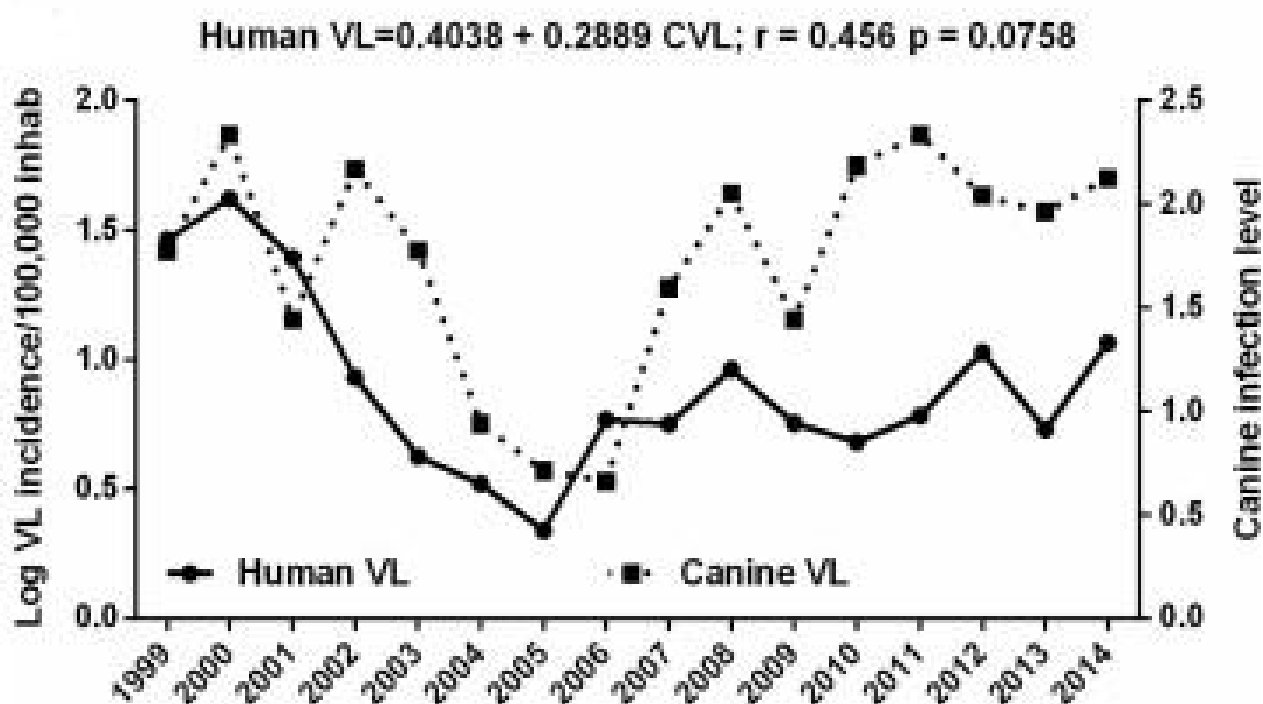
Fonte: MS, 2014.

FERNANDEZ (2013) descreve uma distribuição espacial dos vetores elaborados por QUINTANA *et al.* (2012) baseado em três escalas espaciais para os estudos e análises da abundância dos flebotomíneos e incidência de casos humanos - microescala (microfocal), mesoescala (localidade ou focus epidêmico) e macroescala (regional). A primeira escala refere-se a mudanças na vegetação em pequena escala, como características de moradia e peridomiciliar. A segunda escala refere-se aos efeitos do desmatamento e urbanização em nível local, onde é possível encontrar uma estrutura de metapopulação de vetores e fenômenos relacionados a surtos. A terceira escala refere-se à distribuição de tendências em larga escala (país) e à distribuição potencial de espécies nas eco-regiões (QUINTANA *et al.*, 2012).

A atual complexidade dos mecanismos de transmissão da LV urbana representa novos desafios e exige novas estratégias e abordagens para o seu controle. LE RUTTE *et al.* (2018) sugerem focar em: 1) aumentar a conscientização sobre a presença e o risco de LVC e LVH; 2) tomar medidas preventivas; 3) detectar e tratar casos de doença; e 4) monitorar e avaliar a infecção. Os programas de controle não devem considerar apenas

os fatores biológicos ligados ao ciclo de transmissão da doença, como o controle de reservatórios e vetores, mas também suas inter-relações sociais e os impactos no desenvolvimento econômico das nações afetadas (CONTI *et al.*, 2016). MIRET *et al.* (2011) atentaram em relação aos caninos errantes que constituem um problema global que envolve países de todos os graus de desenvolvimento econômico, e especialmente para os países pobres pois para LIMA *et al.* (2018), existe uma correlação positiva entre a incidência da LV humana com a LV canina (figura 8).

Figura 8. Correlação entre a incidência de LVH com LVC



Fonte: LIMA *et al.* (2018).

A distribuição espacial de um agente patogênico em uma área é importante para monitorar e controlar a doença; como a LV em cães geralmente precede casos humanos, usamos cães como ponto de referência para avaliar a distribuição espacial e os fatores de risco em uma sociedade (SOCCOL *et al.*, 2017). Identificar doenças que representam maior ameaça à saúde e ao bem-estar ajuda os formuladores de políticas a planejar intervenções, monitorar processos e avaliar o impacto e a eficácia das medidas de controle (BEZERRA *et al.*, 2018).

1.1.2. Diagnóstico

A Leishmaniose visceral canina pode apresentar um amplo espectro de sinais clínicos, desde animais aparentemente saudáveis, passando por oligossintomáticos, até estágios severos da doença sendo uma característica importante é a permanência da doença clinicamente inaparente por longos períodos. (GONTIJO & MELO, 2004). Para BANETH *et al.* (2008) e MANCIANTI *et al.* (1988), os cães são principais reservatórios domésticos em áreas urbanas, e alguns animais infectados podem desenvolver doença clínica evidente enquanto outros permanecem como portadores assintomáticos sem sinais clínicos. Segundo LANOTTE (1979 *apud* MANCIANTI *et al.*, 1988), os animais assintomáticos podem desenvolver quadros clínicos de infecções após alguns meses.

De acordo com LEITE *et al.* (2015), o cão pode ser classificado em 4 diferentes grupos em relação a sinais clínicos: (1) os cães não apresentam nenhum dos sinais clínicos; (2) cães com sinais clínicos grau I (SI) que incluem animais apresentando até dois sinais clínicos isolados geralmente causados por LVC e não houve relato de qualquer outra morbidade que pudesse justificar os sintomas; (3) cães com sinais clínicos grau II (SII) que apresentam três ou mais sinais clínicos típicos para LVC sem relato de qualquer outra morbidade; e (4) cães com sinais clínicos *(S*) mostrando pelo menos um sinal clínico relacionado à LVC que, no entanto, pode ter uma causa diferente, como outras queixas/morbididades relacionados com condições ambientais ou a disponibilidade de alimentos (Figura 9).

Figura 9. Cão assintomático e cão oligossintomático respectivamente



Fonte: JUNIOR, A. B., *et al.* (2015).

O diagnóstico laboratorial da LVC pode ser feito através dos métodos parasitológicos e sorológicos (LAURENTI, 2009), sendo que as metodologias adotadas

pelo país para o controle da LVC baseiam-se em métodos sorológicos que incluem o teste imunocromatográfico TR DPP®Bio-Manguinhos, que é usado como exame de triagem, e o teste ELISA indireto como exame confirmatório (BRASIL, 2006; JUNIOR *et al.*, 2015).

Segundo SANTIS *et al.* (2013), os métodos parasitológicos e sorológicos requerem implementação em condições especiais, como um laboratório estruturado e profissionais bem treinados, e com isto poderá levar um certo tempo para entregar melhores resultados. O teste de DPP, por outro lado, apresenta protocolo que não requer equipamentos especializados ou suprimentos extras, utilizando-se para tanto pequenas amostras sanguíneas (RIBEIRO *et al.*, 2019).

SILVA *et al.* (2011) citam algumas desvantagens dos testes sorológicos como a possibilidade de ocorrer reações cruzadas com outras zoonoses caninas. Segundo LEITE *et al.* (2015), os métodos sorológicos empregados na detecção da LVC apresentam baixa sensibilidade e podem subestimar o real resultado. JUNIOR *et al.* (2015) analisaram algumas literaturas indicativas de que o TR-DPP apresenta uma sensibilidade de 93 a 100% e especificidade de 92 a 100%; porém, alguns artigos mostraram que a sensibilidade do teste depende da situação clínica do animal, no caso, em cães assintomáticos a sensibilidade registrada em diferentes artigos publicados varia de 12 a 47%. Casos assintomáticos de LV são comuns em cães e humanos. Segundo um estudo realizado por MANCIANTI *et al.* (1986) na ilha de Elba situado na Itália, avaliou 175 cães positivados pelo teste parasitológico e/ou sorológico (IFAT – teste de imunofluorescência indireta), 35% eram assintomáticos. Estes casos, incluindo-se ainda cães soronegativos, podem ser positivos quando se utiliza o teste de PCR; a presença do parasita em cães assintomáticos com ausência de anticorpos indica que o animal tem a infecção, mas poderiam nunca ficar doentes (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

O kit LVC Dual-Path Platform (DDP®) (figura 10) utiliza reagentes para detectar anticorpos contra a proteína de fusão rK26 / rK39; pesquisas encontraram indicativos de que o kit provavelmente não é sensível o suficiente para detectar portadores caninos assintomáticos de *L. infantum*, mas pode ser útil para confirmar casos suspeitos clinicamente por causa de sua alta especificidade em cães sintomáticos (GRIMALDI Jr. G. *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2014).

GRIMALDI Jr. G. *et al.* (2012) realizou um trabalho com 190 animais, afim de comparar os níveis de anticorpos específicos para K26/K29 em diferentes grupos de cães (figura 11), sendo 60 animais assintomáticos positivos para LV, 60 animais sintomáticos

também positivos, 59 animais negativos e 11 animais apresentando reatividade cruzada e concluiu que animais assintomáticos apresentam baixos níveis de anticorpos específicos.

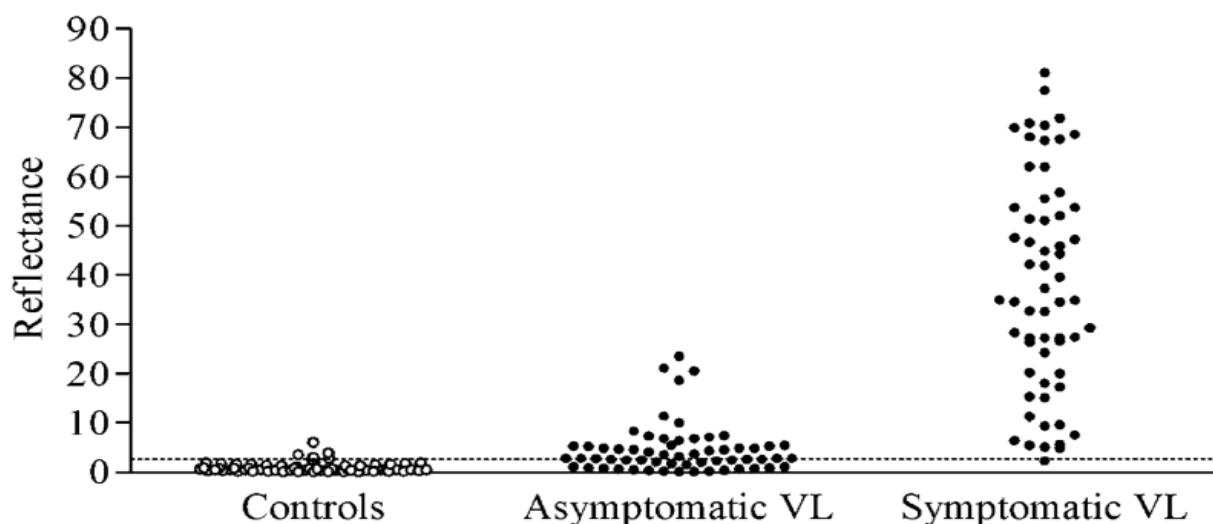
Figura 10. Teste rápido LVC DPP Bio-maguinhos®



Nota explicativa: a linha esquerda representa a banda de teste, indicando um resultado positivo.

Fonte: HIRSCHMANN *et al.* (2015).

Figura 11. Comparação dos níveis de anticorpos específicos para K26/K39 em diferentes grupos de cães utilizando leitor Dual-Path Platform (DPP)



Nota explicativa: São mostrados para soros de animais assintomáticos (n=60) e sintomáticos (n=60) *Leishmania infantum*-positivos (círculos pretos) e para animais controles (n=59) e de reatividade cruzada (n=11) (círculos abertos).

Fonte: GRIMALDI *et al.* (2012).

Portanto, o diagnóstico de LVC deve ser realizado usando uma abordagem integrada, considerando-se fatores como o local onde reside o animal, viagens realizadas, hábitos, exame clínico cuidadoso e análises laboratoriais (SANTIS *et al.*, 2013). Diferentes

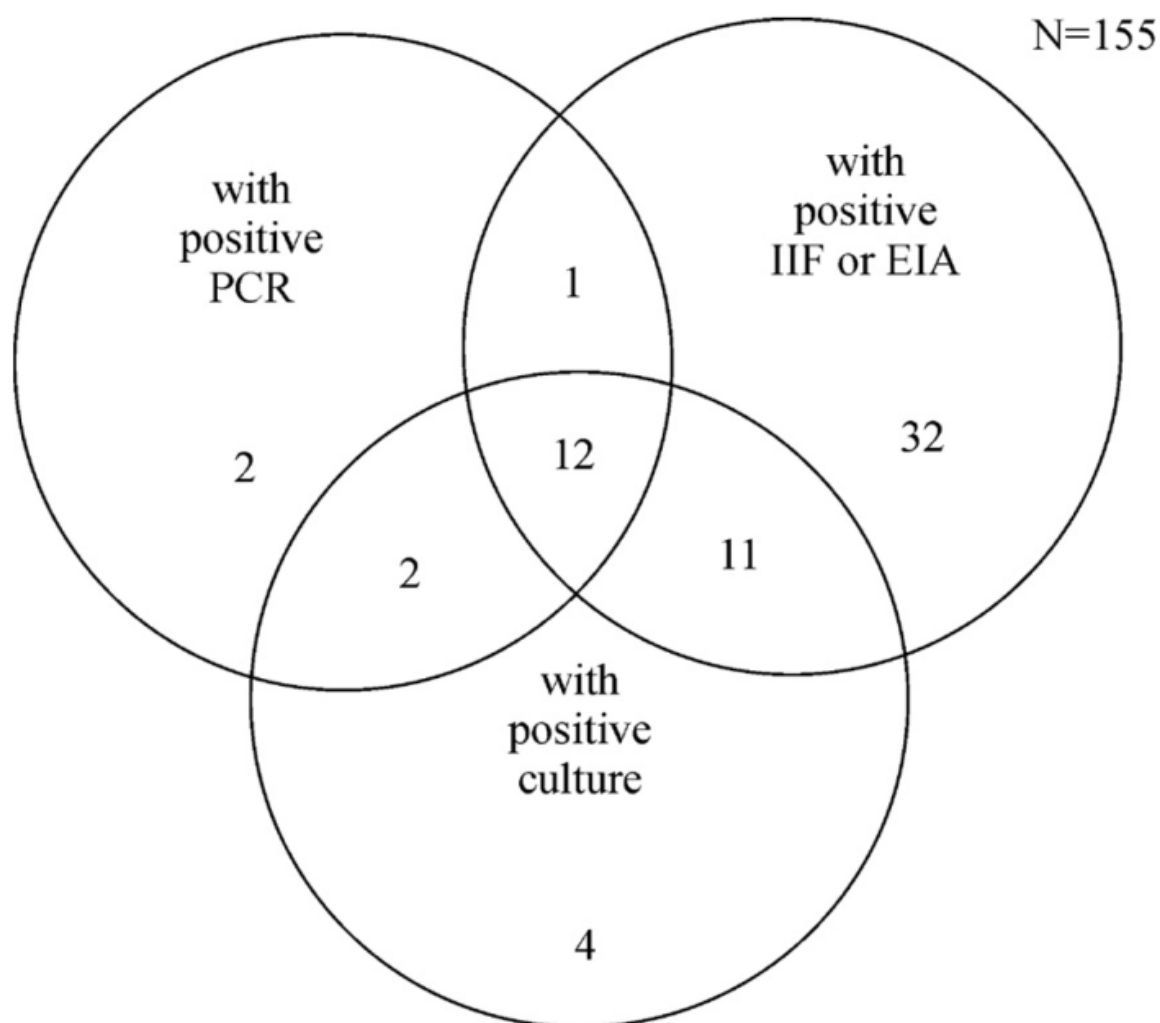
técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana e canina; entretanto, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (GONTIJO & MELO, 2004).

Os atuais métodos sorológicos de diagnóstico adotados pelo Ministério da Saúde no Brasil mostraram ter reatividade cruzada entre *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, sugerindo que essas metodologias para direcionar os reservatórios de LV podem estar superestimando a prevalência de *L. infantum* na sorologia de cães positivos, devido à detecção das outras espécies (PAZ *et al.*, 2018). Para ZANETTE *et al.* (2014) e RIBEIRO *et al.* (2019), os testes diagnósticos clínicos devem ser usados em associação com outros testes de diagnóstico e devem ser usados com cuidado durante a triagem para LVC em áreas endêmicas para erliquiose, babesiose, toxoplasmose e neosporose. ZANETTE *et al.* (2014) concluiu que os testes para LVC pode ter reações cruzadas com *Anaplasma spp.*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neosporacanium*, resultando em falso positivo para LV, bem como resultados falso-negativos em casos de reações duvidosas. SILVA *et al.* (2016) citam a sensibilidade do DPP® em valor de apenas 57.45%; este resultado é preocupante, pois com a tendência de aumento de prevalência observada nos últimos anos, e sendo a técnica de triagem utilizada pelo Ministério da Saúde para identificação dos animais positivos desde 2011, cerca de 42% (IC 95%: 0,28-0,57) dos cães permanecem no campo com resultado falso negativo.

De acordo com RIBEIRO *et al.* (2019) durante a vida de qualquer ser vivo é exposto a uma diversidade de parasitos de modo sequencial ou simultâneo, sendo rara a situação na qual há somente um parasita atuando num mesmo organismo hospedeiro.

Segundo um trabalho realizado por SILVA *et al.* (2011), dentre um *n* de 155 cães soroativos para DPP que foram eutanasiados na cidade de Rio de Janeiro (figura 12), 59% desses cães, que equivale a 91 cães, não apresentaram positividade em testes como: PCR (Polymerase Chain Reaction); IIF (Indirect Immuno Fluorescence) e EIA/ELISA (Enzyme Immuno Assay).

Figura 12. Resultados da combinação de teste parasitológico (cultura), sorológico (IIF/EIA) e molecular (PCR), 64 (41%) apresentaram positivities em uma ou mais performances



Nota explicativa: 91 (59%) cães soro ativos eutanasiados pelo programa de controle de leishmanioses deram negativos em todos os testes.

Fonte: SILVA *et al.* (2011).

De acordo com HIRSCHMANN *et al.* (2015) é necessário o desenvolvimento de ensaios sorológicos baseados em mais antígenos definidos e específicos para melhorar os métodos diagnósticos para as leishmanioses.

Em relação a metodologias parasitológicas que envolvem a punção de órgãos, apesar de fornecerem a certeza da infecção, por possibilitarem a visualização do parasito, são bastantes invasivos (FARIA & ANDRADE, 2012). Em um trabalho realizado por SOUSA *et al.* (2014), em um total de 10 cães, 3 deram positivos para DDP mas foram negativos no exame parasitológico em tecidos específicos como linfonodo e medula óssea, que posteriormente foi confirmado com novas coletas.

Levando-se em consideração que os testes disponíveis para diagnóstico da LVC e os métodos convencionais que incluem avaliação clínica, como análise hematológica,

histopatológica e bioquímica, a técnica molecular baseada na metodologia da PCR quantitativa (qPCR) tem importante valor para detecção, diferenciação e quantificação das espécies de *Leishmania*, permitindo desta forma a detecção de DNA, de forma independente do estágio clínico (COSTA-VAL *et al.*, 2007; MANNA *et al.*, 2009).

A pesquisa de DNA de parasitas do gênero *Leishmania* através da técnica de PCR é utilizada amplamente para verificação da presença ou ausência do DNA parasitário, apresentando a vantagem de diferenciar as espécies de *Leishmania*. Neste sentido, faz-se necessário utilizar primers marcadores específicos para cada espécie (JUNIOR *et al.*, 2015).

A primeira demonstração da reação em cadeia da polimerase ocorrida em 1983 é considerada uma das maiores conquistas científicas do século XX, sendo este processo revolucionário para muitas áreas da ciência, devido a sua capacidade de multiplicar várias cópias de sequências de DNA, usando DNA diretamente ou DNA complementar após a transcrição reversa do RNA (AHRBERG & NEUZIL, 2015).

Essa vertente molecular, conduzida, sobretudo, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), é baseada na amplificação de oligonucleotídeos que formam uma sequência conhecida do parasita. Este teste pode ser realizado em diferentes amostras, tais como aspirados de medula, aspirados de linfonodos, sangue, urina e biópsias de pele. Em amostras de sangue total, apesar da vantagem de ter uma coleta menos invasiva, a sensibilidade mostra-se inferior àquela obtida com outros tecidos (FARIA & ANDRADE, 2012).

SOCCOL *et al.* (2017) pontuam que as técnicas moleculares são mais eficientes para detectar infecções por *L. infantum*, mesmo nos estágios iniciais, enquanto as técnicas sorológicas são mais eficientes nos estágios avançados, quando a produção de IgG está estabelecida e pode ser detectada mais facilmente.

LEITE *et al.* (2015) realizaram um trabalho comparativo entre as técnicas PCR real time de amostras obtidas do swab conjuntival utilizando o marcador *SYBR Green*TM e o teste sorológico de ELISA; em 1350 cães, 369 (27,3%) deram positivos para PCR real time e 126 (9,3%) deram positivos para ELISA; dos 369 positivos para PCR, 105 foram positivos para ELISA; era esperado o achado de um grande número de cães que apresentaram resultados negativos nos ensaios sorológicos, mas foram positivos para a PCR em tempo real, tendo em vista a maior sensibilidade do ensaio molecular (tabela 2).

Tabela 2. Comparativa entre ELISA e PCR real time em 1350 (n) cães avaliados, 369 positivados por PCR real time e 126 foram positivos por ELISA

Diagnosis			
CS real-time PCR	ELISA		
	(+) <i>n</i> (%)	(-) <i>n</i> (%)	Total <i>n</i> (%)
(+)	105 (7.8)	264 (19.6)	369 (27.3)
(-)	21 (1.6)	960 (71.1)	981 (72.7)
Total	126 (9.3)	1224 (90.7)	1350 (100)

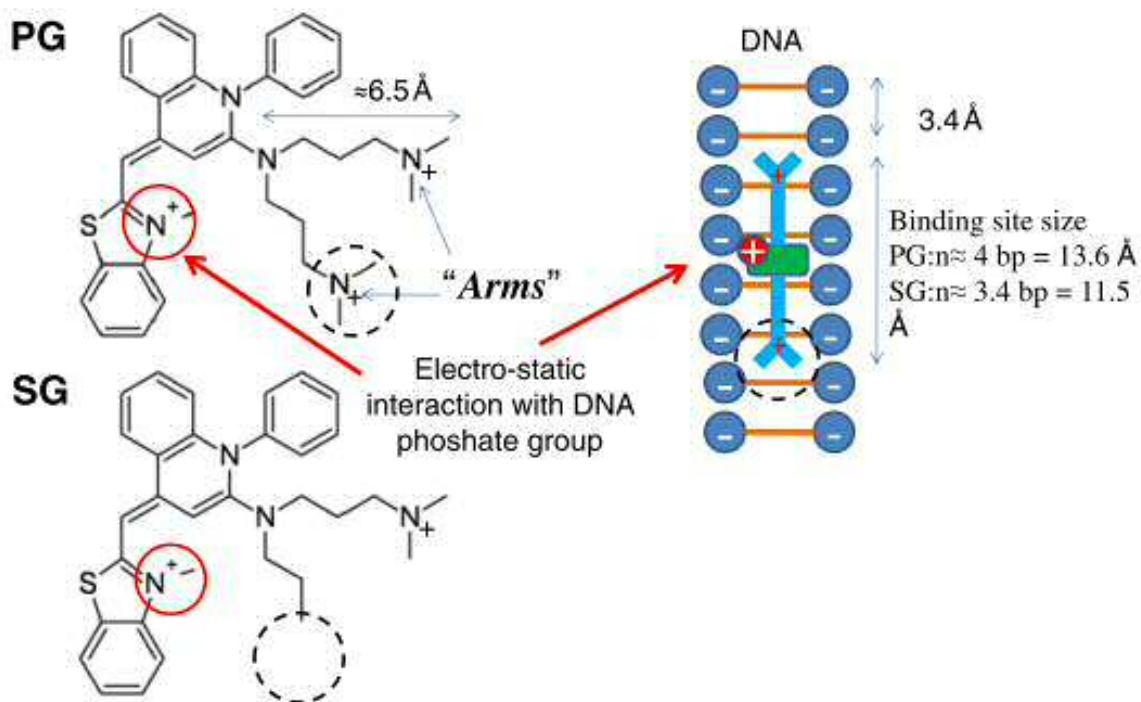
+ positive, – negative, *n* number of animals

Nota explicativa: Dos 369 positivados por PCR, 105 foram positivos por ELISA demonstrando maior sensibilidade no ensaio molecular.

Fonte: LEITE *et al.* (2015).

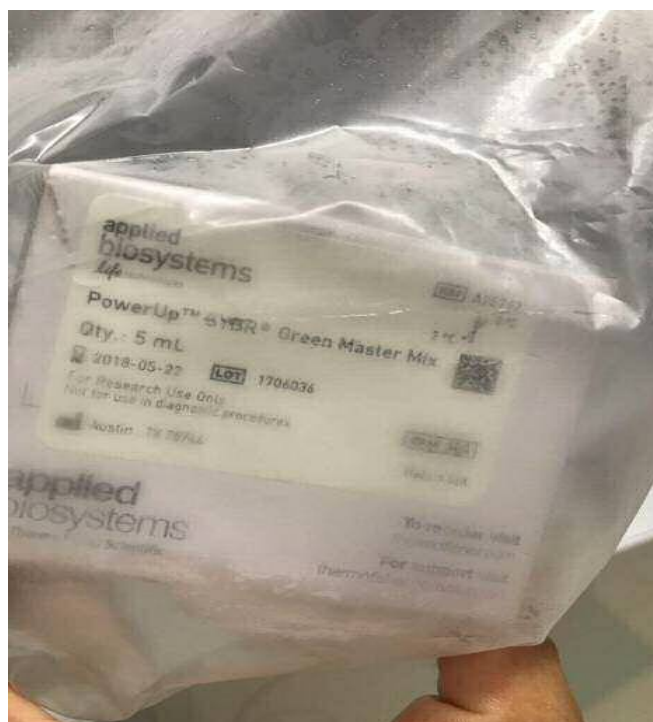
O fluoróforo (figura 13) é um agente intercalante do DNA, em um sistema utilizado para detecção de RNA ou DNA na metodologia de PCR em tempo real. Esse método envolve a incorporação do corante livre, *SYBR Green*TM, a uma molécula de DNA, recém-sintetizada que apresente. A detecção é monitorada através da intensidade de fluorescência ao longo dos ciclos. Durante os primeiros ciclos da PCR, o sinal de fluorescência emitido pelo *SYBR Green*TM (figura 14), é fraco para ser detectado, no entanto, durante a fase exponencial o sinal aumenta proporcionalmente à quantidade de DNA sintetizado pela PCR (PONCHEL *et al.*, 2003). A positividade da presença do trecho analisado será comparada com a referência passiva ou *background* dada pela ROX (PAIVA, 2008). Segundo DRAGAN *et al.* (2012), a espectrofotometria de fluorescência é uma técnica poderosa na utilização para analisar a dinâmica das interações e visualizações das macromoléculas e complexos macromoleculares (figura 13), estes fluoróforos específicos apresentam efetivas interatividades com ácidos nucleicos (DNA, RNA) aumentando significamente o brilho quando forma o complexo, os tornando úteis em vários ensaios de detecção de DNA, na pesquisa biofísica de complexos de DNA-proteína e na coloração de cromossomos.

Figura 13. Interação dos fluoróforos com os pares de bases de DNA



Fonte: DRAGAN *et al.* (2012).

Figura 14. Fluoróforos – Kit PowerUp™ – SYBR® Green Master Mix



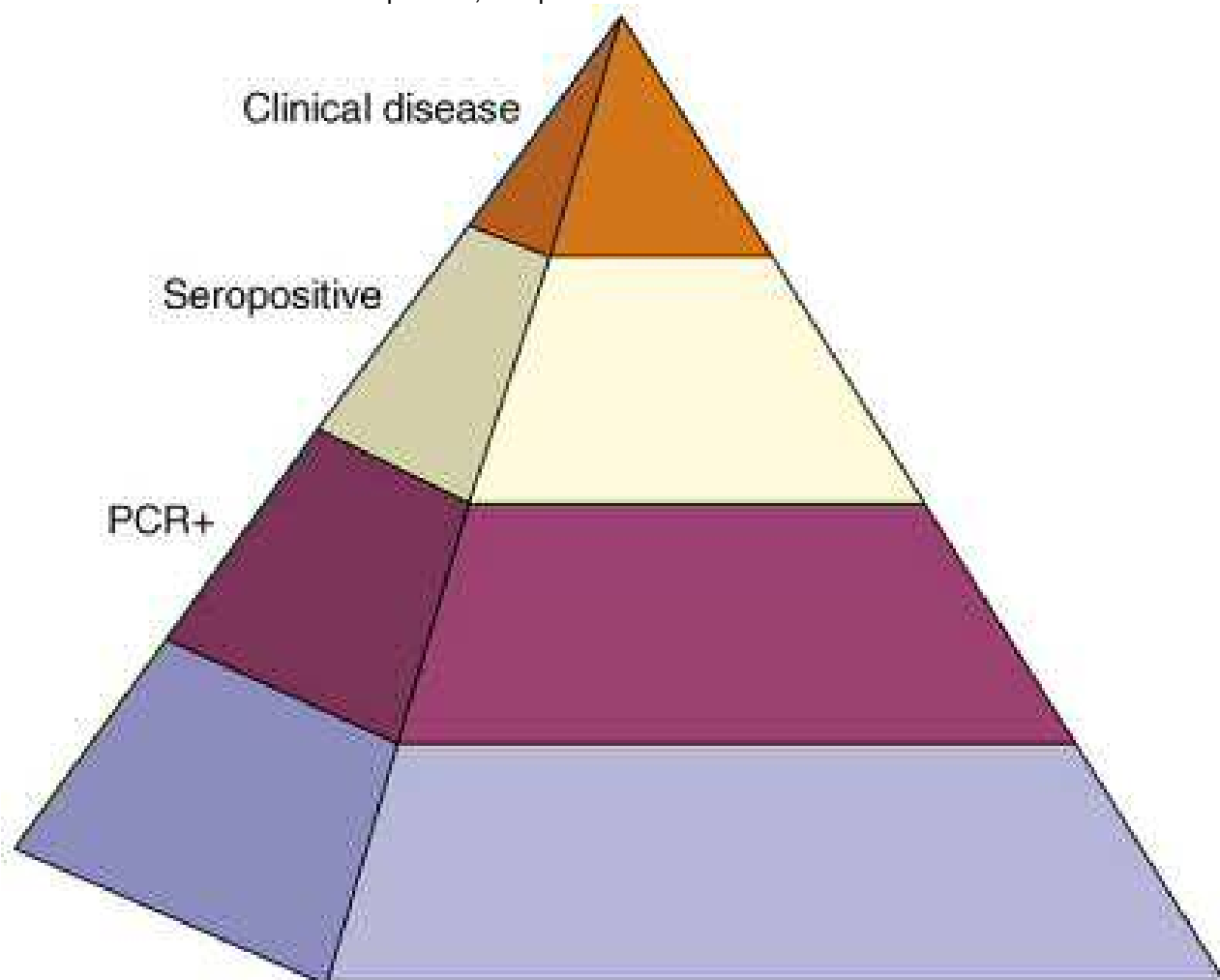
Fonte: dos autores (2022).

CARVALHO FERREIRA *et al.* (2014) realizaram um trabalho comparativo entre o PCR em tempo real com o PCR tradicional em diversas amostras biológicas, obtendo-se melhor resultado com a primeira metodologia: sangue (90% - 27/30), pele (93,3% - 28/30),

medula óssea (100% - 30/30) e *swab* conjuntival (96,7% - (29/30)), obtendo-se uma taxa positiva acima de 90% em dois grupos de cães que foram divididos em sintomáticos e assintomáticos, utilizando-se o marcador SYBR GREEN.

BANETH *et al.* (2008) elaborou uma pirâmide demonstrando as análises clínicas e laboratoriais: o pico da pirâmide (laranja) consiste em um subconjunto relativamente pequeno de cães positivos mostrando sinais clínicos da doença; cães soropositivos sem sinais de doença representam um segundo subconjunto (bege). Um terceiro subconjunto inclui PCR mais assintomáticos, mas com cães soronegativos infectados (roxo) e um quarto subconjunto inclui cães que são soronegativos e não abrigam parasitas (azul) (figura 15).

Figura 15. Pirâmide demonstrando as análises clínicas e laboratoriais entre cães soronegativos, PCR positivo, soropositivo e cães sintomáticos



Fonte: BANETH *et al.* (2008).

A PCR provou ser estatisticamente melhor para detecção de DNA de *Leishmania* em animais sintomáticos em comparação com oligossintomáticos ($P < 0,001$) e

assintomáticos ($P < 0,001$), com probabilidade 4,85 (2,17–11,03) e 10,43 (4,7–23,53) vezes maior, respectivamente; quando comparamos os resultados da PCR em diferentes amostras clínicas (sangue, medula óssea, aspirados de linfonodos e fragmentos de tecidos) foi observado que não houve diferença estatística entre cães assintomáticos e sintomáticos, entretanto, os linfonodos apresentaram melhores resultados (ALMEIDA *et al.*, 2013).

CARVALHO FERREIRA *et al.*, (2013) utilizando o processo de PCR em tempo real em amostras como sangue, fragmentos de tecidos e medula óssea, apresentaram achados de 96,7% de positividade na detecção de *L. infantum* em cães sem sinais clínicos e 100% para cães sintomáticos. Quando os testes parasitológicos e sorológicos não foram capazes de detectar cães positivos para LVC. (ASSIS *et al.* 2010).

1.1.3. Variáveis Socioambientais e Climáticas

No estado do Paraná, a cidade está situada geograficamente no terceiro planalto, onde apresenta acentuado declínio no sentido leste para oeste, caracterizado por grandes rios limítrofes e lineamentos orográficos; a vegetação predominante é do tipo estacional semidecidual (SILVA *et al.*, 2008).

Para CAMARGO (1998 *apud* BRAZ, 2000) Foz do Iguaçu encontra-se em uma região de temperatura úmida de altitudes médias, destacando por verões quentes, abafados e invernos frescos e secos com chuvas de verão contínuas e temperatura varia de 18°C a 22°C. MONTEIRO (1962) cita que as variações climáticas na região estão ligadas à influência de fatores geográficos locais, como presença de vegetação, lagos, florestas e altitude, no entanto, não gera condições climáticas discrepantes.

Ao examinar as relações entre o clima regional e os climas locais, SORRE (*apud* MONTEIRO, 1962) argumenta que o clima regional é um todo que não é constituído pela soma de suas parcelas, ou seja, do conjunto dos climas locais.

Foz do Iguaçu apresenta vários espaços urbanos que geram tensões relativas entre a sociedade e natureza, apresentando degradações dos cursos d'água e áreas baixas susceptíveis a inundações por consequências hidrometeorológicas que geralmente são ocupadas por grupos marginalizados ou com baixo poder aquisitivo (BORTOLUZZI, 2022). Segundo CARNEIRO (2016), a cidade é uma região transfronteiriça composta por diversas etnias e culturas, índios guaranis, japoneses, chineses, indianos, árabes e as misturas que vieram com eles, os brasiguaios e brasentinos. A região apresenta uma

grande diferencial na oferta turística, sendo o principal atrativo as Cataratas do Iguaçu, envolto pelo Parque Nacional do Iguaçu, uma das mais importantes Unidades de Conservação do Mundo e declarados pelo Unesco como Patrimônio Natural da Humanidade (CURY & FRAGA, 2012).

Em relação ao ciclo econômico, a cidade passou por diversas fases de desenvolvimento, iniciando com a extração de madeira e cultivo como qualquer cidade interiorana, passando à sua segunda fase de crescimento com a construção da Usina Hidrelétrica de Itaipu com a vinda dos barrageiros; a terceira fase consiste no ciclo da exportação e turismo de compras envolvendo Ciudad de Leste – PY e por fim, a quarta fase está relacionado com a expansão do comércio, turismo e eventos (GLUCK 2018).

Para GALVÃO *et al.*, (20014), a imagem turística não é a mesma imagem da cidade construída por seus moradores pois os efeitos econômicos, sociais, culturais e ambientais em cidades turísticas podem gerar resultados nem sempre dividido igualmente entre os envolvidos, pois produz desigualdades na distribuição dos benefícios e dos custos. Em relação a população, a sociedade é composta por vários segmentos sociais, sendo a população de poder aquisitivo menor ou a população marginalizada situam-se nas regiões periféricas da cidade ou em áreas de baixas altitudes, geralmente próximos aos rios ou córregos (RIBEIRO, 2015). Para LIMBERGER (2007) é necessário analisar a dinâmica da circulação regional e sua interação com os elementos geocológicos para compreender as sucessões e as circulações dos tipos de estados climáticos.

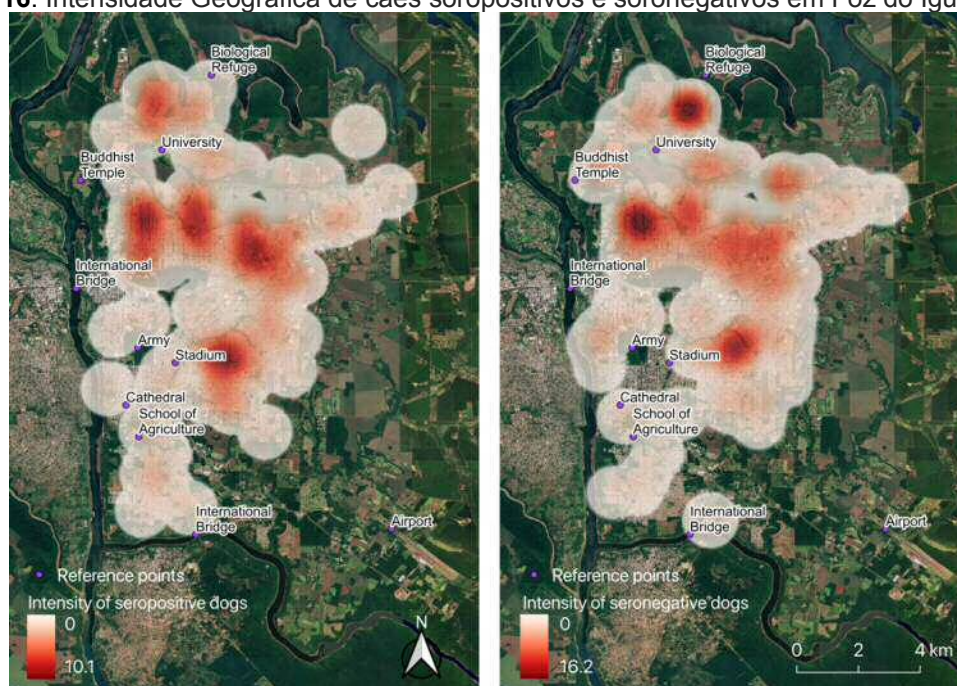
Segundo AFONSO (2013), os fatores socioambientais influenciam nas questões sanitárias que passa ser um agregado a ecoepidemiologia das leishmanioses. Na visão de GALVÃO *et al.* (2014), a percepção ambiental é diferente e varia entre os indivíduos conforme a renda, o sexo, a idade, o grau de escolaridade, as crenças, os mitos e os valores. Assim, BARCELLOS (*apud* AFONSO, 2013) “define a doença como manifestação do indivíduo e a saúde a manifestação do lugar, pois os lugares e seus diversos contextos sociais, dentro de uma cidade ou região, são resultados de uma acumulação de situações históricas, ambientais, sociais, que promovem condições particulares para a produção de doenças”.

Conforme revisado por Harhay *et al.*, (2011), o controle de surtos de leishmaniose humana passa pela necessidade de reduzir a população de canídeos, com foco nos cães domésticos, e na utilização de pesticidas para o díptero. Esse controle pode ser alcançado pelo sacrifício dos animais infectados e pela castração da população de cães; no entanto, medidas como o sacrifício dos cães, tem um grande impacto ético e social

negativo e geralmente não são executadas, a não ser que casos de leishmaniose visceral humana sejam detectados. De acordo com a Nota Técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA, o proprietário que não aceita o processo de eutanásia do cão soropositivo, o proprietário deve optar com o tratamento, arcando com o ônus e responsabilidade (PARANÁ, 2020).

Em relação ao controle, coleiras impregnadas com cipermetrina são repelentes efetivos contra os vetores da CNV e são capazes de quebrar o ciclo de transmissão, porém, essa estratégia pode não funcionar em cães de rua; além disso, para algumas faixas de populações, pode ter um custo bastante elevado. Por estes motivos, ações orquestradas pelos governos são de grande importância. Entre essas ações pode-se incluir planos de educação e conscientização da população de áreas de risco, para a tomada de medidas para evitar a proliferação do vetor em quintais, jardins e em casas vizinhas, além do fornecimento de subsídios à população carente para a aquisição de coleiras repelentes. Em uma análise espacial de área de prevalência de cães soropositivos e negativos, não foram identificadas áreas de prevalência espacial na região avaliada. Observando os mapas de intensidade de distribuição é possível visualizar que houve animais soropositivos praticamente nas mesmas áreas onde houve negativos. Estas áreas são centrais e próxima ao estádio e também se caracterizam por alta densidade de animais (figura 16).

Figura 16. Intensidade Geográfica de cães soropositivos e soronegativos em Foz do Iguaçu – PR



Nota explicativa: Garmin™ GPSmap - QGIS™ software, version 3.6.3.

Fonte: dos autores (2022).

2. JUSTIFICATIVA

O diagnóstico assertivo da leishmaniose visceral canina no Brasil é um passo importante para o controle dessa zoonose. No país, o teste rápido imunocromatográfico (Dual Path Platform – DPP®) foi implementado como uma avaliação de triagem para LVC, sendo positivado na triagem, a amostra passa para o teste confirmatório, utilizando o teste de ELISA (Ministério da Saúde, 2011).

No contexto da profilaxia da leishmaniose visceral, o diagnóstico rápido e preciso de cães infectados é fundamental para o controle, no entanto, o teste sorológico não é suficiente como critério para a eliminação de cães infectados pois as técnicas sorológicas convencionais são limitadas pela reatividade cruzada com outras doenças parasitárias e podem apresentar baixa sensibilidade em animais oligossintomáticos ou assintomáticos. Fatores socioambientais como: presença de terreno baldio; presença de outros animais da mesma espécie ou não; acúmulo de matéria orgânica; presença de vegetação; condições climáticas; grau de escolaridade do tutor; e entre outros podem ser fatores preditoras ou confundidoras que devem ser considerados para estabelecer possíveis vínculos que possam favorecer o estabelecimento do vetor.

A aplicação da metodologia da biologia molecular pode ser vantajosa principalmente para o estágio inicial da doença ou em animais assintomáticos que não produziram uma resposta imune. Segundo TELES *et al.* (2012), o processo de análise por PCR é mais automatizado e não produz dados como falso-positivo e permite análise de um grande número de animais. Além disto, o processo molecular dispensa uma segunda análise confirmativa.

Assim, as análises das condições socioambientais e o diagnóstico correto de leishmaniose visceral canina é um desafio, e testes de diagnóstico confiáveis são essenciais para prevenir a transmissão da doença ou abate desnecessário de cães e o uso do PCR em tempo real aparentemente apresenta vantagem na análise dos resultados, pois possui alta sensibilidade e dessa maneira aparenta ser uma boa escolha para programa de controle de LVC.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- validar o teste de identificação via técnica de biologia molecular (PCR em tempo real) de *L. Infantum* em amostras de cães positivos e negativos para esta parasitose utilizando amostra de sangue total em comparação ao teste sorológico convencional com dupla confirmação. Será ao mesmo tempo obtido um panorama epidemiológico atualizado da LV em cães na cidade de Foz do Iguaçu.

3.2. Objetivos específicos

- validar o protocolo de extração de DNA das amostras de sangue total e a técnica de PCR para identificação de *L. infantum* em amostras de sangue total;
- comparar os testes padrões realizados (teste rápido e ELISA) com a utilização da ferramenta da biologia molecular (PCR em tempo real);
- verificar a sensibilidade/especificidade em sangue total;
- levantar um perfil socioambiental do tutor e do cão para a verificação de possíveis correlações que favorecem ou não, a zoonose;
- determinar um perfil epidemiológico da LV em cães na região de Foz do Iguaçu, coletados de animais levados por proprietários ao serviço de diagnóstico do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município (demanda espontânea); e
- analisar as variáveis socioambientais e climáticas relacionadas com a ocorrência de Leishmaniose visceral canina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras biológicas

A validação das técnicas biomoleculares foi realizada em amostras de sangue total obtidas de animais confirmadamente positivos e negativos para a presença de *L. infantum* pelo Centro de Medicina Tropical (CMT – ANEXO 1) da Tríplice Fronteira em Foz do Iguaçu – PR. Tal confirmação prévia à utilização das técnicas de biologia molecular, foram feitas por exame de triagem sorológica através do kit LVC Dual-Path Platform (DDP® Bio-Manguinhos) realizado pelo Centro de Controle de Zoonoses do município (CCZ) e o teste ELISA indireto como teste confirmatório realizado pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN) situado em Curitiba – Paraná.

As amostras coletadas e separadas para análises moleculares pelo CCZ foram armazenadas a -20°C em um período temporário. Sendo transferidos para um armazenamento definitivo em ultrafreezer (-86°C).

4.2. Extração de DNA Genômico

O protocolo de extração de DNA genômico (GE Healthcare /EUA) consistiu em etapas subsequentes de processamento, utilizando-se aproximadamente de 50 a 300 µL de sangue total.

Na primeira etapa realizou-se a lise de células sanguíneas, em que as amostras foram adicionadas 20 µL de *Proteinase K* e 400 µL de *Lysis buffer type 10* ao tubo misturando a solução no vortex por 15 segundos. A solução inicial foi incubada na temperatura ambiente por 10 minutos com vortex intermitente para auxiliar a lise. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada para trazer as estruturas celulares para o fundo do tubo.

Posteriormente, para a ligação do DNA genômico, a amostra lisada foi transferida para uma mini-coluna no tubo de coleta e colocada em um microcentrífuga durante 1 minuto à 20.000 rpm. O fluido filtrado foi descartado do tubo coletor e novamente colocado na coluna.

Em uma terceira etapa, realizou-se a lavagem da coluna, adicionando-se 500 µL do *Lysis buffer type 10*, centrifugando-se durante 1 minuto à 20000 rpm para assegurar a completa lise celular e desnaturação de quaisquer proteínas residuais. Descartou-se o fluido e a coluna retornou para dentro do tubo coletor.

Em etapa subsequente, realizou-se o procedimento de lavagem e secagem, adicionando-se 500 μ L de *Wash buffer type 6* na coluna. A solução passou por centrifugação por 3 minutos e o fluido foi descartado do tubo coletor.

Por fim, realizou-se a eluição, adicionando-se 200 μ L de *Elution buffer type 5* preaquecido a 70°. C diretamente no centro da coluna. O processo passa por uma incubação de 1 minuto na temperatura ambiente e logo por uma centrifugação de 20000 rpm durante 1 minuto para recuperar o DNA genômico. A amostra com DNA genômico purificado foi armazenada a – 20°C (Figura 17).

Figura 17. Fotos tiradas do Centro de Medicina Tropical da Tríplice Fronteira – Foz do Iguaçu – PR



Fonte: dos autores (2022).

4.3. PCR em Tempo Real

Foram utilizados os seguintes *primers* (Invitrogen) *forwards* e *reverse*, para *Leishmania Infantum*: Lcg-DNApolFw: GC-GCC-TCA-CCA-CGA-TTG e Lcg-DNApolRer: AGC-GGG-CAC-CGA-AGA GA.

As reações foram realizadas em aparelho QuantStudio 7 Flex (figura 18) de acordo com o seguinte protocolo: 50°C por 2 min para a ativação da UDG, 95°C por 2 minutos para ação do DNA polimerase, 95°C por 15 segundos para o processo de desnaturação e 60°C por 1 minuto para o processo de anelamento/extensão. A condição da curva de dissociação (melt curve stage) compreende-se em três estágios: a 95°C por 15 segundos (1.6°C/segundo); 60°C por 1 minuto (1.6°C/segundo) e 95°C por 15 segundos (0.15°C/segundo) totalizando 40 ciclos.

Figura 18. *QuantStudio 7 Flex - Appliedbiosystems* - Centro de Medicina Tropical da Tríplice Fronteira – Foz do Iguauçu – PR



Fonte: dos autores (2022).

4.4. Levantamento Socioambiental

Os tutores que levaram seus cães para o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município responderam a um questionário socioambiental com diversas variáveis, tais como: endereço da residência, grau de escolaridade, número de pessoas que moram na residência, características ambientais onde o cão permanece na maior parte do tempo, números de cães na casa, procedência do animal, presença de outros animais não caninos, presença de árvores frutíferas, presença de terrenos baldios nas vizinhanças, presença de material orgânico (resíduos) expostos, uso de repelente contra o mosquito transmissor (mosquito palha), vacinação e conhecimento do vetor transmissor da Leishmaniose (Apêndice 1).

Além da pesquisa socioambiental, o próprio CCZ realizou um levantamento sobre os dados caninos como: procedência do cão, raça, massa corporal e sinais clínicos de doenças (Anexo 2).

Todos os tutores assinaram um termo de consentimento de uso de amostras e de informações para a pesquisa realizada (ANEXO 3).

4.5. População Canina Avaliada e Estatística

Amostras de sangue total foram obtidas a partir do serviço denominado como demanda espontânea, oferecido pelo CCZ do município a proprietários de cães de todas as regiões que levam seus animais espontaneamente para coleta e conseqüentemente, para a realização do exame sorológico.

Foram avaliados 396 cães entre o período de novembro de 2018 a maio de 2019. Todos os cães que apresentaram sorologia positiva ou negativa foram avaliados a partir da técnica de PCR em tempo real.

4.5.1. Caracterização da amostra

A caracterização da amostra foi realizada avaliando-se, separadamente, as associações entre as características do ambiente, dos proprietários e dos animais, por meio do teste estatístico do Qui-quadrado para Aderência, assumindo-se um nível de significância de 0,05.

4.5.2. Avaliação de concordância entre testes

A avaliação de concordância entre os testes rápido e PCR-RT foi realizado por meio do Coeficiente de Concordância de Cohen Kappa, o qual é considerado como uma medida de concordância inter-observador que permite avaliar se a concordância é dada ao acaso, e qual o grau dessa concordância.

4.5.3. Regressão logística binária

Para as variáveis qualitativas (fatores) foi realizado o teste de Qui-quadrado para Independência, analisando-se a associação de tais variáveis com os resultados dos testes sorológico rápido e PCR em tempo real (nível de significância equivalente a 0,05). Em seguida, para definir os fatores associados aos resultados dos exames, todas as variáveis que apresentaram associação com os resultados dos testes (positivo x negativo), com probabilidade menor ou igual a 0,20 ($p < 0,20$), foram utilizadas para o ajuste do modelo matemático, aplicando-se o método de regressão logística binária.

Para a realização da regressão logística binária, algumas etapas foram cumpridas, sendo elas:

1. seleção das variáveis preditoras do modelo, usando-se o critério de $p < 0,10$ da razão de chance (*odds ratio*) ser estatisticamente equivalente a 1;
2. obtenção de um modelo com número reduzido de variáveis selecionadas a partir da aplicação do critério de $p < 0,05$ da razão de chance (*odds ratio*) ajustada ser estatisticamente equivalente a 1;
3. obtenção de um modelo final após teste para todas as iterações múltiplas possíveis, usando a maximização da função de Wald;
4. verificação do ajuste dos modelos utilizando a estatística de *Hosmer & Lemeshow*.

Uma vez decidido o modelo final de regressão logística, foram calculados, para cada um dos objetivos citados, as probabilidades a partir da fórmula $Pr = 1 / [1 + e^{-(\alpha + \sum (\beta_i x_i))}]$, sendo α a constante do modelo.

Foi ainda construída uma curva ROC (*receiver operating characteristic*) para o modelo, com a finalidade de avaliar a habilidade do modelo criado em representar a realidade. Nesta curva foram representados os valores de sensibilidade e de especificidade do modelo ajustado.

4.5.4. Distribuição potencial de ocorrência de casos

As localizações geográficas foram obtidas usando equipamento GarminTM GPSmap, marcando cada família como um local diferente. Assim, os cães residentes no mesmo domicílio foram registrados no mesmo ponto geográfico. Os modelos para identificar localidades adequadas ambientalmente para o desenvolvimento do vetor da Leishmaniose e, portanto, determinar locais com maior potencialidade de ocorrência de casos foram baseados em modelos de nicho ecológico e a distribuição de espécies ("*Ecological niche modeling*" – ENM, Peterson *et al.* 2011 e "*Species distribution modeling*" – SDM, Guisan & Rahbek, 2011).

Foram construídos modelos para as seguintes situações: i) ocorrências de casos identificados pelo Teste Rápido e validados com teste ELISA (n = 153); ii) ocorrências de casos identificados com o teste de PCR em tempo real (n = 98). Apenas um caso foi considerado para cada célula (pixel) da grade que continha informações ambientais, excluindo-se as coordenadas duplicadas, resultando, portanto, em: Teste rápido/ELISA - n = 66; PCR - n = 52.

Foram usadas variáveis bioclimáticas da base de dados *WorldClim* v.2 (quadro 1), devidamente sumarizadas por meio da Análise de Componentes Principais (PCA). Esses dados são grides (*raster*) no formato GeoTiff, com sistema de coordenadas geográficas ("lat / long"), Datum WGS-84, e resolução espacial de 30 arcsegundos (~ 1km²).

Quadro 1. Descrição das variáveis biogeoclimáticas obtidas pela base de dados do *Worldclim*

Códigos	Descrições
BIO01	Temperatura média anual
BIO02	Varição da média diurna (média por mês (temp max - temp min))
BIO03	Isotermalidade (BIO02/BIO07) (* 100)
BIO04	Sazonalidade da temperatura (desvio padrão *100)
BIO05	Temperatura máxima do mês mais quente
BIO06	Temperatura mínima do mês mais frio
BIO07	Varição da temperatura anual (BIO5-BIO6)
BIO08	Temperatura média do trimestre mais chuvoso
BIO09	Temperatura média do trimestre mais seco
BIO10	Temperatura média do trimestre mais quente
BIO11	Temperatura média do trimestre mais frio
BIO12	Precipitação anual
BIO13	Precipitação do mês mais chuvoso
BIO14	Precipitação do mês mais seco
BIO15	Sazonalidade da precipitação (coeficiente de variação)
BIO16	Precipitação do trimestre mais chuvoso
BIO17	Precipitação do trimestre mais seco
BIO18	Precipitação do trimestre mais quente
BIO19	Precipitação do trimestre mais frio

Fonte: dos autores (2022).

Os modelos foram construídos com base em algoritmos de aprendizado de máquina pertencentes a três classes de métodos, sendo eles: i) método apenas de presença - *Bioclim* - envelope climático (Nix, 1986); ii) método de presença/background - *Maximum Entropy* - MaxEnt (Phillips et al. 2004) e *Support Vector Machines* (SVM) (Tax e Duin, 2004); e iii) método de presença e ausência - *RandomForest* (Breiman, 2001). O uso combinado destes algoritmos pode melhorar os resultados, considerando diferentes tolerâncias na distribuição potencial (Araújo e New, 2007). Para avaliar os modelos construídos, os registros de casos foram randomizados em dois subconjuntos para treinamento (70%) e teste (30%) dos modelos. A divisão dos registros foi aleatorizada 10

vezes pela técnica de *bootstrap* (partição aleatória) para diminuir a correlação dos dados (Peterson et al. 2011), totalizando 40 modelos diferentes (10 repetições x 4 algoritmos).

Foi usada a técnica de *ensemble* (conjunto) com "especificidade e sensibilidade máximas" como um limite (Araújo e New, 2007; Liu *et al.*, 2016). O limite é um valor de adequação que define a presença ou ausência de um fenômeno. Assim, o valor de cada célula, no mapa final, variou de 0 a 40, demonstrando a frequência de predição de presença entre os modelos. Esses valores foram divididos pelo número total de modelos construídos para obter a frequência relativa de presença por pixel, variando entre 0 e 1. Como forma de avaliar cada um dos mapas gerados, foram estimados valores de TSS (*True Skill Statistic*). Os valores de TSS variam de -1 a 1, sendo que valores negativos, ou próximos a 0, indicam que os modelos não são estatisticamente diferentes de modelos gerados aleatoriamente, e valores próximos a 1 indicam modelos excelentes. Assume-se, contudo, que valores acima de 0,5 são considerados adequados (Allouche *et al.*, 2006).

Por fim, foram estudadas apenas células que possuem adequabilidade climática alta (acima do valor de *lowest presence threshold* - LPT) nos modelos. Para isso, as células dos modelos com valores de adequabilidade acima do LPT foram consideradas como presença da espécie (1), e as células com valores inferiores ao limiar de corte, como ausência da espécie (0) (Guisan e Rahbek, 2011). Ao final deste processo foi gerado um mapa de distribuição potencial para cada uma das espécies em estudo.

4.5.5. Avaliação das variáveis bioclimáticas em relação aos locais potenciais de ocorrência de casos

As variáveis bioclimáticas utilizadas para as modelagens extraídas dos *grides* foram avaliadas quanto à relação com os locais potenciais de ocorrência (positivo x negativo), os tipos de testes (teste sorológico rápido/ELISA e PCR-RT) e a interação de tais fatores por meio da Análise de Variância Fator Duplo, seguida pelo teste de acompanhamento de Tukey-NHSD ($\alpha = 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Variáveis sociodemográficas

Em relação às variáveis sociodemográficas dos cães levados pelos proprietários ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Foz do Iguaçu, no Paraná, observou-se que a maioria dos donos (50,25%) possuem Ensino Médio, havendo de 3 a 5 pessoas em sua residência (68,43%). Em grande parte das casas (49,49%) habitam de 1 a 2 crianças, e em 65,15% delas, vivem de 1 a 2 cães. Todas estas variáveis supracitadas foram significativas, havendo diferença estatística entre suas categorias ($p < 0,0001$; Tabela 3).

As variáveis que indicam características apenas dos cães mostraram que o local de preferência da maioria dos animais (56,06%) é a área externa da casa, seguida pela área mista (interior e exterior: 34,60%). Grande parte dos animais (74,56%) foram adquiridos por meio de adoção de conhecidos, da rua ou de lojas de animais. Em relação à idade, 33% possuíam de 0 a 6 meses, 30,73% tinham idades desconhecida sem a informação de serem filhotes ou adultos, e 14,36% tinham de 7 a 24 meses. A grande maioria (86,90%) era procedente de Foz do Iguaçu. O tempo dos cães nos locais de origem indicaram valores próximos para as categorias: 7 a 24 meses (31,83%), 25 meses a 5 anos (28,32%), e acima de 5 anos (28,07%), havendo apenas 10,53% de cães que permaneceram de 0 a 6 meses no local originário. A maior parte dos cães (81,61%) não usava coleira repelente contra o mosquito transmissor da Leishmaniose, e o total absoluto de animais (396 = 100%) não possuía vacina para a referida doença. Todas estas variáveis acima citadas foram significativas, havendo diferença estatística entre suas categorias ($p < 0,0001$; Tabela 3).

Tabela 3. Frequências absolutas (FA) e relativas em porcentagem (FR) das variáveis sociodemográficas relacionadas aos cães levados ao Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu – PR

Variáveis	Categorias	FA (n)	FR (%)	p
Escolaridade	Fundamental	85	21,46	<0,0001
	Médio	199	50,25	
	Pós-graduação	21	5,30	
	Superior	89	22,47	
	Técnico	2	0,51	
Número de pessoas na residência	1 a 2	90	22,73	<0,0001
	3 a 5	271	68,43	
	6 a 8	31	7,83	
	9 ou mais	4	1,01	
Número de crianças na residência	0	182	45,96	<0,0001
	1 a 2	196	49,49	
	3 a 4	17	4,29	
	5 ou mais	1	0,25	
No de cães na residência	1 a 2	258	65,15	<0,0001
	3 a 4	101	25,51	

	5 a 6	19	4,80	
	7 ou mais	18	4,55	
Local de preferência do cão	Área interna da casa	34	8,59	
	Misto (interior e exterior)	137	34,60	
	Misto e rua	2	0,51	<0,0001
	Área externa da casa	222	56,06	
	Não informado	1	0,25	
Procedência do animal	Adoção (rua/PET/conhecidos)	296	74,56	
	Adoção - ONG	3	0,76	
	Comprado	36	9,07	<0,0001
	Ninhada própria	60	15,11	
	Outros	2	0,50	
Idade	0 a 6 meses	131	33,00	
	7 meses a 24 meses	57	14,36	
	25 meses a 5 anos	26	6,55	
	Acima de 5 anos	22	5,54	<0,0001
	Desconhecida (filhote)	23	5,79	
	Desconhecida (adulto)	16	4,03	
	Desconhecida	122	30,73	
Local de nascimento	Foz do Iguaçu	345	86,90	<0,0001
	Outros	52	13,10	
Tempo no local de origem	0 a 6 meses	42	10,53	
	7 meses a 24 meses	127	31,83	
	25 meses a 5 anos	113	28,32	<0,0001
	Acima de 5 anos	112	28,07	
	Não informado	5	1,25	
Uso de coleira repelente X o mosquito	Não	324	81,61	<0,0001
	Sim	73	18,39	
Vacina para Leishmaniose	Não	396	99,75	<0,0001
	Sim	1	0,25	

Nota explicativa: p: teste de Qui-quadrado.

Fonte: dos autores (2022).

Em relação ao ambiente doméstico no qual os cães vivem, a maior parte (46,85%) habita pátio misto, seguido por pátio cimentado (31,99%), pátio com cobertura vegetal (15,62%) e pátio de chão (4,79%). As residências que possuem árvores frutíferas indicaram manga como a mais frequente (28,27%), seguida por jabuticaba (23,10%) e citros (18,84%). Dentre os animais que coabitam o quintal, ou o pátio, com os cães, 66,95% são gatos, 27,97% são galinhas e 5,08% são coelhos. Dentre as galinhas, 72,73% vivem soltas. Foram observados terrenos baldios, ou desocupados, nos arredores das casas em 48,61% das respostas. Presença de material orgânico exposto, dentro ou fora da casa apresenta apenas em 26,45% das residências. Todas as variáveis analisadas sobre o ambiente foram significativas ($p < 0,0001$), havendo diferença estatística entre suas categorias, como pode ser observado na tabela 4. Por fim, entre os proprietários que levaram os cães para atendimento veterinário, apenas 33,50% conhecem o mosquito palha, e somente 7,73% responderam ter visto o mosquito. Estas variáveis foram também significativas, indicando diferença estatística ($p < 0,0001$) entre as respostas positivas e negativas, conforme exposto na tabela 4.

Tabela 4. Frequências absolutas (FA) e relativas em porcentagem (FR) das variáveis sociodemográficas relacionadas aos cães levados ao Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu – PR

Variáveis	Categorias	FA (n)	FR (%)	P
Tipo de ambiente doméstico	Pátio misto	186	46,85	<0,0001
	Pátio com cobertura vegetal	62	15,62	
	Pátio cimentado	127	31,99	
	Pátio de chão	19	4,79	
	Não informado	3	0,76	
Árvores frutíferas no quintal/pátio	Manga	93	28,27	<0,0001
	Jabuticaba	76	23,10	
	Goiaba	34	10,33	
	Citrus	62	18,84	
	Acerola	48	14,59	
Animais no quintal/pátio	Abacate	16	4,86	<0,0001
	Gatos	79	66,95	
	Coelhos	6	5,08	
Galinhas	Galinhas	33	27,97	<0,0001
	Soltas	24	72,73	
Terrenos baldios próximos	Cercadas	9	27,27	<0,0001
	Não	204	51,39	
Material orgânico exposto dentro/fora da casa	Sim	193	48,61	<0,0001
	Não	292	73,55	
Conhece o mosquito	Sim	105	26,45	<0,0001
	Não	264	66,50	
Viu o mosquito	Sim	133	33,50	<0,0001
	Não	358	92,27	
	Sim	30	7,73	<0,0001

Nota explicativa: p: teste de Qui-quadrado.

Fonte: dos autores (2022).

5.2. Avaliação de concordância entre testes

No presente estudo foi possível observar que a concordância é significativamente superior a 1 ($p = 0,0021$), contudo, de acordo com a classificação proposta por Landis e Koch (1977), pode-se assumir que $k = 0,1675$ indica uma concordância baixa entre os testes (Tabela 5).

Tabela 5. Concordância entre os testes rápidos, ELISA e PCR-RT por meio do Coeficiente de Concordância de Cohen Kappa

		Teste rápido/ELISA		p-valor	Kappa de Cohen
		Não	Sim		
PCR-RT	Não	17 (85%)	66 (46%)	0,0021	0,1675
	Sim	3 (15%)	79 (54%)		

Fonte: dos autores (2022).

5.3. Regressão logística

Ao realizar a avaliação das variáveis preditoras dos resultados do teste sorológico rápido com confirmação do teste ELISA foi possível verificar que as consideradas como significativas pelo método de regressão logística foram: local de permanência do cão, área cercada e conhecimento sobre o díptero transmissor da Leishmaniose. O modelo apresentou um ajuste razoável segundo a estatística de Hosmer & Lemeshow (Qui-quadrado = 19,386; GL = 8; $p = 0,013$; Tabela 6).

Segundo este primeiro modelo gerado, cães que permanecem a maior parte do tempo em áreas externas apresentaram um risco 5,85 vezes maior de contraírem a doença do que animais de áreas internas (OR Área externa = 5,8542 [1,1289 – 30,3594]; $p = 0,0354$; Tabela 6). A área em que o animal habita não ser cercada indicou 8,26 vezes mais risco de contaminação pela doença quando comparada a animais residentes em áreas cercadas (OR = 8,2609 [IC95%: 1,8487 – 36,9134]; $p = 0,0057$; Tabela 6). Um dado obtido muito interessante constitui no fato de que o reconhecimento do “mosquito palha” pelos donos dos cães é um fator protetor (OR < 1) para a ocorrência de casos de Leishmaniose, havendo 5,14 vezes mais chance de quem não conhece o flebotomíneo contrair a doença em relação a quem conhece (OR = 5,1414 (1 ÷ 0,1945) [IC95%: 0,0358 – 1,0573]; $p = 0,0580$; Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros obtidos para o modelo criado por meio da aplicação de regressão logística com o intuito de encontrar os fatores associados aos resultados positivos no teste sorológico rápido e ELISA para cães com suspeita de Leishmaniose canina

Variáveis	Categorias	Estimativa	OR [IC95%]	p-valor
Intercepto	-	-0,0814	-	1,0000
Local preferido pelo cão	Interior	0,0000	-	-
	Área externa	1,7672	5,8542 [1,1289 – 30,3594]	0,0354
	Misto	1,5097	4,5255 [0,7603 – 26,9364]	0,0971
Área cercada	Sim	0,0000	-	-
	Não	2,1115	8,2609 [1,8487 – 36,9134]	0,0057
Conhece o “mosquito”	Sim	0,0000	-	-
	Não	-1,6374	0,1945 [0,0358 – 1,0573]	0,0580

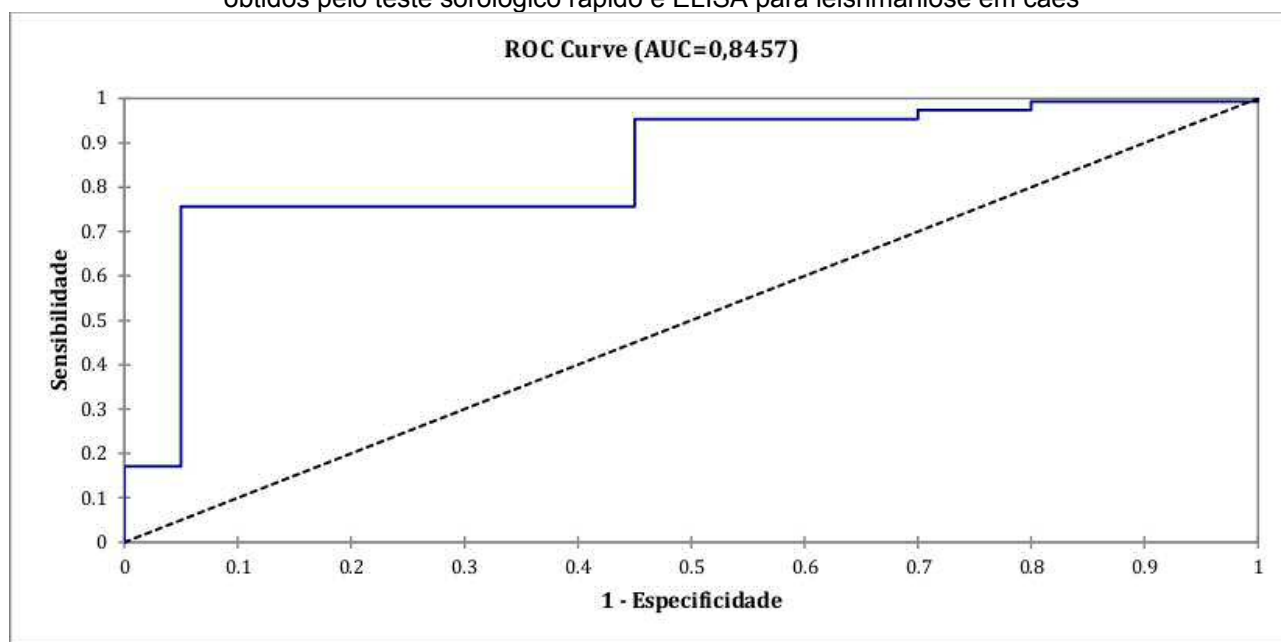
Nota explicativa: Valores em negrito indicam significância estatística.

Fonte: dos autores (2022).

A partir do presente modelo, as probabilidades foram estimadas, ordenadas e plotadas em um gráfico, fornecendo a curva ROC exibida na figura 19. A área sob a curva ROC mostra que o modelo de probabilidades estimadas conseguiu prever aproximadamente 84,57% dos fatores associados ao resultado positivo para o teste

sorológico rápido com confirmação pelo teste de ELISA. A sensibilidade do modelo ajustado reflete o quanto ele é eficaz em identificar quais cães apresentaram resultado positivo, sendo, na presente proposta, equivalente a 99,34%. Já a especificidade do modelo ajustado refletiu o quanto este é eficaz em identificar corretamente os cães que apresentaram resultado negativo no teste sorológico rápido, sendo igual a 5%. Em outras palavras, o modelo conseguiu identificar bem aqueles cães que possam ter resultado positivo, mas inadequadamente cães que possam ter resultado negativo (figura 19).

Figura 19. Curva ROC para o modelo de regressão logística binária com fatores preditivos aos resultados obtidos pelo teste sorológico rápido e ELISA para leishmaniose em cães



Fonte: dos autores (2022).

Ao realizar a avaliação das variáveis preditoras dos resultados do teste de PCR em tempo real, foi possível verificar que apenas a variável “local de preferência do cão” foi significativa. O modelo apresenta um ajuste adequado segundo a estatística de Hosmer & Lemeshow (Qui-quadrado = 8,2216, GL = 8, $p = 0,4121$).

Neste segundo modelo gerado, cães que permanecem maior parte do tempo na área externa apresentam mais risco de contraírem a doença (OR Área externa = 2,487 [IC95%: 0,987 – 6,268], $p = 0,053$) (Tabela 7).

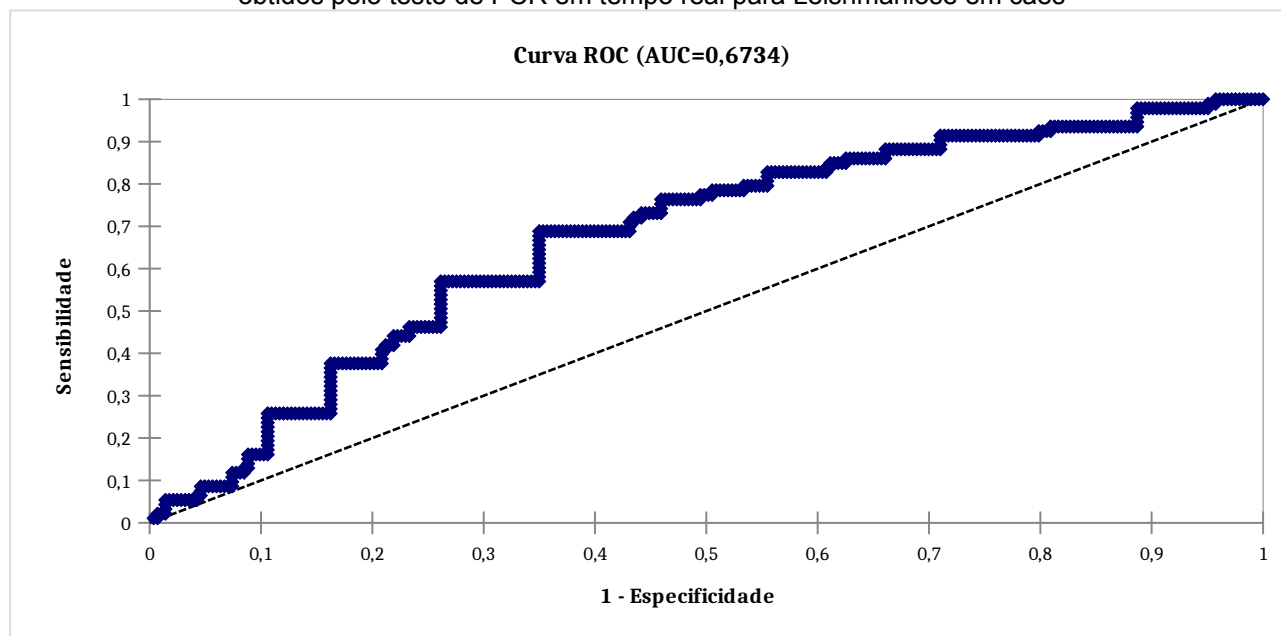
Tabela 7. Parâmetros obtidos para o modelo criado por meio da aplicação de regressão logística com o intuito de encontrar os fatores associados ao resultado positivo no teste de PCR em tempo real para cães com suspeita de Leishmaniose

Variáveis	Categorias	Estimativa	OR [IC95%]	p-valor
Intercepto	-	-1,576	-	0,012
Local de preferência do cão	Interior	0,000		
	Área externa	0,911	2,487 [0,987 – 6,268]	0,053
	Misto	-0,405	0,667 [0,240 – 1,854]	0,437

Fonte: dos autores (2022).

As probabilidades foram estimadas para o modelo dos resultados obtidos com uso do PCR em tempo real, ordenadas e plotadas na curva ROC (figura 20). A área sob a curva ROC mostra que o modelo de probabilidades estimadas consegue prever aproximadamente 67,3% dos fatores associados ao resultado positivo no teste PCR em tempo real. A sensibilidade deste modelo foi nula (0%), enquanto a especificidade foi igual a 100%. Em outras palavras, o modelo consegue identificar de forma excelente os cães que possam ter resultado negativo, mas mostra-se totalmente ineficaz para identificar cães que possam ter resultado positivo.

Figura 20. Curva ROC para o modelo de regressão logística binária com fatores preditivos aos resultados obtidos pelo teste de PCR em tempo real para Leishmaniose em cães



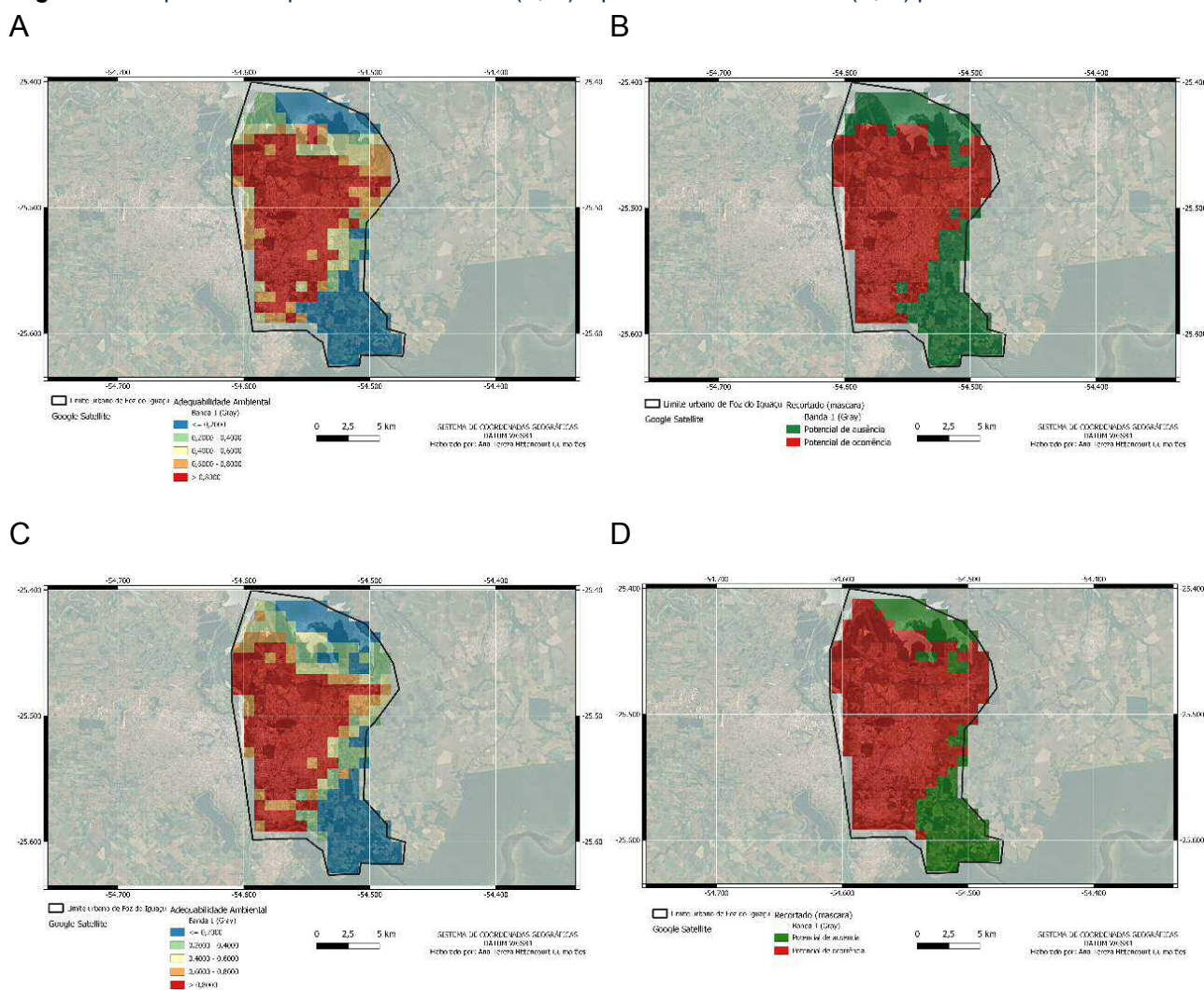
Fonte: dos autores (2022).

5.4. Modelos de adequabilidade ambiental e áreas potenciais de ocorrência

Foram realizados modelos de adequabilidade ambiental para a ocorrência de casos de Leishmaniose visceral em cães em Foz do Iguaçu, Paraná. Estes modelos

foram realizados considerando a ocorrência de casos definidos pelo Teste sorológico rápido com confirmação pelo Teste de ELISA, e pelo teste PCR em tempo real. Os mapas dispostos ao lado esquerdo (A e C) representam os modelos gerados, respectivamente, para os resultados dos Testes sorológico rápido confirmado pelo teste ELISA e PCR em tempo real (figura 21). Nestes, as áreas dos mapas com tons mais fortes (vermelho) indicam uma maior adequabilidade ambiental para a ocorrência do díptero, considerando apenas variáveis ambientais bioclimáticas e, portanto, com valores apropriados para a ocorrência de casos de Leishmaniose. Já nos mapas do lado direito (B e D) (figura 21), a cor vermelha indica a potencial ocorrência de casos de Leishmaniose, sendo que esta área representa 216km² para o teste PCR em tempo real e 187km² para o teste de Sorológico rápido com confirmação de ELISA (Figura 21).

Figura 21. Mapas de adequabilidade ambiental (A, C) e potencial de ocorrência (B, D) para Leishmaniose canina

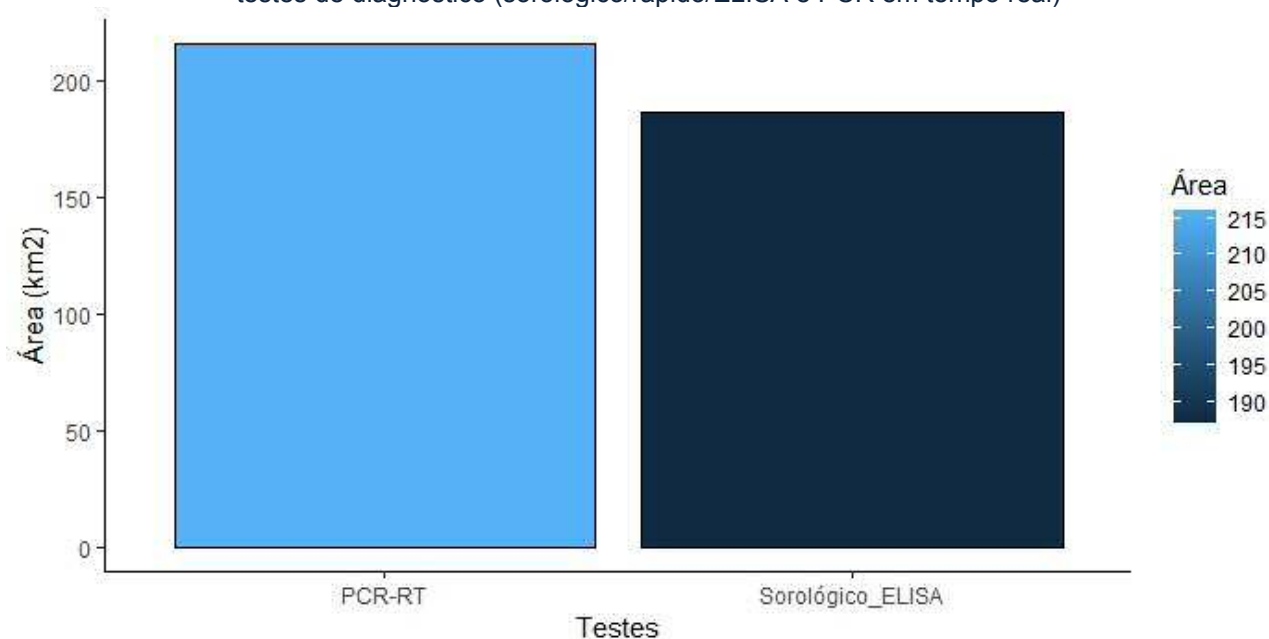


Nota explicativa: A e B) mapas referentes aos dados positivos obtidos pelo teste sorológico rápido com confirmação pelo teste de ELISA; C e D) mapas referentes aos dados positivos obtidos pelo teste de PCR em tempo real.

Fonte: dos autores (2022).

O gráfico da figura 22 indica visualmente que não houve diferença significativa entre as áreas potenciais de ocorrência de casos de Leishmaniose canina, de acordo com os diferentes testes de diagnóstico (sorológico/rápido com confirmação por ELISA e PCR em tempo real) (figura 22).

Figura 22. Áreas potenciais de ocorrência de casos de Leishmaniose canina considerando os diferentes testes de diagnóstico (sorológico/rápido/ELISA e PCR em tempo real)



Fonte: dos autores (2022).

Analisando-se a “interação” entre os testes sorológico/rápido com confirmação por ELISA, e PCR em tempo real e os potenciais locais de ocorrência da Leishmaniose canina, foram obtidas diferenças significativas para a precipitação do mês mais seco ($p = 0,0531$), sazonalidade da precipitação ($p = 0,0134$), precipitação do trimestre mais seco ($p = 0,0162$) e precipitação do trimestre mais frio ($p = 0,0116$), além de uma tendência à significância para a precipitação do trimestre mais chuvoso ($p = 0,0712$) e precipitação do trimestre mais quente ($p = 0,0624$), o que indica que tais variáveis possuem relação tanto com o tipo de teste, quanto com os locais (Tabela 8).

Em relação à comparação apenas entre os potenciais locais de ocorrência (positivo e negativo) para a ocorrência da Leishmaniose canina, as variáveis testadas relacionadas às temperaturas: média anual, mínima do mês mais frio, média do trimestre mais chuvoso, média do trimestre mais quente e média do trimestre mais frio foram consideradas significativas ($p = 0,0020$; $0,0442$; $0,0024$; $0,0058$; $0,0017$, respectivamente), indicando que nos locais onde há uma possibilidade de ocorrência para

casos de Leishmaniose (positivo), tais temperaturas são mais elevadas do que nos locais onde não existe tal potencial (Tabela 8). Assim, tais áreas são mais sujeitas ao surgimento e ao desenvolvimento do mosquito possuindo, portanto, valores mais altos de casos de Leishmaniose canina.

Para a temperatura média do trimestre mais seco notou-se uma diferença somente entre os potenciais locais de ocorrência (positivo e negativo) para a ocorrência da doença, sendo que onde não há um potencial de ocorrência da doença (negativo), tal variável é significativamente mais elevada ($p = 0,0222$) quando comparada aos locais onde há tal potencial (Tabela 8).

Tabela 8. Locais das variáveis testadas em relação aos resultados dos testes rápidos com confirmação por ELISA e PCR em tempo realT (positivos e negativos)

Variáveis	Locais	Rápido*Elisa		PCR		p-valor		
		Média	DP	Média	DP	Locais	Testes	Locais* Testes
Temperatura média anual	Negativo	20,99	0,29	21,00	0,29	0,0020	0,5017	0,1907
	Positivo	21,01	0,29	21,00	0,29			
Variação da temperatura média diurna (média por mês (temp. máxima - mínima))	Negativo	10,76	0,61	10,75	0,61	0,5246	0,4426	0,1583
	Positivo	10,74	0,61	10,76	0,60			
Isotermalidade (BIO02/BIO07) (*100)	Negativo	52,58	0,99	52,57	1,00	0,4821	0,4818	0,1951
	Positivo	52,55	1,01	52,58	0,99			
Sazonalidade da temperatura (desvio padrão *100)	Negativo	356,02	6,18	355,99	6,20	0,7726	0,6617	0,4226
	Positivo	355,93	6,18	356,03	6,12			
Temperatura máxima do mês mais quente	Negativo	30,61	0,50	30,61	0,50	0,1312	0,8297	0,7295
	Positivo	30,62	0,51	30,63	0,50			
Temperatura mínima do mês mais frio	Negativo	10,17	0,60	10,18	0,60	0,0442	0,3899	0,1057
	Positivo	10,20	0,59	10,18	0,59			
Variação da temperatura anual	Negativo	20,44	0,90	20,44	0,90	0,6192	0,4907	0,2062
	Positivo	20,42	0,90	20,45	0,89			
Temperatura média do trimestre mais chuvoso	Negativo	23,20	0,32	23,20	0,32	0,0024	0,6005	0,2992
	Positivo	23,22	0,32	23,21	0,32			
Temperatura média do trimestre mais seco	Negativo	16,92	0,38	16,92	0,38	0,0222	0,4534	0,1538
	Positivo	16,90	0,38	16,91	0,38			
Temperatura média do trimestre mais quente	Negativo	25,12	0,31	25,12	0,31	0,0058	0,6047	0,3081
	Positivo	25,13	0,31	25,13	0,31			
Temperatura média do trimestre mais frio	Negativo	16,55	0,29	16,55	0,29	0,0017	0,4405	0,1361
	Positivo	16,57	0,28	16,56	0,29			
Precipitação anual	Negativo	1766,59	21,38	1766,39	21,65	0,5491	0,4073	0,1376
	Positivo	1766,32	22,52	1767,01	21,64			
Precipitação do mês mais chuvoso	Negativo	205,45	6,29	205,47	6,33	0,2256	0,6617	0,4485
	Positivo	205,41	6,49	205,30	6,34			
Precipitação do mês mais seco	Negativo	102,50	3,93	102,45	3,92	0,0085	0,3057	0,0531
	Positivo	102,25	3,83	102,41	3,87			
Sazonalidade da precipitação (coeficiente de variação)	Negativo	18,53	1,25	18,55	1,26	0,1550	0,1800	0,0134
	Positivo	18,60	1,29	18,54	1,25			
Precipitação do trimestre mais chuvoso	Negativo	520,41	7,57	520,50	7,53	0,0004	0,3480	0,0712
	Positivo	520,96	7,34	520,67	7,48			
Precipitação do trimestre mais seco	Negativo	356,54	7,82	356,42	7,88	0,0877	0,1939	0,0162
	Positivo	356,09	7,96	356,49	7,77			
Precipitação do trimestre mais quente	Negativo	477,98	6,34	478,05	6,35	0,0001	0,3344	0,0624
	Positivo	478,48	6,37	478,23	6,37			
Precipitação do trimestre mais frio	Negativo	358,85	10,28	358,69	10,31	0,0119	0,1764	0,0116
	Positivo	358,14	10,25	358,69	10,15			

Fonte: dos autores (2022).

6. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral é um grave problema de saúde pública em muitas partes do globo, sendo um desafio para os profissionais, gestores e envolvidos com a grande área da saúde, sendo de grande relevância a promoção de estudos que determinam o padrão de eventualidade da LV e suas peculiaridades epidemiológicas, contribuindo assim para compreensão da dinâmica desse problema, bem como viabilizar realização de ações de vigilância e gestão em saúde (MARTINS *et al.*, 2018).

A constatação dos dados obtidos neste estudo mostra que não houve concordância entre o teste rápido (TR DPP®) mais ELISA em relação ao PCR em tempo real, sendo que o valor k (Kappa) apresentou um valor de 0,1675. Esta classificação proposta por LANDIS e KOCH (1977) sugere que a medida tem “1” como valor máximo, que representa concordância total e os valores próximos e até mesmo abaixo de zero indicam não haver nenhuma concordância, ou a presença de uma eventual discordância entre testes. Essa discordância foi constatada devido à grande quantidade de amostras identificadas como positivas no TR DPP® mais ELISA e que se apresentaram negativas no PCR em tempo real. Além disso, também é possível observar que uma pequena parcela de animais com resultado positivo para PCR em tempo real recebeu resultado negativo para TR DPP®/ELISA. Essas divergências de resultados já eram, em parte, esperadas devido às diferenças nas técnicas utilizadas, e já são bem descritas na literatura. De acordo com a FIOCRUZ, fabricante do ensaio TR DPP®, o teste é voltado para realizar a triagem dos animais; dessa maneira, cães que recebem resultado positivo para o TR DPP® irão carecer de teste confirmatório posterior, como PCR, ELISA ou RIFI (imunofluorescência indireta). De acordo com a Nota Técnica de 2011 do Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis do Ministério da Saúde, o teste TR DPP® passou a ser o teste de triagem para suspeita de LVC, devendo a confirmação da infecção ser realizada através de ELISA (Ministério da Saúde, 2011). Para a presente pesquisa, bem como demais estudos a serem realizados, o ideal seria a realização de testes confirmatórios de padrão-ouro, como por exemplo o isolamento/crescimento em meio de cultura; ou então busca direta (visualização por microscopia) em aspirados de linfonodo ou de medula óssea.

Um ponto importante a ser ressaltado é a possibilidade de ocorrência de reação cruzada entre os testes sorológicos para *Leishmania infantum* e outros patógenos que ocorrem em cães, como outros tipos de *Leishmania*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e

Trypanossoma cruzi (ZANETTE *et al.*, 2014; LUCIANO *et al.* 2009; GRIMALDI & TRASH, 1993; COSTA *et al.*, 1991; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). A ocorrência desse tipo de reação ainda é tema de grande divergência de resultados na literatura, fato que pode ser observado comparando os trabalhos de OLIVEIRA *et al.* (2008) e ZANETTE *et al.* (2014).

A resposta imune canina provocada pela presença de *Leishmania sp* pode ser bastante variada entre os indivíduos, pois existem diferenças naturais que decorrem dos fatores como estado imunológico do hospedeiro, presença de coinfeções e grau de exposição ao parasito (REIS *et al.*, 2010). Outro ponto importante é que o protozoário apresenta receptores moleculares de superfície que permite a invasão aos macrófagos sem que ele seja fagocitado, permitindo a sobrevivência e conseqüentemente influenciando no tipo de resposta imune adaptativa (MOREIRA, 2013). Por esta razão possa justificar que o resultado combinatório do teste rápido e ELISA seria inadequado para cães que possam ter resultado negativo pela amostra sorológica e adequadamente bem para os resultados positivos. Ao que tudo indica, quando o patógeno consegue suprimir a ação das células apresentadores de antígenos, os testes sorológicos tornam-se pouco efetivos enquanto que, ao contrário, os testes moleculares podem apresentar resultados mais eficientes (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2013; STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de testes sorológicos mais precisos pode auxiliar a contornar esse problema. É importante salientar que, em muitas regiões do Brasil, animais com resultados de falso-negativos para leishmaniose dificultam o controle da expansão da zoonose. Segundo REIS *et al.* (2010), mesmo que o animal infectado seja assintomático, em alguns casos, o cão possui capacidade de transmitir o parasito para outros cães, via flebotomíneo, e estes podem desenvolver sintomas.

Um outro aspecto importante em nossos resultados é que a quantidade de animais negativos para o teste PCR em tempo real e positivos para TR DPP® /ELISA foi considerável. Esses dados concordam com os resultados obtidos por MARTINEZ *et al.* (2011) que encontraram uma taxa de soro prevalência de 31%, enquanto que a prevalência de DNA de leishmania por PCR em tempo real no sangue foi de 20,1%. Importante notar que esses autores relatam que 84,3% dos animais positivos nos testes sorológicos e negativos para PCR em tempo real não desenvolveram a doença. BELINCHÓN-LORENZO *et al.* (2016) avaliaram amostras de sangue de animais doentes com diagnóstico confirmado por ELISA e IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test) para Leishmaniose e detectaram DNA do parasita em apenas 57,6 % das amostras.

Um dos fatores adicionais que podem ter contribuído para essa divergência entre os resultados obtidos por sorologias positivas e por PCR em tempo real é o tecido utilizado nas reações de PCR. SOLANO-GALLEGO *et al.* (2001) avaliaram 100 cães na ilha de Mallorca por ELISA e também por PCR convencional, técnica com a qual eles avaliaram três tecidos (pele, medula óssea e tecido conjuntivo). Enquanto encontraram 26% de positividade através de teste ELISA, com a PCR a positividade dos animais chegou a 63%, considerando-se os três tecidos avaliados. STRAUSS-AYALI *et al.* (2004) avaliaram cães infectados naturalmente e artificialmente por *Leishmania*. Eles compararam a eficiência da detecção de DNA de *leishmania* por PCR em diferentes tecidos como baço, linfonodo, sangue e tecido conjuntivo da região ocular. Os autores observaram maior sensibilidade da PCR quando se utilizou tecido conjuntivo da região ocular. MARTINEZ *et al.* (2011) BELINCHÓN-LORENZO *et al.* (2016) encontraram sensibilidade menor para detecção de *Leishmania* em amostras de sangue quando comparadas com outros tecidos como medula óssea, linfonodo e cerúmen. Interessante notar que esses autores reportam uma alta sensibilidade para amostras de cerúmen, que são amostras que podem ser coletadas de maneira não invasiva, diferente do que ocorre com as amostras de medula óssea e de linfonodo.

Conforme revisado por SOLANO-GALLEGO *et al.* (2017) quando o PCR é realizado em amostras de medula óssea, linfonodo, baço, pele e esfregaços de tecido conjuntivo, a sensibilidade é maior, especialmente se o PCR utiliza como alvo a molécula de DNA do cinetoplasto (kDNA); ensaios de PCR em tempo real com sangue total e amostras de urina são menos sensíveis do que os tecidos mencionados acima.

As análises estatísticas do estudo evidenciaram a discrepância dos resultados entre os testes. Assim, teste PCR em tempo real, utilizando amostra de sangue total, mostrou-se ineficaz para identificar cães que possam ter resultado positivo e eficaz, para os cães com resultado negativo.

De acordo com os resultados obtidos por SOLANO-GALLEGO *et al.* (2016), em amostras de sangue total de animais sintomáticos, com o aumento da gravidade da doença, aumenta também a carga parasitária no sangue; conseqüentemente a sensibilidade atingida utilizando esse tipo de amostra também aumenta.

Outro ponto a ser observado no trabalho são alguns casos em que ocorreu resultado positivo para PCR em tempo real e negativo para o TR DPP[®]/ELISA. Esse tipo de divergência provavelmente se deu devido à ocorrência de cães que portam o patógeno, mas ainda não sofreram a soro conversão.

Após serem infectados os parasitas podem passar por longos períodos de incubação e levar um tempo até sensibilizar o sistema imune dos animais, passo necessário para que ocorra a soroconversão dos mesmos (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). No início da infecção, ou em casos de infecção subclínica, os animais podem não apresentar anticorpos por um período que varia de 1 a 22 meses e STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; MORENO & ALVAR *et al.*, 2002; BANETH *et al.*, 2008).

A maioria dos animais infectados não desenvolvem sinais clínicos. Embora a soropositividade esteja presente em praticamente todos os animais que desenvolvem a doença associada à infecção, ela está presente em poucos daqueles com infecção subclínica (SOLANO-GALLEGO *et al.* 2004; MARTINEZ *et al.*, 2011). Aparentemente, a resposta imune mediada por células T Helper associadas com Interferon- γ promove a resistência ao desenvolvimento da doença. Já a resposta T regulada, conferida pela produção de Interleucina-10 está associada com uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento dos sinais clínicos, ao aumento na carga parasitária e a uma forte resposta imune humoral ineficaz (SOLANO-GALLEGO *et al.* 2017; BANETH *et al.*, 2008).

Por mais que cães possam portar a *Leishmania infantum* eles podem nunca desenvolver os sinais clínicos da doença. Por este motivo o monitoramento da infecção de cães em áreas endêmicas para leishmaniose a PCR deve ser utilizado juntamente com outras técnicas de sorologia quantitativa (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009), como ELISA. Devido ao variado tropismo que esses parasitas exibem em diferentes tecidos é importante que a pesquisa pelo DNA do patógeno seja realizada em tecidos com maior carga parasitária que resultem em maior sensibilidade da técnica. O grande problema é que a coleta de tecidos que a apresentam e que resultam em boa sensibilidade, como linfonodos e medula óssea, é bastante invasiva (SOLANO-GALLEGO, 2009; MARTINEZ *et al.*, 2011). Neste ponto a análise de cerume parece ser bem promissora (BELINCHÓN-LORENZO *et al.*, 2016), mas ainda carece de mais estudos.

Os resultados observados neste trabalho permitem analisar a importância da escolha correta do tipo de amostra para análise via PCR em tempo real; contudo, de acordo com MARTINEZ *et al.* (2011), amostras de sangue são ótimas para avaliar a resposta da infecção ao tratamento em animais doentes.

6.1. Perfil dos Animais domiciliados na cidade

Como pode-se observar, os cães domiciliados no município de Foz do Iguaçu são principalmente animais adotados, com idade de 0 a 6 meses ou de idade desconhecida, provenientes deste mesmo município e que não possuem coleira repelente para o “mosquito” palha ou não foi vacinado para leishmaniose. Esses animais na sua maioria vivem em ambiente de pátio misto e têm acesso a pátio externo. Quando presente alguma árvore frutífera, na maioria das vezes essa é uma árvore de manga ou jabuticaba e quando dividem residência com algum outro animal esse é geralmente um gato. Quanto ao perfil dos donos, esses são geralmente pessoas com ensino médio completo, que residem em casas com até 2 crianças e que já convivem com o animal adotado, por um período que varia entre 7 e 24 meses. Os donos na sua maioria não conhecem o mosquito palha e não avistaram o mosquito.

FREITAS *et al.* (2011) avaliaram cães domiciliados em duas regiões do município de Fortaleza, Ceará, Brasil. Os autores compararam as diferenças socioeconômicas entre regiões de alta e baixa ocorrência de Leishmaniose Visceral neste município, SER V (Sócio Econômica Região 5) e SER III, respectivamente. Em SER III os autores observaram que a maioria dos domicílios possui apenas um cão, os quais vivem dentro do domicílio e são animais de companhia. Além disso, nessa região o tipo de residência é predominantemente apartamento, as residências não possuem crianças, os moradores possuem nível superior e têm renda familiar superior a três salários mínimos. Em SER V predominam casas com crianças, moradores com nível de escolaridade Fundamental/Médio e que possuem renda igual ou menor que três salários mínimos. Além disso, os autores também observaram que em relação a SER V a população de SER III tem mais conhecimento sobre a sintomatologia da Leishmaniose Canina e da forma de transmissão da doença.

MASSIA *et al.* (2016) analisaram características socioambientais de três bairros de Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil, que apresentaram altos índices de LVC. Esses autores observaram que nos três bairros avaliados a maioria das pessoas avaliadas residem em casas com pátio cercado e que em mais da metade dos domicílios vivem mais de três pessoas e há a presença de crianças. Também se verificou que mais de 80% da população avaliada já havia escutado falar sobre a LVC, inclusive de que se tratava de doença transmissível. Além disso, os autores observaram que em dois dos bairros analisados a maior parte da população sabe que a doença é transmissível. Com relação

às medidas de controle, mais de 70% dos entrevistados nos três bairros responderam não ter disponibilidade financeira para adquirir a coleira repelente do vetor. Entretanto, grande parte declarou ser capaz de realizar a limpeza dos quintais de suas residências. Esses autores também avaliaram a quantidade de cães por domicílio e encontraram média de 1,53 animais por domicílio.

6.2. Regressão logística dos dados ambientais

A partir dos presentes resultados da regressão logística binária, foi possível observar como fatores de risco para resultado positivo de Leishmaniose pelo teste TR DPP® com confirmação do teste ELISA a permanência do animal por mais tempo em áreas externas e concomitante ao fato, a área em que o cão habita por não ser cercada são fatores preditores para contrair a zoonose. Estes fatores permitem a circulação do cão em outros ambientes não protegidos que sejam propícias para o desenvolvimento do vetor. Outro ponto é que o cão pode atrair e interagir com animais errantes positivados ou até mesmo, com outras espécies silvestres que são portadores do protozoário, aumentando assim, o risco de transmissão. Segundo LIMA *et al.* (2008) as características propícias para *Lu. longipalpis* ou de *Lu. cruzi* são as regiões rochosas com ou sem gruta, matas de encostas e áreas antrópicas próximas a esses ecossistemas.

No município de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, ALMEIDA *et al.* (2012) encontraram como fatores de risco para o resultado positivo para LVC por IFAT a função de guarda dos animais, acesso livre a rua, e o fato de viverem na parte exterior da casa, com riscos de 1,78, 1.89 e 3.19 maiores do que os animais que não apresentam essas características, respectivamente. Interessante notar que todos esses são fatores que expõem o animal por mais tempo ao ambiente externo, o que vai de encontro aos resultados obtidos no presente trabalho. CORTEZ *et al.* (2012), ao avaliar cães em diversas regiões de Portugal, encontraram como fatores de risco para resultado positivo para leishmaniose canina por teste de aglutinação direta o fato de os animais passarem a maior parte do tempo em ambiente externo, idade maior que dois anos, morar no interior do país e ausência de pelos longos. CURA-VITAL *et al.* (2013), ao realizarem o diagnóstico para LVC por PCR-RFLP (reação de cadeia polimerase – polimorfismo de fragmentos de restrição) em amostras de sangue, encontraram como fatores de risco a ocorrência de um caso anterior de LVC na mesma residência e também a falta de “reboco” nas paredes. Esses pontos corroboram os dados observados neste trabalho e

demonstram que um dos principais fatores de risco para a ocorrência de diagnóstico positivo para Leishmaniose, independentemente da técnica utilizada, é a exposição de cães a ambientes externos. Embora esse fator não tenha sido avaliado no presente trabalho, a ocorrência de animais contaminados na redondeza também parece ter um papel importante na epidemiologia da doença.

O estudo também revelou que o reconhecimento do “mosquito” palha pelo tutor é um fator protetivo para o animal, assim, seu nível de conhecimento sobre a matéria ajudar na prevenção da transmissão. Segundo LIMA *et al.* (2010), a percepção ambiental de zoonoses passa por uma ampliação do entendimento sobre a matéria, contribuindo para o processo em que a comunidade desenvolva habilidade de resolver seus problemas de saúde intensificando sua própria participação.

Em relação a fator preditora associada aos animais positivados via PCR em tempo real relacionou-se apenas a uma variável que corresponde o local de permanência do cão em área externa.

A partir da curva ROC, é possível observar que o modelo de regressão logística binária prevê aproximadamente 84.57% dos fatores associados aos resultados positivos do teste TR DPP® e ELISA O modelo apresentou sensibilidade de 0,9934 o que indica que o modelo prevê corretamente 99,34% dos animais que irão apresentar resultado positivo, e uma especificidade de 0,05 o que demonstra que ele identifica corretamente 5% dos animais que irão apresentar o teste TR DPP® negativo. Para o teste de PCR o modelo apresentou AUC de 0,6734, ou seja, ele consegue prever aproximadamente 67,34% dos fatores associados ao resultado positivo no PCR. A sensibilidade nula (0%) e a especificidade igual a 100% indicam que ele consegue identificar de forma excelente os cães que possam ter resultado negativo, mas mostra-se totalmente ineficaz para identificar cães que possam ter resultado positivo. Esse resultado provavelmente ocorreu devido ao fato de que a variável tempo de permanência na área externa apresentou associação com PCR positivo para *leishmania*. Com isso, apenas ela foi utilizada no modelo, sendo insuficiente para identificar os animais com resultado positivo.

6.3. Modelo associação climática

A região de Foz do Iguaçu e a Tríplice Fronteira brasileira possuem um clima subtropical úmido mesotérmico e está situado a uma altitude aproximada de 190 metros, apresentando uma das maiores amplitudes térmicas anuais do estado, valor aproximado

de 10°C de diferença média entre o inverno e o verão, devido a uma menor influência da maritimidade; conseqüentemente, os verões costumam ser muito quentes, com máximas médias chegando aos 33°C, podendo superar a marca dos 40°C em alguns anos. Os períodos mais quentes situam-se entre novembro a fevereiro e a precipitação anual varia em torno dos 1.800 mm (SACHT *et al.*, 2020). Estas condições climáticas favoráveis, como temperatura e umidade elevada, associadas às características ambientais de cobertura vegetal com predomínio de árvores frutíferas, associado a características de urbanização com crescimento não planejado – com conseqüente acúmulo da matéria orgânica - pode favorecer a ocorrência e transmissão de doenças pela presença dos vetores (SILVA *et al.*, 2016).

Os modelos de adequabilidade ambiental mostraram-se bons instrumentos para testar as condições ambientais favoráveis à ocorrência de LVC. Como pôde-se observar, as áreas de adequabilidade ambiental para as duas metodologias de diagnóstico testadas se sobrepõem, o que indica a efetividade das duas metodologias de diagnóstico para a construção dos modelos. Os modelos de probabilidade de ocorrência de LVC também demonstram uma distribuição de probabilidades semelhantes para as duas metodologias de diagnóstico testadas e é possível observar que as áreas de adequabilidade ambiental e de potencial de ocorrência se sobrepõem. Um ponto interessante de ser observado é que, quando testes que captaram uma maior quantidade de casos positivos para o teste rápido (TR DPP®) com a confirmação por ELISA são utilizados, observa-se áreas de potencial de ocorrência ligeiramente menor (184 Km²), enquanto que quando se utilizou dados dos exames de PCR em tempo real, que apresentou menor quantidade de animais positivos, o tamanho da área (216 Km²) com potencial ocorrência elevado é maior.

Os locais do município com maior potencial de ocorrência para LVC apresentam grande parte das variáveis relacionadas à temperatura e à precipitação (umidade) maiores do que as observadas em locais de potencial reduzido. A alta precipitação e umidade são condições que favorecem a flebotomíneos e sua ocorrência geralmente aumenta após períodos chuvosos (REZENDE *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2004; MICHALSKY *et al.*, 2009); isso provavelmente ocorre devido ao desenvolvimento larval deste inseto ocorrer principalmente em microambientes com alta umidade, grande quantidade de matéria orgânica e protegidos da luz, como embaixo de troncos caídos, entre raízes de árvores, no solo acumulado embaixo de rochas ou em rachaduras de tanques de água depositados sobre o solo (ALENCAR *et al.*, 2011; SANGIORGI *et al.*, 2012; HANSON, 1961). Conforme revisado por SANTOS (2019), a temperatura é outro

fator importante, ela favorece a atividade dos insetos, o que pode aumentar o número de repastos sanguíneos e elevar a carga parasitária nos vetores, aumentando consequentemente a infectividade.

Os estudos que utilizam modelagem bioclimática para prever a distribuição de LVC ainda são escassos, porém, esse tipo de trabalho já é um pouco mais difundido para prever a distribuição de vetores e também da leishmaniose visceral humana. OLIVEIRA *et al.* (2018) utilizaram os algoritmos BIOCLIM, MaxEnt, RandomForests e Support Vector Machines para gerar um modelo de nicho ecológico multiescala, baseado em variáveis climáticas e de habitat, para prever a distribuição espacial de *Lutzomyia cruzi*. Os autores encontraram como áreas mais favoráveis a ocorrência desse vetor os estados do Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. ANDRADE-FILHO *et al.* (2017) utilizaram dados do SISAN/MS, dados climáticos e dados ambientais, juntamente com o algoritmo MaxEnt, para produzir mapas de probabilidade de ocorrência de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* no Brasil. Os autores concluíram que precipitação anual, temperatura diária e precipitação do trimestre mais quente como sendo as variáveis de maior contribuição para o modelo. Eles observaram que a maior probabilidade de ocorrência desses vetores se dá em uma área que se estende da região nordeste até parte da região sudeste. Com base no regime climático termo-hidrológico, NIETO *et al.* (2006), utilizaram o método GARP (Genetic Algorithm for Rule-set Production) e analisaram a distribuição e o risco potencial de LVH no estado da Bahia. O sistema *Lutzomyia longipalpis*-*Leishmania infantum/chagasi*, e os registros de prevalência da LVH na Bahia mostraram estar relacionados aos principais mapas de zonas ecológicas. As diferentes classificações de prevalência (alta, média e baixa) coincidem com as áreas previstas no modelo de nicho ecológico GARP. Os resultados também demonstraram que o clima e o regime termo-hidrológico são determinantes chave do potencial de risco para Leishmaniose Visceral Humana neste estado. ALMEIDA *et al.* (2013) produziram modelos de nicho ecológico para *Lutzomyia longipalpis* e de casos de Leishmaniose Visceral Humana. A sazonalidade da temperatura e a precipitação média anual foram as variáveis que mais influenciaram esses modelos. Além disso, ocorreu uma grande sobreposição entre os modelos de distribuição de *Lutzomyia longipalpis* e os modelos para casos de leishmaniose visceral humana. A área de sobreposição inclui grande parte dos municípios onde ocorreu transmissão intensa de LVH e vários municípios do sudeste do Mato Grosso do Sul que são vulneráveis à transmissão desta doença.

Como o cão é um importante reservatório para *Leishmania infantum* em áreas urbanas, casos de LVH são geralmente precedidos de um aumento no número de casos de LVC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Por este motivo, modelos de probabilidade de ocorrência de LVC indicam áreas com maior risco potencial para a ocorrência de Leishmaniose em humanos. A detecção de tais regiões pode auxiliar as autoridades de saúde a planejar as medidas de vigilância e controle da leishmaniose, produzindo estratégias mais assertivas, que resultam em economia de recursos e na redução da circulação dos patógenos e dos vetores.

Medidas de controle para LVC passam por um diagnóstico e por um mapeamento adequado de regiões que apresentam alto risco para o desenvolvimento da doença. Com a tecnologia disponível atualmente, para obtermos um diagnóstico assertivo devemos nos valer de mais de uma técnica e a PCR em tempo real é uma importante ferramenta nesse processo. Quando consideramos a PCR para o diagnóstico qualitativo o tecido a ser analisado deve ser levado em consideração devido a variação na sensibilidade de técnica de acordo com o tecido analisado. Muitas vezes um diagnóstico adequado tem um custo elevado e por este motivo o mapeamento tanto de fatores de risco como de áreas com maior potencial de ocorrência são de grande importância pois pode resultar em economia de recursos e maior eficiência nos programas de monitoramento e controle desta zoonose.

7. CONCLUSÃO

As análises estatísticas dos resultados sorológicos em relação ao PCR em tempo real mostraram que os resultados não apresentaram concordância. É importante pontuar que não foram possíveis de realizar uma conclusão assertiva em relação a sensibilidade e especificidade entre as duas metodologias (sorológicas e molecular).

Foi mostrado que a permanência do animal em área externa aumenta as chances de ocorrência da enfermidade. Outros fatores como grau de escolaridade dos tutores, número de pessoas (adultos e crianças) na residência, idade do animal, tempo de residência do animal, procedência do animal, número de cães na residência, uso de coleira repelente ao vetor, presença de árvores frutíferas, tipo de ambiente doméstico e presença de material orgânico exposto (dentro/fora) não corroboraram com a presença da LVC.

Os mapas de adequabilidade ambiental mostraram que a cidade (Foz do Iguaçu) possui um alto potencial para a expansão da zoonose, reunindo condições ambientais favoráveis para o vetor. Este estudo georreferenciado ora desenvolvido mostrou não somente o panorama da enfermidade no município, mas espera-se que contribua também para estudos adicionais sobre o impacto e a ocorrência da leishmaniose, tanto em animais quando em humanos, que devem nortear as ações públicas para o enfrentamento do severo panorama da leishmaniose visceral na região da Tríplice Fronteira.

8. REFERÊNCIAS

AFONSO, M. M. S.. 2013. **Estudos sobre *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis***: hábitos alimentares, infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e correlação com a expansão da leishmaniose visceral americana. Orientadores: Sergio Augusto de Miranda Chaves (orientador); Elizabeth Ferreira Rangel (coorientador). 171 f. Tese (Doutorado) – PPG-SP (Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública), FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), Rio de Janeiro.

AHRBERG, C. D. & NEUZIL, P.. 2015. *Doubling Throughput of a Real-Time PCR*. **Scientific Reports**, n. 5, v. 12595.

ALENCAR, R.; QUEIROZ, R. de; BARRETT, T.. 2011. *Breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and efficiency of extraction techniques for immature stages in terra-firme forest in Amazonas State, Brazil*. **Acta Trop.**, n. 118, p. 204-208.

ALLOUCHE, O.; TSOAR, A.; KADMON, R.. 2006. *Assessing the accuracy of species distribution models: prevalence, kappa and the true skill statistic (TSS)*. **J Appl Ecol**; n. 43: p. 1223-1232.

ALMEIDA, A. D. B. P. F. de; *et al.*. 2012. *Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil*. **Rev Bras Parasitol Vet.**, n. 21, p. 359-365.

ALMEIDA, P. S. de; *et al.*. 2013. *Predicting the geographic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n. 108, p. 992-996.

ALVAR, J.; *et al.*. 2012. *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence*. **PLoS One**, n. 07, v. 05, p. e35671.

ANDRADE-FILHO, J. D.; *et al.*. 2017. *Mapas de ocorrência e probabilidade de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotiminiæ) no Brasil*. **Journal of Medical Entomology**, n. 54, v. 05, p. 1430-1434.

ARAÚJO, M. B. N. M.. 2007. *Ensemble forecasting of species distributions*. **Trends Ecol Evol**, n. 22, p. 42-47.

ARBO, A.. 2014. *Leishmaniasis Visceral en Paraguay*. **Revista de Medicina Tropical**, v. 09, n. 01.

BANETH, G.; *et al.*. 2008. *Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one*. *Trends Parasitol*, n. 24, p. 324-330.

BELINCHÓN-LORENZO, S.. *et al.* 2016. *First detection of Leishmania kDNA in canine cerumen samples by qPCR*. **Vet. Parasitol.**, n. 228, p. 65-68.

BEZERRA, J. M. T.; *et al.*. 2016. *Burden of leishmaniasis in Brazil and Federated Units, 1990-2016: findings from Global Burden of Disease Study*. **PLoS Negl Trop Dis.**, n. 2018; v. 12.

BORTOLUZZI, L. N.. 2022. **Vunerabilidade socioambiental em áreas de fundo de vale na cidade de Foz do Iguaçu – PR**. Orientadores: José Tadeu Garcia Tommaselli. 277 f. Tese (Doutorado) - PPG-G (Programa de Pós-Graduação em Geografia), UNESP (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"), Presidente Prudente/SP.

BRASIL. Estado de Santa Catarina. Secretaria da Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. 2018. **Guia de Orientação para a Vigilância da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)**. Florianópolis: Governo de Santa Catarina.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8ª ed. rev.. Brasília: Ministério da Saúde.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2014. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed.. Brasília: Ministério da Saúde.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 2017. **Guia de Vigilância em Saúde**. v. 03 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 1ª. ed. atual.. Brasília: Ministério da Saúde.

BRAZ, F. C.. 2000. **História do Paraná**: das origens à atualidade. v. 1. Arapongas: El Shaddai.

BREIMAN, L.. 2001. *Random forests*. **Mach Learn**, n. 45, p. 05-32.

CABRERA, M. A. A.; *et al.*. 2003. *Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors*. **Rev Inst Trop S. Paulo**, n. 45, p. 79-83.

CALDART, E. T.; *et al.*. 2018. *Canine visceral leishmaniasis in Londrina, Paraná – investigation and case report*. **Relato de Caso. Ciências Agrárias**, v. 39, n. 3, p. 1371-1376, maio/jun..

CARNEIRO, C. P.. 2016. **Fronteiras Irmãs – Transfronteirizações na Bacia do Prata**. Porto Alegre: Ideograf.

CARVALHO, F. L. N.; *et al.*. 2018. *Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs*. **Epidemiol Infect.**, n. 146, v. 05, p. 571-576.

CONTI, R. V.; *et al.*. 2016. *Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil*. **J Vector Borne Dis.**, n. 53, p. 99-104.

CORTES, S.; *et al.*. 2012. Fatores de risco para leishmaniose canina em uma região endêmica do Mediterrâneo. **Veterinario. Parasitol.**, n. 189, p. 189-196.

COSTA, C. A.; *et al.*. 1991. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Rev Soc Bras Med Trop.**, n. 24, p. 21-25.

COSTA, C. H. N.; *et al.*. 2000. Competência do hospedeiro humano como reservatório para *Leishmania chagasi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183.

COSTA, J. M. L.; *et al.*. 1995. Leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. **Cadernos de Saúde Pública**, n. 11, p. 321-324.

COURA-VITAL, W.; *et al.*. 2013. Leishmaniose visceral canina: incidência e fatores de risco para infecção em estudo de coorte no Brasil. **Veterinario. Parasitol.**, n. 197, p. 411-417.

CURY, M. J. F.. 2012. A Geografia nas territorialidades da destinação turística da tríplice fronteira de Foz do Iguaçu (BR), Ciudad del este (PY) e Puerto Iguazu (AR): Avanços transfronteiriços. **Revista Turismo e Desenvolvimento**, n. 17/18, p. 1671-1680.

DRAGAN, A. I.; *et al.*. 2012. *SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA*. **J. Fluoresc.**, n. 22, v. 04, p. 1189-1199.

FREITAS, J. C. C. de; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; ABREU, C. R. A. de. 2011. Perfil socioeconômico e conhecimento sobre Leishmaniose de proprietários de cães da cidade de Fortaleza, Ceará, BRASIL. **Ciênc. Anim.**, v. 21, n. 01, p. 17-24.

GALVÃO, D. F.; *et al.*. 2014. Estudo da imagem sócio-ambiental urbana de Foz do Iguaçu-PR. **Revista Monografias Ambientais**, v. 13, n. 05, dez., p. 3907-3914.

GALVIS-OVALLOS, F. *et al.*. 2018. *A field study of the survival and dispersal pattern of Lutzomyia longipalpis in na endemic área of visceral leishmaniasis in Brazil*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 04, abr..

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N.. 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. bras. epidemiol.**, v. 07, p. 338–49.

GRADONI, L.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MOKNI, M.. 2017. **Manual on case management and surveillance of the Leishmaniasis in the WHO European Region**. Copenhagen: World Health Organization, 62 p.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R. B.. 1993. *Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 230-250.

GRIMALDI, G. Jr.; *et al.* 2012. *Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on dualpath platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 106, p. 54-59.

GUBLER, D. J.. 1998. *Resurgent vector-borne diseases as a global health problem*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 04, p. 424-450.

GUISAN, A.; RAHBEK, C.. 2011. *SESAM - a new framework integrating macroecological and species distribution models for predicting spatio-temporal patterns of species assemblages*. **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 08, p. 1433-1444.

HANSON, W. J.. 1961. *The breeding places of Phlebotomus in Panama (Diptera: Psychodidae)*. **Ann. ent. SOC. Am.**, v. 54, p. 317-322.

HARHAY, M. O.; *et al.* 2011. *Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil*. **Trends Parasitol**, v. 27, p. 403-409.

HIRSCHMANN, L. C.; *et al.* 2015. *Leishmaniose visceral canina: comparação de métodos sorológicos em cães de área indene do Rio Grande do Sul no Brasil*. **Rev. Patol. Trop.**, v. 44, n. 01, jan./mar., p. 33-44.

JUNIOR, A. B., *et al.* 2015. **Manual Técnico de Leishmanioses Caninas – Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral**. Curitiba: CRMV/PR.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M.A.; KEELING, J. H.. 2015. *New World and Old World leishmania infections – a practical review*. **Dermatol Clin.**, v. 33, p. 579-593.

KIRSTEIN, O. D.; *et al.*. 2018. Um estudo eco-epidemiológico em escala fina sobre a leishmaniose visceral endêmica em aldeias do norte da Etiópia. **Acta Trop.**; v. 183, p. 64-77.

KULLDORFF, M.; NAGARWALLA, N.. 1995. *Spatial disease clusters Detection and Inference*. **Stat Med**. v. 14, p. 799-810.

LE RUTTE, E. A.; VAN-STRATEN, R.; OVERGAAUW, P. A. M.. 2018. Conscientização e controle da leishmaniose canina: uma pesquisa entre veterinários espanhóis e franceses. **Vet Parasitol.**, v. 253, p. 87-93.

LEITE, R. S.. 2015. **Avaliação do swab conjuntival para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral em inquéritos caninos rotineiros**. Orientadores: Antero Silva Ribeiro de Andrade. 130 f. Tese (Doutorado) - PPG-CT (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais), UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), Belo Horizonte.

LEMOS, E. M.; *et al.*. 2008. Leishmaniose visceral canina: realização de um teste diagnóstico rápido (*Kalazar Detect*) em cães com e sem sinais da doença. **Acta Trop.**, v. 107, p. 205-207.

LIMA, A. M. A.; *et al.*. 2010. Percepção sobre o conhecimento e profilaxia das zoonoses e posse responsável em pais de alunos do pré-escolar de escolas situadas na comunidade localizada no bairro de Dois Irmãos, na cidade do Recife (PE). **Ciência & saúde coletiva**, v. 15, p. 1457-1464.

LIMA, I. D.; *et al.*. 2018. *Changing demographics of visceral leishmani - asis in northeast Brazil: lessons for the future*. **PLoS One**, v. 12, n. e0006164.

LIMBERGER, L.. 2007. **O clima do oeste do Paraná: análises da presença do lago de Itaipu**. Orientadores: Nome do Orientador; Nome do Coorientador. 148 f. Dissertação (Mestrado) - PPG-G (Programa de Pós-Graduação em Geografia), UNESP (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"), Rio Claro/SP.

LIU, C.; WHITE, M.; NEWELL, G.; WHITE, M.. 2016. *On the selection of thresholds for predicting species occurrence with presence-only data. Ecol Evol.*, v. 06, p. 337-348.

LOCHLAINN, S. O.; *et al.*. 2011. *High Resolution Melt (HRM) analysis is an efficient tool to genotype EMS mutants in complex crop genomes. Plant Methods*, v. 07, n. 43.

LUCIANO, R. M.; *et al.*. 2009. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Braz. J Vet Res Anim Sci.**, v. 46, n. 03, p. 181-187.

MADALOSSO, G.; FORTALEZA, C. M.; RIBEIRO, A. F.. 2012. *American visceral leishmaniasis: factors associated with lethality in the state of Sao Paulo, Brazil. J. Trop. Med.*; 281572.

MANCIANTI, F.; *et al.*. 1988. *Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, p. 566-567.

MANCIANTI, F.; *et al.*. 1986. *Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. Trop. Ped. Parasit.*, v. 37, p. 110-112.

MARASSÁ, A. M.; *et al.*. 2006. Identificação do sangue ingerido por *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) E *Lutzomyia almerioi* (Galti & Nunes, 1999) pela técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 02, mar./abr., p. 183-186.

MARTINEZ, V.; *et al.*. 2011. *Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. Parasit Vectors*, v. 04, n. 57.

MARTINS-MELO, F. R.; *et al.*. 2014. *Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. PloS One*, v. 09, n. 04.

MASSIA, L. I.; *et al.*. 2016. Leishmaniose visceral canina em três bairros de Uruguaiana – RS. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 04, n. 01, p. 113-119.

MICHALSKY, E. M.; *et al.*. 2009. *Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 56-61.

MIRET, J.; *et al.*. 2011. *Leishmaniosis visceral en caninos errantes en la ciudad de Asunción, Paraguay* Canine visceral leishmaniosis in stray dogs of Asunción, Paraguay. **Rev. Parag. Epidemiol.**, vol 02, n. 02, dez., p.13-22.

MONTEIRO, C. A. F.. 1962. Da necessidade de um caráter genético à classificação climática. **Revista Geográfica do Instituto Pan-Americano de Geografia e História do Brasil**, v. XXXI, n. 57, jul./dez., p. 29-44.

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

MOREIRA, M. L. de.. 2013. **Duração da imunidade vacinal na Leishmaniose visceral canina: perfil fenotípico e funcional da atividade fagocítica anti-Leishmania chagasi**. Orientadores: Márcio Sobreira Silva Araújo (orientador). 109 f. Dissertação (Mestrado) - PPG-SP (Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública), FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), Belo Horizonte.

NIETO, P.; *et al.*. 2006. *Ecological niche modeling for visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, using genetic algorithm for rule-set prediction and growing degree day-water budget analysis*. **Geospat Health**, v. 01, p. 115-126.

NIX, H. A.. 1986. *Biogeographic Analysis of Australian Elapid Snakes*. In: LONGMORE, R.. 1986. **Atlas of Elapid Snakes of Australia**. Canberra, Australia: Australian Government Publishing Service, p. 4-10.

ODDONE-COSTANZO, R.. 2012. *Leishmaniosis visceral: a 101 años del primer caso diagnosticado en las Américas*. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, v. 10, n. 01, p. 100-104.

OLIVEIRA, E. F. de. 2018. *Ecological niche modelling and predicted geographic distribution of Lutzomyia cruzi, vector of Leishmania infantum in South America*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 12.

OLIVEIRA, T. M. F. S. et al.. 2008. *A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for Leishmania sp., Babesia canis and Ehrlichia canis in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test*. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 07-11.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2015. **Visceral Leishmaniasis Control Strategies and Epidemiological Situation Update in East Africa**. Addis Ababa, Ethiopia: WHO Bi-Regional Consultation. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/190168>>. Acesso em 11 abr. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2016. **Leishmaniasis: epidemiological situation**. New York, USA: ONU. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 27 abr. 2020.

PAHO. 2017. Leishmanioses – Informe Epidemiológico das Américas. **Informe de Leishmanioses**, n. 05, abr.. Disponível em: <www.paho.org>. Acesso em: 20 fev. 2021.

PAHO. 2018. *Leishmaniasis. Epidemiological Report in the Americas 2018*, v. 06, 07 p.. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34856>>.

PAHO. 2019. Leishmanioses – Informe Epidemiológico das Américas. **Informe de Leishmanioses**, nº. 07, mar.. Disponível em: <www.paho.org>. Acesso em: 18 jun. 2021.

PARANÁ. Governo do Estado. Secretaria do Estado da Saúde. 2020. Nota Técnica nº. 09/2020/DVDTV/CVIA/SESA. **Dispõe sobre ações de vigilância e controle da**

Leishmaniose Visceral Canina (LVC) no estado do Paraná. Diário Oficial de(o)(a) Estado: seção 1, Curitiba. PR.

PETERSON, A. T.; *et al.*. 2011. ***Ecological Niches and Geographic Distributions.*** Princeton, Nova Jersey, USA: Princeton University Press.

PHILLIPS, S. B.; DUDK, M.; SCHAPIRE, R.. 2004. ***A maximum entropy approach to species distribution modeling.*** In: ***Proceedings of the Twenty-First International Conference on Machine Learning***, v. 21, 2004, Banff, Canadá, Anais [...], Banff, Canadá: ACM, p. 655-662.

PRODROMOU, C.; PEARL, L. H.. 1992. ***Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis.*** ***Protein Engineering***, v. 05, n. 08, pp. 827-829.

RAMOS, J. M.; *et al.*. 2018. ***Epidemiological and clinical features of visceral leishmaniasis in children in Alicante Province, Spain.*** ***Paediatr Int Child Health***, v. 38, p. 203-208.

REIS, I. E. S.. *et al.*. 2013. ***Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural Leishmania infantum infection.*** ***Veterinary Parasitology***, v. 197, p. 498-503.

REIS, A. B.; *et al.*. 2010. ***Immunity to Leishmania and rational search for vaccines against canine leishmaniasis.*** ***Trends Parasitol.***, v. 26, n. 07, jul., p. 341-349.

RESENDE, M. C.; *et al.*. 2006. ***Seasonal variation of Lutzomyia longipalpis in Belo Horizonte, State of Minas Gerais.*** ***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***, v. 39, p. 51-55.

RIBEIRO, D. G.. 2015. ***Metamorfoses na cidade: tensões e contradições na produção e apropriação do espaço urbano em Foz do Iguaçu.*** Orientadores: Eric Gustavo Cardin. 256 f. Dissertação (Mestrado) – PPG-CS (Programa de Pós-Graduação em Ciências Sociais), UNIOESTE (Universidade Estadual do Oeste do Paraná), Toledo/PR.

RIBEIRO, R. R.; *et al.*. 2018. *Canine Leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. Biomed. Res. Int. Artn*, v. 3296893.

RIOS-GONZALEZ, C.; *et al.*. 2016. *Características epidemiológicas y clínicas de la leishmaniasis visceral en Paraguay de enero de 2008 a diciembre de 2014. Revista Médica Risaralda*, v. 22, n. 02, pp. 83-86.

SANGIORGI, B.; *et al.*. 2012. *Natural breeding places for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a semiarid region of Bahia state, Brazil. J. Trop. Med.*, v. 124068.

SANTOS, R. C. S.. 2020. **Políticas de habitação popular em Foz do Iguaçu**. Orientadores: Luiz Fernando Vasconcellos de Miranda. 75 f. Monografia (Graduação) - ADM (Curso de Graduação Bacharelado em Administração Pública e Políticas Públicas), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu/PR.

SANTOS, R. J.; ALMEIDA, A. S.; OLIVEIRA, B. F. A.. 2019. **A influência das alterações climáticas na ocorrência de leishmaniose visceral no Brasil**. Orientadores: Andréa Sobral de Almeida. 128 f. Dissertação (Mestrado) - PPG-SP (Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente), FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), Rio de Janeiro.

SILVA, A. M.; *et al.*. 2008. *Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. Neotrop Entomol.*, v. 37, p. 209-225.

SILVA, D. A.; *et al.*. 2011. *Laboratory tests performed on Leishmania seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. Vet. Parasitol.*, v. 179, p. 257-261.

SILVA, A. M. da. *et al.*. 2008. *Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. Public Health, Neotropical Entomology*, v. 37, n. 02, p. 209-225.

SILVA, R. B. S.; *et al.*. 2016. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 36, n. 07, jul., p. 625-629.

SOLANO-GALLEGO, L.; *et al.*. 2017. *Diagnostic Challenges in the Era of Canine Leishmania infantum Vaccines. Trends in parasitology*, v. 33, p. 706-717.

SOLANO-GALLEGO, L.; *et al.*. 2009. Orientações para o diagnóstico, estadiamento clínico, tratamento e prevenção da leishmaniose canina. **Vet. Parasitol.**, v. 165, n. 01/02, p. 01-18.

SOLANO-GALLEGO, L.; *et al.*. 2011. *The LeishVet Group: LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. Parasit. Vectors*, v. 04, n. 86.

SOLANO-GALLEGO, L.; *et al.*. 2016. Produção específica de *Leishmania infantum* de IFN- γ e IL-10 em sangue estimulado de cães com leishmaniose clínica. **Parasites Vectors**, v. 09, n. 317.

SOLANO-GALLEGO, L.; *et al.*. 2001. *Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J. Clin. Microbiol.*, v. 39, p. 560-563.

SOUZA, A. P. L.; JESUS, J. R.; TEIXEIRA, M. C.. 2014. Estudo retrospectivo da epidemiologia da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul. **Veterinária em Foco**, v. 11, n. 02, p. 112-118.

SOUZA, C. M.; *et al.*. 2004. *Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 795-803.

STRAUSS-AYALI, D.; *et al.*. 2004. *Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of Leishmania infantum DNA in dogs. J. Infect. Dis.*, v. 189, p. 1729-1733.

SUTHERST, R. W.. 2004. *Global change and human vulnerability to vectorborne diseases*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, p.136-173.

TAX, D. M. J.; DUIN, R. P. W.. 2004. *Support Vector Data Description*. **Machine Learning**, v. 54, p. 45-66.

THOMAZ-SOCCOL, V.; *et al.*. 2017. *More than the eyes can see: the worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border*. **PLoS One**, v. 12, n. 12.

THOMAZ-SOCCOL, V.; *et al.*. 2019. *Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 18, n. 03, p. 46-51.

TORRES, M. M.; *et al.*. 2013. *Associação da carga parasitária renal com achados laboratoriais em cães com leishmaniose visceral*. **Ciência Rural**, v. 43, p. 894-896.

TRENCH, F. J. P.; *et al.*. 2016. *First report of auto Chthonous Visceral Leishmaniosis in humans in Foz do Iguaçu, Paraná State, southern Brazil*. **Ann Clin Cytol Pathol**, v. 02, n. 06.

VILANOVA, M.. 2020. *Vacinas e imunidade*. **Rev. Ciência Elem.**, v. 08, n. 02.

WITTEWER, C. T.. 2009. *High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations*. **Human Mutation**, v. 30, n. 06, p. 857-859.

ZAMPIERI, R. A.; *et. al.*. 2016. *High resolution melting analysis targeting hsp70 as a fast and efficient method for the discrimination of leishmania species*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, fev..

ZANETTE, M. F.; *et al.*. 2014. *Serological cross-reactivity of Trypanosoma cruzi, Ehrlichia canis, Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Babesia canis to Leishmania infantum chagasi tests in dogs*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, p. 105-107.

APÊNDICES

Apêndice A – Requerimento de autorização para uso de amostras do banco de soro sanguíneo, de cães analisados para leishmaniose visceral canina, do Programa de Controle de Zoonoses, do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu, bem como informações sobre os resultados destes exames (teste rápido e ELISA)

Excelentíssimo senhor Prefeito Municipal de Foz do Iguaçu – PR

[] **DEFERIDO**

[] **INDEFERIDO**

Nome:

Data de Nascimento:

Nacionalidade:

CNPJ / CPF-

RG:

Estado Civil:

Profissão:

Endereço:

No.

Bairro:

CEP:

Telefone: (45)

Inscrição Imobiliária:

Cidade: Foz do Iguaçu

Abaixo assinado, vem mui respeitosamente a Vossa Excelência, REQUERER o que segue:

Autorização para uso de amostras do banco de soro sanguíneo de cães analisados para leishmaniose visceral canina do Programa de Controle de Zoonoses do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu, bem como informações sobre os resultados destes exames (teste rápido e ELISA). A princípio, serão utilizadas todas as amostras disponíveis, quer sejam desde os anos de 2014/2015 até 2019.

Pelo seguinte motivo:

Realização de Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação ***stricto sensu*** em Biociências (PPG-BC), ofertado pela Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), tendo orientação do Professor Dr. Flávio Luiz Tavares.

O objetivo da utilização das amostras em questão é validar o teste para *Leishmania sp* e *L. Infantum* elaborado pelo Instituto da Biologia Molecular do Paraná (IBMP), junto ao laboratório do Centro de Medicina Tropical (CMT), utilizando a técnica de biologia molecular (qPCR / PCC-Real Time) através da molécula de fluorescência (*Sybr Green*TM) e *TaqMan* já adquirida pelo CMT, comparando os resultados obtidos pelas técnicas sorológicas empregadas atualmente pelo setor público oficial.

Termo em que,
Pede e aguarda Deferimento,

Foz do Iguaçu, 05 de abril de 2018.

Assinatura

ANEXOS

Anexo A – Termo de compromisso para estágio

Termo de Compromisso para Estágio que entre sicelebram **FUNDAÇÃO DE SAÚDE ITAIGUAPY**, pessoa jurídica de direito privado, com sede em Foz do Iguaçu, na Avenida Gramado, 580 – Vila “A”, inscrita no CGC/MF sob n.º00.304.148/0001-10, neste ato representado por seus Procuradores, respectivamente Senhora **MARINEZBURTETMARTINS E ROBSON MICHAEL DELAI** doravante denominados, simplesmente, **CONCEDENTES** de **ALAN YEUN LAW**, brasileiro (a), portador (a) do RG 4.719.273-0, residente e domiciliado à Rua Olívio Mazzarolo, 166, – cidade Foz do Iguaçu – PR, doravante denominado **ESTAGIÁRIO** (a), nas cláusulas e condições que obrigam as partes, nos termos a seguir:

O ESTAGIÁRIO, obriga-se:

1. Atingir aproveitamento e rendimento compatíveis com a natureza da pesquisa do Trabalho de Conclusão de Curso;
2. Obedecer ao horário estipulado para a realização do TCC; fixado das quintas, sextas e sábados no período matutino e vespertino, com intervalos não ultrapassando seis horas diárias.
3. Usar o crachá de identificação, nas dependências do Hospital, que deverá ser recebido e devolvido diariamente ao orientador interno no Setor de Recursos Humanos. O não uso do crachá impossibilitará a entrada e/ou permanência do estudante na Instituição.
4. Zelar pelas instalações, equipamentos, móveis e materiais da FUNDAÇÃO, responsabilizando-se por eventuais perdas e danos;
5. utilizar, obrigatoriamente, luvas de procedimentos descartáveis, máscara descartável, avental e pro pé descartável, devendo os materiais serem providenciados pelo ESTAGIÁRIO;
6. mobilizar recursos necessários para realização do Trabalho e estágio objeto deste instrumento;
7. e demais materiais necessários.

O período do Trabalho de Conclusão de Curso será de: junho de 2018 a julho de 2019, nas dependências desta fundação, sujeitando-se ao cancelamento mediante as seguintes ocorrências:

- A seu termo;
- Por comunicação de qualquer das partes, com antecedência mínima de cinco dias;
- Por desligamento da unidade de ensino;
- Por ausências imotivadas ou injustificadas por período superior a três dias.

ACONCEDENTE disponibilizará dados necessários às atividades da aprendizagem profissional. O estágio de que trata este instrumento atende ao que dispõe a lei específica e não acarretará vínculo empregatício de qualquer natureza.

Fica eleito o foro da Comarca de Foz do Iguaçu, para dirimir quaisquer dúvidas que por ventura surjam em decorrência do presente instrumento.

E, por assim estar em justos e acordados quanto ao Termo de Compromisso aqui avençado, firmam o presente em duas vias, em único teor, para fins e efeitos legais.

Foz do Iguaçu, 11 de junho de 2018.

FUNDAÇÃO DE SAÚDE ITAIGUAPY

MARINEZ BURTET MARTINS
GESTÃO DE PESSOAS

(ALAN YEUNG LAW)
ESTAGIÁRIO

ROBSON MICHAEL DELAI
LABORATÓRIO DE BIO. MOLECULAR

(FLÁVIO LUÍZ TAVARES)
ORIENTADOR DO PROJETO

Anexo B – Requisição para exame de Leishmaniose Visceral Canina



PREFEITURA MUNICIPAL DE FOZ DO IGUAÇU
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
CENTRO DE CONTROLE DE ZONOSSES



REQUISIÇÃO PARA EXAME DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

***** PREENCHIMENTO EXCLUSIVO DO CCZ *****

PROTOCOLO: [REDACTED]	Nº ID: [REDACTED]	Data: 12/12/18
DISTRITO	TERRITÓRIO	ÁREA
		MICROÁREA
TIPO DE DEMANDA:		QUARTEIRÃO
<input type="checkbox"/> Espontânea (demandada pelo proprietário do animal)		<input type="checkbox"/> Investigação (demandada pelo CCZ)

***** CAMPOS PARA PREENCHIMENTO PELO MÉDICO VETERINÁRIO REQUISITANTE *****

I – DADOS DO REQUISITANTE

Nome do Méd. Vet. requisitante: Santi Guislaire
 Telefone: _____ Data da coleta: 12/12/18

II – FINALIDADE DO EXAME

Diagnóstico
 Profilaxia (triagem para vacinação)

III – DADOS DO ANIMAL

Nome: [REDACTED] RG ou CPF: [REDACTED]
 Endereço: [REDACTED] Nº: 679
 Bairro: Parque Sandalino
 Ponto de referência: [REDACTED]
 Telefone: 991066185 Município: Foz UF: PR
 Email: _____

IV – DADOS DO CÃO

Nome: Nequinho Microchip: _____
 Sexo: Macho Fêmea Data de nascimento: 1/12/2014
 Raça: SRD Outra: _____
 Cor: Preto Peso: 9 kg Pelagem: Curta Média Longa
 Sinal ou marca característica: _____
 Cidade onde nasceu: _____ UF: _____
 Animal recolhido da rua. Qual bairro: Cidade Nova Há quanto tempo: 2 anos
 Não Sim. Qual cidade? _____
 Animal foi vacinado contra leishmaniose? Não Sim. Data da última dose: / /

V - SINAIS CLÍNICOS DE DOENÇA APRESENTADOS

- | | | | | |
|--|---|--|---|--|
| <input type="checkbox"/> Nenhum sinal | <input checked="" type="checkbox"/> Linfadenomegalia discreta | Alopecia:
<input type="checkbox"/> Focinho | Descamação furfurácea:
<input type="checkbox"/> Focinho | Lesões ulceradas:
<input type="checkbox"/> Focinho |
| <input type="checkbox"/> Perda de peso | <input type="checkbox"/> Linfadenomegalia acentuada | <input type="checkbox"/> Ao redor do olhos | <input type="checkbox"/> Ao redor do olhos | <input type="checkbox"/> Ao redor do olhos |
| <input type="checkbox"/> Caquexia | <input type="checkbox"/> Esplenomegalia | <input type="checkbox"/> Orelhas | <input type="checkbox"/> Orelhas | <input type="checkbox"/> Orelhas |
| <input type="checkbox"/> Atrofia de massa muscular da cabeça | <input type="checkbox"/> Onicogribose discreta | <input type="checkbox"/> Abdômen | <input type="checkbox"/> Abdômen | <input type="checkbox"/> Abdômen |
| <input type="checkbox"/> Ceratite | <input type="checkbox"/> Onicogribose acentuada | <input type="checkbox"/> Dorso | <input type="checkbox"/> Dorso | <input type="checkbox"/> Dorso |
| <input type="checkbox"/> Conjuntivite | | <input type="checkbox"/> Membros | <input type="checkbox"/> Membros | <input type="checkbox"/> Membros |
| <input type="checkbox"/> Uveíte | | <input type="checkbox"/> Generalizada | <input type="checkbox"/> Generalizada | <input type="checkbox"/> Generalizada |
| <input type="checkbox"/> Epístaxe | | <input type="checkbox"/> Outro local: | <input type="checkbox"/> Outro local: | <input type="checkbox"/> Outro local: |

Outros sinais clínicos: _____

Data do início dos primeiros sinais clínicos: ____/____/____

Fez tratamento: Sim Não

Observações sobre o quadro clínico do animal ou outras informações pertinentes:

De acordo com a Nota Técnica Conjunta nº 01/2011 – CGDT – CGLAB/DEVIT/SVS/MS (Ministério da Saúde), o TR DPP® LVC Bio-Manguinhos é utilizado como teste de triagem, e o ELISA, como teste confirmatório.

De acordo com a mesma NT, somente o resultado reagente deve ser submetido ao teste ELISA, para confirmação.

***** PREENCHIMENTO EXCLUSIVO DO CCZ *****

VI - RESULTADOS

TR DPP® LVC BIO-MANGUINHOS					
Resultado	Data	Responsável pelo teste	Comunicação do resultado	Responsável pela Comunicação	Destinatário
<input type="checkbox"/> Reagente <input checked="" type="checkbox"/> Não reagente	12/12/18	<input type="checkbox"/> LACEN <input checked="" type="checkbox"/> CCZ DUPEL	<input type="checkbox"/> Email <input type="checkbox"/> Telefone <input type="checkbox"/> Pessoal		<input type="checkbox"/> MV requisitante <input type="checkbox"/> Proprietário <input type="checkbox"/> Outro:
ELISA					
<input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não reagente <input type="checkbox"/> Indeterminado		<input type="checkbox"/> LACEN <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Email <input type="checkbox"/> Telefone <input type="checkbox"/> Pessoal		<input type="checkbox"/> MV requisitante <input type="checkbox"/> Proprietário <input type="checkbox"/> Outro:
ISOLAMENTO DE LEISHMANIA					
Sangue c/ EDTA Coleta: _____ <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	Linfonodo Coleta: _____ <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	Medula óssea Coleta: _____ <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	Pele Coleta: _____ <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	LCR Coleta: _____ <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	

VII. OBSERVAÇÕES (Preenchimento pelo CCZ)

Anexo C – Termo de consentimento de uso de amostras e de informações

TERMO DE CONSENTIMENTO DE USO DE AMOSTRAS E DE INFORMAÇÕES

Título da Pesquisa: Estudo da Leishmaniose Visceral Canina na Tríplice Fronteira:
Atualizações Epidemiológicas e Saúde Ambiental
Coordenador do Projeto: Prof. Dr. Flávio Tavares (UNILA) – Contato: 30

1. Responsável/Tutor

Nome	[REDACTED]
Endereço	
Bairro/Quadr./Quart.	
Telefone	

Declaro que permito a participação do meu cão na pesquisa denominada "Estudo da Leishmaniose Visceral Canina na Tríplice Fronteira Brasileira: Atualizações Epidemiológicas e Saúde Ambiental". A participação do meu cão será feita através da doação, com minha devida permissão, de uma pequena alíquota de sangue total (1,0 mL) para análise da presença do parasita *Leishmania infantum* em tal amostra. Declaro também consentir o uso das informações constantes no formulário específico do projeto, que foram por mim respondidas.

Fui devidamente informado que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar o motivo de tal recusa. Estou também ciente de que não terei nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago pela minha aceitação em ter uma amostra biológica do meu animal participando da mesma.

Estou informado de que meus dados e informações pessoais não serão divulgados e que os procedimentos adotados nesta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal (CEUA) da UNILA (Protocolo 03/2018); tais procedimentos obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008 e à Lei Estadual 11.977, de 25 de agosto de 2008.

Foi assegurado a mim o devido acesso às informações e esclarecimentos adicionais sobre esta pesquisa e seus desdobramentos, resultem estes em informações gerais e/ou específicas que eu queira saber antes, durante e depois da participação do meu animal neste projeto de pesquisa.

Tendo eu sido orientado(a) quanto ao teor do projeto e compreendido a natureza e objetivo deste estudo, manifesto pelo presente o meu livre consentimento para permitir a utilização de amostra sanguínea do meu animal, bem como as respostas por mim fornecidas nesta pesquisa.

Foz de



Assinatura do proprietário/tutor do animal considerado na pesquisa

Nome(s) e assinaturas(s) do(s) pesquisador(es) responsável(is)

Anexo D – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNILA**UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UNILA****Parecer da Relatoria**

O projeto intitulado “Contribuições ao Estudo Molecular, Imunológico e Epidemiológico da Leishmaniose Visceral Canina em Foz do Iguaçu-PR” processo de número 002/2018, sob responsabilidade do professor Flávio Tavares, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008).



Kelvinson F. Viana
CEUA-UNILA

Foz do Iguaçu-PR

10/01/2019

Anexo E – Questionário: leishmaniose visceral canina e saúde ambiental

QUESTIONÁRIO: LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E SAÚDE AMBIENTAL

USO EXCLUSIVO DO CCZ
PROTOCOLO N° _____
DATA: ___/___/___

1. Dados do animal

Nome	
Raça	
Sexo	
Idade	

2. Responsável/Tutor

Nome	
Endereço	
Bairro	

3. Grau de escolaridade do chefe familiar:

- 1º
 2º
 Superior
 Pós-graduação

4. Número de pessoas na residência:

- 1 5
 2 6
 3 7
 4 Mais. Quantos?_____

5. Número de crianças na residência:

- 1 5
 2 6
 3 7
 4 Mais. Quantos?_____

6. Número de cães na residência:

- | | |
|----------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 5 |
| <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 6 |
| <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 7 |
| <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> Mais. Quantos? _____ |

7. Local preferencial para o animal (no qual passa a maior parte do tempo):

- No interior da residência
- No quintal (exterior)
- Mixto (interior e exterior)
- Na rua
- Outros. Qual? _____

8. Local de procedência do animal:

- Adoção de animal de rua
- Doação de conhecidos
- Compra de criador certificado
- Outros. Qual? _____

9. Local de nascimento/origem do animal:

- Foz do Iguaçu
- Outros. Qual? _____

10. Utilização dos seguintes itens/produtos:

- Coleira contra leishmaniose
- Vacina contra leishmaniose
- Outros. Qual? _____

11. Ambiente doméstico / Residencial:

- Pátio cimentado
- Pátio de chão
- Pátio com cobertura vegetal
- Pátio misto

12. Presença de árvores frutíferas no quintal:

- | | |
|----------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> 5 |
| <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> 6 |
| <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> 7 |
| <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> Mais. Quantos? _____ |

13. Presença de espécies animais na residência/pátio:

- Gato
- Coelho
- Aves domésticas (galinhas/patos)
- Suíno
- Equino
- Outros. Qual? _____

14. Você se lembra da presença de terrenos desocupados ou baldios na vizinhança / proximidades?

- Sim
- Não