

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Investigação do papel de vetores secundários da
Leishmania (Leishmania) infantum no Município de
Mirandópolis – SP, Brasil.**

Rosa Maria Ferreira Nogueira Odorizzi

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública, para obtenção
do título de Doutor em Saúde Pública.**

Área de concentração: Epidemiologia.

**Orientadora: Prof. Dra. Eunice Aparecida
Bianchi Galati**

**São Paulo
2010**



**Investigação do papel de vetores secundários da
Leishmania (Leishmania) infantum no Município de
Mirandópolis – SP, Brasil.**

Rosa Maria Ferreira Nogueira Odorizzi

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para obtenção
do título de Doutor em Saúde Pública.**

Área de concentração: Epidemiologia.

**Orientadora: Prof. Dra. Eunice Aparecida
Bianchi Galati**

**São Paulo
2010**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

52418/2010 de

DEDICATÓRIA

“Nosso medo mais profundo não é o de sermos inadequados. Nosso medo mais profundo é que somos poderosos além de qualquer medida.

É a nossa luz, não as nossas trevas, o que mais nos apavora.

Nós nos perguntamos: Quem sou eu para ser brilhante, maravilhoso, talentoso e fabuloso?

Na verdade, quem é você para não ser?

Não há iluminação em se encolher, para que os outros não se sintam inseguros quando estão perto de você.

Conforme deixamos nossa própria luz brilhar, inconscientemente damos às outras pessoas, permissão para fazer o mesmo.

E conforme nos libertamos do nosso medo, nossa presença, automaticamente liberta os outros.”

Nelson Mandela

Aos meus pais Dina e Sebastião

A minha família Adans, Andréa, Lucas e Pedro Paulo.

Ao meu irmão Luiz Paulo

Aos meus sobrinhos Álvaro e David

Aos meus tios Lena e Floriano.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati, do departamento de Epidemiologia da FSP/USP, pelo incentivo, confiança, amizade e orientação para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Noryuki Kaneto, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal do Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, pelo auxílio, confiança e por permitir a utilização de instalações sob sua responsabilidade para a realização dos trabalhos de identificação dos ixodídeos e preparação dos materiais coletados.

À Prof. Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola, do Instituto Adolfo Lutz pelo incentivo, apoio, amizade e realização das PCRs.

À Prof. Dra Márcia Dalastra Laurentti do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da FM/USP pelo incentivo, apoio, amizade e realização dos testes ELISA.

Ao Dr. Lúcio de Oliveira Leite Vice-coordenador da Coordenadoria de Defesa Agropecuária da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo pela amizade e apoio.

Ao Dr. José Roberto Monteiro Gagliardo Diretor Técnico do Escritório de Defesa Agropecuária de Andradina pela amizade e apoio.

Ao Médico Veterinário Nilton Moraes Gonçalves diretor do Centro de Controle de Zoonoses do Município de Mirandópolis pelo auxílio na colheita de materiais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido.

Aos colegas da Pós-Graduação pelos momentos de descontração sem os quais essa jornada teria sido mais difícil.

Aos colegas da Coordenadoria de Defesa Agropecuária pelo apoio e amizade

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução. A leishmaniose visceral (LV) vem se apresentando como grave problema de saúde pública na região noroeste do Estado de São Paulo, desde o final da década de 90 e o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, reconhecido vetor da *Leishmania (Leishmania) infantum* agente etiológico dessa enfermidade, tem sido encontrado nos diversos municípios com transmissão dessa parasitose. Porém, em estudo realizado em 2004/2005 no município de Mirandópolis, localizado nesta região, este díptero foi encontrado em baixíssima freqüência, e por outro lado, observou-se uma soro-prevalência elevada, para leishmaniose visceral, em cães (60,8%), sugerindo que a maciça infecção na população canina antecedeu ao período deste estudo ou outros mecanismos de transmissão poderiam estar atuando. Dentre os possíveis mecanismos de transmissão, os envolvendo carrapatos e pulgas merecem especial atenção devido à alta freqüência e intimidade com que são observados nos cães. **Objetivo.** O presente estudo teve como objetivo avaliar a importância de ixodídeos e sifonápteros na transmissão e manutenção da leishmaniose visceral canina (LVC). **Método:** Dos cães recolhidos ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Mirandópolis, no período de agosto/2007 a maio/2008, depois de identificados por sexo, idade e condição clínica (assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos) e sacrificados de forma humanitária, coletou-se sangue, fragmento de linfonodo poplíteo e quando presentes, carrapatos e pulgas. Os ectoparasitos foram então separados por grupos taxonômicos e identificados quanto à espécie, sexo e fase de

desenvolvimento, no caso dos carrapatos. Foi realizado ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA) e reação da polimerase em cadeia (PCR) nas amostras obtidas dos cães e os ectoparasitas deles colhidos foram submetidos à PCR. Os resultados foram analisados pelos testes estatísticos: Índice de correlação de Pearson e Probit. **Resultados:** Dos animais amostrados, 64,22% eram sintomáticos, 28,44%, assintomático e 7,34%, oligossintomático. Foram reagentes pelo teste ELISA 78,08% e PCR 82,19%. A extração de DNA de todas as amostras, como confirmado por PCR, foi obtida com sucesso. Todas as pulgas encontradas foram da espécie *Ctenocephalides felis* e os carrapatos de *Rhipicephalus sanguineus*. Os ectoparasitas coletados dos cães com resultado negativo, também foram negativos na PCR. Na investigação da infecção natural nos ectoparasitas não foi observada a presença de flagelados nos artrópodes dissecados. Dos 60 cães positivos para a LVC, detectou-se DNA de *L. (L.) infantum* em 48 (sensibilidade de 80%). As correlações mais elevadas se deram entre os resultados dos testes empregados (ELISA e PCR) para detectar a presença da leishmaniose nos animais. Houve forte correlação entre a presença *L. (L.) infantum* nos cães e a presença desta leishmânia nos carrapatos, segundo os gêneros, no entanto foi menor a correlação entre o animal doente e a pulga, de ambos os sexos. As análises estatísticas com o teste Probit demonstraram que aparentemente, a fêmea do carrapato seria o principal fator de contaminação do cão pela *L.(L.) infantum* e que em pulgas de cães jovens é esperada a ausência deste parasita, efeito que tende a desaparecer em cães mais velhos. **Conclusão:** Os achados clínicos, o teste ELISA e a

PCR confirmaram a presença de *L.(L.) infantum* em mais de 60% dos animais analisados. A PCR realizada nos ectoparasitas confirma a presença de *L. (L.) infantum* em carrapatos e pulgas. Na avaliação clínica dos cães, 64,22% eram sintomáticos para LVC. As espécies de ectoparasitas e sua distribuição nos cães do presente estudo são semelhantes aquelas observadas em outros estudos. A análise estatística Probit atribui grande importância para a relação existente entre o cão e o carrapato fêmea e a contaminação por *L.(L.) infantum*. A presença de flagelados não foi evidenciada nas pulgas e carrapatos dissecados. Assim, embora a técnica de PCR tenha se mostrado sensível e específica na detecção de DNA de *Leishmania* nesses ectoparasitas, esta detecção não significa necessariamente que estes artrópodes são capazes de manter, multiplicar e transmitir esse protozoário. Portanto, mais estudos são necessários para demonstrar a competência vetorial desses artrópodes na transmissão da *L.(L.) infantum* aos cães.

SUMMARY

Introduction. Visceral leishmaniasis (VL) has been reported as a serious public health problem in the northwestern region of São Paulo state since the late 90's and the sandfly *Lutzomyia longipalpis*, a known vector of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, the etiological agent of this disease, has been found in several municipalities associated with transmission of the disease. However, in a study carried out in 2004/2005 in the city of Mirandópolis located in this region, this insect was found in very low frequency, and secondly, there was a high prevalence of sera reactive to visceral leishmaniasis in dogs (60.8%), suggesting that the massive infection in the canine population preceded the period of this study unless some other transmission mechanisms were acting. Among the possible mechanisms of transmission, the involvement of ticks and fleas deserve special attention due to their high frequency and close contact with dogs. **Objective.** This study aimed to evaluate the importance of ticks and fleas in the transmission and maintenance of canine visceral leishmaniasis (CVL). **Method:** Of the dogs captured by the Zoonosis Control Center of the City of Mirandópolis from August 2007 to May 2008, after identification by sex, age and clinical condition (asymptomatic, mildly symptomatic and symptomatic) and humanely euthanized, samples of blood, popliteal lymph node were collected and when present, ticks and fleas. These ectoparasites were then separated into taxonomic groups, the species and sex or stages of development of the ticks were identified. The samples taken from the dogs were submitted to

Enzyme Linked Immunosorbent Assay and the Polimerase Chain Reaction (PCR). The statistical tests used were Pearson's correlation Index and Probit.

Results: The rates of animals found to be positive by ELISA and PCR were, respectively, 78.08% and 82.19%. Of the total of the animals assessed 64.22% were symptomatic, 28.44% asymptomatic and 7.34% oligosymptomatic. The extraction of DNA from all the samples was confirmed by successful PCR. All the flea specimens found were *Ctenocephalides felis* and the ticks *Ripicephalus sanguineus*. All the ectoparasites collected from dogs with negative results, were also negative according to the PCR. In the investigation of natural infection in ectoparasites no flagellates were observed in the arthropods dissected. Out of the 60 dogs positive for VCL, the DNA of *L. (L.) infantum* was found in 48 of them (sensitivity of 80%). The highest correlation indices occurred between the two tests (ELISA e PCR) used to detect the presence of leishmania in the animals. A strong correlation was detected between the presence of *L. (L.) infantum* in the dogs and the presence of this parasite by sex in the ticks; however, the correlations were less evident between the sick animal and both flea sexes. The analysis showed that, according to Probit, the female tick is apparently the principal factor of contamination of dogs by *Leishmania (L.) infantum chagasi* whereas the probability of finding fleas contaminated by this parasite on young dogs is negligible, an aspect that is reversed in older dogs.

Conclusion: The clinical findings, the ELISA and PCR confirmed the presence of *L. (L.) infantum* in more than 60% of the animals examined. The PCR performed on ectoparasites confirms the presence of *L. (L.) infantum* in both ticks and

fleas. As to the clinical evaluation of dogs, 64.22% were symptomatic for CVL. The species of parasites and their distribution in dogs of this study are similar to those observed in other studies. The Probit statistical analysis attaches great importance to the relationship between dog and female tick and contamination by *L. (L.) infantum*. The presence of flagellates was not detected in the fleas and ticks dissected. Thus, although the PCR technique has been shown to be sensitive and capable of the specific detection of *Leishmania* DNA in these ectoparasites, this detection does not necessarily mean that these arthropods are able to maintain, multiply and transmit this parasite. Thus, further studies are necessary to demonstrate the vectorial competence of these arthropods in the transmission of this parasite to the canine population.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	14
	1.1 Agente etiológico	15
	1.2 Hospedeiros vertebrados	17
	1.3 Vetores	17
2	OBJETIVOS	22
	2.1 Objetivo Geral	22
	2.2 Objetivos específicos	22
3	MÉTODOS	23
	3.1 Área de Estudo	23
	3.2 Avaliação dos Cães	23
	3.3 Identificação dos ectoparasitos	25
	3.4 Avaliação da infecção natural em sifonapteros e ixodídeos.	26
	3.5 Reação em cadeia de polimerase	27
	3.6 Testes estatísticos	29
4	RESULTADOS	30
	4.1 Avaliação dos cães	30
	4.2 Avaliação dos ectoparasitas	31
	4.3 Avaliação da infecção natural em sifonapteros e Ixodídeos	33
	4.4 Resultado das PCR para os Ectoparasitas	33
	4.5 Resultados estatísticos	35
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO	49
7	REFERÊNCIAS	51
8	ANEXOS	59
	Anexo 1 – Teste Probit	59

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l - Microlitros

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

CEVS - Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul.

CVL – “Canine visceral leishmaniasis”

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DRS – Departamento Regional de Saúde Secretaria da Saúde do estado de São Paulo.

ELISA – Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFAT – Teste de imunofluorescência indireta

kDNA - DNA cinetoplastideal

LV - Leishmaniose visceral

LVC – Leishmaniose visceral canina

NaOH – Hidróxido de Sódio

nm - Nanômetros

PBS – Solução salina tamponada com fosfato.

PCR – Reação da polimerase em cadeia

PNPP - P-Nitrophenyl Phosphate

USP – Universidade de São Paulo

WHO – Organização Mundial de Saúde

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses que têm como agentes etiológicos cerca de 20 espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* Ross, 1903, da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, possuindo um flagelo e dois genomas: DNA nuclear e DNA cinetoplastideal (kDNA) (CORTES, 2008)

Conforme estimativas da Organização Mundial de Saúde, as leishmanioses ameaçam atualmente 350 milhões de pessoas em 88 países (WHO, 2010). Avalia-se que ocorra 1,5 a 2 milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar e 500 mil novos casos de leishmaniose visceral (LV) anualmente no mundo (WHO, 1990; 2010).

Cerca de 60% dos casos de LV ocorrem no subcontinente indiano (em Bangladesh, Índia e Nepal), principalmente entre as pessoas mais pobres nas zonas rurais. Os demais casos ocorrem predominantemente na África Oriental (Etiópia, Quênia e Sudão) e na América Latina (Brasil) (WHO, 2010).

No Brasil, a transmissão da LV está presente em inúmeros municípios das Regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste e recentemente, diagnosticada na Região Sul (CEVS, 2010). Nos últimos anos, a letalidade da LV no país vem aumentando gradativamente, passando de 3,6% no ano de 1994, para 6,7% em 2003, o que representa um incremento de 85%. Esse fato vem ocorrendo devido à expansão da epidemia que tem

acometido grupos de indivíduos jovens ou com co-morbididades, ocasionado número elevado de óbitos (BRASIL, 2006).

No Estado de São Paulo, a LV era conhecida apenas por meio de diagnóstico de casos, que após investigação eram identificados como importados (SÃO PAULO - ESTADO, 2006). Porém, no final da década de 90, na cidade de Araçatuba, localizada na região noroeste do Estado de São Paulo, foram detectados cães com suspeita clínica de leishmaniose visceral canina (LVC) e que após exame parasitológico confirmaram a presença de *Leishmania* sp. Esse fato e a constatação da presença de *Lutzomyia longipalpis*, reconhecido vetor do agente etiológico dessa enfermidade na América, desencadearam investigação epidemiológica que confirmou a transmissão autóctone da LVC em Araçatuba e, posteriormente, em outros municípios da região (SÃO PAULO - ESTADO, 2006).

O município de Mirandópolis localizado na região noroeste do estado de São Paulo e distante cerca de 70 Km de Araçatuba, com população estimada, em 2009, de 26.761 habitantes e área de 918 km² (IBGE, 2010), nos últimos dez anos contabilizou quarenta e sete casos de leishmaniose visceral em humanos, com três óbitos, porém no ano de 2009 não se registrou novos casos humanos neste município (CVE, 2010).

1.1 Agente Etiológico

Os parasitas do gênero *Leishmania* são protozoários digenéticos, tendo o seu ciclo de vida dividido entre hospedeiros invertebrados e vertebrados (PIMENTA et al., 2003).

Atribui-se a *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 a maioria dos casos da forma visceral na América. Entretanto, *L. (L.) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 foi isolada de medula óssea de caso humano na Bahia (BARRAL et al., 1986).

Análises de DNA indicaram que a *L.(L.) infantum*, espécie responsável pela leishmaniose visceral (LV) na Europa e a *L.(L.) chagasi* apresentam tanta semelhança que só poderiam ser separadas em nível sub-específico. (MAURÍCIO et al. 1999). Portanto, neste estudo utilizaremos a nomenclatura *L.(L.) infantum* que é a mais aceita hoje.

Parte do ciclo de vida da *Leishmania* nos mamíferos é intracelular e multiplicam-se sempre dentro do sistema monocítico fagocitário. Essa forma intracelular do protozoário é ovóide e apresenta um flagelo rudimentar, sendo denominada amastigota. A fêmea do flebotomíneo adquire as formas amastigotas durante o repasto sangüíneo em hospedeiro vertebrado infectado. Essas, no intestino médio do inseto, multiplicam-se por divisão binária e rapidamente se transformam em várias formas extracelulares. Parte destas se desenvolve em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes (LAINSON & SHAW, 1992; PIMENTA et al., 2003). Posteriormente, essas formas metacíclicas migram para a parte anterior do intestino médio, onde se concentram e ficam envolvidas por um gel de secretado por elas. Neste gel estão concentradas 75% das formas promastigotas metacíclicas presentes no inseto, essa mistura de promastigota e gel promove um bloqueio da probólide do inseto. Quando faz um novo repasto o inseto tem dificuldade para se alimentar e acaba

expelindo as formas metacíclicas infectando o novo hospedeiro (ROGERS et.al., 2002) No vertebrado, as formas infectantes são fagocitadas pelos macrófagos e dentro destes se multiplicam, por divisão binária. Assim se espalham por todo o corpo, principalmente baço, fígado, medula óssea e pele. O ciclo se mantém quando outro inseto se alimenta de sangue neste hospedeiro infectado e num posterior repasto em hospedeiro suscetível, transfere a infecção (LAINSON & SHAW, 1987).

1.2 Hospedeiros vertebrados

Na LV do continente americano, o cão tem sido apontado como o mais importante reservatório doméstico, principalmente por sua proximidade com o homem (DEANE, 1955). Entre os animais silvestres, *Cerdocyon thous*, *Didelphis albiventris* e *D. marsupialis* são considerados como reservatórios de *L.(L.) infantum* (DEANE, 1955; LAINSON et al.,1990; SHERLOCK et al., 1984).

Os sinais clínicos clássicos da leishmaniose visceral canina (LVC) são: lesões cutâneas acompanhadas principalmente por alopecias generalizadas ou locais; descamações ou eczemas, particularmente no focinho e orelhas; pelos opacos; pequenas úlceras rasas, localizadas mais freqüentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações. Com o avanço da doença observa-se também aumento do volume dos linfonodos, onicogribose, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, vômitos e edemas das patas e hiperqueratose. Na fase final ocorre paresia das patas posteriores e caquexia, inanição e morte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; COUTINHO, 2003).

Segundo classificação proposta por MANCIANTI et al. (1988) os estágios clínicos de animais leishmaniose visceral canina (LVC) compreendem:

Assintomáticos: aqueles animais com ausência de sinais e sintomas sugestivos de leishmaniose;

Oligossintomático: adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pêlos opacos;

Sintomáticos : alguns ou todos os sinais severos da doença.

1.3 Vetores

Os vetores da leishmaniose compreendem insetos hematófagos, nematóceros, de diferentes gêneros e várias espécies da subfamília Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) (DEDET, 1993). Apresentam portes reduzidos, cujo comprimento raramente ultrapassa 0,5 cm. São densamente pilosos e esse aspecto constitui característica geral do grupo (FORATTINI, 1973).

Nas Américas, são conhecidas cerca de 500 espécies de flebotomíneos (GALATI 2003), das quais aproximadamente 40 foram relatadas como possíveis vetores das leishmanioses (PIMENTA et al., 2003).

Entre os inúmeros flebotomíneos que têm sido incriminados e/ou comprovados como vetores de *Leishmania* no Brasil, destaca-se para a *L.(L.) infantum* a espécie *Lutzomyia longipalpis*, como a mais importante; seguida de *Lutzomyia cruzi* (GALATI et al., 1997; SANTOS et al., 1998; PITA-PEREIRA et al., 2008) e em Corumbá, suspeita-se de *Lutzomyia forattinii* (GALATI et al., 1997; PITA-PEREIRA et al., 2008).

Porém, em áreas onde a ocorrência de flebotomíneos não foi observada, ou onde só se encontra ou predomina a LVC, levanta-se a suspeita de outras modalidades de transmissão entre esses animais (SHERLOCK, 1964). Entre esses possíveis mecanismos destacam-se a pulga *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) e o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1829) devido à frequência e intensidade com que ambos ocorrem em cães (COUTINHO et al., 2005).

O papel das pulgas e carrapatos na veiculação de doenças ao homem ou na manutenção de epizootias entre animais é bastante conhecido e pode ser interpretado em dois níveis: como vetor biológico ou como hospedeiro intermediário (FORTES, 1997; LINARDI & GUIMARÃES, 2000).

Em trabalho realizado em Belo Horizonte, LINARDI & NAGEN (1973) observaram que as espécies de ectoparasitos com maior índice de infestação específico em cães são: *C. felis felis* (87%), *Pulex irritans* Linnaeus, 1758 (60,28%) e *R. sanguineus* (32%).

Além dos vetores reconhecidos de parasitos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, pulgas e carrapatos das espécies *C. felis felis* e *R. sanguineus* já foram encontradas albergando tripanosomatídeos dos gêneros *Leptomona sp* e *Blastocrithidia christophersi*, respectivamente (COUTINHO, 2003).

Recentemente, COUTINHO et al. (2005; 2007), em trabalho com *C. felis felis* e *R. sanguineus* observaram que 1,9% dos esfregaços produzidos a partir de pulgas dessa espécie retiradas de animais naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* apresentaram formas promastigotas de

Leishmania. Os resultados das análises de DNA para *Leishmania*, obtidos de ectoparasitos retirados, também, de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* foram positivos em 29,9% das pulgas e 15,4% dos carrapatos. Nestes estudos, ainda, foram realizadas inoculações por via peritoneal e oral de macerados de pulgas e carrapatos em hamsters, tendo-se como resultado da reação em cadeia da polimerase (PCR) para os macerados de *C. felis felis* 77% de animais positivos para a inoculação peritoneal e 23% para a via oral. Já, o teste da PCR de hamsters inoculados com macerado de *R. sanguineus* mostrou-se positivo em 81% das inoculações peritoneais e 29,4% por via oral. No entanto permaneceu a dúvida quanto ao agente etiológico, pois o PCR poderia dar reação cruzada entre *Leishmania sp.* e *Leptomona sp.* Necessitando, portanto de novos estudos para elucidar essas questões.

No final da década de 90, foram descritos os primeiros casos de LV na região noroeste do Estado de São Paulo, os quais seguem de forma crescente, até o ano de 2006, totalizando 386 casos, nas regiões cobertas pelas DRS VI Araçatuba, DRS X Bauru, DRS XIV Adamantina (CVE, 2010).

Mirandópolis, município pertencente à DRS VI, foi alvo de estudo em duas oportunidades em 2000 e 2004/05 (KANETO, 2000; ODORIZZI, 2006). Observou-se uma grande redução da densidade de flebotomíneos capturados (de 549 *Lu. longipalpis* em 2000 para 55 em 2004/05) e um aumento significativo de cães soro reagentes, de 1,7% em 2000 para 60,8% em 2005.

A baixa frequência de *Lu. longipalpis* durante o segundo período de estudo e por outro lado, a prevalência elevada da infecção canina no município, sugeriram que a maciça infecção na população canina antecedeu ao período deste estudo ou outros mecanismos de transmissão poderiam estar atuando.

Durante o estudo foi observada a presença constante de ectoparasitos nos cães do município, principalmente carrapatos, e pulgas em menor quantidade. Tais evidências suscitaram a hipótese de que ixodídeos e sifonápteros poderiam estar atuando como mecanismos de transmissão da *L. (L.) infantum* entre os cães ou influenciando nos resultados dos testes sorológicos, uma vez que estes artrópodes já foram encontrados parasitados por tripanosomatídeos e poderiam apresentar reações falso positivas.

A capacidade de pulgas e carrapatos de transmitirem o agente da LV quando ingeridos ou inoculados por via peritonal foi demonstrada por COUTINHO em 2005; 2007, porém permaneceu a dúvida quanto aos testes de imunofluorescência indireta (IFAT) e PCR por apresentarem reação cruzada entre *Leishmania sp.* e *Leptomonas sp.*

Assim, pareceu-nos importante realizar um novo estudo para tentar elucidar estas dúvidas e testar a competência vetorial de carrapatos e pulgas e perpetuação da infecção entre os cães.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o papel de sifonápteros e ixodídeos na manutenção da infecção por *Leishmania (L.) infantum* nos cães.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Avaliar os canídeos conforme sua condição clínica e quantificar a prevalência da leishmaniose visceral canina nos animais recolhidos ao Centro de Controle e Zoonose (CCZ) de Mirandópolis.
- 2.2.2 Identificar os sifonápteros e ixodídeos na população canina do CCZ de Mirandópolis, bem como avaliar a densidade e distribuição desses artrópodes no corpo dos animais;
- 2.2.3 Avaliar a prevalência de *L. (L.) infantum* em sifonápteros e ixodídeos retirados dos cães.
- 2.2.4 Investigar a correlação entre a infecção pela *L. (L.) infantum* nos cães e nos ectoparasitas.

3 MÉTODO:

3.1 Área de estudo

Os estudos foram realizados no município de Mirandópolis, com extensão territorial de 920 km², localizado na região noroeste do Estado de São Paulo, distante 600 km da capital do Estado. A sede municipal situa-se a 21°08'01" S e 51°06'06" O, em altitude de 429 m acima do nível do mar (IBGE, 2010).

O clima é tropical, quente e úmido, com inverno seco (tipo Aw, segundo classificação de Koeppen). A precipitação total média no período de abril de 1996 a 21/07/2010 foi de 1.544 mm; na estação quente e chuvosa (outubro - abril), as temperaturas médias variaram entre 25,1-27,6 °C; a precipitação total média foi de 2020,8 mm e mensal média de 143,7 mm e no período seco e frio (maio – agosto), as temperaturas médias variaram entre 21,6-23,6 °C, a chuva total média foi de 590 mm e mensal média de 40,1 mm (CIIAGRO, 2010).

3.2 Avaliação dos cães

Foram coletadas amostras biológicas e ectoparasitas de cães capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município, no período de agosto de 2007 a maio de 2008.

Os animais foram identificados, quanto à idade, sexo e procedência. A seguir, avaliados em relação ao aspecto clínico em três grupos:

sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos conforme classificação de MACIANTI et al. (1988).

Os cães foram sedados com xilazina e sacrificados com cloreto de potássio e então, realizada a colheita dos ectoparasitos, com o auxílio de pinças, em toda a extensão do corpo dos animais. Intensificou-se a busca nos locais onde sabidamente ocorrem os diferentes ectoparasitos - para os carrapatos: entre os dedos, na face interna do pavilhão auricular e nas axilas; para as pulgas: na região próxima à cauda e do pescoço.

Após a retirada dos ectoparasitas, os animais foram necropsiados e colhidas as amostras de sangue em tubo plástico sem anticoagulante e fragmentos de linfonodo poplíteo que foram acondicionados em tubos plásticos com solução fisiológica e congelados.

3.2.1 ELISA para pesquisa de IgG anti-leishmânia em soro de cão

As amostras de soro, obtidas após a coagulação e centrifugação do sangue, foram testadas pelo ensaio de imunoadsorção ligado à enzima ou (ELISA) no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da USP.

A determinação de IgG anti-leishmânia foi realizada utilizando-se microplacas de poliestireno de fundo plano de 96 poços que foram sensibilizadas com um volume de 100µL de antígeno solúvel de promastigotas de *L. (L.) infantum* na concentração de 10µg/ml de proteína, em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M; pH 9,5; e incubadas em câmara úmida durante a noite a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas três vezes com 200µl por poço de Solução Tampão Fosfato 0,15M; pH 7,2; contendo

0,05% de Tween-20 (PBS-T). O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com solução de leite em pó desnatado (MOLICO[®]) a 10% em PBS-T (200µl por poço) e as placas incubadas em câmara úmida durante 2 horas a 37°C.

A seguir, as placas foram lavadas novamente três vezes com PBS-T. As amostras de soro de leite e de controles positivos e negativos foram adicionadas à placa, em duplicata, no volume de 100µl por poço, na diluição de 1:400 em PBS-T e incubadas a 37°C durante 1 hora em câmara úmida. Após uma segunda lavagem por três vezes com PBS-T, adicionou-se conjugado anti-IgG de cão ligado à fosfatase alcalina (BETHIL, USA) no volume de 100µl por poço (na diluição de 1:2000 em PBS-T). As placas então foram incubadas a 37°C, durante 45 minutos em câmara úmida e novamente foram lavadas três vezes com PBS-T.

O revelador contendo o substrato e o cromógeno (1,0 mg/mL de PNPP em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,5) foi adicionado no volume de 100µl por poço e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. E, por fim, a reação foi interrompida com 50µl de NaOH 3M por poço, sendo a leitura da absorbância feita em filtro de 405nm (Multiskan EX da Labsystems[®]).

3.3 Identificação dos ectoparasitos

Os ectoparasitos coletados foram separados por grupos taxonômicos, em frascos longos com tampa de borracha.

Os frascos foram levados ao Laboratório de Parasitologia da Universidade “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Araçatuba, onde as pulgas foram identificadas quanto a espécie ao sexo, utilizando a metodologia de

LINARDI & GUIMARÃES (2000) e os carrapatos, quanto a espécie e ao estágio de desenvolvimento e no caso dos adultos, quanto ao sexo, segundo ARAGÃO (1936) e depois contados.

3.4 Avaliação da infecção natural em sifonápteros e ixodídeos.

Logo após a captura, sifonápteros e ixodídeos foram imobilizados utilizando-se gelo. As pulgas foram dissecadas segundo a metodologia descrita por LINARDI & GUIMARÃES (2000) e os carrapatos, aquela utilizada por COUTINHO (2003).

As pulgas foram dissecadas utilizando-se o método de imobilização com gelo, insensibilização e abertura da parte posterior do abdômen, com o auxílio de agulhas e exposição do intestino, tubos de Malpighi em lâmina e foram coradas por Giemsa.

Os carrapatos, machos e fêmeas, adultos, foram colados com “super bonder[®]” em placas de Petri com o abdômen voltado para baixo e cobertos com solução salina. Tiveram toda a parte lateral do idiossoma aberta com estilete entomológico rebatendo-se anteriormente a parte superior do idiossoma para visualização do sistema digestório.

O sistema digestório de alguns artrópodes foi transportado para lâmina de vidro contendo solução fisiológica e coberto com lamínula para investigação, ao microscópio, da infecção natural por flagelados.

Os demais sifonápteros e ixodídeos depois de identificados e separados segundo sexo e/ou estágio de desenvolvimento foram acondicionados adequadamente em tubos plásticos com tampa e então enviados ao Instituto Adolfo Lutz para análise molecular por PCR, segundo

protocolo da Dra. Vera L. P. Chioccola para a identificação da espécie de *Leishmania*.

3.5 Reação em cadeia de polimerase

3.5.1 Extração de DNA

As amostras de ectoparasitas e linfonodos dos cães foram processadas conforme protocolo básico de extração de DNA descrito por SAMBROOK et al. (1989) e com as modificações previamente descritas por GOMES et al. (2007).

As amostras foram maceradas e dissolvidas em tampão de lise (This-HCl, 10 mM, pH 8.0; EDTA 10mM; SDS, 0,5%; N-laurilsarcozil, 0,01%; proteinase K, 100µg/mL) e incubados em banho-Maria a 56°C de uma a quatro horas, até a lise completa do tecido.

Moléculas de DNA foram extraídas pelo protocolo fenol/clorofórmio/isoamil e precipitado com isopropanol. A seguir, as moléculas de DNA foram dissolvidas em água pura, após lavagem com etanol a 70% a 10.000g por 10 minutos. A concentração de DNA e a qualidade das extrações foram verificadas por Nanodrop.

3.5.2 PCR

As reações de amplificação foram realizadas com auxílio de um kit (Promega®), conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA e os iniciadores apropriados para cada experimento foram adicionados ao kit e colocados no termociclador. As amostras de DNA foram testadas com um marcador molecular 150-152, que amplifica um fragmento de 120 pb da

região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania spp* (PASSOS et al., 1999).

A PCR foi composta de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento de 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. As reações foram finalizadas com um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

A identificação de *L. (L.) infantum* foi realizada utilizando o marcador molecular RV1-RV2, que amplifica um fragmento de 145 pb de uma região variável do minicírculo do kDNA (região LT1), específica para o complexo *L. (L.) donovani* (Ravel et al., 1995; Gomes et al., 2007).

As amplificações foram compostas de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidas de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento de 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. As reações foram finalizadas com um ciclo de extensão a 72°C por 5 minutos. Foram adotadas medidas de controle em todas as etapas da reação. A cada conjunto de reações foi adicionado dois controles negativos, um contendo apenas água pura e outro com DNA extraído de amostra sabidamente negativa para *Leishmania spp.*; e um controle positivo, uma amostra sabidamente positiva para *L. (L.) infantum*.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em géis de agarose a 2% e corados com brometo de etídio. A seguir, os fragmentos foram visualizados sob iluminação ultravioleta. As imagens foram analisadas por um equipamento Mini Bis Gel Imager and Documentation

(BioSystematica). Os tamanhos dos fragmentos foram baseados comparando-se com um marcador de tamanho molecular de 100 bp.

3.6 Testes estatísticos

Uma primeira tentativa para correlacionar as variáveis escolhidas foi realizada, pelo índice de correlação de Pearson (r), que correlaciona todas as variáveis coletadas umas às outras em pares. A validade dos resultados deve, todavia, ser apreciada pelo pesquisador caso a caso uma vez que o teste nada diz sobre o tamanho das amostras e não aborda o problema das correlações espúrias.

Além da correlação de Pearson procedeu-se ainda o teste Probit para identificar quais os ectoparasitas, no caso das pulgas conforme o sexo e para os carrapatos, as fases evolutivas presentes no cão, que poderiam contribuir para que os cães fossem infectados. Para tanto foi utilizada a versão 3.0 do programa econometric views.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação dos cães

Foram avaliados clinicamente 109 canídeos, 70 (64,22%) sintomáticos, 8 (7,34%) oligossintomáticos e 31 (28,44%) assintomáticos. Destes, em uma amostra de 73 cães (17 assintomáticos, 6 oligossintomáticos e 50 sintomáticos), a partir do soro sanguíneo, foram realizados os testes ELISA. Resultaram positivos no teste 78,08% das amostras. Segundo a condição clínica, foram positivos: assintomáticos (82,35%), oligossintomáticos (50,0%) e sintomáticos (80,0%). Dentre os que apresentaram ELISA positivo, 24,56% eram assintomáticos, 5,26% oligossintomáticos e 70,18% sintomáticos (Tabela I)

Tabela I. Número e percentual de cães testados por ELISA, conforme a classificação clínica.

Sintomas Teste	Assintomáticos		Oligossintomáticos		Sintomáticos		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
ELISA +	14	24,56	3	5,26	40	70,18	57	100,0
ELISA -	3	18,75	3	18,75,0	10	62,50	16	100,0
TOTAL	17	23,3	6	8,2	50	68,5	73	100,0

Da amostra também formada por 73 cães (22 assintomáticos, 6 oligossintomáticos e 45 sintomáticos) foi feita a PCR com fragmentos de linfonodo poplíteo. Foram positivos na PCR 82,19% das amostras; dentre os assintomáticos (63,36%), oligossintomáticos (83,3%) e sintomáticos

(91,11%). Para os que apresentaram PCR positiva, 23,3% eram assintomáticos, 8,3% oligossintomáticos e 68,4% sintomáticos (Tabela II)

Tabela II. Número e percentual de cães testados por PCR conforme a classificação clínica.

Sintomas Teste	Assintomáticos		Oligossintomáticos		Sintomáticos		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
PCR +	14	23,3	5	8,3	41	68,4	60	100,0
PCR -	8	61,5	1	7,7	4	30,8	13	100,0
TOTAL	22	30,1	6	8,2	45	61,7	73	100,0

4.2 Avaliação dos Ectoparasitas.

Todos os cães recolhidos ao CCZ de Mirandópolis, no período de estudo, passaram pela avaliação para detecção da presença de ectoparasitos, carrapatos e ou pulgas.

Dos 109 animais avaliados, 30 (27,52%) não tinham os ectoparasitas sob investigação, Dos animais que apresentavam algum ectoparasita, 5 (6,33%) tinham apenas pulgas, 33 (41,77%), apenas carrapatos e 41 (51,90%), os dois artrópodes.

Tabela III - Avaliação dos cães quanto à presença de sifonápteros.

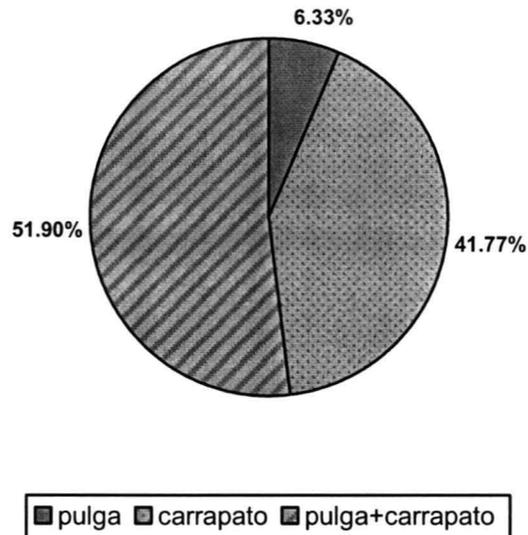
Presença	Sifonápteros	
	N	%
Sim	46	42,20
Não	63	57,80
Total	109	100,00

Tabela IV – Avaliação dos cães quanto à presença de ixodídeos.

Presença	Ixodídeos	
	N	%
Sim	74	67,88
Não	35	32,12
Total	109	100,00

A prevalência de pulgas e carrapatos nos animais com a presença dos ectoparasitas pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 - Prevalência de artrópodes nos cães recolhidos no CCZ de Mirandópolis – SP. De agosto de 2007 a maio de 2008.



Um total de 1.483 carrapatos foram coletados e identificados sendo 720 machos, 414 fêmeas da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, além de 29 larvas e 320 ninfas deste ixodídeo.

Todos os sifonápteros coletados foram identificados totalizando 336 indivíduos, destes 253 eram fêmeas e 83 machos da espécie *Ctenocephalides felis felis*.

4.3 Avaliação da infecção natural em sifonápteros e ixodídeos

Apesar das tentativas de visualização de protozoários não conseguimos encontrar em nenhuma das 40 pulgas e dos 20 carrapatos dissecados qualquer forma de flagelados.

4.4 Resultado das PCR para os Ectoparasitas

Foram submetidas à reação em cadeia de polimerase (PCR) para identificação de *Leishmania* as amostras de ectoparasitas coletados de 73 cães. Na tabela V são apresentados os resultados dos testes nos cães segundo os seus ectoparasitas.

Tabela V – Presença de *Leishmania*, detectada pela PCR, em cães e seus ectoparasitas.

Ectoparasitas	Cão		TOTAL
	PCR Positiva	PCR Negativa	
PCR positiva	48	0	48
PCR negativa	12	13	25
TOTAL	60	13	73

Sessenta e duas amostras de sifonápteros foram testadas para *Leishmania (L.) infantum*, cujos resultados constam tabela VI.

Tabela VI – Resultado da PCR para *L.(L.) infantum* nas amostras de sifonápteros colhidas dos cães do CCZ de Mirandópolis de agosto de 2007 a maio de 2008.

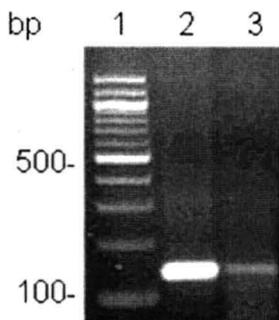
PCR	<i>L. (L.) infantum</i>	
	N	%
Positiva	20	32,25
Negativa	42	67,75
Total	62	100

Duzentas e oito amostras de carrapatos foram submetidas à PCR para detecção de *L.(L.) infantum*, sendo os resultados apresentados na Tabela VII.

Tabela VII – Resultado da PCR para *L. (L.) infantum* das amostras de ixodídeos colhidas em cães do CCZ de Mirandópolis de agosto de 2007 a maio de 2008.

PCR	Ixodídeos									
	Macho		Fêmea		Ninfa		Larva		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Positiva	30	41,1	52	57,7	23	56,1	0	0	105	50,5
Negativa	43	58,9	38	42,3	18	43,9	4	100	103	49,5
Total	73	100	90	100	41	100	4	100	208	100

Figura 2: Produtos de PCR amplificados analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. As reações foram realizadas em DNA extraído de um cão positivo para leishmaniose (coluna 2) e de carrapatos fêmeas retirados do mesmo cão (coluna 3). A coluna 1 mostra o padrão de tamanho molecular de 100 bp.



4.5 Resultados estatísticos

Na análise de correlação de Pearson, as correlações mais elevadas se deram entre os resultados positivos e os resultados negativos dos testes empregados para detectar a presença da leishmaniose nos animais. Assim, temos:

	sorocão	<i>Linfantumcão</i>
Sorocão	1	
<i>Linfantumcão</i>	0,6779	1

A correlação indica que, em média, o cão soropositivo possui *L.(L.) infantum*.

Outro resultado importante é que há uma forte correlação entre a presença *L.(L.) infantum* no cão e a presença do mesmo microorganismo

nos carrapatos, segundo os gêneros. Todavia, houve uma menor correlação entre o animal doente e a pulga, de ambos os sexos, com *L.(L.) infantum*.

	Caosoro	cão <i>Linfantum</i> PCR
Pulga <i>L.infantum</i>	0,1271	0,4995
carmacho <i>Linfantum</i>	0,3351	0,3351
carfemea <i>Linfantum</i>	0,4266	0,4710
carNinfa <i>Linfantum</i>	0,5505	0,5505

Dado o pequeno número de larvas de carrapato, não foi possível obter o índice de correlação de Pearson entre elas e os resultados para os cães, motivo pelo qual, foram omitidos da tabela acima.

Note-se, ainda, que há elevadas correlações entre a *Leishmania* detectada e entre os ectoparasitos: o cão que possui carrapatos machos infectados com *L.(L.) infantum*, também possuirá carrapatos fêmeas com este parasita; além disto, os cães com carrapatos fêmeas portadoras de *L.(L.) infantum* terão, também, ninfas com o mesmo parasita.

	Pulga <i>Linfantum</i>	Carmacho <i>Linfantum</i>	Carfemea <i>Linfantum</i>
Pulga <i>Linfantum</i>	1,0000		
Carmacho <i>Linfantum</i>	0,1826	1,0000	
Carfemea <i>Linfantum</i>	0,2626	0,5222	1,0000
Ninfa <i>Linfantum</i>	0,0000	0,3118	0,6630

Teste Probit:

Os testes Probit obtidos a partir da versão 3.0 do programa econometric views estão descritos no ANEXO I.

Resumidamente os resultados encontrados com a utilização dessa ferramenta são os que se seguem.

Probit/cães

Sorologia:

Para os resultados sorológicos, o número de carrapatos machos por animal e a relação entre o número de pulgas fêmeas e de pulgas machos geram efeitos negativos para a contaminação;

É possível que, contando com um número maior de observações, se perceba também um efeito positivo do número de carrapatos de sexo feminino sobre a contaminação detectada pela sorologia. Com a amostra em questão, esta possibilidade foi rejeitada;

PCR :

A contaminação por *L.(L.) infantum* da amostra em questão tende a ter uma relação direta com a idade do animal, havendo um efeito negativo da probabilidade de contaminação em função do número de carrapatos de sexo masculino.

Probit/Ectoparasitas

Analisando-se a presença da *L.(L.) infatum*, segundo esta mesma presença nos ectoparasitos, separados segundo espécie (pulga e carrapato) e segundo a fase do ciclo de vida (carrapato adulto macho, carrapato adulto fêmea, ninfa e larva), foram obtidos os seguintes resultados:

Pelo pequeno número de análises para *L.(L.) infantum* em larvas de carrapatos, o programa econométrico não foi capaz de obter estatística alguma;

Aparentemente, a fêmea do carrapato é o principal fator de contaminação pela *L.(L.) infantum*. Os testes feitos para a *L.(L.) infantum* atribuem grande importância para a relação existente entre o cão e o carrapato fêmea.

Probit / Ixodídeos

Começando pelos carrapatos machos com *L.(L.) infantum*, tem-se os resultados abaixo:

Fazendo uso da distribuição probit, verifica-se, que a detecção, por PCR, de *L.(L.) infantum* no grupo de carrapatos machos capturados em um cão pode ser explicada pela idade do animal em que o grupo foi colhido e pela própria contaminação do cão pelo mesmo microorganismo.

Realizando o mesmo exercício para o caso das fêmeas contaminadas por *L.(L.) infantum*, tem-se os resultados abaixo:

O que os resultados apresentados indicam é: uma boa adequação do modelo e um bom ajustamento aos dados. No entanto, distintamente do caso dos carrapatos machos, a idade não parece ser um bom regressor.

Excluindo-se a idade, verifica-se que a presença de contaminação por *L.(L.) infantum* no grupo de fêmeas de carrapato extraídas de cada cão é dependente da contaminação do próprio cão, independentemente da idade que possua.

Por outro lado, a presença de resultados negativos para o PCR para *L.(L.) infantum* no cão reduz substancialmente a probabilidade de contaminação do grupo de carrapato fêmea, o que se infere pelo sinal negativo da variável C, cujo estimador não foi rejeitado.

Probit /Sifonápteros

Para determinar o que, entre as variáveis disponíveis, contribui para que o grupo de pulgas retirado de determinado cão tenha resultado positivo em PCR para *L.(L.) infantum*, procedeu-se às regressões de estilo, sendo que a que melhor respondeu ao parâmetros esperados foi a seguinte:

A maior idade dos cães contribui para a obtenção de resultados negativos para *L.(L.) infantum* nas pulgas, mas os efeitos tendem a ser cada vez menores na medida em que a idade avança. Por fim, a chance de o grupo de pulgas ter a *L. (L.) infantum* é fortemente influenciado pela leishmaniose no cão.

Assim, nos grupos de pulgas extraídos de cães novos espera-se a ausência de *L. (L.) infantum*, efeito que tende a desaparecer na medida em que o tempo passa em função de idade², isto é, o quadrado da idade do cão. No que respeita ao cão com *L. (L.) infantum*.

5. DISCUSSÃO

No Estado de São Paulo LVC vem se expandindo desde a sua primeira notificação em 1998. Até 2005 foram notificados casos de LVC em 45 municípios ocorrendo em seis regiões administrativas: Araçatuba, Bauru, Marília Presidente Prudente, Grande São Paulo e São João da Boa Vista (SÃO PAULO - ESTADO, 2006).

Os cães que foram utilizados nesse estudo são procedentes do CCZ de Mirandópolis, portanto, cães que sofreram eutanásia ou por solicitação dos proprietários ou por apresentarem situação clínica compatível com a LVC ou ainda, por já apresentarem resultado positivo para doença pela RIFI em inquérito realizado pela Prefeitura de Mirandópolis.

Essa situação explica o alto índice de animais positivos tanto no teste ELISA (78,08%) quanto na PCR (82,19%) como apresentado nos resultados. No entanto, ODORIZZI, em 2006, encontrou alta prevalência de animais positivos para LVC (60,8%) no município de Mirandópolis quando comparado com os resultados de KANETO em 2001 (1,7%).

Fato semelhante foi observado por SILVA et al. (2001), na região metropolitana de Belo Horizonte, onde observou 64,6% de positividade contra 3,6% estimada pela Secretaria de Saúde de Belo Horizonte entre 1994 e 1998.

Com relação aos ectoparasitas encontrados (Siphonaptera e Ixodidae) no presente estudo, foi observado que todos os ixodídeos eram da espécie

R. sanguineus, talvez devido ao fato de que todos os cães avaliados eram procedentes de área urbana. Este achado vai de encontro aos de MASSARD et al. (1981), que ao estudarem as parasitoses de cães, no período 1976 - 1980, no Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Espírito Santo e São Paulo, verificaram que aqueles que viviam nas áreas urbanas desses estados, quando parasitados por carrapatos, eram unicamente da espécie *R. sanguineus*; e de LABRUNA et al. (2001) que afirma que a espécie em questão é a mais comum em ambiente urbano.

Os sifonápteros observados, nesse estudo, eram todos da espécie *C. felis felis* o que também foi observado por SOARES et al. (2006).

Tanto os cães quanto os ectoparasitas deles colhidos foram testados pela PCR seguindo o protocolo descrito. Obteve-se com sucesso a extração de DNA de todas as amostras como confirmado por PCR de genes de ectoparasitos. Todas as pulgas e carrapatos, coletados a partir de cães com resultado negativo (13), também foram negativas.

Já para a presença do protozoário, considerando os cães positivos para LVC, fomos capazes de detectar DNA de *L. (L.) infantum* de ectoparasitas coletados em 48 de 60 cães (sensibilidade de 80%). Das sessenta e duas amostras de sifonápteros submetidas a PCR, 32,3% foram positivas para *L.(L.) infantum* e das 208 amostras de carrapatos, 41,1% dos machos, 57,7% das fêmeas, 56,1% das ninfas também apresentaram resultados positivos.

Uma primeira tentativa para correlacionar as variáveis escolhidas foi realizada pelo índice de correlação de Pearson (r), que correlaciona todas as variáveis coletadas umas às outras em pares.

Pelo índice de correlação de Pearson, as correlações mais elevadas se deram entre os resultados positivos e os resultados negativos, dos testes empregados para detectar a presença da leishmaniose nos animais.

Outro resultado importante é que há uma forte correlação entre os resultados que detectam a presença de *L.(L.) infantum* no cão e a presença do mesmo microorganismo nos carrapatos segundo os gêneros, sendo menor a correlação entre o animal doente e a pulga, de ambos os sexos, com a *Leishmania*.

Estes dados mostram a presença de *L. (L.) infantum* em carrapatos e pulgas, o que pode sugerir uma possível importância desses ectoparasitas na manutenção da LVC entre os cães.

Ao afirmar o encontro de tripanosomatídeos em pulgas e carrapatos deve-se estar ciente da importância da identificação segura das espécies envolvidas (COUTINHO 2003). Nas primeiras décadas do século XX, diversos estudos citados por CUNHA (1914) e WENTON (1926) relatam o encontro de formas de *Leishmania* em pulgas *C. felis felis*, e *apud* (COUTINHO, 2003), esses autores comprovaram que ocorreu a transmissão, naturalmente ou experimentalmente da *Leishmania* entre cães, a partir de pulgas. No entanto, deve-se considerar a possível influência do recém descrito *Trypanosoma caninum* (MADEIRA et al., 2009; PINTO et al., 2010)

nos resultados de transmissão experimental realizados no início do século passado.

Mesmo que possamos pensar na probabilidade de erros cometidos na identificação da *Leishmania*, em função dos recursos presentes naquela época, ainda assim, segundo COUTINHO (2003), sabe-se que formas de *Leptomonas*, *Herptomonas* e *Blastocrithidia* não são encontradas em hospedeiros vertebrados, uma vez que apresentam ciclos monoxênicos.

Atualmente com o advento da PCR, que é uma ferramenta de grande sensibilidade e especificidade no diagnóstico da leishmaniose, uma vez que pesquisa o DNA do parasito, temos mais segurança em afirmar a presença desse tripanosomatídeo em artrópodes.

No presente estudo utilizamos a PCR para identificar a presença de *Leishmania* nos carrapatos e pulgas colhidos dos cães em Mirandópolis. E obtivemos 32,25% das amostras de pulgas positivas para *Leishmania*. No caso dos carrapatos, 50,5% das amostras testadas pela PCR foram positivas. Alguns estudos já utilizaram a PCR para identificar a presença de *Leishmania* em flebotomíneos (PAIVA et al., 2006, PITA-PEREIRA et al., 2008; SAVANI et al., 2009), em sifonáptero e ixodídeos (COUTINHO et al., 2005, 2007).

Pulgas da espécie *C. felis* foram retiradas de cães sabidamente positivos pelos testes ELISA e RK-39 para LVC por FERREIRA et.al. (2009). As pulgas, foram maceradas e inoculadas por via peritonal em hamsters. Quatro meses pós-infecção os hamsters foram sacrificados e testados por

ELISA e PCR. Resultou positivo em 18,1% (4/22) dos testes PCR + ELISA; 45% (10/22) dos PCR; e 9% (2/22) só ELISA. Tais resultados sugerem, portanto, a participação de pulgas de cão no ciclo da LVC.

A competência vetorial de *R. sanguineus* na transmissão do agente da LVC por meio de experimento controlado em laboratório foi avaliada por PAZ et.al. (2010). Um cão sadio (livre de *Leishmania*) e dois naturalmente infectados por *Leishmania* foram infestados com *R. sanguineus* nos diferentes estágios de desenvolvimento. Larvas alimentadas, ninfas alimentadas ou não, adultos em jejum e alimentados foram coletadas dos animais em experimentação e investigados para a infecção por *Leishmania* por microscopia óptica, PCR e cultura do parasita. Formas de *Leishmania* não foram detectadas em nenhum dos 433 esfregaços preparados a partir de espécimes alimentados, nem em qualquer um dos 118 esfregaços preparados a partir daqueles em jejum. Todas as amostras de *R. sanguineus* que haviam se alimentado em cães infectados foram PCR positiva para DNA de *Leishmania*, com a única exceção do pool de larvas ingurgitadas. Em contraste, todos os pools de carrapatos que haviam se alimentado no cão sadio (livre de *Leishmania*) foram PCR-negativo. O crescimento de *Leishmania* não foi observado em nenhuma das amostras de carrapatos inoculadas em meio de cultura. Assim os autores concluem que a manutenção e multiplicação de *Leishmania* no carrapato é pouco provável, tendo em vista que não foram identificados em nenhum dos campos microscópicos meticulosamente analisados, formas de *Leishmania* provenientes de carrapatos ingurgitados.

No presente estudo, os resultados obtidos são semelhantes aos apresentados por PAZ et.al. (2010), pois as amostras dos ectoparasitas retiradas dos 13 cães negativos nos testes empregados foram todas negativas na PCR.

Outro ponto em comum, diz respeito à não observação em microscopia ótica da presença de tripanosomatídeos em esfregaços. No presente estudo, Isso pode ter ocorrido devido a pouca experiência para visualizar as formas ou mesmo à ausência do protozoário nas amostras. No entanto, COUTINHO et al. (2005), num total de 39 amostras (6 fêmeas, 11 machos e 22 ninfas) de *R. sanguineus* retirados 21 cães com sintomas de LVC, observaram que seis desses carrapatos foram positivos para o gênero *Leishmania*, obtendo uma taxa de infecção de 15,4% pela PCR. Porém, em nenhum dos esfregaços feitos a partir desses carrapatos foi observado tripanosomatídeos. Esse achado pode indicar também a dificuldade na observação das formas dos protozoários em esfregaços obtidos a partir de carrapatos.

Com a suspeita do papel de *R. sanguineus* na transmissão de *L. (L.) infantum* para cães, DANTAS-TORRES et al. (2010) inocularam 5 μ l promastigotas de *L. infantum* (1×10^6) células/ml) na hemocele dos carrapatos através da coxa I de quatro fêmeas ingurgitadas e em duas fêmeas controles, foi injetado fosfato estéril (PBS), utilizando o mesmo procedimento. Em seguida, estas fêmeas, os ovos e as larvas delas originados foram testados pelo tempo real de reação em cadeia da

polimerase (PCR em tempo real) para a presença de DNA do cinetoplasto (kDNA) de *L. infantum*. As fêmeas e os ovos foram testados após o término do período de oviposição (cerca de 5 semanas pós-inoculação) e as larvas cerca de 4 meses após a inoculação das fêmeas. Todas as fêmeas infectadas artificialmente foram positivas para kDNA de *L. infantum*, assim como duas amostras de ovos e quatro pools de larvas. Estes resultados mostraram, pela primeira vez, a passagem transovariana de *L. infantum* em *R. sanguineus*, sugerindo que a transmissão transovariana do protozoário *L. infantum* em carrapatos vale a pena ser investigada.

Para determinar o que contribuiu para que os cães da amostra fossem infectados, quis-se proceder a uma análise de regressão empregando, para tanto, o método dos mínimos quadrados ordinários. Tal metodologia permitiria correlacionar os resultados (positivo ou negativo) com múltiplas variáveis, como o número de ectoparasitos de cada espécie, de cada gênero e de cada fase do ciclo de vida (ninfã, larva ou indivíduo adulto). O método dos mínimos quadrados ordinários, no entanto, requer uma dispersão maior de resultados do que apenas dois (positivo ou negativo), pois, supõe que eles possam ser descritos ou assemelhados a uma distribuição de tipo normal.

No caso, sem abrir mão da análise de regressão, optou-se por testes de tipo probit, desenvolvidos na década de 30 do século passado para identificar, nos Estados Unidos, quais fatores eram determinantes para a obtenção de bons resultados com o emprego de pesticidas. Tal teste torna

desnecessária a hipótese, presente no dos mínimos quadrados ordinários, de distribuição normal da variável dependente. Em outras palavras, as regressões utilizadas procuraram identificar quais elementos, entre os colhidos para a pesquisa, contribuíram para que os cães fossem infectados, sendo considerado infectado o animal cujos resultados dos testes foram positivos para *L.(L.) infantum*.

As análises com PROBIT demonstraram que aparentemente, a fêmea do carrapato é o principal agente de contaminação pela *L.(L.) infantum*. Os testes feitos para a *L.(L.) infantum* atribuem grande importância para a relação existente entre o cão e o carrapato fêmea. No entanto, vale salientar que as fêmeas desse artrópode alimentam-se de um maior volume de sangue, logo sua positividade na PCR deve ser entendida como consequência e não como causa da positividade do cão.

Outro aspecto que não podemos deixar de considerar é o “Grooning” ou seja a ingestão de carrapatos ingurgitados, que foi a única forma de transmissão da LVC, até agora demonstrada em hamsters (COUTINHO et al, 2005), e portanto pode-se inferir que em condições naturais, as fêmeas alimentadas recentemente e despreendidas de cães infectados e sintomáticos oferecem o maior risco potencial de transmissão de LVC entre os cães.

Essas considerações se destacam sobretudo quando se tem presente as observações de DANTAS-TORRES (2010) sobre o fato de que a transmissão transovariana da *Leishmania* pode estar ocorrendo. Outro

resultado interessante obtido pela análise Probit é que nos grupos de pulgas extraídos de cães novos espera-se a ausência de *L. (L.) infantum*, efeito que tende a desaparecer na medida em que o tempo passa em função de idade do cão.

Em algumas áreas endêmicas no Brasil, a densidade de *Lu. longipalpis* não parecem estar relacionados com os perfis, quer uma transmissão de LV humana ou a prevalência da LVC (MICHALSKY et al. 2009, MISSAWA, 2007) o que sugere que outros vetores podem estar envolvidos no ciclo da leishmaniose visceral canina (LVC).

Diante dos resultados obtidos neste estudo e no que foi exposto pelos pesquisadores citados (FERREIRA et.al., 2009; PAZ et.al. 2010; DANTAS-TORRES et. al. 2010; COUTINHO et. al. 2005, 2007) há ainda muita controvérsia sobre a importância dos sifonápteros e ixodídeos na manutenção e transmissão de LVC entre os cães. No entanto é importante lembrar que a epidemiologia da transmissão da *L.(L.) infantum* por seu vetor biológico *Lu. longipalpis* também não está completamente elucidada.

Portanto, novos estudos devem ser realizados para que se possa realmente dizer qual é a importância dos artrópodes acima citados na transmissão e manutenção da LVC.

CONCLUSÃO

- Conforme a avaliação clínica dos cães, 64,22% eram sintomáticos para LVC. Essa proporção praticamente se manteve quando os animais foram avaliados pelos testes ELISA e PCR.
- O alto índice de animais sintomáticos e positivos nos testes apresentados pode estar relacionado ao fato de ter sido utilizada a população de animais recolhidos ao CCZ, com suspeitas ou confirmação da doença.
- A presença de duas espécies de ectoparasitas: *C. felis* e *R. sanguineus* na amostra canina e a sua distribuição nos cães se assemelham aos achados de outros estudos.
- Neste trabalho foi verificada a presença de DNA de *Leishmania* em carrapatos e pulgas retirados de cães com resultados positivos para LVC. Por outro lado, em nenhuma das amostras de ectoparasitas coletados em cães não reagentes ao teste ELISA ou pela PCR foi detectada a evidência da presença de *Leishmania*.
- A análise (Probit) atribui grande importância para a relação existente entre o cão e o carrapato fêmea e a contaminação por *L. (L.) infantum*.
- As correlações (índice de correlação de Pearson) mais elevadas se deram entre os resultados positivos e os

resultados negativos dos testes empregados, para detectar a presença da leishmaniose nos animais.

- Há uma forte correlação entre a presença *L. (L.) infantum* no cão e a presença do mesmo microorganismo nos carrapatos segundo os gêneros, sendo menor a correlação entre o animal doente e a pulga, de ambos os sexos, com *L. (L.) infantum*.
- A presença de flagelados não foi evidenciada nas pulgas e carrapatos dissecados. Assim, embora a técnica de PCR tenha se mostrado sensível e específica na detecção de DNA de *Leishmania* nesses ectoparasitas, esta detecção, não significa necessariamente que estes artrópodes são capazes de manter, multiplicar e transmitir esse protozoário.

6. REFERÊNCIAS

ARAGÃO, HB. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 31(4): 759-844. 1936.

BARRAL, A; BADARO, R; BARRAL-NETO, M; GRIMALDI, G Jr.; MOMEM, H; CARVALHO, EM. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** 35(4):732-4. 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

CEVS - Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Situação da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul. <http://www.saude.rs.gov.br/dados/1239825393188SITUA%C7%C3O%20NO%20RS.pdf> (acessado em 27 de maio de 2010)

CIIAGRO (Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas)

Resenha Agrometeorológica.

<http://www.ciiagro.sp.gov.br/dados/entrada.htm> (Acessado em 21 de julho de 2010).

CORTES, SJC. **Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal.** 2008. 192 p. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Lisboa.

COUTINHO, MTZ. **Investigação da capacidade vetorial de sifonápteros e ixodídeos na leishmaniose visceral canina.** 2003. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

COUTINHO, MTZ; BUENO, LL; STERZIK, A; FUJIWARA, RT; BOTELHO, JR; DE MARIA, M; GENARO, O; LINARDI, PM. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis **Veterinary Parasitology.** 128: 148-155. 2005.

COUTINHO, MTZ; LINARDI, PM; Can fleas dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology.** doi;10.1016 j. vetpar. 2007.

CVE, **Leishmaniose Visceral Americana Humana - casos autóctones e óbitos de Leishmaniose Visceral Americana, segundo município de residência 1999 – 2009.** Disponível em :< URL: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_auto9904.htm. > [2010 mar 07].

DANTAS-TORRES, F; MARTINS, TF; PAIVA-CAVALCANTI, M; FIGUEIREDO, LA; LIMA, BS; BRANDÃO-FILHO, S; Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. **Experimental Parasitology.** v: 125 (2); 184-185. 2010.

DEANE, LM; DEANE, MP;. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. **Hospital . R. Janeiro,** 48:61-76.1955

DEDET, JP. *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. **Ann Inst Pasteur/ actual.** 4 (1): 3-25. 1993.

FERREIRA, MG; FATTOTI, KR; SOUZA, F; LIMA, VM. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Vet Parasitol.** FEB 26;168(1-2):173-4. 2010.

FORATTINI, OP. **Entomologia Médica. Phlebotominae. Psychodidae. Leishmanioses. Bartonelose.** São Paulo: Edgard Blücher/EDUSP. 658p. 1973.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária** 3^a ed. rev. e ampl. Ed. Ícone. 686p.1997

GALATI, EAB. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Saude Publica.** 31(4):378-90.1997.

GALATI, EAB. Classificação de Phlebotominae. In Rangel EF e Lainson R coordenadores. **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro, 2003, Fiocruz, p. 23-52.

GOMES, AH; FERREIRA, IM; LIMA, ML; CUNHA, EA; GARCIA, AS; ARAUJO, MF; PEREIRA-CHIOCCOLA VL. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Vet Parasitol.** Mar 31;1:234-241. 2007.

IBGE-Cid@ades – **Município de Mirandópolis** Disponível em <URL:<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>.> [2010 mar.07].

KANETO, CN. **Aspectos da transmissão da leishmaniose visceral no município de Mirandópolis, região noroeste do Estado de São Paulo.** São Paulo, 2001. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.

LABRUNA, MB; PEREIRA, CM; Carrapatos em cães do Brasil, **Clínica Veterinária.** v.06; nº 30, p: 24 – 32. 2001

LAINSON, R; SHAW JJ. Evolution, Classification and geographical distribution. In: Peter W, Kellick-Kendrick R, editors. **The leishmaniasis in biology and medicine.** London: Academic Press; 1987.

LAINSON, R; DYE, C; SHAW, JJ; MACDONALD, W; COUTERNAY, O; SOUZA, AAA; SILVEIRA, FT. Amazonian Visceral Leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 85(1) 135-137.1990.

LAINSON, R; SHAW, JJ. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Journal of the Association for the Advancement of science** Vol 44(2/3). mar/jun.1992.

LINARDI, PM; NAGEM RL. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. **Rev. Brasil. Biol.** 33(4): 529-538.1973.

LINARDI, PM; GUIMARÃES, LR. **Sifonápteros do Brasil.** Ed. Museu de Zoologia USP/FAPESP 291p. 2000.

MADEIRA, MF; SOUSA, MA; BARROS, JH; FIGUEIREDO, FB; FAGUNDES, A; SCHUBACH, A; DE PAULA, CC; FAISSAL, BN; FONSECA, TS; THOMA, HK; MARZOCHI, MC. *Trypanosoma caninum n.sp.* (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology** 136(4):411-23. 2009.

MACIANTI, F; GRAMICCIA, M; GRANDONI, L; PIERI, S. Studies on canine Leishmaniasis Control . 1 Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 82: 566-567. 1988.

MAURÍCIO, IL ; HORWARD, MK ; STOTHARD, JR ; MILES, MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**. 119 (Pt3) : 237-46. 1999.

MASSARD, CA ; MASSARD, CL ; REZENDE, HEB. Carrapatos de cães em áreas urbanas e rurais de alguns estados brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, Belo Horizonte, MG. **Sociedade Brasileira de Parasitologia**. v6 p. 201. 1981.

MICHALSKY, EM; FRANÇA-SILVA, JC; BARATA, RA; LARA E SILVA, FO; LOUREIRO, AM; FORTES-DIAS, CL; DIAS ES. Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 104, pp. 56–61. 2009

MISSAWA, NA; DIAS, ES. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, *Brazil*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 102 , pp. 913–918. 2007

ODORIZZI, RMFN. **Estudo da leishmaniose visceral canina e dos vetores de leishmanioses no município de Mirandópolis, região noroeste do Estado de São Paulo**. São Paulo 2006 Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo, São Paulo.

PAZ, GF; RIBEIRO, MF; MICHALSKY, EM; DA ROCHA LIMA, AC; FRANÇA-SILVA, JC; BARATA, RA; FORTES-DIAS, CL; DIAS, ES. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. **Parasitol Res.** 106:523–528. 2010

PAIVA, BR; SECUNDINO, NFC; NASCIMENTO, JC; PIMENTA, PFP; GALATI, EAB; ANDRADE-JUNIOR, HF; MALAFORTE, RS. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica.** 99:252-259. 2006.

PIMENTA, P; SECUNDINO, NFC; NIEVES-BIANCO, E. Interação vetor hospedeiro. In RANGEL, EF; LAINSON, R. Coordenadores **Flebotomíneos do Brasil** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

PINTO, AG; SCHUBACH, TM; FIGUEIREDO, FB; BAPTISTA, C; FAGUNDES, A; DA S BARROS, JC; DE PAULA, CC; TOMA, HK; MADEIRA, MF. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brasil. **Parasitology.** May 26:1-8. 2010. [Epub ahead of print].

PITA-PEREIRA, D; CARDOSO, MAB; ALVES, CR; BRASIL, RP; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica** 107(1): 66-69. 2008.

RAVEL, S; CUNY, G; REYNES, J; VEAS, F. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. **Acta Trop.** 59:187-196. 1995.

ROGERS, ME; CHANCE, ML; BATES, PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology** 124(5): 495-507.2002

SAMBROCK, J; FRITSCH, EF; MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. *New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press* 1989.

SANTOS, SO; ARIAS, J; RIBEIRO, AA; DE PAIVA HOFFMANN, M; DE FREITAS, RA; MALLACO, MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol.** 12(3):315-7.1998

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo/** Coordenação Vera Lucia de Camargo Neves – A Secretaria, 2006.

SAVANI, ESMM; NUNES, VLB; GALATI, EAB; CASTILHO, TM; ZAMPIERI, RA; FLOETER-WINTER, LM. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 160 (1-2): 18-24. 2009.

SHERLOCK, IA. Nota sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Brasil **Rev. Brasil. Malariol. D. Trop.** 16: 19-26. 1964

SHERLOCK, IA; MIRANDA, JC; SADIGURSKI, M; GRIMALDI, Jr G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 79(4): 511. 1984,

SILVA, ES; GONTIJO, CMF; PACHECO, RS; FIUZA, VOP; BRAZIL, RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 96:285-91.2001.

SOARES, AO; SOUZA, AD; FELICIANO, EA; RODRIGUES, AFSF; D'AGOSTO, M; DAEMON, E. Avaliação Ectoparasitológica e Hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG **Ver. Brás. Parasitol. Vet.**15(1): 13-16. 2006.

WHO. Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization . **Technical Report Series**, 1990. 793.

WHO, **Research to support the elimination of visceral leishmaniasis**

Disponível: <http://apps.who.int/tdr/svc/research/visceral-leishmaniasis-elimination>. Acessado em abril de 2010.

ANEXO I

TESTE Probit

Para determinar, então, o que contribuiu para que os cães da amostra fossem infectados, quis-se proceder a uma análise de regressão empregando, para tanto, o método dos mínimos quadrados ordinários. Tal metodologia permitiria correlacionar os resultados (positivo ou negativo) com múltiplas variáveis, como o número de ectoparasitos de cada espécie, de cada gênero e de cada fase do ciclo de vida (ninfã, larva ou indivíduo adulto). O método dos mínimos quadrados ordinários, no entanto, requer uma dispersão maior de resultados do que apenas dois (positivo ou negativo), pois, supõe que eles possam ser descritos ou assemelhados a uma distribuição de tipo normal.

No caso, sem abrir mão da análise de regressão, optou-se por testes de tipo probit, desenvolvidos na década de 30 do século passado para identificar, nos Estados Unidos, quais fatores eram determinantes para a obtenção de bons resultados com o emprego de pesticidas. Tal teste torna desnecessária a hipótese, presente no dos mínimos quadrados ordinários, de distribuição normal da variável dependente. Em outras palavras, as regressões abaixo procuraram identificar quais elementos, entre os colhidos para a pesquisa, contribuíram para que os cães fossem infectados, sendo considerado infectado o animal cujos resultados dos testes foram positivos para *L.(L.)infantum*

Iniciando-se pelos resultados para a sorologia, têm-se os quadros abaixo, obtidos a partir da versão 3.0 do programa econometric views:

Dependent Variable: CAOSORO

Method: ML - Binary Probit

Date: 06/01/10 Time: 17:37

Sample(adjusted): 1 77

Included observations: 45

Excluded observations: 32 after adjusting endpoints

Convergence achieved after 23 iterations

Covariance matrix computed using second derivatives

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
C	0.325370	0.894060	0.363925	0.7159
IDADE	0.030839	0.418982	0.073604	0.9413
IDADE2	0.025299	0.055288	0.457581	0.6473
PMACHO	0.121778	0.185830	0.655319	0.5123
PFEMEA	0.009364	0.055610	0.168391	0.8663
CMACHOS	-0.018649	0.014453	-1.290324	0.1969
CFEMEAS	0.036760	0.041833	0.878747	0.3795
LARVAS	9.580448	6053551.	1.58E-06	1.0000
NINFAS	-0.000538	0.043489	-0.012380	0.9901
MASC1	-0.238236	0.564410	-0.422098	0.6730
PULGAS	-1.010082	0.881665	-1.145652	0.2519
Mean dependent var	0.800000	S.D. dependent var	0,40452	
S.E. of regression	0.427175	Akaike info criterion	1,297074	
Sum squared resid	6.204264	Schwarz criterion	1,738703	
Log likelihood	-18.18417	Hannan-Quinn criter.	1,461709	
Restr. log likelihood	-22.51811	Avg. log likelihood	-0,40409	
LR statistic (10 df)	8.667883	McFadden R-squared	0,192465	
Probability(LR stat)	0.563886			
Obs with Dep=0	9	Total obs	45	
Obs with Dep=1	36			

O que a tabela acima indica é o seguinte:

1. a variável dependente é cãosoro, isto é, os resultados positivos e negativos, para os quais se atribuíram os valores 1 e 0, respectivamente, para a sorologia;

2. dado que o programa econometric views usa a língua inglesa, a expressão em inglês para o método probit de máxima verossimelhança é ML – Binary Probit, em que a sigla ML abrevia o termo *Maximum Likelihood*;
3. a data da regressão acima foi 01/06/2010 e a hora em que ela foi rodada foi às 17:37;
4. a quarta linha informa qual foi o tamanho da amostra empregada: 78 animais;
5. a quinta linha indica quantos elementos da amostra foram incluídos da regressão: 45; a sexta linha indica quantos foram excluídos: 32. Isto se deveu à ausência de informações entre as variáveis de alguns dos indivíduos. Por exemplo: nem todos os animais em que foram encontradas pulgas tiveram-nas contadas e separadas segundo o sexo, o que excluiu, no caso, algumas delas. O mesmo problema se apresentou com outras variáveis e na ausência de dados o programa econométrico empregado exclui, para efeito de cálculo, os indivíduos com informações incompletas.
6. Os resultados das variáveis empregadas serão discutidas adiante, cabendo aqui nomeá-las e indicar-lhes os significados:
C: representa a possibilidade de que haja resultados positivos independentemente das demais variáveis mencionadas;
Idade: é a idade de cada animal usado no experimento;
Idade 2: é a idade ao quadrado. Justifica-se o uso desta variável se, dependendo o resultado da idade, tal dependência se tornar

relativamente menor ao longo do tempo, o que pressupõe um coeficiente negativo;

Pmacho: trata-se do número de pulgas de sexo masculino capturadas em cada animal;

Pfemea: trata-se do número de pulgas de sexo feminino capturadas em cada animal;

Cmachos: trata-se do número de carrapatos de sexo masculino capturados em cada animal;

Cfemeas: trata-se do número de carrapatos de sexo feminino capturados em cada animal;

Larvas: trata-se do número de larvas de carrapato capturadas em cada animal;

Ninfas: trata-se do número de ninfas de carrapato capturadas em cada animal;

Masc1: trata-se de variável binária em que se atribuiu número 1 para os animais de sexo masculino;

Pulgas: trata-se de outra variável binária em que se atribuiu o número 1 para a presença de pulga no animal e o número zero quando não havia o parasita;

Abaixo dos coeficientes há as estatísticas apresentadas automaticamente pelo programa e-views 3.0. Assim:

Mean Dependent Variable indica o valor médio da variável dependente (sorocao) calculada. De fato, para o contexto do presente trabalho, 78% dos animais apresentaram sorologia positiva. O e-views 3.0, com os coeficientes

apresentados pela regressão acima indica 80% de infecção. A diferença de resultados é fruto da própria regressão, a qual, a partir dos dados e supondo que o modelo empregado se ajusta bem aos fatos deveria encontrar 80% de animais infectados;

S.E. of regression indica o erro padrão da regressão calculada. O valor encontrado será usado para o cálculo da estatística LR, abaixo explicada.

Sum Squared resid indica a soma dos resíduos ao quadrado, dado que também é usado para o cálculo da estatística LR;

Log Likelihood e Restr. Log likelihood são estimadores, respectivamente, do valor máximo da função de verossimilhança e do valor máximo da média da função de máxima verossimilhança quando os coeficientes dos estimadores são supostamente iguais a zero. São necessários para o cálculo da estatística LR;

LR Statistics é análoga à estatística F da análise de variância, a qual serve para testar a validade conjunta dos estimadores e do próprio modelo;

Probability (LR Statistics) é a probabilidade de rejeitar a hipótese nula referente à estatística LR. No caso, considera-se rejeitado o modelo se o resultado for superior a 0,1.

Há três critérios, listados nos resultados, para realizar a escolha entre modelos concorrentes: Akaike, Hannan-Quin e Schwarz, os quais penalizam modelos com maior número de parâmetros e a maior diferença entre os resultados previstos pelo modelo e os efetivamente obtidos. Para os três, não há valores específicos de referência, sendo considerado o melhor modelo aquele que, em cada um dos critérios, produzir o menor valor;

McFadden R-Squared é estatística que varia entre zero e um e é semelhante à R^2 , usado nas regressões comuns e serve ao propósito de calcular quanto dos resultados é explicado pelo modelo.

De posse das informações sobre cada estatística e dos resultados, podemos analisa-los à luz delas:

O modelo acima indicado é ruim porque:

- a. a probabilidade de rejeição dos estimadores é sempre superior a 19%, quando o comum é aceitar os estimadores com chance de rejeição inferior a 10%;
- b. a estatística LR indica a rejeição global dos estimadores, uma vez que foi igual a 0,56, sendo o comum a aceitação dos modelos com probabilidade de rejeição inferior a 10%;
- c. os critérios de Akaike, Schwarz e Hannan-Quin deverão servir de parâmetros para a reespecificação do modelo, o que será feito adiante, o mesmo valendo para o R^2 de MacFaden.

Perceba-se que o modelo rejeita todas as variáveis mencionadas como determinantes dos resultados positivos e negativos para a sorologia. Evidentemente, quando a rejeição é geral, requer-se a reespecificação do modelo porque, por exemplo, a elevada correlação entre duas variáveis pode causar a má estimação dos coeficientes dos regressores. Ademais, dado o resultado da estatística LR, é indispensável reespecificá-lo.

O procedimento é, à luz da teoria, excluir algumas das variáveis presentes e incluir outras por ventura ausentes, o que foi feito abaixo:

Dependent Variable: CAOSORO
 Method: ML - Binary Probit
 Dependent Variable: CAOSORO
 Method: ML - Binary Probit
 Date: 06/01/10 Time: 17:45
 Sample(adjusted): 1 77
 Included observations: 45
 Excluded observations: 32 after adjusting endpoints

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
C	0.631346	0.843209	0.748742	0.4540
IDADE	-0.038280	0.392143	-0.097616	0.9222
IDADE2	0.020055	0.050703	0.395543	0.6924
PMACHO	0.046036	0.122193	0.376749	0.7064
PFEMEA	-0.018400	0.046101	-0.399135	0.6898
CMACHOS	-0.012231	0.011831	-1.033835	0.3012
CFEMEAS	0.034860	0.038161	0.913515	0.3610
NINFAS	0.013607	0.037094	0.366813	0.7138
MASC1	-0.294478	0.510495	-0.576848	0.5640
Mean dependent var	0,8000	S.D. dependent var	0,40452	
S.E. of regression	0,4312	Akaike info criterion	1,31437	
Sum squared resid	6,6945	Schwarz criterion	1,67570	
Log likelihood	-20,5733	Hannan-Quinn criter.	1,44907	
Restr. log likelihood	-22,5181	Avg. log likelihood	-0,45718	
LR statistic (8 df)	3,8896	McFadden R-squared	0,08637	
Probability(LR stat)	0,8669			
Obs with Dep=0	9	Total obs	45	
Obs with Dep=1	36			

Excluída as variáveis larvas, a qual apresentou maior probabilidade de rejeição na regressão anterior, percebe-se uma piora considerável do modelo porque a estatística LR se eleva em comparação com a situação anterior e, por outro lado, o R^2 de McFadden se torna menor. O significado destes dois resultados é o seguinte: a probabilidade de rejeição global das

variáveis escolhidas para explicar os resultados da sorologia se torna ainda maior, ao mesmo tempo em que a correspondência entre os resultados reais e aqueles previstos pelo modelo se torna menor.

Por fim, percebe-se que a exclusão da quantidade de larvas encontrada nos animais, do modelo inicial, altera os coeficientes dos regressores e a probabilidade de que sejam iguais a zero, mas nenhuma das probabilidades se tornou inferior a 0,1, o que sugere a rejeição de outros estimadores além do que foi excluído.

Dando seguimento às exclusões e inclusões, optou-se por excluir idade e o quadrado da idade. Os resultados são os seguintes:

Dependent Variable: CAOSORO
 Method: ML - Binary Probit
 Date: 06/01/10 Time: 17:49
 Sample(adjusted): 1 77
 Included observations: 47
 Excluded observations: 30 after adjusting endpoints
 Convergence achieved after 4 iterations
 Covariance matrix computed using second derivatives

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
C	0.969119	0.441696	2.194088	0.0282
PULGAS	-0.301558	0.645420	-0.467228	0.6403
PMACHO	0.043025	0.123713	0.347780	0.7280
PFEMEA	-0.009343	0.048527	-0.192542	0.8473
CMACHOS	-0.005205	0.009731	-0.534828	0.5928
CFEMEAS	0.022583	0.031574	0.715219	0.4745
NINFAS	0.019380	0.038374	0.505041	0.6135
MASC1	-0.250458	0.488675	-0.512525	0.6083
Mean dependent var				0.3977
S.E. of regression	0.808511		S.D. dependent var	27
Sum squared resid	6.974.528			1,2626
Log likelihood	-21,67260		Akaike info criterion	64
				1,5775
			Schwarz criterion	83
			Hannan-Quinn criter.	1,3811

			70
			-
Restr. log likelihood	-22,95364	Avg. log likelihood	0.4611
			19
LR statistic (7 df)	2,562077	McFadden R-squared	0.0558
Probability(LR stat)	0.922351		10
	Obs with Dep=0	9	Total obs
	Obs with Dep=1	38	47

A exclusão das variáveis idade e o quadrado da idade não melhorou o modelo, apesar da redução dos critérios de Akaike, de Schwarz e de Hannan-Quinn. O único regressor aceito foi C, o qual responde pelos resultados da sorologia independentemente de qualquer das demais variáveis. Dada a baixa qualidade da regressão, atestada tanto pela probabilidade LR quanto pelo R^2 de McFadden, a aceitação de C pode ser considerada espúria, ainda mais à luz das próximas regressões.

Procedendo, então, à exclusão do número de pulgas de sexo masculino e do número daquelas de sexo feminino, mas mantendo-se o restante das variáveis, tem-se uma pequena melhora do modelo abaixo:

Dependent Variable: CAOSORO
Method: ML - Binary Probit
Date: 06/01/10 Time: 17:52
Sample(adjusted): 1 77
Included observations: 48
Excluded observations: 29 after adjusting endpoints
Convergence achieved after 5 iterations
Covariance matrix computed using second derivatives

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
C	0.841527	0.411385	2.045596	0.0408
PULGAS	-0.420022	0.462504	-0.908148	0.3638
CMACHOS	-0.003878	0.009429	-0.411285	0.6809
CFEMEAS	0.024350	0.031910	0.763090	0.4454
NINFAS	0.029091	0.040635	0.715905	0.4740
MASC1	-0.117625	0.450654	-0.261009	0.7941
Mean dependent var	0.791667	S.D. dependent var	0.410414	
S.E. of regression	0.422198	Akaike info criterion	1,208250	
Sum squared resid	7,486533	Schwarz criterion	1,442150	
Log likelihood	-22,99800	Hannan-Quinn criter.	1,296641	
Restr. log likelihood	-24,56352	Avg. log likelihood	-0,479125	
LR statistic (5 df)	3,131056	McFadden R-squared	0,063734	
Probability(LR stat)	0.679789			
Obs with Dep=0	10	Total obs	48	
Obs with Dep=1	38			

Pelos critérios de Akaike, de Schwarz e de Hannan-Quinn, assim como pelas estatísticas LR e R^2 de McFadden, trata-se de um modelo melhor em comparação com os anteriores, mas não bom o suficiente para ser aceito. Substituindo a variável qualitativa da presença ou da ausência de pulgas, assim como do número de pulgas de sexo masculino e de pulgas de sexo feminino pela relação entre o número destas por aquelas, isto é, número pulgas de sexo feminino encontrada em cada animal dividido pelo número de pulgas de sexo masculino em cada animal da amostra, tem-se o seguinte resultado:

Dependent Variable: CAOSORO
Method: ML - Binary Probit
Date: 06/01/10 Time: 17:54
Sample(adjusted): 1 77
Included observations: 23
Excluded observations: 54 after adjusting endpoints
Convergence achieved after 6 iterations
Covariance matrix computed using second derivatives

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
C	0.931238	0.816798	1.140108	0.2542

PFFM	-3.331314	1.965115	-1.695226	0.0900
CMACHOS	-0.024383	0.016491	-1.478539	0.1393
CFEMEAS	0.181339	0.135060	1.342656	0.1794
NINFAS	0.013362	0.068192	0.195945	0.8447
MASC1	0.989537	0.959535	1.031267	0.3024
Mean dependent var	0.826087	S.D. dependent var	0.387553	
S.E. of regression	0.338598	Akaike info criterion	1.098671	
Sum squared resid	1.949026	Schwarz criterion	1.394886	
Log likelihood	-6.634712	Hannan-Quinn criter.	1.173168	
Restr. log likelihood	-10.62685	Avg. log likelihood	-0.288466	
LR statistic (5 df)	7.984274	McFadden R-squared	0.375665	
Probability(LR stat)	0.157104			
Obs with Dep=0	4	Total obs	23	
Obs with Dep=1	19			

Trata-se do melhor modelo pelos critérios de Akaike, de Schwarz e de Hannan-Quinn, bem como pelas estatísticas LR e R^2 de McFadden, sendo aceite o regressor da relação numérica entre pulgas do sexo feminino e do sexo masculino, a qual diminuiria o risco de infecção detectada pela sorologia. Ocorre que a regressão acima contou com um número muito restrito de casos (apenas 23) e ainda assim foi rejeitada pela estatística LR tendo vários regressores igualmente rejeitados, com destaque para C. Com as características negativas apontadas, ainda é prudente rejeitar o modelo.

Dependent Variable: CAOSORO
Method: ML - Binary Probit
Date: 06/01/10 Time: 17:56
Sample(adjusted): 1 77
Included observations: 23
Excluded observations: 54 after adjusting endpoints
Convergence achieved after 6 iterations
Covariance matrix computed using second derivatives

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
C	1.587148	0.612980	2.589234	0.0096
PFFM	-2.626605	1.521977	-1.725785	0.0844

CMACHOS	-0.023963	0.014842	-1.614521	0.1064
CFEMEAS	0.130657	0.110709	1.180185	0.2379
Mean dependent var	0.826087	S.D. dependent var	0.387553	
S.E. of regression	0.339963	Akaike info criterion	0.988067	
Sum squared resid	2.195917	Schwarz criterion	1.185545	
Log likelihood	-7.362774	Hannan-Quinn criter.	1.037732	
Restr. log likelihood	-10.62685	Avg. log likelihood	-0.320121	
LR statistic (3 df)	6.528149	McFadden R-squared	0.307154	
Probability(LR stat)	0.088559			
Obs with Dep=0	4	Total obs	23	
Obs with Dep=1	19			

Trata-se do melhor modelo e o último a ser apresentado, uma vez que a exclusão de qualquer uma das variáveis leva a pioras sensíveis. Perceba-se que são os menores valores atribuídos aos critérios de Akaike, de Schwarz e de Hannan-Quinn, sendo as variáveis globalmente aceitas segundo a estatística LR e com R^2 de McFadden relativamente elevado: 0,30. Note-se, no entanto, que se trata de um modelo rodado com apenas 23 animais, um número pequeno para que se aceite a suposição de normalidade dos resíduos.

Quanto ao significado dos coeficientes, tem-se que a sorologia positiva é fortemente influenciada por outras variáveis que não as presentes no modelo em discussão, o que se infere pela variável C, sendo a relação numérica entre as pulgas de sexo feminino e de sexo masculino (pfpm) um elemento fortemente desfavorável à sorologia positiva, dando-se o mesmo com a quantidade de carrapatos de sexo masculino por animal (cmachos), mas com efeitos significativamente menores (perceba-se que os valores encontrados para os regressores devem ser levados em consideração de

maneira relativa, ou seja, uns em comparação com os outros contribuindo para a maior ou menor probabilidade de ocorrência da sorologia positiva ou negativa e esta é uma característica dos modelos com distribuição probit).

Por fim, o modelo rejeita a hipótese de influência na sorologia da quantidade de carrapatos de sexo feminino (prob. 0,23). Dada a pequena dimensão da amostra, é possível que, com amostras maiores, a probabilidade de que ocorra sorologia positiva aumente significativamente com o aumento de carrapatos de sexo feminino.

Passando-se ao teste de PCR para *L.(L.) infantum*, tem-se o primeiro modelo da seguinte forma:

Dependent Variable: CAOL.(L.) INFANTUM
 Method: Least Squares
 Date: 06/01/10 Time: 18:00
 Sample(adjusted): 1 77
 Included observations: 45
 Excluded observations: 32 after adjusting endpoints
 Dependent Variable: CAOL.(L.) INFANTUM
 Method: Least Squares

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
C	0.586215	0.925017	0.633735	0.5263
IDADE	0.152683	0.431008	0.354245	0.7232
IDADE2	0.007237	0.055534	0.130320	0.8963
PULGAS	-0.680409	0.817674	-0.832127	0.4053
PMACHO	-0.069666	0.170640	-0.408263	0.6831
PFEMEA	0.106307	0.077018	1.380296	0.1675
CMACHOS	-0.026779	0.013132	-2.039230	0.0414
CFEMEAS	0.016473	0.022714	0.725207	0.4683
LARVAS	0.783774	1.244495	0.629793	0.5288
NINFAS	-0.027245	0.045529	-0.598404	0.5496
MASC1	-0.651478	0.587977	-1.107999	0.2679
Mean dependent var	0.777778	S.D. dependent var	0.420437	
S.E. of regression	0.419740	Akaike info criterion	1.285686	

Sum squared resid	5.990175	Schwarz criterion	1.727314
Log likelihood	-17.92793	Hannan-Quinn criter.	1.450321
Restr. log likelihood	-23.83678	Avg. log likelihood	-0.398398
LR statistic (10 df)	11.81770	McFadden R-squared	0.247888
Probability(LR stat)	0.297443		
Obs with Dep=0	10	Total obs	45
Obs with Dep=1	35		

A primeira regressão rodada para os cães com resultados positivos e com resultados negativos para *leishmania chagasi* mostrou-se mais promissora do que a primeira regressão para sorologia positiva porque ao menos uma variável mostrou ser significativa: o número de carrapatos machos em cada animal (cmachos). Curiosamente, o efeito, se mantida a variável em outros modelos, é negativo: a um número maior de carrapatos machos corresponde uma probabilidade menor de contaminação por *leishmania chagasi*.

O modelo, tal como se encontra, é globalmente rejeitado pela estatística LR e quase todos os regressores, com exceção do mencionado, foram rejeitados também, o que requer a reespecificação do modelo, como abaixo foi feito.

Dependent Variable: *CAOL.(L.) INFANTUM*
Method: ML - Binary Probit
Date: 06/01/10 Time: 20:44
Sample(adjusted): 1 77
Included observations: 46
Excluded observations: 31 after adjusting endpoints
Convergence achieved after 4 iterations
Covariance matrix computed using second derivatives

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
----------	-------------	------------	-------------	-------

C	0.106134	0.473442	0.224175	0.8226
IDADE	0.184323	0.105871	1.741009	0.0817
CMACHOS	-0.012359	0.008330	-1.483768	0.1379
Mean dependent var	0.760870	S.D. dependent var	0.431266	
S.E. of regression	0.418353	Akaike info criterion	1.134421	
Sum squared resid	7.525832	Schwarz criterion	1.253680	
Log likelihood	-23.09167	Hannan-Quinn criter.	1.179096	
Restr. log likelihood	-25.30347	Avg. log likelihood	-0.501993	
LR statistic (2 df)	4.423601	McFadden R-squared	0.087411	
Probability(LR stat)	0.109503			
Obs with Dep=0	16	Total obs	46	
Obs with Dep=1	30			

Após várias tentativas de simplificação, por exclusão, das variáveis do primeiro modelo, chegou-se à regressão acima, a qual não rejeita globalmente os estimadores propostos (estatística LR = 0,109503) e logra explicar 8% dos resultados (R^2 de McFadden).

Com relação às variáveis estimadas, não se rejeita a hipótese de nulidade do estimador de C (variável que procura captar os resultados supondo-se a nulidade dos demais), bem como a quantidade de carrapatos machos capturados no animal. Ressalte-se, todavia, que a rejeição desta variável é dúbia e, se não rejeitada, influencia negativamente a probabilidade de que o animal seja infectado. Por fim, a idade é, aparentemente, fundamental para a contaminação.

Analisando-se a presença de *L.(L.) infantum* nos cães segundo esta mesma presença nos ectoparasitos, separados segundo espécie (pulga e carrapato) e segundo a fase do ciclo de vida (carrapato adulto macho,

carrapato adulto fêmea, ninfa e larva), foram obtidos os seguintes resultados:

1. pelo pequeno número de análises para *L.(L.) infantum* em larvas de carrapatos, o programa econométrico não foi capaz de obter estatística alguma;
2. excluindo-se a variável acima mencionada e mantendo-se as demais, foi obtido o seguinte resultado:

Dependent Variable: CAOL.(L.) INFANTUM
 Method: ML - Binary Probit
 Date: 06/01/10 Time: 20:58
 Sample(adjusted): 11 78
 Included observations: 21
 Excluded observations: 47 after adjusting endpoints
 Convergence achieved after 22 iterations
 Covariance matrix computed using second derivatives

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
C	-1.976202	2.107045	-0.937902	0.3483
IDADE	0.767628	0.835424	0.918847	0.3582
IDADE2	-0.074472	0.087071	-0.855305	0.3924
PULGAL.(L.) INFANTUM	8.925288	9041980.	9.87E-07	1.0000
CMACHOL.(L.) INFANTUM	1.728015	1.578949	1.094408	0.2738
Mean dependent var	0.761905	S.D. dependent var		0.436436
S.E. of regression	0.381827	Akaike info criterion		1.092482
Sum squared resid	2.332671	Schwarz criterion		1.341178
Log likelihood	-6.471060	Hannan-Quinn criter.		1.146455
Restr. log likelihood	-11.52636	Avg. log likelihood		-0.308146
LR statistic (5 df)	10.11060	McFadden R-squared		0.438586
Probability(LR stat)	0.038605			
Obs with Dep=0	5	Total obs		21
Obs with Dep=1	16			

A regressão acima sofre de graves problemas, a começar pelo exíguo número de observações: apenas 21. Apesar disto, os regressores não foram globalmente rejeitados pela estatística LR, ainda que isto não tenha ocorrido com cada regressor, apesar de o modelo lograr explicar até 43% dos resultados, conforme o R^2 de McFadden. Talvez um número maior de elementos pudesse levar à aceitação do modelo.

Depurando-o, todavia, chegou-se a algo melhor, como abaixo indicado:

Dependent Variable: *CAOL.(L.) INFANTUM*
 Method: ML - Binary Probit
 Date: 06/01/10 Time: 21:02
 Sample(adjusted): 1 77
 Included observations: 51
 Excluded observations: 26 after adjusting endpoints
 Convergence achieved after 3 iterations
 Covariance matrix computed using second derivatives

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
C	0.253347	0.283542	0.893507	0.3716
<i>CFEMEAL.(L.) INFANTUM</i>	1.595249	0.522778	3.051484	0.0023
Mean dependent var	0.823529	S.D. dependent var		0.385013
S.E. of regression	0.343087	Akaike info criterion		0.779526
Sum squared resid	5.767742	Schwarz criterion		0.855284
Log likelihood	-17.87792	Hannan-Quinn criter.		0.808475
Restr. log likelihood	-23.76596	Avg. log likelihood		-0.350547
LR statistic (1 df)	11.77609	McFadden R-squared		0.247751
Probability(LR stat)	0.000600			
Obs with Dep=0	9		Total obs	51
Obs with Dep=1	42			

Com apenas duas variáveis (C – responsável pela explicação dos resultados na hipótese de nulidade da outra variável e *cfemea L.(L.)*)

infantum – que apresenta os resultados de pcr para as fêmeas de carrapato) logrou-se a aceitação da regressão (segundo a estatística LR) com critérios melhores em comparação com o modelo inicial (segundo os critérios de Akaike, de Schwarz e de Hannan-Quinn) e com um R^2 de McFadden de 0,247.

Começando pelos carrapatos machos com leishmania chagasi, tem-se os resultados abaixo:

Dependent Variable: CMACHOL.(L.) *INFANTUM*
 Method: ML - Binary Probit
 Date: 06/01/10 Time: 16:38
 Sample(adjusted): 11 78
 Included observations: 42
 Excluded observations: 26 after adjusting endpoints
 Convergence achieved after 4 iterations
 Covariance matrix computed using second derivatives

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
C	-0,673634	0,670620	-1,004494	0,315100
IDADE	-0,187370	0,107041	-1,750461	0,080000
CAOL.(L.) <i>INFANTUM</i>	1,448556	0,658468	2,199888	0,027800
Mean dependent var	0,380952	S.D. dependent var	0,49151	
S.E. of regression	0,463902	Akaike info criterion	1,27317	
Sum squared resid	8,393015	Schwarz criterion	1,39729	
Log likelihood	-23,736610	Hannan-Quinn criter.	1,31867	
Restr. log likelihood	-27,910190	Avg. log likelihood	-0,56516	
LR statistic (2 df)	8,347163	McFadden R-squared	0,14954	
Probability(LR stat)	0,015397			
Obs with Dep=0	26	Total obs	42	
Obs with Dep=1	16			

Fazendo uso da distribuição probit, verifica-se, pelos resultados acima, que a detecção, por pcr, de leishmania chagasi no grupo de carrapatos machos capturados em um cão (*cmachoL.(L.) infantum*) pode ser

explicada pela idade do animal em que o grupo foi colhido e pela própria contaminação do cão pelo mesmo microorganismo.

Note-se que os coeficientes dos regressores (idade = -0,18737 e $caoL.(L.)\ infantum = 1.448556$) devem ser analisados relativamente e que cada qual indica a probabilidade de contaminação. Assim, o efeito da contaminação do cão é muito maior (1.58) do que o efeito negativo da idade que apresenta.

A estatística LR não rejeita o modelo e a estatística R^2 de McFadden indica que aproximadamente 15% dos resultados pode ser explicado pelo modelo.

Por fim, a rejeição do regressor C indica que a anulação das outras duas variáveis ($L.(L.)\ infantumcao$ e idade) leva também à ausência de leishmania chagasi entre os carrapatos machos.

Realizando o mesmo exercício para o caso das fêmeas contaminadas por leishmania chagasi, tem-se os resultados abaixo:

Dependent Variable: CFEMEAL.(L.) INFANTUM
 Method: ML - Binary Probit
 Date: 06/01/10 Time: 16:50
 Sample(adjusted): 1 77
 Included observations: 45
 Excluded observations: 32 after adjusting endpoints
 Convergence achieved after 3 iterations
 Covariance matrix computed using second derivatives

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
C	-1,205316	0,647254	-1,862198	0,0626
IDADE	-0,004091	0,089475	-0,045718	0,9635
CAOL.(L.) INFANTUM	1,732687	0,600935	2,883320	0,0039
Mean dependent var	0,577778	S.D. dependent var	0,499495	
S.E. of regression	0,450765	Akaike info criterion	1,257617	
Sum squared resid	8,533925	Schwarz criterion	1,378061	
Log likelihood	-25,29638	Hannan-Quinn criter.	1,302517	

Restr. log likelihood	-30,64496	Avg. log likelihood	-0,562142
LR statistic (2 df)	10,69716	McFadden R-squared	0,174534
Probability(LR stat)	0,004755		
Obs with Dep=0	19	Total obs	45
Obs with Dep=1	26		

O que os resultados acima indicam é: uma boa adequação do modelo (probabilidade LR < 0,1) e um bom ajustamento aos dados (R^2 de McFadden = 0,1748). No entanto, distintamente do caso dos carrapatos machos, a idade não parece ser um bom regressor, já que a probabilidade de que o coeficiente encontrado (-0,004091) não seja diferente de zero é 0,98.

Dada a necessidade de melhorar o modelo, pode-se ou excluir a variável idade ou, ainda, a variável que responde pela contaminação por leishmania chagasi, detectada por pcr, do cão. Rodando uma regressão excluindo-se a contaminação do cão e mantendo a idade, tem-se uma piora considerável do modelo: não apenas a variável idade continua a ser rejeitada como, também, cai significativamente o R^2 de Macfadden (0,0012) e a probabilidade de rejeição do modelo se eleva abruptamente (0,79).

Excluindo-se a variável idade, todavia, tem-se os resultados abaixo:

Dependent Variable: CFEMEAL.(L.) *INFANTUM*
Method: ML - Binary Probit
Date: 04/30/10 Time: 09:49
Sample(adjusted): 1 77
Included observations: 46
Excluded observations: 31 after adjusting endpoints
Convergence achieved after 3 iterations
Covariance matrix computed using second derivatives

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
C	-1.335178	0.529781	-2.520246	0.0273
CAOL.(L.) <i>INFANTUM</i>	1.739856	0.572985	3.036479	0.0025
Mean dependent var	0.607843	S.D. dependent var	0.493089	

S.E. of regression	0.439395	Akaike info criterion	1.186934
Sum squared resid	9.460317	Schwarz criterion	1.262692
Log likelihood	-28.26681	Hannan-Quinn criter.	1.215883
Restr. log likelihood	-34.15486	Avg. log likelihood	-0.554251
	11.77609	McFadden R-squared	0.172393
LR statistic (1 df)			
Probability(LR stat)	0.000600		
Obs with Dep=0	20	Total obs	51
Obs with Dep=1	31		

Excluindo-se a idade, verifica-se que a presença de contaminação por *L.(L.) infantum* no grupo de fêmeas de carrapato extraídas de cada cão é dependente da contaminação do próprio cão, independentemente da idade que possua. Por outro lado, a presença de resultados negativos para o pcr para *L.(L.) infantum* no cão ($caoL.(L.) infantum = 0$) reduz substancialmente a probabilidade de contaminação do grupo de carrapato fêmea, o que se infere pelo sinal negativo da variável C, cujo estimador não foi rejeitado.

Procurou-se verificar quais foram os determinantes da contaminação de larvas e de ninfas por *L.(L.) infantum*. O pequeno número de observações impediu a realização deste exercício.

Para determinar o que, entre as variáveis disponíveis, contribui para que o grupo de pulgas retirado de determinado cão tenha resultado positivo em pcr para leishmania spp, procedeu-se às regressões de estilo, sendo que a que melhor respondeu ao parâmetros esperados foi a seguinte:

Dependent Variable: PULGAL.(L.) INFANTUM
Method: ML - Binary Probit
Date: 06/01/10 Time: 21:33
Sample(adjusted): 1 78
Included observations: 32
Excluded observations: 46 after adjusting endpoints
Convergence achieved after 4 iterations
Covariance matrix computed using second derivatives

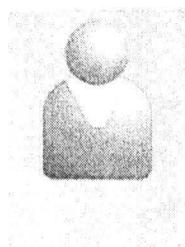
Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
IDADE	-0.868514	0.401797	-2.161573	0.0307
IDADE2	0.099274	0.053148	1.867889	0.0618
CAOL.(L.) <i>INFANTUM</i>	1.634456	0.711588	2.296913	0.0216
Mean dependent var	0.406250	S.D. dependent var	0.498991	
S.E. of regression	0.461010	Akaike info criterion	1.304904	
Sum squared resid	6.163381	Schwarz criterion	1.442317	
Log likelihood	-17.87846	Hannan-Quinn criter.	1.350452	
Avg. log likelihood	-0.558702			
Obs with Dep=0	19	Total obs	32	
Obs with Dep=1	13			

O problema com a regressão acima é a amostra diminuta (32 casos) e a ausência de duas estatísticas fundamentais: R^2 de McFadden e LR, as quais indicam, respectivamente, o quanto dos resultados é explicado pelo modelo e a não rejeição global dos parâmetros estimados. Isto se deveu ao fato de que há uma forte correlação entre a variável C (ausente do modelo acima) e a variável cão *L.(L.) infantum*. A primeira procura captar a ocorrência do evento *pulgaleishspp* positivo, isto é, a detecção de leishmaniose no grupo de pulgas extraído do cão quando os demais parâmetros são nulos. A segunda, por seu turno, é o resultado do pcr para leishmania *chagasi* no cão de onde o grupo de pulgas foi coletado.

Apesar da ausência mencionada, verifica-se a não-rejeição das variáveis idade, idade2 e *caol.(L.) infantum*, ou seja, a maior idade dos cães contribui para a obtenção de resultados negativos para leishmania *chagasi* nas pulgas, mas os efeitos tendem a ser cada vez menores na medida em que a idade avança (o que é indicado por idade2). Por fim, a chance de o

grupo de pulgas ter a leishmania é fortemente influenciado pela leishmania no cão.

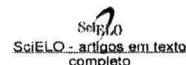
Assim, nos grupos de pulgas extraídos de cães novos espera-se a ausência de leishmania, efeito que tende a desaparecer na medida em que o tempo passa em função de idade², isto é, o quadrado da idade do cão. No que respeita ao cão com leishmania chagasi, a probabilidade de que o grupo de pulgas dele extraído tenha o mesmo microorganismo é positiva e alta em comparação com as outras duas variáveis.



Rosa Maria Ferreira Noguerol Odorizzi

Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade de Alenas (1990). Especialista em vigilância sanitária pela FSP/USP(1998) e Mestre em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (2006). Atualmente trabalha na Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.
(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 26/07/2010
Endereço para acessar este CV:
<http://lattes.cnpq.br/6417140512768086>

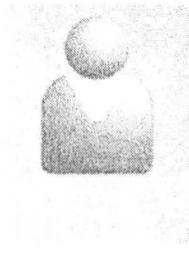


Dados pessoais	
Nome	Rosa Maria Ferreira Noguerol Odorizzi
Nome em citações bibliográficas	ODORIZZI, R. M. F. N.
Sexo	Feminino
Endereço profissional	COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, Inspetoria de Defesa Agropecuária. R. Selme Sadano,1173 Centro 16800-000 - Mirandópolis, SP - Brasil Telefone: (18) 37011805

Formação acadêmica/Titulação	
2006	Doutorado em andamento em Saúde Pública (Conceito CAPES 5) . Universidade de São Paulo, USP, Brasil. <i>Título:</i> Investigação do papel de vetores secundários da Leishmania(Leishmania) infantum no Município de Mirandópolis - SP, Brasil. , <i>Orientador:</i> Eunice Aparecida Bianchi Galati. <i>Palavras-chave:</i> vetores das leishmanioses; leishmaniose visceral canina; Siphonaptera; Ixodidae.
2004 - 2006	Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 5) . Universidade de São Paulo, USP, Brasil. <i>Título:</i> Estudo da leishmaniose visceral canina e dos vetores das leishmanioses no município de Mirandópolis, Região Noroeste do Estado de São Paulo., <i>Ano de Obtenção:</i> 2006. <i>Orientador:</i> Eunice Aparecida Bianchi Galati. <i>Bolsista do(a):</i> Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, . . <i>Palavras-chave:</i> Leishmaniose Visceral. <i>Grande área:</i> Ciências da Saúde / <i>Área:</i> Saúde Coletiva / <i>Subárea:</i> Epidemiologia.
1998 - 1998	Especialização em Vigilância Sanitária . (Carga Horária: 456h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. <i>Título:</i> Street Food.
1986 - 1990	Graduação em Medicina Veterinária . Universidade de Alenas.

Formação complementar	
2009 - 2009	Curso de Colheita de Amostras Animais de Produção. (Carga horária: 40h). Organização Panamericana de Saúde.
2009 - 2009	Treinamento em sanidade de Suídeos. (Carga horária: 20h). COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, CDA, Brasil.
2009 - 2009	Vigilância e Mitigação de Riscos em abate. (Carga horária: 12h). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.
2009 - 2009	Diagnostico de Scrapie. (Carga horária: 20h). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.
2009 - 2009	Treinamento do Programa de Raiva dos Herbívoros. (Carga horária: 24h). COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, CDA, Brasil.
2009 - 2009	II Curso de Emerg. Sanit. para Executores. (Carga horária: 48h). Organização Panamericana de Saúde.
2008 - 2008	Curso de Capacitação de auditores- SISBOV. (Carga horária: 48h). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.
2007 - 2007	Siphonaptera. (Carga horária: 80h). Universidade Federal de Minas Gerais.

Atuação profissional	
COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, CDA, Brasil.	
Vínculo Institucional	
2008 - Atual	Vínculo: Efetivo, Enquadramento Funcional: Assistente Agropecuário I. Carga horária: 40
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.	
Vínculo Institucional	
2005 - 2005	Vínculo: Estágio de Docência, Enquadramento Funcional: Estagiária
Outras informações	Estágio de Docência na Graduação em Medicina Veterinária, perfazendo um total de 76 horas, tendo sido aprovada pelo Conselho do Curso de Graduação em Medicina Veterinária, em reunião realizada no dia 19/05/2006.
Atividades	



Eunice Aparecida Bianchi Galati

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (1977), graduação em Ciências pela Universidade de São Paulo (1976), mestrado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (1981), doutorado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (1990) e livre-docência pela Universidade de São Paulo (2008). Atualmente é professor associado da Faculdade de Saúde Pública/USP. Tem experiência de pesquisa e orientação na área de Zoologia, com ênfase em Entomologia Médica (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae), atuando principalmente em taxonomia e ecologia de flebotomíneos, bem como na epidemiologia de doenças veiculadas por vetores, sobretudo as leishmanioses. Desenvolveu projetos sobre flebotomíneos de cavernas das Províncias Espeleológicas da Bodoquena e do Vale do Ribeira.
(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 14/06/2010
Endereço para acessar este CV:
<http://lattes.cnpq.br/1359035734723864>



Certificado
pelo autor em
14/06/10



Rede de Colaboração



Diretório de grupos de pesquisa



SciELO - artigos em texto completo

Dados pessoais

Nome Eunice Aparecida Bianchi Galati
Nome em citações bibliográficas GALATI, E. A. B.
Sexo Feminino
Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia.
Av. Dr. Arnaldo, 715
Cerqueira Cesar
01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30667786 Ramal: 011 Fax: (11) 30812108

Formação acadêmica/Titulação

- 2008** Livre-docência.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) da Província Espeleológica do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, *Ano de obtenção:* 2008.
Palavras-chave: cavernas; dispersão; Ecologia de vetores; Fauna flebotomínea; Leishmanioses; ambiente antrópico.
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Parasitologia / *Subárea:* Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores.
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Zoologia / *Subárea:* Taxonomia dos Grupos Recentes / *Especialidade:* Entomologia Médica.
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Ecologia / *Subárea:* Ecologia de Vetores.
Setores de atividade: Saúde e Serviços Sociais.
- 1983 - 1990** Doutorado em Saúde Pública.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Sistemática dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) das Américas, *Ano de Obtenção:* 1990.
Orientador: Ubirajara Ribeiro Martins de Souza.
Palavras-chave: Sistemática; Psychodidae; Taxonomia; Phlebotominae; Diptera.
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Zoologia / *Subárea:* Taxonomia dos Grupos Recentes / *Especialidade:* Entomologia Médica.
Setores de atividade: Saúde Humana.
- 1979 - 1981** Mestrado em Saúde Pública.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Aspectos taxonômicos e biogeográficos do gênero *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 e sua importância epidemiológica (Diptera, Phlebotominae), *Ano de Obtenção:* 1981.
Orientador: Oswaldo Paulo Forattini.
Palavras-chave: Taxonomia; Biogeografia; Diptera; Phlebotominae; Psychodopygus.
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Zoologia / *Subárea:* Taxonomia dos Grupos Recentes / *Especialidade:* Entomologia Médica.
Setores de atividade: Saúde Humana.
- 1978 - 1978** Especialização em Curso de Especialização Em Saúde Pública. (Carga Horária: 978h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
- 1972 - 1977** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
- 1972 - 1976** Graduação em Ciências.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
- 1970 - 1970** Curso técnico/profissionalizante em Epidemiologia Médico Entomológica.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Atuação profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

1990 - Atual Vínculo: Servidor público ou celetista, Enquadramento Funcional: Professor Doutor, Carga horária: 0, Regime: Dedicção exclusiva.

Vínculo institucional

1981 - 1990 Vínculo: Servidor público ou celetista, Enquadramento Funcional: Professor Assistente, Carga horária: 0

Vínculo institucional

1978 - 1981 Vínculo: Servidor público ou celetista, Enquadramento Funcional: Auxiliar de Ensino, Carga horária: 0

Vínculo institucional

1977 - 1978 Vínculo: Servidor público ou celetista, Enquadramento Funcional: Preparador em Entomologia, Carga horária: 0, Regime: Dedicção exclusiva.