



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO
SEMIÁRIDO

ANDREINA DE CARVALHO ARAUJO

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE PETROLINA,
PERNAMBUCO

PETROLINA-PE

2015

ANDREINA DE CARVALHO ARAUJO

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE PETROLINA,
PERNAMBUCO**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito da obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Claudio Horta.

PETROLINA-PE

2015

A658e Araujo, Andreina de C.

Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Petrolina / Andreina de Carvalho Araujo. -- Petrolina, 2015.

73 f.: il. ; 29cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias no Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina - PE, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Claudio Horta.

Referência

1. Cão – Doença. 2. Leishmaniose Canina. I.Título. II. Horta, Mauricio Claudio. III. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD: 636.70896

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO
SEMIÁRIDO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Andreina de Carvalho Araujo

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO
MUNICÍPIO DE PETROLINA, PERNAMBUCO

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: ____ de _____ de ____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Mauricio Claudio Horta – CMVET/Univasf

Prof. Dr. Fernando Ferreira – FMVZ/USP

Prof. Dr. Raimundo de Campos Palheta – CMVET/Univasf

*Dedico este trabalho aos meus pais Izabel Barbosa de Carvalho Araujo e
Gaudêncio Antônio de Araujo, como forma de reconhecimento e
agradecimento por todo apoio e confiança que depositaram em mim!!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua presença constante em minha vida, pelo seu amor, proteção, misericórdia, pelas oportunidades oferecidas, pelas pessoas maravilhosas que pôs em minha vida durante esses anos e por permitir que eu chegasse até aqui. Nele eu vivo, movo e existo!

Aos meus irmãos, Quely e Darby e aos meus sobrinhos por todo incentivo, amor e compreensão.

A minha irmã Andryelly, por todo amor, carinho, orações, incentivo, pela ajuda nas coletas.

Ao meu orientador, Mauricio C. Horta pela oportunidade, confiança, paciência, dedicação, ensinamentos e orientações durante todos esses anos.

Ao pesquisador, Dr. Arlei Marcili pela oportunidade, contribuição e ensinamentos fundamentais para realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Fernando Ferreira, pela disponibilidade, contribuição essenciais para desenvolvimento desta pesquisa.

A Dra. Andréa Pereira da Costa, por todos os ensinamentos técnicos, disponibilidade, hospitalidade e amizade que foram fundamentais nesse trabalho.

Aos colegas, Anne, Maíra, Ivo, Anna Maria, Nara, Josenilton, Naylla, Laís, Elaine, Viviane, Ana Isabel, Dália, Glauber, Mariana, Davi, Denyse, Tássia, Talita, Aline, Renata, Juliana, Rafaela, Raíra e Kelly pela ajuda imprescindível nas coletas. Obrigada pelo auxílio!

À Prefeitura Municipal de Petrolina- PE em especial a Secretaria Municipal de Saúde por fornecer os dados populacionais.

À Secretaria de Vigilância Epidemiológica de Petrolina pelo acesso as fichas de notificação.

Aos coordenadores do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Petrolina, Paulo Lima e Jarbas Costa.

A todos os funcionários do CCZ de Petrolina, em especial ao Maurício.

Aos médicos veterinários, Michelle da Luz Paschoal e Washington Luiz Gonçalves de Almeida Júnior e Camuel Vieira Liro pelo apoio nas coletas realizadas no CCZ.

A VIII Geres – Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, em especial Antônio Carlos.

À profa. Dra. Francesca Silva Dias Nobre por ceder seu laboratório para realização do ELISA.

Ao professor Dr. Mateus Matiuzzi da Costa por ceder seu laboratório para o uso do leitor de microplacas.

À profa. Dra. Elenice Andrade Moraes, por ceder seu laboratório para realização da RIFI.

Ao prof. Dr. Antônio Marcos dos Santos pelo auxílio no ArcGis.

Ao técnico Peixoto pela ajuda nas coletas.

Aos cães, a razão maior disto tudo.

Aos proprietários dos cães, pela colaboração e confiança essenciais na realização deste estudo.

Aos colegas do NEZOOM (Núcleo de Estudo em Zoonoses), pela amizade e disponibilidade em ajudar na realização deste trabalho.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias no Semiárido.

Aos colegas do mestrado pelo aprendizado que compartilhamos.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo auxílio financeiro do projeto (FACEPE APQ-0051-4.00/13) e pela concessão da bolsa (IBPG- 0078-5.05/13).

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença de grande importância para saúde pública devido a sua alta incidência e letalidade. Este estudo objetivou avaliar a situação da LV humana no município de Petrolina no período de 2007-2013; realizar um inquérito sorológico em cães domiciliados de áreas urbanas e rurais; avaliar os possíveis fatores de riscos associados à soropositividade canina à *L. infantum chagasi* e por fim isolar o agente mediante punção aspirativa de linfonodos poplíteos de cães do Centro de Controle de Zoonoses de Petrolina (CCZ). Os dados de casos humanos foram obtidos das fichas de Notificação do Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Amostras sanguíneas de 1.245 cães de áreas urbanas e rurais foram colhidas (IC 95%; erro de 2%), considerando o cálculo para população infinita, e uma prevalência estimada de 15% levando-se em consideração a população humana residente no município. As amostras sanguíneas foram processadas para obtenção de soro, e examinadas, pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e pelo Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA). Foram consideradas reagentes à RIFI as amostras com títulos ≥ 40 . Para os cálculos de prevalência foram considerados positivos apenas os cães sororreagentes nos dois testes. Os cães foram submetidos ao exame físico e classificados de acordo com as manifestações clínicas em assintomáticos e sintomáticos. Durante as visitas aplicou-se um questionário aos proprietários visando a detecção dos potenciais fatores de risco para a infecção por *Leishmania* spp, utilizando modelos de regressão logística considerando-se estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$. Visitas ao CCZ foram realizadas para punção aspirativa de linfonodos poplíteos dos cães e posteriormente inoculadas em hemoculturas BAB/LIT. Foram notificados 69 casos humanos residentes no município. A doença afeta predominantemente crianças de 1-4 anos de idade (34,8%). A co-infecção com HIV ocorreu em 14,5% dos casos. O critério de confirmação mais utilizado foi o clínico-epidemiológico (59,4%), com cura clínica em 78,3% dos casos ocorrendo apenas um óbito. Dos 1.245 cães avaliados, 11,2% (140/1.245) foram sororreagentes nos dois testes (IC 95%: 9,5%-13,1%). Quanto à sintomatologia, 60,7% dos cães sororreagentes eram sintomáticos e 39,7% assintomáticos, sendo a linfadenopatia, ulcerações e onicogribose os sinais mais evidentes. A soroprevalência em áreas urbanas e rurais foi de 5,4% (IC 95%: 4%-7,1%) e 23,6% (IC 95%: 19,5% - 28,1%), respectivamente. Foram considerados possíveis fatores de risco para presença de anticorpos anti-*L. infantum chagasi*: presença de área verde próximo à residência (OR = 3,63; $p = 0,000$), raça – sem raça definida (OR = 2,11; $p = 0,025$) e o sexo – macho (OR = 1,51; $p = 0,034$). Três isolados de *L. infantum chagasi* foram obtidos. A LV é considerada endêmica em Petrolina com taxa de transmissão de moderada a alta e a soroprevalência de anticorpos anti-*L. infantum chagasi* na população canina está distribuída de forma heterogênea, com prevalência maior nas áreas rurais.

Palavras-chave: *Leishmania*. Diagnóstico sorológico. Cães. Fatores de risco.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a disease of great concern for public health because of its high incidence and lethality. This study aimed to evaluate the situation of human VL in the municipality of Petrolina in the 2007-2013 period; perform a serologic survey among domestic dogs from urban and rural areas; evaluate the possible risk factors associated with canine seropositivity for *L. infantum chagasi* and finally isolate the agent by aspiration of popliteal lymph nodes of dogs from Zoonosis Control Center (CCZ). Human data were collected from the Brazilian National Information System for Notifiable Diseases. Blood samples from 1,245 dogs in urban and rural areas were collected (CI 95%; error of 2%) considering the calculation for infinite population and an estimated prevalence of 15% taking into account the resident human population in the municipality. Blood samples were processed to obtain serum, and examined by indirect immunofluorescence (IFA) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Indirect (ELISA). Reagents samples were considered at IFA samples with titers ≥ 40 . For prevalence were considered positive only reactive serum dogs in both tests. The dogs were subjected to physical examination and classified according to the clinical manifestations in asymptomatic and symptomatic. During the visits was applied a questionnaire to the owners in order to detect potential risk factors for infection with *Leishmania* spp, using logistic regression models considering statistically significant p values <0.05 . Visits at CCZ were realized to aspiration of popliteal lymph nodes of dogs and then inoculated into hemoculture BAB/LIT. A total of 69 human cases resides in the municipality. The disease predominantly affected children of 1-4-year-old age group (34.8%). Co-infection with HIV occurred in 14.5% of cases. The criterion most frequently used was the clinical epidemiological confirmation (59.4%), with clinical cure in 78.3% of cases; presenting only one death. Of the 1,245 dogs evaluated, 11.2% (140/1.245) were seropositive in both tests (CI 95%: 9.5%-13.1%). About the symptomatology, 60.7% of reactive serum dogs were symptomatic and 39.7% asymptomatic, and the lymphadenopathy, ulceration and onychogryphosis the most obvious signs. The seroprevalence in urban and rural areas was 5.4% (CI 95%: 4%-7.1%) and 23.6% (CI 95%: 19.5% - 28.1%), respectively. Were considered possible risk factors for the presence of antibodies anti *L. infantum chagasi*: presence of green area close to the home (OR = 3.63; p = 0, 000), breed - mixed breed (OR = 2.11; p = 0.025) and gender - male (OR = 1.51, p = 0.034). Three isolates of *L. infantum chagasi* were obtained. VL is endemic in Petrolina with transmission from moderate to levels high and the seroprevalence of anti-*L. infantum chagasi* in canine population is distributed in a heterogeneous manner, with higher prevalence in rural areas.

Key- words: *Leishmania*. Serological diagnosis. Dogs. Risk factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mapa do Estado de Pernambuco destacando a localização do município de Petrolina, PE.	42
Figura 2	Mapa do município de Petrolina, indicando os bairros da zona urbana e rural onde foram colhidas as amostras.	45
Figura 3	Distribuição dos cães sororreagentes e soronegativos obtidos pela RIFI e ELISA, para anticorpos anti- <i>Leishmania infantum chagasi</i> em Petrolina, PE.	61
Figura 4	Distribuição dos cães sororreagentes para anticorpos anti- <i>L. infantum chagasi</i> nas áreas rurais do município de Petrolina, PE.	62
Figura 5	Distribuição dos cães sororreagentes para anticorpos anti- <i>L. infantum chagasi</i> nas áreas urbanas do município de Petrolina, PE.	63
Figura 6	Diferença entre os valores da função K para animais sororreagentes e não reagentes em função da distância em metros.	67
Figura 7	Parcimônia e inferências Bayesianas baseadas na região V7V8 SSU rRNA e gGAPDH concatenadas. As sequências obtidas neste estudo estão em negrito.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de cães amostrados por bairros de Petrolina, de acordo com a população humana segundo dados da prefeitura municipal.	46
Tabela 2	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas PCRs.	53
Tabela 3	Distribuição dos casos humanos de LV no município de Petrolina, Pernambuco, 2007 a 2013.	55
Tabela 4	Número de casos e óbitos de LV, por idade e sexo em Petrolina, Pernambuco, 2007 a 2013.	56
Tabela 5	Dados referentes ao sexo, raça, porte e idade da população canina na zona urbana e rural do município de Petrolina, PE.	58
Tabela 6	Detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania infantum chagasi</i> , em cães do município de Petrolina-PE, pelos testes RIFI e ELISA.	60
Tabela 7	Prevalência de anticorpos anti- <i>Leishmania infantum chagasi</i> , em cães do município de Petrolina-PE, em relação ao sexo, raça, porte e faixa etária.	64
Tabela 8	Análise univariada dos possíveis fatores de risco para Leishmaniose visceral canina no município de Petrolina, PE.	66
Tabela 9	Modelo final de regressão logística multivariada de fatores de risco (<i>Odds ratio</i>) para Leishmaniose visceral canina no município de Petrolina, PE.	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Representação da sintomatologia clínica dos cães da zona urbana e rural do município de Petrolina, PE.	59
-----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBT	Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-cético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto
et al.	E colaboradores
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
gGAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
IC	Intervalo de confiança (95% de confiança)
LIT	“Liver Infusion Tryptose”
LPS	Lipopolissacarídeos
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
OR	Odds ratio
pb	Pares de bases
PBS	Solução Fosfato Tamponada
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PE	Estado de Pernambuco
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Padrão de peso molecular

RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SRD	Sem Raça Definida
SSU rDNA	Subunidade menor do gene ribossômico
TAQ	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris- borato-EDTA
TE	Tampão TRIS HCl- EDTA
TRIS	Tris (hidroximetil) amino metano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
UI	Unidade Internacional
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra Violeta
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco
VPS	Veterinária Preventiva e Saúde Animal
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

mm	Milímetros
cm	Centímetros
°C	Graus Celsius
M	Molar
mM	Milimolar
U	Unidades
µg	Micrograma
Kg	Quilograma
mL	Mililitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
µL	Microlitro
seg	Segundos
min	Minutos
=	Igual
x	Vezez
®	Marca Registrada
≥	Maior ou igual
>	Maior
%	Proporção em porcentagem

Sumário

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Geral	20
2.2	Específicos	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	Aspectos epidemiológicos	21
3.2	Agente etiológico	24
3.3	Hospedeiros e reservatórios	25
3.4	Vetores	28
3.5	Ciclo evolutivo e formas de transmissão	29
3.6	Patogenia	31
3.7	Manifestações clínicas	33
3.8	Diagnóstico	35
3.8.1	Métodos parasitológicos	36
3.8.2	Métodos sorológicos	37
3.8.3	Métodos moleculares	39
3.9	Prevenção e controle	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	Caracterização da área de estudo	42
4.2	Perfil epidemiológico dos casos humanos	44
4.2.1	Fonte de dados	44
4.2.2	Análise dos dados	44
4.3	Inquérito sorológico canino	44
4.3.1	Amostragem	44
4.3.2	Colheita de sangue	46
4.3.3	Avaliação clínica dos cães	47
4.3.4	Sorodiagnóstico	48
4.3.4.1	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	48
4.3.4.2	Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)	49
4.3.5	Determinação dos fatores de risco	49
4.3.6	Análise espacial	50
4.4	Isolamento de <i>Leishmania</i> spp	51
4.4.1	Obtenção dos isolados	51
4.4.2	Extração da biomassa dos parasitas	52
4.4.3	Amplificação de DNA pela Reação em Cadeia pela Polimerase	52
4.4.4	Eletroforese em gel de agarose	53
4.4.5	Sequenciamento de DNA	53
4.4.6	Alinhamento e inferências filogenéticas	54
4.5	Aspectos éticos	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Perfil epidemiológico dos casos humanos	55
5.2	Inquérito sorológico canino	57
5.2.1	Caracterização da população canina	57
5.2.2	Análise clínica dos cães	58

5.2.3	Sorodiagnóstico	59
5.2.4	Análise dos fatores de risco	65
5.2.5	Análise espacial	67
5.3	Isolamento de <i>Leishmania</i> spp	68
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXOS	116

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar é uma zoonose que pode manifestar-se no homem e animais. É uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, e transmitida aos vertebrados por vetores do gênero *Lutzomyia*. É uma doença tropical de elevada importância, devido a sua incidência, letalidade e implicações econômicas, apresentando-se como um grave problema de saúde pública. A doença é endêmica em diversos países dos quatro continentes, em sua maioria países em desenvolvimento, com cerca de 200 milhões de pessoas expostas ao risco.

A doença, antes restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, avançou para outras regiões indenes alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos. Nos últimos dez anos a LV têm sofrido um processo de expansão e urbanização ocorrendo nas cinco regiões do Brasil. Esse processo está associado a vários fatores, como descontinuidade das ações de controle relacionadas ao agravo em questão, adaptação do vetor aos ambientes modificados pelo homem, mudanças ambientais e climáticas, migração de população humana e canina para espaços urbanos, redução dos investimentos em saúde e educação, fatores imunossupressivos e dificuldades de controle da doença em grandes aglomerados urbanos.

Em Pernambuco, assim como em outros estados da região Nordeste do Brasil, a LV é historicamente endêmica. Durante a década de 90, houve grande expansão na distribuição da doença no Estado, e atualmente está amplamente distribuída, com registros de casos em todas as regiões do Estado.

O município de Petrolina consiste em um grande centro de exportação com base na fruticultura irrigada, acompanhado por um aumento da população associada com a migração, atraídos pelas alterações decorrentes do processo de industrialização e modernização da agricultura irrigada, com isso houve um crescimento desorganizado do centro urbano. Neste contexto, na década de 90 houve um aumento de registros e distribuição espacial de LV na cidade, com pico epidêmico em 1995. Desde então, observa-se uma expansão da doença, com um

aumento do número de casos na área urbana, sendo considerada uma área de alta transmissão, com média anual de 11,1 casos nos últimos dez anos.

Diante deste quadro é essencial, portanto, a realização, em regiões endêmicas, de estudos periódicos, que avaliem suas características epidemiológicas e a efetividade das medidas de controle. Estudar o comportamento de uma doença, avaliar sua magnitude e sua distribuição, além de possibilitar conhecer a área e extensão de transmissão, indica qual a sua possibilidade de continuidade, a população sob risco e as medidas de controle que devem ser adotadas. O conhecimento mais detalhado da relação das doenças com o espaço onde elas se reproduzem, ajuda a identificar padrões epidemiológicos, que auxiliam no seu controle e na sua predileção.

Somam-se a estes fatos informações oriundas da escassez de trabalhos no município de Petrolina, uma vez que os trabalhos já realizados avaliaram apenas uma região isolada, uma pequena população, sem relação com os fatores inerentes à dinâmica populacional, aos dados de transmissão e distribuição da mesma no município. Desta forma, é imprescindível a realização de pesquisas sobre a epidemiologia da leishmaniose visceral humana e canina, para ampliar o conhecimento de sua história natural focando seu principal reservatório doméstico, o cão, a fim de maximizar a eficácia das medidas de controle desta enfermidade aplicadas no município. Portanto, o presente estudo buscou avaliar a situação epidemiológica da LV humana no município de Petrolina, no período de 2007-2013; realizar um inquérito sorológico em cães domiciliados provenientes de áreas urbanas e rurais do município; avaliar os possíveis fatores de riscos associados à soropositividade canina à *Leishmania infantum chagasi*. Além disso, isolar o agente mediante punção aspirativa de linfonodos poplíteos de cães encaminhados e/ou capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Petrolina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Conhecer os aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina no município de Petrolina, localizado na região do Submédio do São Francisco, Pernambuco.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever o perfil epidemiológico dos casos humanos de Leishmaniose Visceral no município de Petrolina - PE no período de 2007 a 2013;
- Avaliar as principais alterações clínicas em cães domiciliados com infecção natural por *Leishmania* spp;
- Determinar a prevalência da Leishmaniose Visceral Canina nas áreas urbanas e rurais do município, por meio de inquérito sorológico canino pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Teste Imunoenzimático (ELISA), em cães domiciliados;
- Determinar os possíveis fatores de risco para a infecção por *Leishmania* spp em cães domiciliados;
- Confeccionar mapas de risco para Leishmaniose Visceral Canina no município;
- Isolar e caracterizar *Leishmania* spp em amostras de aspirado de linfonodo de cães capturados e/ou encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses do município utilizando a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos epidemiológicos

A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como calazar, possui um amplo espectro epidemiológico, sendo identificada em mais de 100 países em todo o mundo, sejam eles de clima tropical, subtropical e temperado (DEANE; DEANE, 1962; ALVAR et al., 2004; DESJEUX, 2004; ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012). Atualmente é considerada uma das sete endemias prioritárias no mundo e tem se tornado um importante problema de saúde pública, estando amplamente distribuída em quatro continentes (MICHALSKY et al., 2011).

A Organização Mundial de Saúde estima que ocorra de dois a quatro milhões de casos de LV anualmente. Sendo que 90% dos casos ocorrem em seis países, incluindo Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil. Entretanto, esses dados são subestimados, uma vez que a afecção não é de notificação compulsória em todos os países em que ocorre, e muitos países não realizam vigilância ou outras investigações e não possuem um sistema de armazenamento de dados (ALVAR et al., 2012; WHO, 2012; KHALIL et al., 2014). A doença apresenta elevadas taxas de letalidade, cerca de 50.000 pessoas morrem com LV, anualmente (WHO, 2010).

Na América Latina, já foi descrita em 12 países, sendo que o Brasil é responsável por 95% dos registros da Leishmaniose Visceral Humana (LVH), no qual foram identificados em 26 (96,3%) das 27 unidades federativas, com infecções autóctones diagnosticadas em 21 (80,8%) delas e, em aproximadamente, 1.300 municípios brasileiros, com caráter endêmico-epidêmico, apresentando anualmente entre 3.000 e 4.000 novos casos (WHO, 2010; VIANA et al., 2011; BRASIL, 2012; SARAIVA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013).

Nos últimos dez anos, o número de casos notificados na região Nordeste foi menor em comparação com a década de 90, entretanto, nos últimos cinco anos, em média 3.500 novos casos humanos foram notificados, sendo 47% na região Nordeste, com perfil tanto urbano quanto rural, seguida do Norte e Sudeste com cerca de 18% dos casos (OLIVEIRA et al., 2011; AFONSO et al., 2012; BRASIL, 2012).

No Brasil inicialmente a LV apresentava caráter essencialmente rural. Nos anos 80, comprovou-se uma importante modificação neste perfil, uma vez que a doença, antes restrita a zonas rurais do Nordeste, avançou para regiões indenes atingindo periferias de grandes cidades (GONTIJO; MELO, 2004). A prevalência da doença apresentou, desde então, um acentuado crescimento no país, não só em número de casos, mas também, na sua dispersão geográfica (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

Nos últimos dez anos a LV têm sido considerada uma doença urbanizada, com ocorrência em diversos centros urbanos do país como no Rio de Janeiro-RJ, Araçatuba-SP, Santarém-PA, Corumbá-MS, Teresina-PI, Natal-RN, São Luís-MA, Fortaleza-CE, Aracaju-SE Minas Gerais- MG, Camaçari-BA, Palmas-TO, Três Lagoas-MS (BRASIL, 2006; ROMERO; BOELAERT, 2010; BRASIL, 2012).

Acredita-se que este novo panorama esteja associado a diversos fatores, dentre eles, os ambientais, causados pelo intenso processo migratório de um grande contingente populacional de áreas rurais para os subúrbios das grandes cidades, estimulado por questões econômicas e/ou sociais, aliado ao processo de longas estiagens, promoveram o chamado “esvaziamento rural”, e levaram a um processo de urbanização crescente e desordenado e, conseqüentemente, agravamento das desigualdades sociais concomitante com a precariedade das condições de moradia, alimentação, saneamento básico, numerosos cães errantes, grande número de pessoas susceptíveis. Todavia, essas mudanças acarretaram a expansão das áreas endêmicas da LV, forçaram a adaptação do vetor ao ambiente urbano e dessa forma contribuíram para o aparecimento de novos focos da doença (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; GONTIJO; MELO, 2004; BRASIL, 2006). A inadequação dos investimentos em educação e saúde, descontinuidade das ações de controle e fatores associados à resistência do parasito a quimioterápicos e à imunossupressão, como as coinfeções *Leishmania*/HIV, são apontadas como causas da expansão da LV (REITHINGER; DAVIES, 2002; DESJEUX, 2004; HARHAY et al., 2011).

Em Pernambuco, assim como também em vários outros estados do nordeste, a leishmaniose tem se revelado como uma endemia histórica (PEREIRA et al., 1985), sendo responsável pela maior parte dos casos notificados de LV. Pereira et al. (1985) descreveram alguns aspectos da epidemiologia da LV no estado, durante

o período de 1934 a 1984. Neste período, foram registrados 336 casos, e o maior destaque foi para os municípios localizados no Sertão com 64,8% dos registros. Os municípios da Região Metropolitana do Recife e da Zona da Mata também se destacavam, com uma parcela de 33,5% dos casos. O grupo mais acometido foi às crianças menores de nove anos (68,5%).

Nos últimos 20 anos, a doença difundiu-se e tornou-se cada vez mais comum em áreas urbanas ou periurbanas (DANTAS-TORRES; BRANDÃO, 2006a). Entre 1990 e 2000 foram registrados em 119 municípios casos da doença, indicando a presença da mesma em praticamente todo território pernambucano. Além da histórica concentração de casos no Sertão, observou-se o registro de 1.190 casos no Agreste e na Região Metropolitana de Recife (DANTAS-TORRES; BRANDÃO, 2006b; DANTAS-TORRES, 2006). De acordo com dados da Fundação Nacional de Saúde em 2001 o número estimado de cães sororreagentes para a leishmaniose era de 2,5%, o equivalente a 9.893/392.914 da população canina do estado (ALEXANDRINO, 2001).

De 2000 a 2013 foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, 1.589 casos confirmados no Estado de Pernambuco com registro de 122 óbitos. Em 2002, dos 104 casos de LV notificados em Pernambuco 42,3% afetaram indivíduos residentes na região Agreste (AGUIAR et al., 2003). Nas outras regiões do Estado, merecem destaque os municípios de Salgueiro no Sertão, Petrolina no Sertão do São Francisco, Itamaracá na Região Metropolitana do Recife e Goiana na Zona da Mata (DANTAS-TORRES; BRANDÃO FILHO, 2005).

Na década de 90 houve um aumento de registros e distribuição espacial de LV no município de Petrolina, com pico epidêmico em 1995 (CESSE, et al., 2001). Devido à sua extensa área territorial, e ao crescimento da população humana e canina nos últimos anos, a LV tem se mostrado um importante problema de saúde pública, classificado como uma área de alta transmissão da Leishmaniose Visceral, com média anual de 11,1 casos nos últimos dez anos.

A distribuição geográfica da LV em Pernambuco ratifica a superação do paradigma da doença tipicamente da zona rural. O ciclo zoonótico encontra-se claramente estabelecido em áreas urbanas e periurbanas, como nos municípios de Petrolina (CESSE, et al., 2001) e Paulista (DANTAS-TORRES; ALMEIDA; BRANDÃO-FILHO, 2005). Todavia nas áreas rurais, onde as precárias condições de vida da população são importantes determinantes do processo saúde-doença, assim como em áreas urbanas, a LV ainda permanece como uma doença negligenciada, acometendo principalmente crianças (SILVA; VASCONCELOS, 2002), sobretudo as mal nutridas (QUEIROZ; ALVES; CORREIA; 2004).

Assim como observado em outras regiões do Brasil, o aumento da incidência da LV em áreas urbanas de Pernambuco está relacionado à pressão da população sobre o ambiente, ao intenso fluxo migratório intermunicipal, sobretudo do interior do estado para a Região Metropolitana de Recife, mas também no sentido inverso, permitindo tanto a introdução do agente causador da LV em áreas livres, quanto à inserção de indivíduos susceptíveis em áreas endêmicas. Além disso, muitas destas famílias se estabelecem na periferia das cidades de médio e grande porte, formando aglomerados densamente povoados que apresentam precárias condições de infraestrutura e saneamento básico (CESSE et al., 2001; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006b).

3.2 Agente etiológico

De acordo com sua classificação taxonômica, o gênero *Leishmania* agrupa espécies de protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae (LEVINE et al., 1980). Estes parasitas estão divididos em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, organizados em 10 complexos (LAINSON; SHAW, 1987).

As espécies que estão envolvidas na LV pertencem ao subgênero *Leishmania*, complexo *Leishmania donovani*. Neste complexo incluem-se as espécies *Leishmania donovani*, causadora do calazar na Índia, Paquistão, Bangladesh e em países da África Oriental; *Leishmania infantum* responsável pelo calazar no Mediterrâneo, África Central e Ocidental, Oriente Médio e China. Nas

Américas, a Leishmaniose Visceral é causada por *Leishmania chagasi* (REY, 2001a; REY, 2001b; PRATA; SILVA, 2005) que apresenta alta similaridade genética com a *L. infantum* sendo consideradas por alguns autores como a mesma espécie (MAURÍCIO et al., 1999, 2000; EL TAI et al., 2001; GONTIJO; MELO, 2004; ZEMANOVA et al., 2004; KUHLS et al., 2005; LUKES et al., 2007).

Dessa forma, devido à escassez de estudos bioquímicos e moleculares que permitam a distinção entre as duas espécies, houve uma revisão na taxonomia das espécies que causam a LV nas Américas (IBRAHIM; BARKER, 2001; MAURICIO et al., 2001, 2004; QUISPE TINTAYA et al., 2004; KUHLS et al., 2005, 2011; HIDE et al., 2007; LUKES et al., 2007) sugerindo que a espécie seja denominada de *L. (L.) infantum chagasi* (KUHLS et al., 2005, 2011; LAINSON; SHAW, 1988; MAURICIO et al., 1999, 2001, 2004). No entanto, recentemente, Marcili et al. (2014) através de análises filogenéticas validaram a existência da *L. (L.) infantum chagasi* como uma subespécie, separando a *L. chagasi* e *L. infantum*.

3.3 Hospedeiros e reservatórios

Várias espécies de mamíferos, incluindo os primatas (MALTA et al., 2010), marsupiais (SANTIAGO et al., 2007), endentados (ARAÚJO et al., 2013), morcegos (LIMA et al., 2008), lagomorfos (MOLINA et al., 2012), carnívoros (BECK et al., 2008; LUPPI et al., 2008), roedores (PAPADOGIANNAKIS et al., 2010) e equinos (ROLÃO et al., 2005) têm sido encontradas naturalmente infectadas por *Leishmania* spp.

Os principais reservatórios primários da LV são os mamíferos selvagens, como os canídeos silvestres, destacando-se as raposas das espécies *Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous* (DEANE, 1956; ALENCAR, 1961; LAINSON et al., 1990; SILVA et al., 2000; PALATINIK-DE-SOUSA et al., 2001; VIANNA, 2001; LAINSON; RANGEL, 2005); e os marsupiais do gênero *Didelphis* (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*) (SHERLOCK et al., 1984; TRAVI et al., 1994; CABRERA et al., 2003; SCHALLIG et al., 2007), animais de hábitos sinantrópicos.

Jusi et al. (2011) encontraram três animais de cativeiro sorologicamente positivo para *Leishmania*: uma raposinha (*Cerdocyon thous*), um cachorro vinagre (*Sprothos venaticus*) e um lobo Guará (*Chrysocyon brachyurus*).

Devido o processo de domiciliação do ciclo zoonótico de transmissão da LV, os animais sinantrópicos assumiram uma relevante importância na infecção pela *L. infantum chagasi* (DANTAS-TORRES, 2007), associando-se a alimentação onívora desses animais aliados ao modo de vida estar associados ao ambiente florestal e em habitações humanas. Dessa forma, tornam-se elos importantes entre a transmissão silvestre, peridomiciliar e domiciliar da LV (CABRERA et al., 2003; SILVA et al., 2005).

Também já foram observadas infecções por *L. infantum chagasi* em roedores das espécies *Rattus rattus*, *Nectomys squamipes*, *Rhipidomys mastacalis*, *Thrichomys apereoides* (CARVALHO, 2005; FERREIRA, 2010; QUARESMA et al., 2011; ZANET et al., 2014).

Com o processo de urbanização das Leishmanioses, do ponto de vista epidemiológico, o cão doméstico é considerado o principal reservatório doméstico da LV no Brasil, Américas, Mediterrâneo, África, em ambientes rurais e urbanos (DAVIES et al., 2000; FRANÇA-SILVA et al., 2003; MARLET et al., 2003; CARDOSO et al., 2004), sendo preponderante a sua participação para manutenção do ciclo da doença, constituindo-se, assim, principal elo na cadeia de transmissão da LV (SLAPPENDEL; FERRER, 1998; FEITOSA, 2001; VIANNA, 2001; MELO, 2004; CURI; MIRANDA; TALAMONI, 2006; GIUNCHETTI et al., 2006; BANETH et al., 2008; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

Os fatores que conferem aos cães esse importante papel na cadeia de transmissão da LV é a estreita convivência com o homem, compartilhando o mesmo domicílio; bem como ao intenso parasitismo cutâneo observado nos animais infectados (SILVA et al., 2005; LAURENTI et al., 2009); ao fato de que tanto os cães sintomáticos quanto os assintomáticos apresentam a mesma importância como fonte de infecção aos vetores (FEITOSA et al., 2000; PALATNIK-DE-SOUZA et al., 2001; SILVA et al., 2001; ALVAR et al., 2004; SILVA et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006; GUARGA et al., 2009; LAURENTI et al., 2009; BARBOSA et al., 2010; SILVEIRA et al., 2012; LAURENTI et al., 2013); e por fim, devido a enfermidade ser

mais prevalente na população canina, relativamente à humana, e na constatação de que os casos humanos geralmente são precedidos por casos caninos, pois os cães apresentam uma quantidade maior de parasitas por área tegumentar, relativamente ao evidenciado em humanos infectados (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; SCOTT; WILLIAM; GRIFFIN, 2001; OLIVEIRA et al., 2001; BANETH, 2006; PRADO et al., 2011), dessa forma, aumentando a possibilidade de infecção ao vetor, e consequentemente a transmissão a suscetíveis humanos (QUEIROZ et al., 2011).

A infecção natural de gatos domésticos por *L. infantum* tem sido verificada em diversos países da Europa (PORTÚS et al., 2002; POLI et al., 2002; MANCIANTI, 2004; PENNISI et al., 2004; GREVOT et al., 2005; VITA et al., 2005; MAROLI et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; AYLLÓN et al., 2008; CARDOSO et al., 2010; SHERRY et al., 2011; AYLLÓN et al., 2012; SPADA et al., 2013; CHATZIS et al., 2014), Ásia (HATAM et al., 2009; SARKARI et al., 2009; HATAM et al., 2010) e no Brasil (DA SILVA et al., 2008; BRESCIANI et al., 2010; COELHO et al., 2010; COSTA et al., 2010; COELHO et al., 2011; NETO et al., 2011; VIDES et al., 2011; SOBRINHO et al., 2012; CARDIA et al., 2013; SILVA et al., 2014; SOUSA et al., 2014).

No que concerne ao papel dos gatos como possíveis reservatórios da LV, alguns autores sugerem que esses animais possam atuar como reservatórios secundários, participando no ciclo epidemiológico da doença (GRAMICCIA; GRADONNI, 2005; MAROLI et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; SILVA et al., 2010). Entretanto, acredita-se que os felinos infectados possuam certo grau de resistência natural à doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2007).

A leishmaniose equina causada por *L. infantum* tem sido descrita em países da Europa, como Alemanha (KOEHLER et al., 2002), Espanha (SOLANO-GALLEGO et al., 2003) e Portugal (ROLÃO et al., 2005), relacionada com problemas cutâneos. No Brasil, já descrita por Feitosa et al. (2013) em equinos do estado de São Paulo; e por Soares et al. (2013) em equinos provenientes de área endêmica de Minas Gerais. Contudo, o papel desses animais na cadeia de transmissão da LV ainda não foi esclarecido (CERQUEIRA et al., 2003; KOUAM et al., 2010; SOARES et al., 2013).

3.4 Vetores

No Brasil, o principal vetor da LV é a *Lutzomyia longipalpis*, pertencente à classe Diptera, gênero Psychodidae e subfamília Phlebotominae (REY, 2001a; ISHKAWA et al., 2002; CALDAS et al., 2002; FRANÇA-SILVA, et al., 2005; BALBINO et al., 2006). Entretanto, outras espécies já foram descritas como vetores, como a *Lutzomyia cruzi* no estado do Mato Grosso do Sul (GALATI, et al., 1997; GALATI, et al., 1997; SANTOS et al., 1998; SANTOS-GOMES; CAMPINO; ABRANCHES, 2000; PITA-PEREIRA et al., 2008), a *Lutzomyia intermedia*, no litoral do Rio de Janeiro (MARZOCHI; CARVALHO, 1994), a *Lutzomyia neivai* e *Lutzomyia sallesi* em Minas Gerais (SARAIVA et al., 2009) *Lutzomyia forattinii* em Corumbá (MS) (PITA-PEREIRA et al., 2008), assim como *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia firmatoi*, descritos em outras regiões endêmicas do país (DIAS-LIMA; GUEDES; SHERLOCK, 2003; DANTAS-TORRES et al., 2010).

Os flebotomíneos são pequenos, de um a três milímetros e têm como características: a coloração amarelada ou de cor palha, com corpo revestido de pelos e, em posição de repouso, suas asas permanecem eretas e semi-abertas, com alcance de vôos curtos. Por essas características, são também conhecidos como mosquito palha, asa-dura, birigui, cangalhinha, tatuquira, catuqui, murutinga, orelha-de-veado (KILLICK-KENDRICK, 1990; WOLFF et al., 2003).

Os machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentam-se de seiva e néctar de plantas, e frutas maduras (BRASIL, 2006). Entretanto, as fêmeas são hematófagas obrigatórias, pois necessitam de sangue para o desenvolvimento dos ovos, podendo realizar repasto sanguíneo em diversas espécies de vertebrados, como os humanos, cães, gatos, equinos, asininos, caprinos, bovinos, suínos, aves e animais silvestres, principalmente os roedores (QUINNELL; DYE; SHAW, 1992; CAMARGO-NEVES et al., 2001; MORENO; ALVAR, 2002; PASSOS-DIAS; LOROSA; REBÊLO, 2003; MISSAWA; LOROSA; DIAS, 2008; COSTA et al., 2013). A atividade hematófaga é predominantemente noturna e inicia-se cerca de uma hora após o crepúsculo (CAMARGO-NEVES; GOMES; ANTUNES, 2002).

As mudanças ambientais, seja por fenômeno natural ou intervenção humana, como destruição das matas nativas, alteram os habitats naturais destes

flebotomíneos e modificam a situação ecológica entre vetores e parasitos (PESSOA; MEDEIROS; BARRETT, 2007) diminuindo desta forma a disponibilidade de animais silvestres como fonte alimentar, propiciando a rápida adaptação do vetor ao ambiente, que busca fontes alternativas de alimentação (FELIPE et al., 2011; AFONSO et al., 2012).

A espécie *L. longipalpis* está bem adaptada ao ambiente peridomiciliar. Esses hospedeiros invertebrados e suas formas imaturas são identificados preferencialmente em áreas com abrigo de animais, em maior densidade nos galinheiros, chiqueiros, canis, paios; lixo, matéria orgânica em decomposição e pedras, (GALATI et al., 1997; FELICIANGELI, 2004; LAINSON; RANGEL, 2005). Entretanto, em áreas urbanizadas é frequente encontrá-los no interior das residências durante o período crepuscular (BRASIL, 2006; KESARI et al., 2010; COSTA, 2011).

Fatores climáticos, tais como temperatura, umidade relativa do ar e precipitação podem influenciar na densidade populacional de flebotomíneos. A ocupação humana desordenada e invasão em áreas florestais permitem que os vetores se aproximem cada vez mais do peridomínio e domicílio e ciclos das leishmanioses ocorram de forma extra silvestre (LAINSON; SHAW, 1998; ELNAIEN et al., 2003; MADEIRA et al., 2003; QUEIROZ et al., 2012).

3.5 Ciclo evolutivo e formas de transmissão

Os protozoários do gênero *Leishmania*, são parasitos intracelulares obrigatórios, multiplicando-se nos fagócitos mononucleares do sistema mononuclear fagocitário (SMF). Apresentam-se sob a forma amastigota ou promastigota, na dependência do hospedeiro parasitado (MICHALICK; GENARO, 2007; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

As formas amastigotas são pequenas, apresentando tamanho entre 2 a 5 µm, com formatos ovóides, contem um núcleo arredondado e um cinetoplasto alongado em forma de bastão próximo ao núcleo (BRASIL, 2006; MICHALICK; GENARO, 2007), não apresentam motilidade, pois não possuem flagelo livre, somente um

rudimento que está presente na bolsa flagelar, caracterizada como uma pequena invaginação da membrana do parasita (REY, 2001a; LAURENTI, 2010; WHO, 2010). Essas formas estão presentes no interior de células mononucleares do SMF de diversos tecidos de hospedeiros vertebrados, tais como os seres humanos, animais domésticos ou animais silvestres (MÁRTIN-SÁNCHEZ et al., 2007; MICHALICK ; GENARO, 2007).

As promastigotas são alongadas e no polo anterior há um flagelo que é responsável pela movimentação do parasita. Possuem corpo flexível, e o tamanho variando entre 14 a 40 x 1,5-3,0 μm , incluindo o flagelo. O núcleo é central, ovoide ou esférico, e o cinetoplasto localiza-se próximo a extremidade anterior (REY, 2001a; LAURENTI, 2010; WHO, 2010). São formas extracelulares e encontrando-se no tubo digestório de fêmeas de hospedeiros invertebrados, como os flebotomíneos (MÁRTIN-SÁNCHEZ et al., 2007; MICHALICK ; GENARO, 2007).

A infecção para o hospedeiro invertebrado ocorre quando as fêmeas de flebotomíneos, durante o repasto sanguíneo em hospedeiro infectado, ingerem células do SMF, macrófagos e leucócitos, parasitados pelas formas amastigotas de *Leishmania*. Durante o trajeto pelo trato digestivo anterior, ou no estômago do vetor, os macrófagos rompem-se, liberando as formas amastigotas. Estas sofrem divisão binária e transformam-se rapidamente numa forma promastigota procíclica móvel e divisível, que se prende à parede do intestino. Posteriormente transformam-se numa forma promastigota metacíclica não divisível que é incapaz de se prender ao intestino e por isso migra para a parte superior do aparelho gastrointestinal, a probóscide, (PESSOA, 1972; DE ALMEIDA et al., 2003; NEUBER, 2008), sendo eliminadas pela saliva durante o próximo repasto sanguíneo (MICHALICK ; GENARO, 2007; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

Ao exercer novo repasto sanguíneo sobre um hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas presentes na glândula salivar, são inoculadas na pele, gerando resposta inflamatória local, com subsequente fagocitose por células do SMF, macrófagos teciduais e granulócitos neutrófilos. No interior dos macrófagos, o parasito sofre a transformação para a forma amastigota, intracelular obrigatória, capaz de desenvolver-se e multiplicar-se (NEVES et al., 1997; FERRER et al., 1999; REY, 2001a; CUNNINGHAM, 2002).

A multiplicação por divisão binária simples é iniciada pela duplicação do cinetoplasto no interior do vacúolo fagocitário dos macrófagos. Após sucessivas multiplicações, na ausência do controle parasitário pela célula hospedeira, esta se rompe e as amastigotas liberadas serão fagocitadas por outros macrófagos (NEVES et al., 1997; REY, 2001a; GREENE, 2006, REILING et al., 2010; KAYE; SCOTT, 2011). A disseminação hematogena e linfática ocorre para tecidos ricos em células do SMF, tais como linfonodos, medula óssea, baço e fígado (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012). Além destes tecidos, outros órgãos e estruturas, tais como os rins, as articulações e os músculos, podem apresentar o parasita (SILVA et al., 2007; BANETH et al., 2008).

A ausência do vetor em determinadas áreas onde foi verificada a ocorrência de casos de LV sugere a existência de outras formas de transmissão (DANTAS-TORRES, 2009). Nesse contexto, alguns autores têm apontado as pulgas e carrapatos como possíveis vetores da *L. infantum chagasi*, entretanto, não foi comprovada a capacidade vetorial desses artrópodes (COUTINHO et al., 2005; COUTINHO; LINARDI, 2007; FERREIRA et al., 2009; PAZ et al., 2010; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2010; DANTAS-TORRES et al., 2010b; COLOMBO et al., 2011; DANTAS-TORRES, 2011; SOLANO-GALLEGO et al., 2012; TROTTA et al., 2012).

A transmissão transplacentária, venérea e por transfusões sanguíneas também já foi relatada, porém estes não são mecanismos de importância epidemiológica (OWENS et al., 2001; MORILLAS-MARQUEZ et al., 2002; ROSYPAL et al., 2005; FREITAS et al., 2006; TABAR et al., 2008; PANGRAZIO et al., 2009; SILVA et al., 2009; BOGGIATTO et al., 2011; NAUCKE; LORENTZ, 2012).

3.6 Patogenia

Leishmania infantum chagasi é um parasito de células do SMF, principalmente do baço, fígado, linfonodos e medula óssea. Entretanto, no curso da infecção, outros órgãos e tecidos podem ser afetados (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

Uma vez que a infecção se instale as primeiras células a serem recrutadas para o local são os neutrófilos, seguidos pelos monócitos/macrófagos dois ou três

dias depois, caracterizando a resposta imunológica inata (AGA et al., 2002). Estas células participam ativamente na defesa inicial contra a infecção, porém elas também podem participar como elementos de evasão do protozoário, conferindo-lhes diversos mecanismos de proteção (LAUFS et al., 2002; PETERS et al., 2008; RITTER; FRISCHKNECHT; VAN ZANDBERGEN, 2009; CHARMOY et al., 2010). Além disso, postula-se a hipótese de que os neutrófilos infectados são responsáveis pela entrada silenciosa e sobrevivência do parasito no interior de macrófagos (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2008; RITTER et al., 2009).

Durante a infecção, as células apresentadoras de antígenos, pertencentes ao SMF, estimulam a proliferação de linfócitos T (CD4+) auxiliares do Tipo 1 (Ta1) ou auxiliares do Tipo 2 (Ta2) (BARBIERI, 2006; MACHADO; HOFFMANNL; LANGONI, 2007). As células Ta1, ativadas pela IL-12, produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas IL-2, IL-3 e IL12, e o interferon gama (IFN- γ), que aumentam a eficiência das células fagocíticas e de linfócitos citotóxicos. O IFN- γ é um potente indutor da formação de superóxido e óxido nítrico pelos macrófagos, favorecendo o controle do parasitismo com a eliminação da infecção (PINELLI et al., 1994; CIARAMELLA; CORONA, 2003; BARBIÉRI, 2006). Por outro lado, se houver a ativação de linfócitos Ta2, ocorrerá a produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, com conseqüente proliferação de células B e produção exagerada de imunoglobulinas, desencadeando a formação e deposição de imunocomplexos circulantes, os quais resultam em danos teciduais. Desta forma, os animais que apresentam sinais clínicos da doença desenvolvem uma resposta imunológica predominantemente humoral que, além de não ser protetora, é ainda deletéria ao organismo (BARBIÉRI, 2006).

Para que ocorra o estabelecimento da infecção o parasito precisa ser internalizado por células do sistema fagocitário, como os macrófagos, as células dendríticas e os neutrófilos e, uma vez no interior da célula, resistir à ação microbicida (RITTIG; BOGDAN, 2000). Dessa forma, após a fagocitose, os parasitos têm a capacidade de desenvolver mecanismos intrínsecos de escape, conferindo-lhes resistência à ação das enzimas hidrolíticas e espécies reativas ao oxigênio, resultantes da ação das enzimas dependentes de oxigênio, capacitando-os a se

multiplicarem no interior das células (ASSCHE et al., 2011). Contudo, o acúmulo dos produtos microbicidas tem como contrapartida a lesão de biomoléculas e, se não controlado pelo sistema antioxidante, estes produtos tornam-se excessivos, com desenvolvimento do estresse oxidativo, característico nos animais com LV (BILDIK et al., 2004; BRITTI et al., 2008).

A patogenia da doença é determinada por múltiplos fatores que envolvem os hospedeiros e os parasitos, além dos fatores genéticos determinantes da susceptibilidade para a infecção e para a cura, e ainda o estado imunológico e nutricional do indivíduo (NEVES, 2005), sendo que a disseminação e localização estável do parasito no organismo do hospedeiro é um requisito prévio para a progressão do processo infeccioso e, conseqüente, a manifestação clínica da doença. Desta forma, é considerado como elemento patogênico primário na LV a infecção, sobrevivência e multiplicação do parasito no interior das células do SMF dos animais e no homem (MARQUES, 2008).

3.7 Manifestações clínicas

A LVC é uma doença sistêmica, de decurso crônico, que pode envolver potencialmente qualquer tecido, órgão ou fluido corporal, e manifestam-se sinais clínicos inespecíficos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

As manifestações clínicas mais comuns da LVC incluem linfadenomegalia generalizada, perda de peso corporal, diminuição ou aumento do apetite, letargia, palidez de mucosas, esplenomegalia, hepatoesplenomegalia, poliúria, polidipsia, febre, vômitos, diarreia (incluindo colite crônica), dermatites (esfoliativa não pruriginosa com ou sem alopecia, erosiva-ulcerativa, nodular, papular, pustulosa), alopecia, onicogrifose, blefarites (esfoliativa, ulcerativa ou nodular), conjuntivite, ceratoconjuntivite, uveíte, lesões ulcerativas ou nodulares mucocutâneas e mucosas (oral, genital e nasal), epistaxe, poliartrite, polimiosite, vasculopatias (vasculite sistêmica, tromboembolismo arterial), distúrbios neurológicos e renais (síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica (CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; FEITOSA et al., 2000; CIARAMELLA; CORONA, 2003; COSTA et al., 2003;

ZATELLI, et al., 2003; BRACHELENTE et al., 2005; BARBIERI, 2006; CARDOSO et al., 2007; BANETH et al., 2008; PALTRINIERI et al., 2010; REIS et al., 2010).

As lesões cutâneas são as mais frequentes, e segundo Baneth (2006) podem estar presentes entre 50 a 90% dos cães infectados por *L. infantum chagasi*, e os locais mais severos e comumente afetados são o plano nasal, focinho, região periocular e pavilhões auriculares.

Alguns animais desenvolvem a sintomatologia logo após a infecção, porém, em muitos animais a infecção segue seu curso de forma assintomática, permanecendo dessa forma por tempo indefinido (vários anos) ou mesmo durante toda a vida do animal. Entretanto, se ocorrer uma alteração em seu estado imune, em decorrência de alguma enfermidade ou pelo uso de medicamentos imunossupressores, podem levar ao surgimento da sintomatologia da doença (MORENO; ALVAR, 2002; ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008).

O desenvolvimento tardio dos sinais clínicos, juntamente com a sintomatologia inespecífica é considerado fatores que desencadeiam o sub-diagnóstico da LVC. Dessa forma, alguns autores sugerem que os cães assintomáticos mantêm o ciclo de transmissão da LV na mesma proporção, ou até em proporções superiores aos cães sintomáticos, pois estes animais são altamente competentes para estabelecer a infecção em flebotomíneos, demonstrando o seu papel na manutenção do ciclo epidemiológico da doença (MOLINA et al., 1994; LAURENTI et al., 2013).

No homem assim como nos cães, a sintomatologia clínica da LV pode diversificar bastante, gerando desde manifestações inaparentes e oligossintomáticas, caracterizadas por quadro clínico discreto, de curta duração que normalmente culmina em cura espontânea, a quadros graves, que se não tratados podem levar o paciente ao óbito (BRASIL, 2010). Os sintomas incluem febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia (MANDELL et al., 2005).

Alguns casos de LV ocorrem de forma atípica, uma vez que envolvem os pulmões, pleura, mucosa oral, faringe, laringe, esôfago, estômago, intestino delgado, medula óssea e pele (SUNDAR; CHAKRAVART, 2005; TISEO et al., 2008; HICKS et

al., 2009). Geralmente estes casos atípicos foram descritos principalmente em pacientes infectados com HIV (LAGUNA et al., 1994; ROSENTHAL et al., 2000) ou com qualquer outra condição imunossupressora, tais como diabetes, linfoma ou em pacientes idosos (ÁLVAREZ-NEBREDA et al., 2005; ELLUL; PISCOPO; VASSALLO, 2007; HICKS et al., 2009). Dessa forma, as manifestações clínicas da LV podem ser influenciadas pelo estado imunológico do paciente (COTA et al., 2012).

A desnutrição tem sido descrita como um importante fator de risco para a aquisição da doença, principalmente em crianças (CERF et al., 1987; BADARÓ et al., 1986; DYE; WILLIAMS, 1993; ANSTEAD et al., 2001; CALDAS et al., 2002; MACIEL et al., 2008) nos primeiros anos de vida, relacionando-se à elevada letalidade, em contraposição, na fase adulta a letalidade aumenta proporcionalmente com a idade (AL-JURAYYAN et al., 1995; GRECH et al., 2000; PEDROSA; ROCHA, 2004). No Brasil, nos anos de 2001 a 2008, a letalidade atingiu principalmente os pacientes menores de um ano e com 50 anos ou mais de idade (BRASIL, 2011).

3.8 Diagnóstico

O diagnóstico da LV deve ser realizado no homem e no cão. Recomenda-se a combinação de diferentes métodos, uma vez que a doença apresenta um amplo espectro clínico tanto em humanos (REITHINGER; DUJARDIN, 2007) quanto em cães (GONTIJO; MELO, 2004), não havendo um teste com sensibilidade e especificidade de 100% (ALVAR, et al., 2004). Nos cães o diagnóstico constitui sérios problemas relacionados à doença, tornando ineficazes na vigilância e na adoção de medidas de controle, pois, geralmente ocorrem reações inespecíficas e uma janela entre a infecção e a soroconversão (BIGELI; OLIVEIRA JÚNIOR; TELES, 2012).

O diagnóstico específico da LVC pode ser realizado através de métodos parasitológicos, sorológicos, moleculares (GONTIJO; MELO, 2004; MANNA et al., 2004; FRANCINO et al., 2006; FERNÁNDEZ-BELLON, 2006; ZANETTE, 2006; MOREIRA et al., 2007; MIRÓ et al., 2008).

3.8.1 Métodos parasitológicos

O exame parasitológico direto permite a visualização do parasito. Para sua demonstração, são comumente utilizados materiais de biópsias ou aspirados esplênicos, linfonodos, medula óssea, fígado e sangue. Com o material coletado são confeccionados esfregaços e colorações específicas em lâminas para análise microscópica e a detecção de formas amastigotas do parasito (CIARAMELLA; CORONA, 2003; ALVAR et al., 2004; SARIDOMICHELAKIS et al., 2005; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006; MOREIRA et al., 2007; REITHINGER; DUJARDIN, 2007). Consiste em uma técnica bastante simples, pouco invasiva, com especificidade de 100%, mas, a sensibilidade é dependente da carga parasitária, do tipo de material biológico coletado, do seu processamento e coloração, além do observador, que deve examinar exaustivamente a lâmina antes de considerá-la negativa (DIETZE, 2006; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006; LAURENTI, 2009).

Podem ser utilizadas ainda as técnicas de Imunohistoquímica e Imunocitoquímica. Estas técnicas são sensíveis, auxiliam na detecção do parasito, quando há uma carga parasitária muito baixa nos tecidos lesados (FERRER et al., 1988; MOREIRA et al., 2007). A pele e os órgãos linfóides são os mais amplamente avaliados, apresentando, independentemente do quadro clínico do animal acometido, altos valores de especificidade e sensibilidade, porém exigem mais tempo de elaboração (TAFURI et al., 2004; MOREIRA et al., 2007; LAURENTI, 2009; ASSIS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2010).

O cultivo *in vitro* em meio bifásico de diferentes materiais clínicos como aspirados de linfonodos, medula óssea, baço e fígado podem ser utilizados para o isolamento do parasito (TROTZ-WILLIAMS; GRADONI, 2003; ALVAR et al., 2004; SARIDOMICHELAKIS et al., 2005; GOMES et al., 2006). A técnica apresenta alta especificidade e, diante da positividade, não há dúvida quanto à presença da infecção. No entanto, a sensibilidade depende de vários fatores, tais como o tipo de meio utilizado, e a quantidade de material que é depositada nos tubos de cultivo (CIARAMELLA et al., 1997). Outro fator que interfere na sensibilidade é a falta de adequação na esterilidade durante todo o processo de obtenção do material e a semeadura nos meios, uma vez que, são meios extremamente ricos em nutrientes, e

dessa forma podem levar ao crescimento de fungos, bactérias que impedem o crescimento de *Leishmania* (LAURENTI, 2009).

Materiais de biópsias ou aspirados podem ainda ser inoculados em animais de laboratório, geralmente hamsters (*Misocricetus auratus*), para posterior visualização do desenvolvimento da doença nestes animais. Posteriormente, o parasito pode ser recuperado mediante biópsias ou necropsia dos animais experimentalmente infectados, e inoculados em meios de cultivos bifásicos para manter-se em cultivo (HERWALDT, 1999; GOMES et al., 2006). O xenodiagnóstico também pode ser utilizado, embora sua aplicação seja restrita, assim como a inoculação em animais de laboratório à pesquisa acadêmica, sendo de grande importância para investigação de fatores epidemiológicos acerca do papel de determinados hospedeiros como possíveis reservatórios da LV (MAIA; CAMPINO, 2008; SOARES et al., 2011).

3.8.2 Métodos sorológicos

A LV é caracterizada por uma acentuada estimulação policlonal de linfócitos B, resultando em hipergamaglobulinemia, produzindo altos títulos de IgG anti-*Leishmania*. Dessa forma, diversas técnicas sorológicas têm sido utilizada no diagnóstico da LV e LVC (FERRER, 1999).

Os testes diferem na sua especificidade e sensibilidade, na sua aplicação prática em campo, bem como na disponibilidade de reagentes. Apresentam algumas limitações como podem permanecer positivos durante um período longe de tempo após o tratamento, nos casos humanos, onde o tratamento é permitido, não permitindo dessa forma a avaliação do efeito da terapia e podem ainda ocorrer reações cruzadas com outras doenças. Nas infecções subclínicas, um teste positivo não indica necessariamente doença ativa. Seus resultados devem ser avaliados cautelosamente, uma vez que não apresentam especificidade e sensibilidade de 100% e, falham em detectar cães assintomáticos infectados, que possuem uma resposta imune predominantemente celular, resultando tanto falso-positivos como falso-negativos (FERRER et al., 1995; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; GONTIJO; MELO, 2004; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006; KHAN et al., 2014).

Os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* spp, obtidos por meio de exames sorológicos, nem sempre estarão associados com a severidade dos sinais clínicos. Títulos baixos geralmente são observados em cães assintomáticos infectados, cães provenientes de áreas endêmicas e expostos ao parasita (PALTRINIERI et al., 2010), ou naqueles que apresentam reação cruzada com outros agentes infecciosos (ZANETTE, 2006). Inversamente, um título de anticorpos elevado, isto é, de duas a quatro vezes acima do ponto de corte da reação, irá confirmar a presença da doença (PALTRINIERI et al., 2010). Em cães com idade inferior a três meses não se deve realizar a sorologia, uma vez que a presença de anticorpos circulantes maternos podem propiciar resultados falso- positivos (BRAGA et al., 1998).

Muitos testes sorológicos podem ser utilizados, tais como: Fixação de Complemento, Aglutinação Direta, Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) com diferentes modificações, Western Blot, Imunocromatografia, Hemaglutinação Indireta, Imunofixação em Gel (GONTIJO; MELO, 2004; METTLER et al., 2005; MAIA ; CAMPINO, 2008; LAURENTI, 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; MARCONDES et al., 2011).

No Brasil, onde LV é um grave problema de saúde pública, o diagnóstico canino é importante, uma vez que a eliminação de cães sorologicamente positivos é uma das medidas de controle adotadas para evitar a transmissão da LV humana e canina. Entre os métodos mais aplicados para o diagnóstico sorológico, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é usada com bastante frequência em estudos epidemiológicos (ALVAR et al., 2004). A sua sensibilidade e especificidade varia de 60% a 100% (ALMEIDA; JESUS; SOUSA-ATTA, 2005; SILVA et al., 2013), entretanto, reações cruzadas com anticorpos de outras doenças já foram relatadas (ZANETTE et al., 2014). Quanto ao ponto de corte da reação, o mesmo pode variar de acordo com o laboratório. De maneira geral, considera-se positivo um animal com título igual ou superior a 40, todavia, alguns laboratórios utilizam como ponto de corte valores iguais ou superiores a 1:80 (BRASIL, 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; PALTRINIERI et al., 2010).

O Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) também é bastante utilizado, de fácil execução, valor acessível, leitura rápida, fornecendo resultados automatizados, o que elimina a subjetividade na leitura, além de permitir a análise simultânea de um

número grande de amostras (BRASIL, 2011). A sensibilidade e especificidade da técnica podem variar entre 92 e 100% e entre 71 e 100%, respectivamente, na dependência do antígeno utilizado (REITHINGER et al., 2002; METTLER et al., 2005; ZANETTE et al., 2006; MOREIRA et al., 2007; MIRÓ et al., 2008; SILVA et al., 2012). Dessa maneira, a utilização de antígenos recombinantes (rA2, rK9, rK26 e rK39), e purificados de glicoproteínas de membranas (gp 63, gp70 e gp 72) aumentaram a sensibilidade e especificidade da técnica (BOARINO et al., 2005; ROSÁRIO et al., 2005; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006; PORROZZI et al., 2007; SILVA et al., 2012).

O diagnóstico sorológico da LVC anteriormente recomendado pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose do Ministério da Saúde para a rotina e inquéritos epidemiológicos em municípios com registro de LV era realizado através do Ensaio Imunoenzimático (ELISA), como método de triagem e, da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), como método confirmatório. Entretanto, para melhorar a precisão no diagnóstico de LVC, o Ministério da Saúde publicou uma Nota Técnica estabelecendo a substituição do protocolo usado atualmente, com a implantação de um teste rápido de imunocromatografia (DPP®CVL- Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) que utilizam antígenos recombinantes K39 (rk39) como método de triagem e ELISA, como teste confirmatório da doença (BRASIL, 2011b; GRIMALDI et al., 2012; COURA-VITAL et al., 2013; BRAGA; LANGONI; LUCHEIS, 2014). No entanto, estes testes apresentam algumas limitações como a baixa sensibilidade, principalmente em cães assintomáticos (FARIA et al., 2011; GRIMALDI et al., 2012), e reatividade cruzada com alguns agentes (PORROZZI et al., 2007).

3.8.3 Métodos moleculares

Os testes moleculares baseados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) têm sido consistentemente validados como os mais rápidos, sensíveis e específicos quando comparados a outros métodos diagnósticos como os parasitológicos e os sorológicos. Além disso, a PCR tem sido adequada quando usados em programas de vigilância da LV (BIGELI; OLIVEIRA JÚNIOR; TELES,

2012; BRAGA; LANGONI; LUCHEIS, 2014). Dentre eles vários protocolos têm sido utilizados para a identificação e caracterização de *Leishmania*, tanto em vetores quanto em hospedeiros reservatórios (MIRZAEI et al., 2013). Devido a sua alta sensibilidade o desenvolvimento desta técnica molecular tem se mostrado uma poderosa ferramenta para o diagnóstico da LV nas últimas décadas (SALAM; KHAN; MONDAL, 2011). Todavia, apresenta ainda um alto custo e pode não estar disponível em algumas áreas geográficas, dependendo da endemicidade da LV, dos recursos financeiros e científicos (CLEMENTE et al., 2014).

Dentre as técnicas moleculares para o diagnóstico de LVC, destacam-se a PCR convencional, nested PCR e PCR em tempo real (BOURDEAU et al., 2014). O desempenho diagnóstico destes testes é altamente dependente da metodologia aplicada, e das medidas adotadas por cada laboratório para evitar resultados falso-positivos. Em condições ideais, DNA do parasito podem ser detectados em amostras de tecidos pele, pelos, swabs conjuntivais, nódulos linfáticos, medula óssea, baço, e em vários fluidos corporais como sangue, urina e liquor, cortes histológicos de tecidos parafinados e congelados, e também no vetor (FISA et al., 2001; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; LEONTIDES et al., 2002; MANNA et al., 2004; NUNES et al., 2007; MAIA; CAMPINO, 2008; MAIA et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; DI MUCCIO et al., 2012; LOMBARDO et al., 2012; SOLCÀ et al., 2012; BELINCHÓN-LORENZO et al., 2013; BRAGA; LANGONI; LUCHEIS, 2014; PEREIRA et al., 2014), além disso, permite detectar cães infectados assintomáticos mesmo antes da soroconversão (COURA-VITAL et al., 2013).

3.9 Prevenção e controle

As medidas de profilaxia adotadas pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV), do Ministério da Saúde, são direcionadas ao reservatório canino, ao homem e aos vetores. Essas medidas incluem a utilização de mosquiteiros ao redor das camas; uso de telas em portas e janelas, uso de repelentes, a não exposição ao vetor durante o período crepuscular e noturno, na tentativa de evitar o contato dos seres humanos com os flebotomíneos (BRASIL, 2006). Recomenda-se ainda o uso de coleiras impregnadas com Deltametrina a 4%

em cães (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; MAROLI et al., 2001; CAMARGO-NEVES et al., 2004; BRASIL, 2006).

No que concerne às medidas de prevenção direcionadas aos flebotomíneos, recomenda-se o manejo ambiental adequado, com limpeza periódica dos quintais, terrenos, por meio da remoção de matéria orgânica em decomposição (folhas, frutos, fezes de animais e outros entulhos que favoreçam a umidade do solo) e destino adequado do lixo orgânico, a fim de impedir o desenvolvimento das formas imaturas dos flebotomíneos; a limpeza dos abrigos de animais domésticos; bem como a manutenção de animais domésticos distantes do domicílio, especialmente durante a noite, de modo a reduzir a atração dos flebotomíneos para o intradomicílio (BRASIL, 2006).

As estratégias de controle que têm sido utilizadas no Brasil são centradas e dirigidas verticalmente para o controle do reservatório canino através de inquérito sorológico canino e da eutanásia dos cães sororreagentes, como também a aplicação de inseticidas para redução da população de flebotomíneos e a realização de diagnóstico e tratamento adequados dos casos humanos registrados (CAMARGO, 2010; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2014). Nos últimos anos tem sido discutida a eutanásia de cães infectados como estratégia de controle, especialmente porque a incidência de humanos com LV tem permanecido alta, mesmo com a aplicação intensiva dessa estratégia (WHO, 2010; COURTENAY et al., 2014).

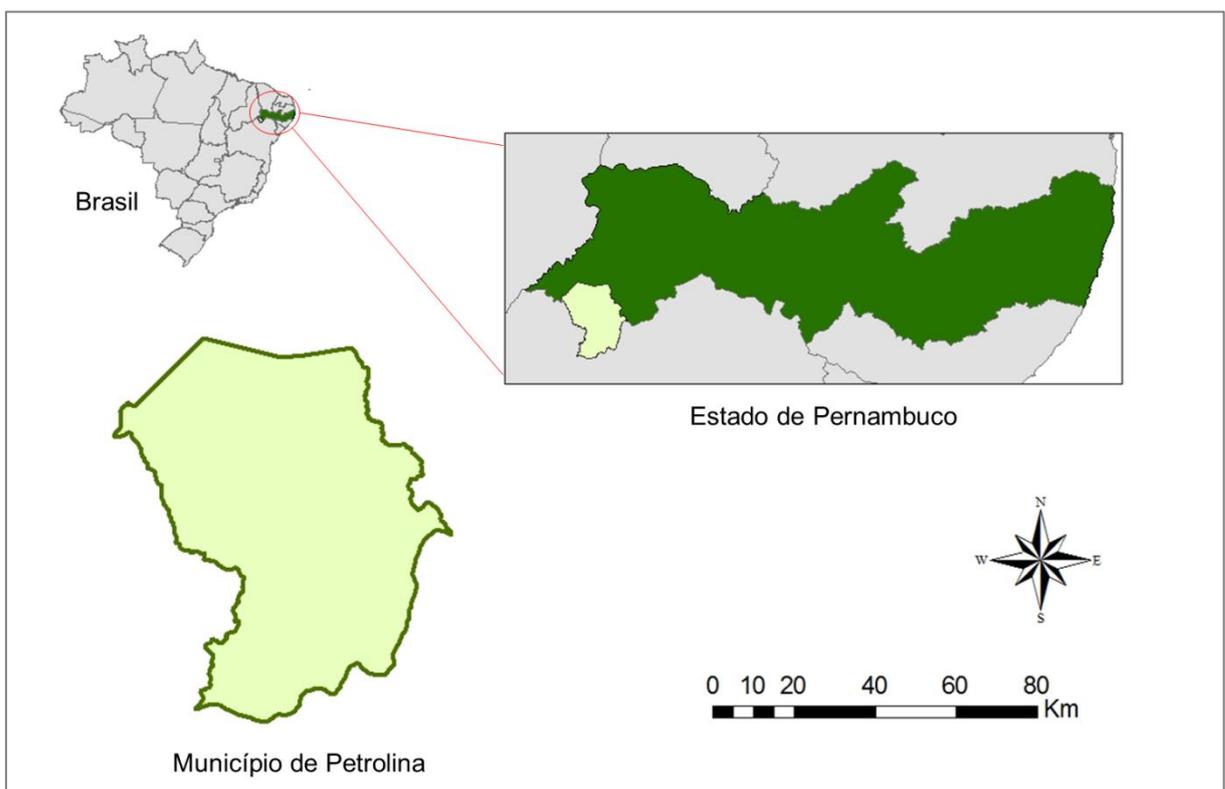
É possível reconhecer que tais medidas quando realizadas de forma isolada não tem apresentado eficácia na redução da incidência da doença, dessa forma, torna-se evidente a necessidade de reavaliar as ações propostas pelo programa de controle da LV no país, assim como propiciar uma melhor definição das áreas de transmissão e de risco da doença (GONTIJO; MELO, 2004; BRASIL, 2006; MAIAELKHOURY et al., 2008; RONDON et al., 2008; WHO, 2010; COURTENAY et al., 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área de estudo

O município de Petrolina (9° 23' 55" latitude sul; 40° 30' 3" longitude oeste) (Figura 1) está localizado na mesorregião São Francisco e na Microrregião Petrolina do Estado de Pernambuco ocupando uma área de aproximadamente 4.562 Km². O clima é tropical semiárido, chuvas escassas e irregulares, com temperatura máxima de 32,1°C e mínima de 20,5°C, com índices pluviométricos médios de 541,1 mm/ano e umidade relativa do ar em média de 65,9%. A vegetação é basicamente composta por caatinga hiperxerófila com trechos de floresta caducifólia (IBGE, 2015).

Figura 1- Mapa do Estado de Pernambuco destacando a localização do município de Petrolina, PE.



Fonte: ARAUJO (2015).

Administrativamente o município de Petrolina está dividido em quatro distritos: Sede, Curral Queimado, Cristália e Rajada. A divisão do município por bairros diverge nas diferentes fontes de dados utilizadas neste estudo, a Secretaria de Planejamento e Urbanismo e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Dessa forma, tendo em vista a dinâmica do crescimento do município, a Prefeitura Municipal reconhece bairros que o IBGE desconhece principalmente as áreas rurais. Sendo assim, neste estudo consideramos a divisão proposta pela Secretaria de Planejamento e Urbanismo do município que divide o município em 71 bairros, sendo 32 localizados na zona urbana e 39 na zona rural. De acordo com o censo populacional de 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Petrolina (PE) possui aproximadamente 293.962 habitantes, dos quais 219.215 (74,57%) residem em área urbana e 74.747 (25,43%) em área rural. A densidade demográfica do município é de 64,49 habitantes/km² e, em conjunto com o município de Juazeiro, na Bahia, forma o maior aglomerado urbano da região semiárida, totalizando 499.512 habitantes.

Petrolina possui cerca de 80.351 domicílios permanentes, dos quais 61.291 encontram-se na área urbana e 19.061 na rural. A coleta de lixo é realizada em 86,2% de sua área e o abastecimento de água e rede de esgoto sanitário atendem, respectivamente, 92% e 60,8% da malha urbana (IBGE, 2015). Em relação à população, aproximadamente 68% (200.273) dos habitantes possui faixa etária entre 10 e 49 anos. Cerca de 78% (231.784) da população é alfabetizada (IBGE, 2015).

A renda média da população urbana é de R\$ 2.577,57 reais e a rural de R\$ 1.032,21 reais e o índice médio de desenvolvimento humano do município é de 0,697, na escala de 0 a 1. Quanto às principais atividades econômicas da região destacam-se a fruticultura irrigada, destacando-se as culturas de uva, manga, banana e goiaba, a vinicultura, agropecuária e o comércio (IBGE, 2015). A expansão desse mercado, particularmente da agroindústria exportadora, promoveu mudanças na dinâmica populacional do município determinado pelo intenso processo migratório. Neste contexto se destaca a LV que, por seu potencial de expansão, representa um importante problema de saúde pública, uma vez que o município é considerado uma área de intensa transmissão.

4.2 Perfil epidemiológico dos casos humanos

4.2.1 Fonte de Dados

Os dados referentes ao número absoluto e os dados demográficos e epidemiológicos dos casos humanos de LV ocorridos no município de Petrolina no período de 2007 a 2013 foram obtidos por meio do acesso ao banco do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde. Dados referentes ao município e sua população foram consultados nos arquivos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

4.2.2 Análise dos dados

As principais variáveis obtidas para as informações epidemiológicas foram: sexo, faixa etária, grau de escolaridade, evolução do caso, métodos diagnósticos, presença de co-infecção com HIV, de modo a definir o perfil epidemiológico e discutir a incidência dos casos em Petrolina no período de estudo.

Os dados foram tabulados e analisados utilizando-se de estatística descritiva. O coeficiente de incidência foi calculado por 100.000 habitantes, dividindo-se o número de casos pelo total da população residente no mesmo período e em seguida multiplicando-se o resultado por 100.000. Para o cálculo do grupo etário, o cálculo foi feito dividindo-se o número de casos ocorridos em determinada faixa etária pela população da mesma idade e ano. Da mesma forma foi realizado o cálculo da incidência por sexo. A distribuição temporal dos casos também foi descrita em relação ao ano de notificação.

4.3 Inquérito Sorológico Canino

4.3.1 Amostragem

O cálculo da amostra foi realizado utilizando-se o software Epi Info versão 7.1, que apresentou um intervalo de confiança de 95%; erro de 2%, considerando o cálculo para população infinita, e uma prevalência estimada de 15%. Desta forma,

foi obtida uma amostra de 1.223. Porém, a amostra final foi arredondada para 1.245 cães.

A determinação do número de amostras a serem colhidas por bairro foi realizada levando-se em consideração a população humana residente em cada bairro do município de acordo com dados obtidos junto a Secretaria Municipal de Saúde referente ao remapeamento 2011/2012 do Programa da Saúde da Família do município (Tabela 1). A figura 2 apresenta os bairros (zona urbana e rural) onde foram colhidas as amostras. Os pontos de colheita foram escolhidos aleatoriamente, sendo incluídos no estudo apenas cães com idade igual ou superior a seis meses de idade, e que não fossem imunizados para Leishmaniose. Nas residências onde existia mais de um cão, foi escolhido o animal a critério do proprietário, que estivesse sob os mesmos fatores de risco. O ponto de colheita onde não havia cão ou que não houve consentimento de colheita pelo proprietário, foi substituído pela próxima residência onde havia animal.

Figura 2 – Mapa do município de Petrolina, indicando os bairros da zona urbana e rural onde foram colhidas as amostras.

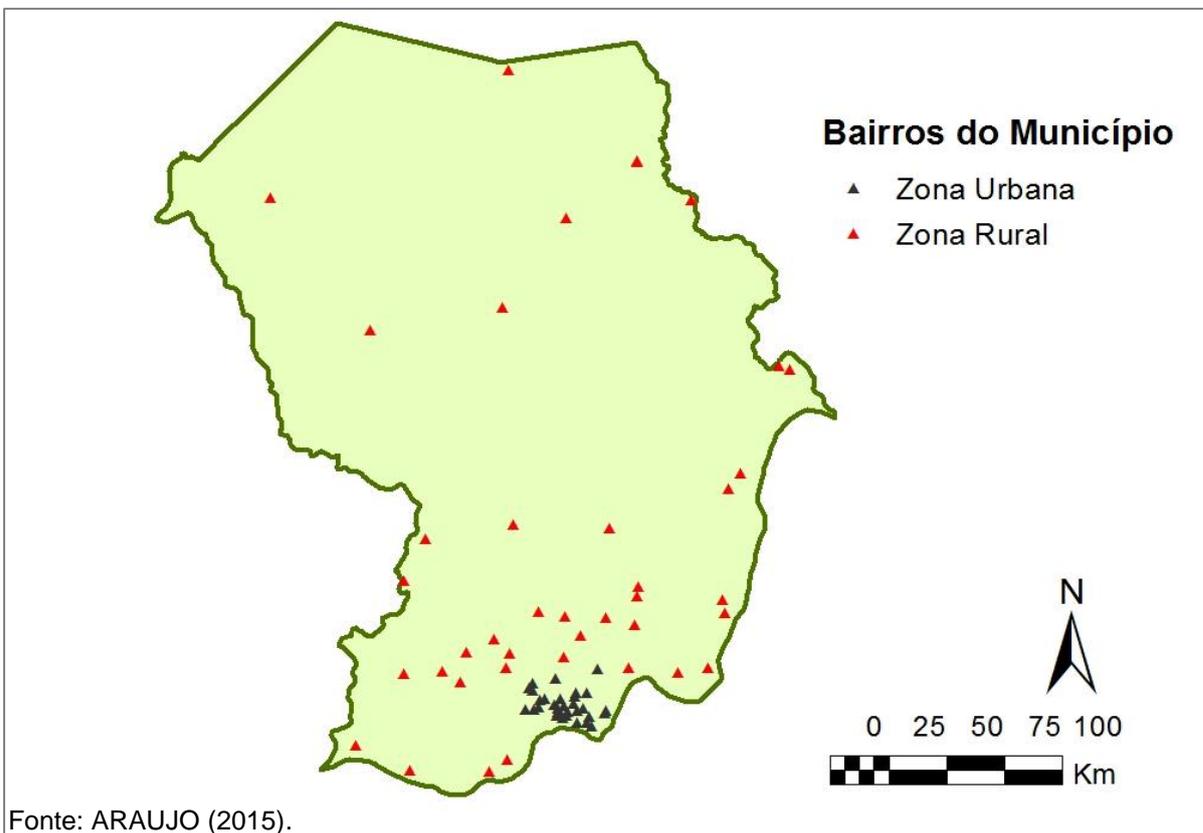


Tabela 1 – Número de cães amostrados por bairros de Petrolina, de acordo com a população humana segundo dados da prefeitura municipal.

Zona Urbana			Zona Rural		
Bairro	População Humana	Amostras de cães	Bairro	População Humana	Amostras de cães
Antônio Cassimiro	7.846	29	Assent. São Francisco	224	2
Areia Branca	9.425	35	Bebedouro	2.241	10
Atrás da Banca	2.736	11	C01	1.040	5
Boa Esperança	1.328	3	C02	601	3
Carneiro	83	2	C03	883	4
Centro	8.883	33	Caatinguinha	1.159	5
Cidade Universitária	838	4	Caititu	2.582	12
Cohab Massangano	12.253	45	Capim	600	3
Cohab São Francisco	11.231	42	Cristália	396	2
Cosme e Damião	6.048	23	Cruz de Salinas	295	2
Distrito Industrial	80	2	Curral Queimado	100	2
Dom Avelar	17.213	64	Izacolândia	7.415	32
Dom Malan	3.764	14	Maria Tereza	9.046	40
Gercino Coelho	7.792	29	Massangano	1.723	8
Jardim Amazonas	10.327	38	N01	2.041	9
Jardim Maravilha	5.982	22	N02	720	4
Jardim São Paulo	8.414	31	N03	3.133	14
Jatobá	10.531	39	N04	5.634	25
João de Deus	18.223	67	N05	3.960	17
José e Maria	19.641	72	N06	1.652	8
Km 2	1.111	5	N07	5.348	23
Maria Auxiliadora	4.378	17	N08	2.436	11
Ouro Preto	4.069	15	N09	3.119	14
Palhinhas	1.260	5	N10	3.889	17
Pedra do Bode	883	4	N11	3.136	14
Pedro Raimundo	8.970	34	N12	1.010	5
Recife	6.480	24	Nova Descoberta	3.979	17
São Gonçalo	18.760	69	Pau Ferro	2.577	12
São José	3.334	13	Pedrinhas	1.063	5
Topázio	2.017	8	Pico	60	2
Vila Eduardo	9.869	37	Ponta da Serra	400	2
Vila Mocê	2.842	11	Porto da Ilha	854	4
			Porto de Palha	371	2
			Rajada	6.222	27
			Roçado	793	4
			Serrote do Urubu	2.878	12
			Simpatia	146	2
			Tapera	1.803	8
			Uruás	2.130	10
Total	226.611	847	Total	87.659	398

4.3.2 Colheita de sangue

Durante outubro de 2013 a dezembro de 2014 foram realizadas visitas aos bairros do município para obtenção das amostras sanguíneas. Com os animais devidamente contidos, e após realização da assepsia do membro com álcool a 70%, dava-se início a colheita sanguínea. Aproximadamente quatro mL de sangue foram

colhidos por venopunção cefálica, radial e/ou jugular, com auxílio de seringa e agulha 25x7 mm descartáveis. Em seguida, as amostras de sangue foram armazenadas em tubos estéreis, sem anticoagulante, os quais foram devidamente identificados, com o número da ficha individual de cada animal, mantidos em temperatura ambiente até a retração do coágulo, e posteriormente, acondicionado em caixas térmicas contendo gelo até o envio ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF.

No laboratório as amostras de sangue foram centrifugadas a 5.000g durante 15 minutos, para obtenção do soro, os quais foram transferidos para microtubos de polipropileno de 1,5 mL, devidamente identificados, e estocados a – 20°C até a realização dos testes sorológicos.

4.3.3 Avaliação Clínica dos cães

Em cada cão foi realizado um exame físico completo, através do preenchimento de fichas individuais (Anexo A). Foi inspecionada a pele e fâneros, avaliados os principais gânglios linfáticos (linfonodos poplíteos, pré-escapulares e submandibulares), avaliada as mucosas (oral e ocular) e realizada palpação abdominal. As fichas eram compostas pela identificação do animal, sexo, idade, porte, e relação dos achados clínicos mais frequentes em cães (ALVAR et al., 2004; AMUSATEGUI et al., 2003) com Leishmaniose Visceral Canina, como sinais viscerais (caquexia, apatia, epistaxe, icterícia, mucosas pálidas, hepatoesplenomegalia), sinais cutâneos (alopecia, descamação, úlceras, onicogribose, lesões oculares, conjuntivite) e a localização das lesões cutâneas. Após serem avaliados clinicamente, os cães foram agrupados em dois grupos: assintomáticos e sintomáticos.

4.3.4 Diagnóstico sorológico

4.3.4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A determinação de anticorpos anti-*Leishmania* foi realizada pela técnica de RIFI utilizando formas promastigotas da cepa CBT 153 de *Leishmania infantum chagasi*, segundo a metodologia descrita por Oliveira et al. (2008a). As lâminas previamente sensibilizadas com *Leishmania infantum chagasi* foram descongeladas à temperatura ambiente. Em seguida, os soros a serem testados, juntamente com os soros controles (positivo e negativo) foram diluídos em PBS (pH 7,2), utilizando-se o fator de diluição dois, a partir de 1:40. Os soros controles foram obtidos a partir do banco de soro do Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

Com as lâminas já secas, foram adicionados 20µL da diluição obtida sobre cada região demarcada das lâminas com o antígeno fixado, sendo utilizado em cada lâmina um controle positivo e negativo. Após a incubação das lâminas em câmara úmida, na estufa a 37°C por 30 minutos, estas foram lavadas três vezes, por 5min com PBS (pH 7,2) em cuba de vidro e secas à temperatura ambiente. A cada região demarcada da lâmina foram acrescentados 20µL do conjugado (anti- IgG de cão, marcado com isotiocianato de fluoresceína – Sigma Aldrich, EUA) diluído a seu título em PBS (pH 7,2), acrescido de azul de evans 0,04% a 1:200.

As lâminas foram novamente incubadas por 30 min a 37°C, lavadas e deixadas secar como descrito anteriormente. E posteriormente foram cobertas com glicerina tamponada (pH 8,0) e sobrepostas por uma lamínula, sendo a leitura realizada em microscópio de imunofluorescência epifluorescente (Eclipse E600, Nikon®).

As amostras séricas positivas na diluição de 1:40 foram testadas em diluições sucessivas utilizando fator de diluição dois, até apresentarem perda de fluorescência. Foram consideradas positivas as reações com fluorescência em torno dos parasitos com título igual ou superior a 40 conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

4.3.4.2 Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)

O teste imunoenzimático (ELISA) foi realizado através do kit IMUNOTESTE® (Imunodot - diagnósticos) utilizando antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*, seguindo instruções do fabricante.

A leitura da reação foi realizada em um leitor de ELISA (Equipamento Microplate Reader, Model 3550, Bio Rad) em densidade óptica de 405 nanômetros. O cálculo do Índice de Corte (I.C.) foi calculado a partir da média das densidades ópticas (D.Os.) dos soros controles negativos, multiplicada pelo fator 2,5. Para cada placa foi calculado um ponto de corte. As amostras que apresentaram coloração amarela intensa e densidades ópticas (D.Os.) iguais ou maiores que o I.C., foram consideradas positivas.

Para os cálculos de prevalência foram considerados positivos apenas os cães sororreagentes nos dois testes. Para verificar associação entre as variáveis (gênero, faixa etária e quadro clínico) com a soropositividade foi utilizado teste Qui-quadrado (χ^2), considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O teste exato de Fisher foi aplicado quando os valores esperados foram inferiores a 5 e os resultados apresentando valor de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os cálculos foram realizados com auxílio do programa SPSS, versão 17.0.

4.3.5 Determinação dos Fatores de Risco

Durante as visitas aplicou-se um questionário (Anexo A) aos proprietários contendo variáveis reconhecidamente com potencial de risco para a infecção por *Leishmania spp.*

As variáveis analisadas foram: sexo (macho ou fêmea), idade (≤ 1 ano, entre ≥ 1 a ≤ 5 anos, ou ≥ 5 anos), raça (com raça definida ou sem raça definida), porte (pequeno, médio ou grande), presença de área verde (sim ou não), acesso à rua (sim ou não), contato com outros animais (sim ou não), contato com áreas de mata e/ou caatinga (sim ou não), contato com animais silvestres (sim ou não), assistência veterinária (sim ou não), presença de galinheiro na residência e/ou próximo –

vizinhança (sim ou não). Todas as variáveis qualitativas foram classificadas como dicotômicas com valores de 0, 1 e 2.

A análise foi conduzida em duas etapas: análise bivariável e análise multivariável. Na análise bivariável, cada variável independente foi cruzada com a variável dependente, e aquelas que apresentaram níveis de significância menores ou iguais a 20% ($p \leq 0,20$) quando comparadas com a sorologia positiva nos diferentes critérios, pelo teste de qui-quadrado ou exato de Fisher foram submetidas a uma análise múltipla de regressão logística pelo método forward selection (HOSMER; LAMESHOW, 2000), cujos resultados da análise de fatores de risco foram expressos na forma de valor pontual e intervalar (IC 95%) da "Odds ratio". O nível de significância adotado na análise múltipla foi de 5%. Os cálculos foram realizados com auxílio do Statistical Package for Scientific Science (SPSS), versão 17.0.

4.3.6 Análise espacial

Durante as visitas aos domicílios, de cada animal foram obtidas as coordenadas geográficas (latitude e longitude) em graus, minutos e segundos, utilizando-se aparelhos de posicionamento global por satélite (GPS). Foi realizada a reprojeção das coordenadas do sistema South American Datum 69 (SAD 69) para a zona 24 sul do sistema Universal Transverso de Mercator (UTM 24S), posteriormente inseridas em um banco de dados e plotadas nos mapas, através do programa ArcGIS® ArcMAP 10. Os resultados do teste diagnóstico para LVC foram então cruzados com as coordenadas geográficas (latitude e longitude) para realização da análise espacial.

A avaliação da presença de aglomerados de casos positivos foi realizada com auxílio do programa R (R Development Core Team, 2014) seguindo metodologia descrita por Bailey e Gatrell (1995).

4.4 Isolamento de *Leishmania* spp

4.4.1 Obtenção dos isolados

Visando o isolamento de parasitas do gênero *Leishmania*, foram realizadas 15 visitas ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Petrolina, Pernambuco, para punção aspirativa de linfonodos poplíteos de 250 cães de ambos os sexos, diferentes idades e raças.

Com os animais devidamente contidos, e após realização da assepsia de cada linfonodo com álcool a 70%. Cada animal foi submetido à punção aspirativa dos linfonodos poplíteos (direito e esquerdo), com auxílio de agulha fina (20 x 5,5mm) e seringas descartáveis.

Os aspirados de cada linfonodo foram semeados em tubos contendo um meio de cultura bifásico contendo uma fase sólida BAB (Blood Ágar Base com 15 % de sangue carneiro desfibrinado) e fase líquida de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) acrescidos de soro fetal bovino (10%) e antibióticos. Os tubos foram encaminhados ao Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), onde foram analisados por microscopia óptica comum com objetiva de 40x, uma vez por semana, durante 90 dias.

Os isolados obtidos foram cultivados em meio LIT, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado a 65°C, 10µg/mL de gentamicina e 10µg/mL de ampicilina, 2% de urina masculina e cultivados a 27°C. Para a manutenção da cultura semanalmente uma alíquota era retirada, e examinada a fresco em microscopia óptica comum com objetiva de 40x até o momento onde eram submetidas ao congelamento.

Os isolados foram mantidos a 25-28°C e posteriormente as análises, criopreservados em Nitrogênio (N²) líquido na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos (CBT) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal FMVZ/USP.

4.4.2 Extração da biomassa dos parasitas

Os isolados de *Leishmania* obtidos em cultura foram lavados duas vezes com PBS 1x e os precipitados ressuspensos (1,0mL/109 *Leishmania*) em SE (0,15 M de NaCl; 2,5 mM de EDTA, pH 8,0; 2,5 mM de Tris pH 8,0) e mantidos em banho de gelo. Após a adição de 0,5% de Sarkosil, 100 µg/mL de Pronase e 10 µg/mL de RNase, o material foi incubado em banho-maria, a 55-60°C, por 1 a 2 h. Após incubação, a mistura obtida foi extraída uma vez com Fenol:Tris (1:1), duas vezes com Fenol:Clorofórmio (1:1), duas vezes com Clorofórmio:Isoamílico (24:1) e uma vez com Clorofórmio. Após a última extração, o DNA foi precipitado com acetato de sódio a 0,3 M (pH 7,0) e 2 volumes de etanol gelado a 100%, por incubação, por 12 a 15 horas, a 20°C. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70%; os precipitados foram secos a 37°C e ressuspensos em tampão Tris-EDTA (TE). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro.

4.4.3 Amplificação de DNA pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

As amplificações foram realizadas utilizando-se os oligonucleotídeos e condições das reações utilizados para a amplificação de SSU rDNA, gGAPDH descritos em trabalhos anteriores (ULIANA et al., 1991; MAIA DA SILVA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2006; MARCILI et al., 2009a,b; HAMILTON et al., 2004; HAMILTON; GIBSON; STEVENS , 2007) (Tabela 2). As reações de PCR foram realizadas adicionando-se 100 ng de DNA genômico; 100 ng de cada iniciador; 200 mM de cada dNTP; 5µl de tampão (200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500mM KCl e 1,5 mM MgCl₂); 2,5ul de Taq DNA polimerase e água bidestilada deionizada e estéril (qsp 50µl).

As condições para reação de amplificação de V7-V8 SSU rDNA utilizando-se os oligonucleotídeos 609F e 706R ;1156F e 1156R foram: 94°C por 3 minutos para desnaturação inicial, seguindo-se 29 ciclos de amplificação consistindo de desnaturação inicial a 94°C durante 1 minuto; anelamento a 60°C durante 2 minutos e extensão a 72°C durante 1 minuto; extensão final a 72° durante 10 minutos. Para reação de amplificação de gGAPDH utilizando os oligonucleotídeos G3 e G4b foram: 94°C por 3 minutos para desnaturação inicial, seguindo-se 30 ciclos de amplificação consistindo de desnaturação inicial a 94°C durante 1 minuto;

anelamento a 55°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto; extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Tabela 2 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas PCRs.

Reação de Amplificação	Iniciadores	Sequência 5' – 3'	Referência
V7-V8 SSU rDNA	609F	CAC CCG CGG TAA TTC CAG C	Maia da Silva et al., 2004
	706R	TTG AGG TTA CAG TCT CAG	
	1156F	CGT ACT GGT GCG TCA GAG G	
	1156R	CCT CTG ACG CAC CAT ACG	
gGAPDH	G3	TTT GCC GTA TTG GTC GCA TGG	Hamilton et al., 2004
	G4b	CCA CGA CAC AAC CTT GAA GAA	

gGAPDH: Gliceraldeído fosfato desidrogenase.

4.4.4 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 50 V/100 mA, corado com Syber Safe (Invitrogen) e a visualização das bandas fotografados em transiluminador de luz U.V.

4.4.5 Sequenciamento de DNA

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o produto comercial ExoSAP-IT (USB Corporation), que consiste em Exonuclease I (Exo I) para digerir excesso de “primers” e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR. Após purificação, os produtos amplificados purificados foram submetidos a reações de sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer), de acordo com especificações do fabricante, em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Perkin Elmer).

4.4.6 Alinhamento e inferências filogenéticas

As sequências obtidas, por PCR, dos diferentes genes utilizados como alvo foram submetidas a alinhamentos múltiplos pelo programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997) alterando os parâmetros relativos à inserção de “indels” (peso de inserção=1, Extensão=1) e manualmente ajustados no programa GeneDoc v. 2.6.01 (NICHOLAS; NICHOLAS; DEERFIELD, 1997).

As árvores filogenéticas foram inferidas pelos métodos de análise bayesiana (B) e máxima parcimônia (MP). As árvores de MP foram construídas utilizando o programa PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) via busca heurística com 100 replicatas de adição aleatória dos terminais seguida de troca de ramos (“RAS-TBR Branch-breaking”). As análises de suporte por “bootstrap” foram feitas em 100 replicatas com os mesmos parâmetros empregados na busca. As análises bayesianas foram executadas no programa MrBayes v.3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Foram empregadas 1.000.000 gerações usando GTR como modelo de substituição e quatro categorias de gama mais proporção de sítios invariantes. Para a verificação de suporte de ramos nas análises bayesianas foram utilizados os valores de probabilidade a posterior obtidos com o programa Mr. Bayes. As matrizes de similaridade (baseadas em distância p não corrigida) foram construídas utilizando o programa Poit Replacer v.2.0.

4.5 Aspectos Éticos

O presente projeto de pesquisa foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas da Universidade Federal do Vale do São Francisco, conforme o protocolo nº 0002/190213 (Anexo B).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil epidemiológico dos casos humanos

Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, de Janeiro de 2007 a Dezembro de 2013 foram confirmados 111 casos de Leishmaniose Visceral em Petrolina, dos quais 69 residiam no município e os demais pertencentes a áreas circunvizinhas. No período de estudo foi calculado uma média de 9,9 casos por ano, com a maioria desses casos (n= 15; 21,7%) ocorridos no ano de 2012 (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição dos casos humanos de LV no município de Petrolina, Pernambuco, 2007 a 2013.

Ano	População humana estimada	Ocorrência LV (n)	Coeficiente de incidência*
		casos	
2007	x	11	x
2008	276.174	9	3,2
2009	281.851	4	1,4
2010	293.962	11	3,7
2011	299.752	8	2,7
2012	305.352	15	4,9
2013	319.893	11	3,4
Total	-	69	-

*por 100.000 habitantes, LV: Leishmaniose visceral.

A maior parte dos casos ocorreu em pacientes entre um a quatro anos de idade, representando 34,8% (13/69). Aproximadamente 59,4% (41/69) dos pacientes eram do sexo masculino e 40,6% (28/69) do sexo feminino (Tabela 4).

Tabela 4 - Número de casos e óbitos de LV, por idade e sexo em Petrolina, Pernambuco, 2007 a 2013.

Faixa etária (ano)	Masculino		Feminino		Total		Óbitos
	N	%	N	%	N	%	
<1	2	4,9	2	7,1	4	5,8	0
01-04	14	34,1	10	35,7	24	34,8	0
05-09	8	16,5	8	28,6	16	23,2	0
10-19	0	-	5	17,8	5	7,2	0
20-39	10	24,4	2	7,1	12	17,4	1
40-59	7	17,1	1	3,6	8	11,6	0
> 60	0	-	0	-	0	-	0
Total	41	40,6	28	59,4	69	100	1

LV: Leishmaniose visceral.

Quanto ao nível de escolaridade, das 69 pessoas acometidas, 32 não foram classificadas (não se aplica) por apresentar uma idade inferior a seis anos e 16 exibiam uma ficha médica em branco neste campo ou pertenciam a uma idade considerada inválida para esta análise (Ign/Branco). Dentre as 48 ocorrências válidas para este aspecto, a maioria (n = 13; 27%) possuía a 4ª série do ensino fundamental incompleta.

No que se refere à evolução dos casos, 54 (78,3%) evoluíram para a cura clínica, ocorrendo apenas um óbito por LV durante o período de estudo. O critério de confirmação mais empregado foi o clínico-epidemiológico (41/69 - 59,4%). O diagnóstico laboratorial foi realizado em 40,6% (28/69) dos pacientes. Dentre estes, executou-se o diagnóstico imunológico em apenas 18,8% (13/69) das notificações e o diagnóstico parasitológico em 20,3% (14/69). Quando efetivados, foram positivos em 46,1% (6/13) e 85,7% (12/14), respectivamente.

A presença de co-infecção por *Leishmania*/HIV foi observada em 14,5% (10/69) dos pacientes. Sendo que, 43,5% das fichas preenchidas no momento da consulta estavam sem informação para este critério.

5.2 Inquérito sorológico canino

5.2.1 Caracterização da população canina

Foram avaliados 1.245 cães provenientes de 71 bairros do município de Petrolina, PE, dos quais 398 cães de áreas rurais e 847 urbanas. Do total, 723 (58,8%) cães eram machos e 513 (41,2%) fêmeas, verificando que tanto na zona urbana quanto na rural, a maior porcentagem dos cães eram machos.

Em relação ao padrão racial, observou-se que 79,4% (988/1.245) dos animais eram sem raça definida (SRD) e 20,6% (257/1.245) com raça definida, com 98,4% (253/257) dos animais com raça definida provenientes de áreas urbanas, apenas 1,6% (4/257) de áreas rurais (Tabela 4). Foi constatada a presença de 18 diferentes raças de cães, sendo Poodles (20,6%) e Pinschers (8,5%) os mais comumente observados, seguidos dos Pit Bulls (4,6%), Labrador (3,8%) e Dachshund (3,5%).

Quando se refere ao porte dos animais, foram analisados 1.222 cães, pois em 23 fichas não houve o preenchimento dessa variável. Das fichas preenchidas, 30% (366/1.222) dos cães eram de porte pequeno, 51,1% (625/1.222) de médio porte e 18,9% (231/1.222) de grande porte.

Ao analisar a faixa etária dos animais, foi constatado que 30,4% (379/1.245) da população canina estudada apresentavam idade inferior ou igual a um ano. Animais com idade superior a um ano a inferior ou igual a cinco anos constituíram 50,6% (631/1.245) da população, e 19% (235/1.245) dos cães possuíam idade superior a cinco anos (Tabela 5).

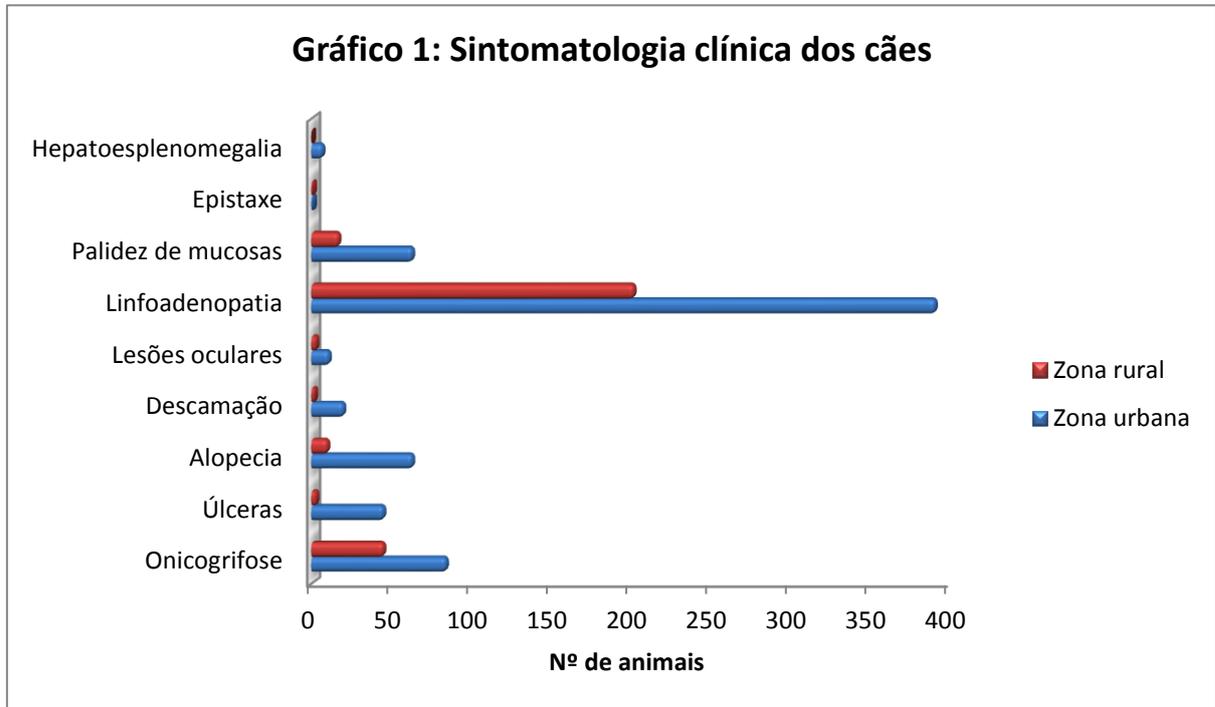
Tabela 5 – Dados referentes ao sexo, raça, porte e idade da população canina na zona urbana e rural do município de Petrolina, PE.

Variável/Categoria	Nº de cães avaliados		Total	
	Zona urbana	Zona rural		
Sexo				
	Macho	464	268	732
	Fêmea	383	130	513
Raça				
	SRD	594	394	988
	Definida	253	4	257
Porte				
	Pequeno	294	72	366
	Médio	393	232	625
	Grande	157	74	231
Idade				
	≤ 1 ano	241	138	379
	≥ 1 a ≤ 5 anos	416	215	631
	≥ 5 anos	190	45	235

5.2.2 Análise clínica dos cães

De acordo com a análise da sintomatologia clínica, 86,8% dos cães (1.080/1.245) apresentaram sinais e/ou sintomas compatíveis com a LV, apenas 13,2% (165/1.245) dos cães eram assintomáticos. Evidenciou-se que os cães de áreas urbanas eram os mais sintomáticos. Os sinais clínicos mais frequentemente observados foram os dermatológicos, principalmente onicogribose (10,3%), úlceras nos membros, ponta e/ou ao redor das orelhas (9,4%), alopecia (5,8%), descamação (1,8%) e lesões oculares (1,1%); seguidos de hipertrofia de linfonodos (poplíteos e/ou pré-escapulares e/ou submandibulares) (47,5%), palidez de mucosas (oral e/ou ocular) (6,4%) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Representação da sintomatologia clínica dos cães da zona urbana e rural do município de Petrolina, PE.



5.2.3 Sorodiagnóstico

Pela avaliação sorológica, dos 1.245 cães submetidos à RIFI, 181 (14,5%) apresentaram anticorpos anti-*L. infantum chagasi*, e destes 8% (68/847) em cães da zona urbana e 28,4% (113/398) zona rural. Os títulos de anticorpos variaram de 40 a 20.480. Por sua vez, ao ELISA 464 (37,3%) dos cães foram sororreagentes, com 35,9% (304/847) na zona urbana e 40,2% (160/398) na zona rural (Tabela 6).

As D.O.s referentes aos pontos de corte, valores dos soros controles positivos, e valores dos soros controles negativos verificados para *L. infantum chagasi* variaram de 0,475-1,195; 0,615-3,438; e 0,130-0,765, respectivamente. A média das D.O.s das amostras reagentes para presença de anticorpos anti-*L. infantum chagasi* foi 0,880.

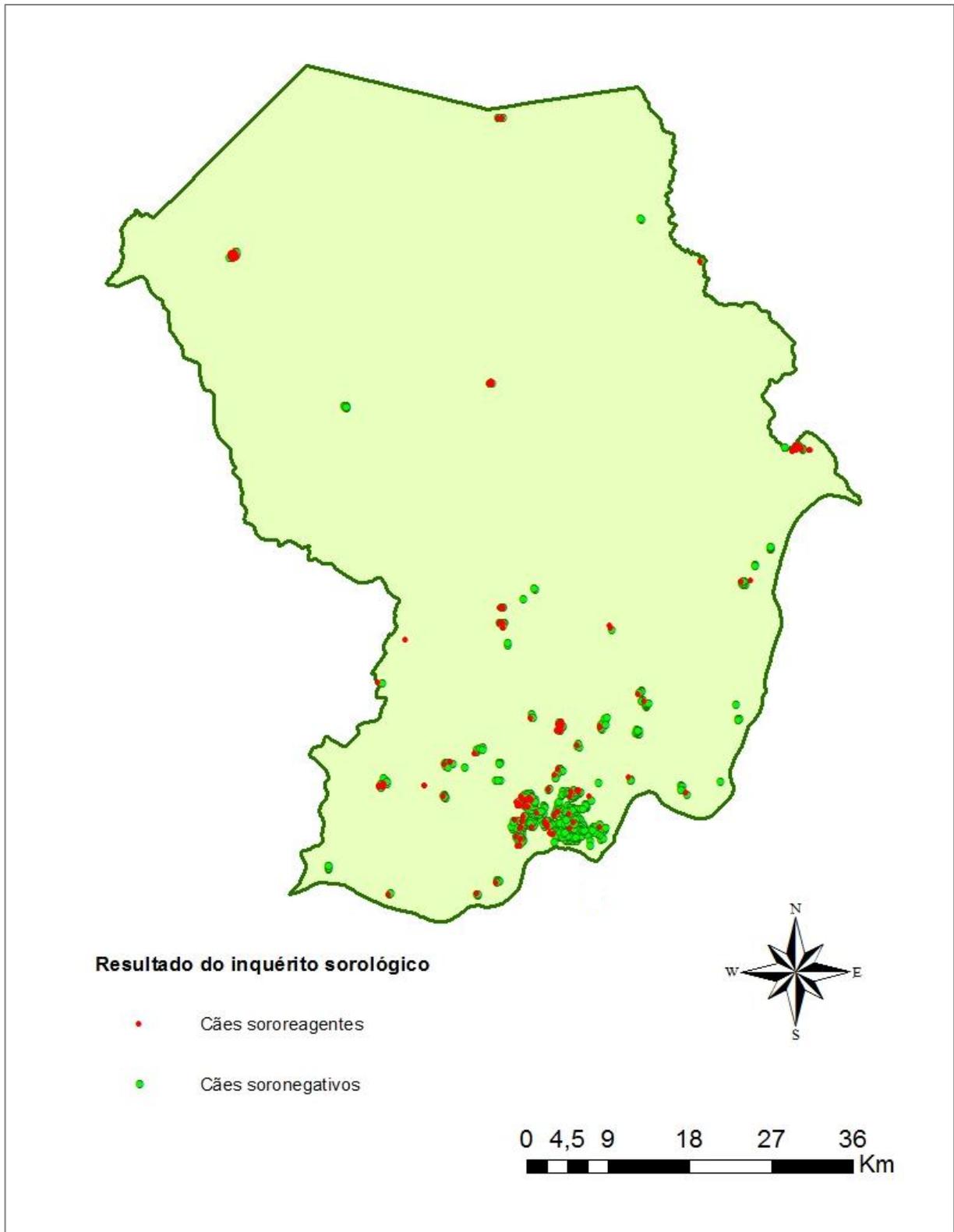
Tabela 6 – Detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi*, em cães do município de Petrolina-PE, pelos testes RIFI e ELISA.

Zona	Nº de cães avaliados	Teste		
		RIFI	ELISA	RIFI + ELISA
		% reagentes (n)	% reagentes (n)	% reagentes (n)
Urbana	847	8,0% (68)	35,9% (304)	5,4% (46)
Rural	398	28,4% (113)	40,2% (160)	23,6% (94)
Total	1.245	14,5% (181)	37,3% (464)	11,2% (140)

RIFI: Reação de imunofluorescência indireta; ELISA: Ensaio imunoenzimático indireto.

Para análise de prevalência foram considerados sororreagentes os animais que apresentaram anticorpos anti-*L. infantum chagasi* nos dois testes (RIFI e ELISA), correspondendo a 140 animais, com prevalência de 11,2% (IC 95%: 9,5% - 13,1%). A distribuição espacial dos cães do município de Petrolina segundo a presença de anticorpos anti-*L. infantum chagasi* está representada na figura 3. A soroprevalência em áreas urbanas e rurais foi de 5,4% (46/847) (IC 95%: 4% - 7,1%) e 23,6% (94/398) (IC 95%: 19,5% - 28,1%), respectivamente.

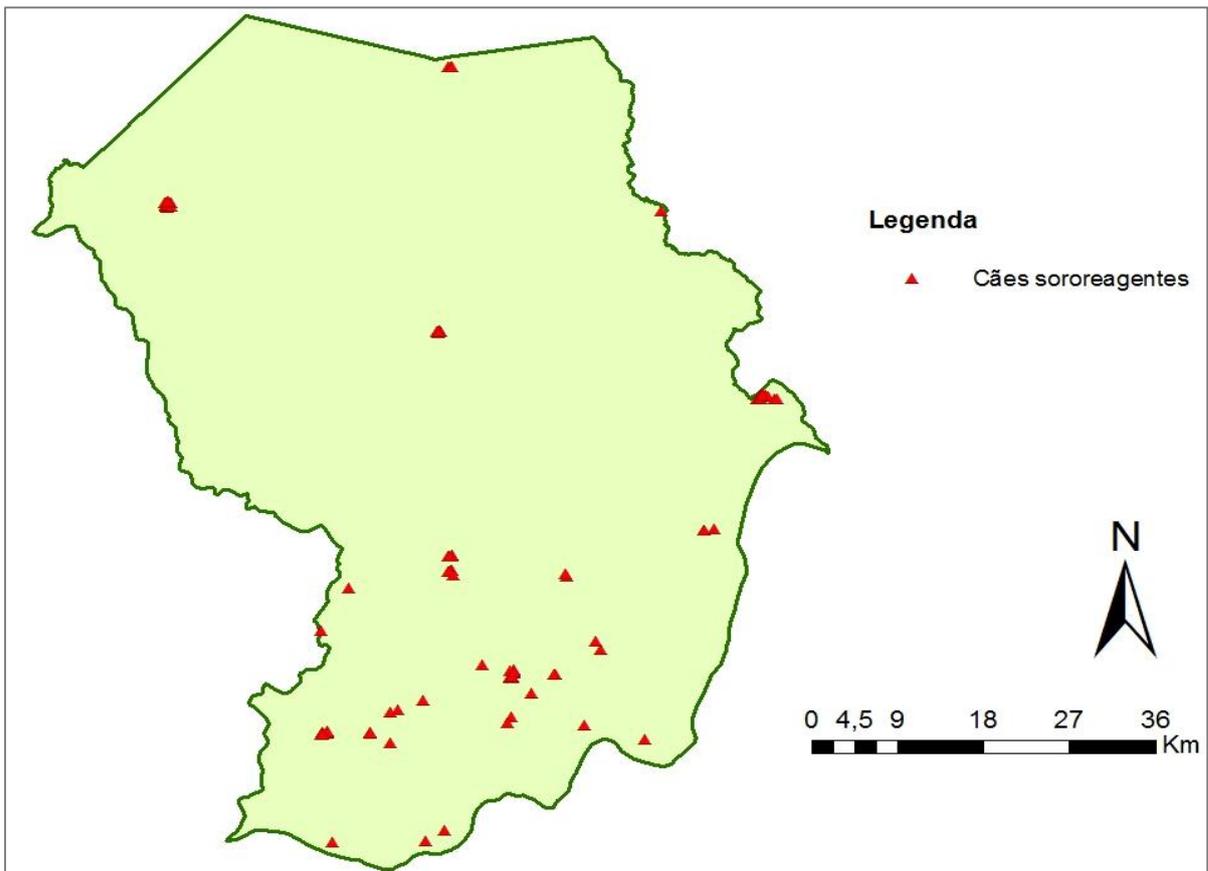
Figura 3- Distribuição dos cães sororeagentes e soronegativos obtidos pela RIFI e ELISA, para anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi* em Petrolina, PE.



Fonte: ARAUJO (2015).

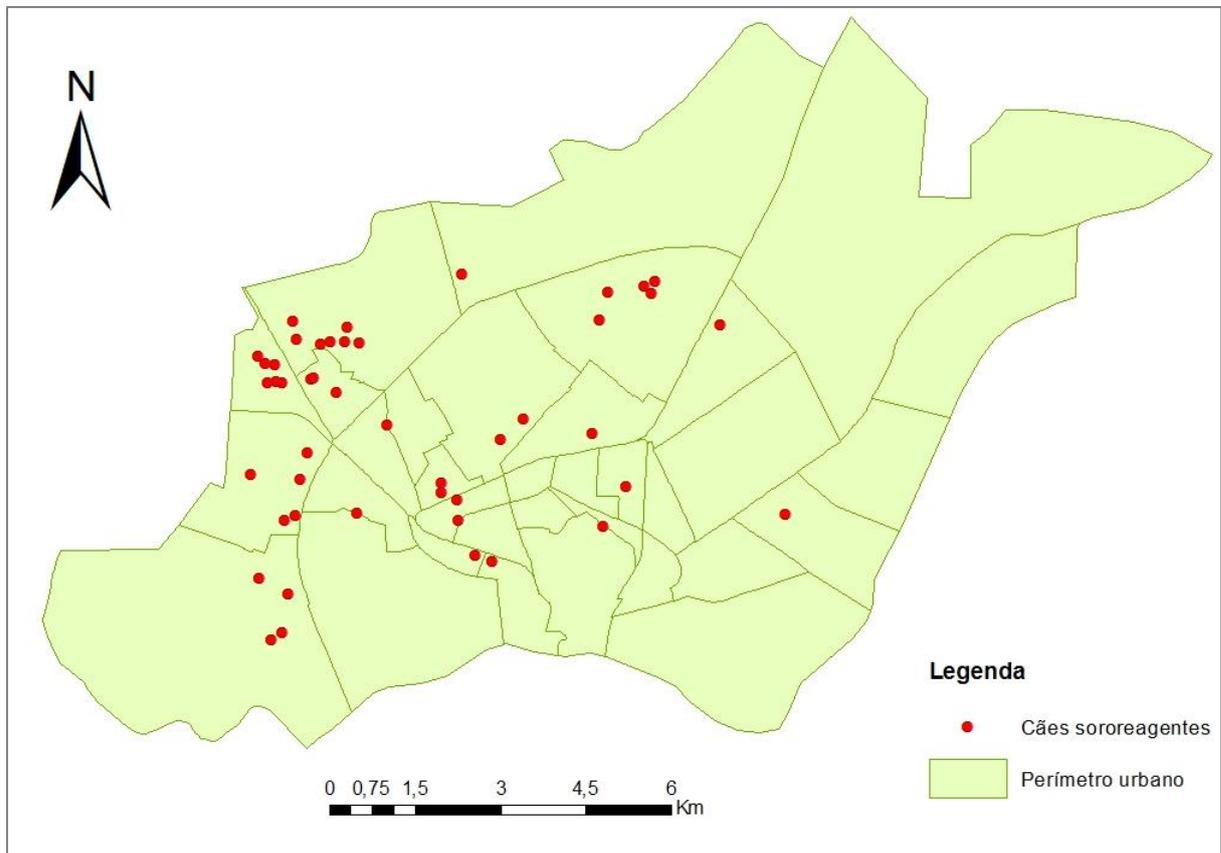
A distribuição espacial dos cães sororreagentes para anticorpos anti-*L. infantum chagasi* na zona rural e urbana do município de Petrolina, PE está representada na figura 4 e 5, respectivamente.

Figura 4 – Distribuição dos cães sororreagentes para anticorpos anti-*L. infantum chagasi* nas áreas rurais do município de Petrolina, PE.



Fonte: ARAUJO (2015).

Figura 5 – Distribuição dos cães sororeagentes para anticorpos anti-*L. infantum chagasi* nas áreas urbanas do município de Petrolina, PE.



Fonte: ARAUJO (2015).

Quanto ao sexo, os cães machos obtiveram uma prevalência de anticorpos anti-*L. infantum chagasi* maior ($p < 0,05$) que as fêmeas. Foi constatado que a prevalência de anticorpos nos cães sem padrão racial definido (SRD) (92,1%) foi significativamente maior ($p < 0,05$) que em cães de raça definida. Ao analisar o porte dos animais verificou-se diferença significativamente maior para os cães de médio porte, diferindo estatisticamente das demais categorias. No que se refere à idade dos animais, a ocorrência de cães sororreagentes foi observada em todas as faixas etárias sem que houvesse associação estatística significativa ($p > 0,05$) para algum grupo etário específico (Tabela 7).

Tabela 7 – Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi*, em cães do município de Petrolina-PE, em relação ao sexo, raça, porte e faixa etária.

Variável/Categoria	Nº de cães		Prevalência (%)	p
	amostrados	positivos		
Sexo				
Macho	732	96	68,6	0,008
Fêmea	513	44	31,4	
Raça				
SRD	988	129	92,1	<0,001
Definida	257	11	7,9	
Porte				
Pequeno	366	31	22,1	0,040
Médio	625	74	52,9	
Grande	231	35	25	
Idade				
≤ 1 ano	379	43	11,3	0,577*
≥ 1 a ≤ 5 anos	631	75	11,9	
≥ 5 anos	235	22	9,4	

*valor não significativo ($p > 0,05$)

Dos animais sororreagentes para LVC 60,7% (85/140) apresentaram algum sinal ou sintoma relacionado à doença, e 39,3% (55/140) dos cães eram assintomáticos. Os sinais clínicos mais evidentes foram 60% linfadenopatia dos linfonodos poplíteos e/ou pré-escapulares e/ou submandibulares (84/140), 22,1% ulcerações nos membros, ponta e/ou ao redor das orelhas (31/140), 19,3%

onicogrifose (27/140), 11,4% palidez de mucosas (oral e/ou ocular) (16/140) e 10% alopecia nos membros, ao redor dos olhos, narinas, ponta das orelhas, região axilar e dorso (14/140).

5.2.4 Análise dos fatores de risco

Os resultados da análise univariada e o modelo final de regressão logística multivariada de fatores de risco para Leishmaniose Visceral Canina no município de Petrolina são apresentados nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

Como mostrado na Tabela 9, quando as variáveis independentes foram submetidas à análise multivariada, foram identificados como possíveis fatores de risco para presença de anticorpos anti-*L. infantum chagasi* ($p < 0,05$): presença de área verde próximo à residência (OR = 3,63; $p = 0,000$), raça – sem raça definida (OR = 2,11; $p = 0,025$) e o sexo – macho (OR = 1,51; $p = 0,034$).

Tabela 8 – Análise univariada dos possíveis fatores de risco para Leishmaniose visceral canina no município de Petrolina, PE.

Variável	Categoria	No. Total de cães	No. de positivos (%)	χ^2	p valor
Raça	SRD	988	129 (13,1)	15,740	0,000*
	Com raça	257	11(4,3)		
Sexo	Macho	732	96 (13,1)	6,223	0,013*
	Fêmea	513	44 (8,6)		
Porte	Pequeno	366	31 (8,5)	6,418	0,040*
	Médio	625	74 (11,8)		
	Grande	231	35 (15,2)		
Presença de área verde	Não	687	35 (5,1)	58,095	0,000*
	Sim	558	105 (18,8)		
Acesso à rua	Não	661	64 (9,7)	3,448	0,063*
	Sim	584	76 (13)		
Contato com outros animais	Não	446	42 (9,4)	2,327	0,127*
	Sim	799	98 (12,3)		
Contato com mata/caatinga	Não	1026	98 (9,6%)	16,757	0,000*
	Sim	219	42 (19,2)		
Contato com animais silvestres	Não	1043	110 (10,5)	3,142	0,076*
	Sim	202	30 (14,9)		
Galinheiro na residência e/ou próximo	Não	1054	103 (9,8)	14,929	0,000*
	Sim	191	37 (19,4)		

* Variáveis selecionadas para regressão logística múltipla ($p < 0,20$)

Tabela 9 – Modelo final de regressão logística multivariada de fatores de risco (*Odds ratio*) para Leishmaniose visceral canina no município de Petrolina, PE.

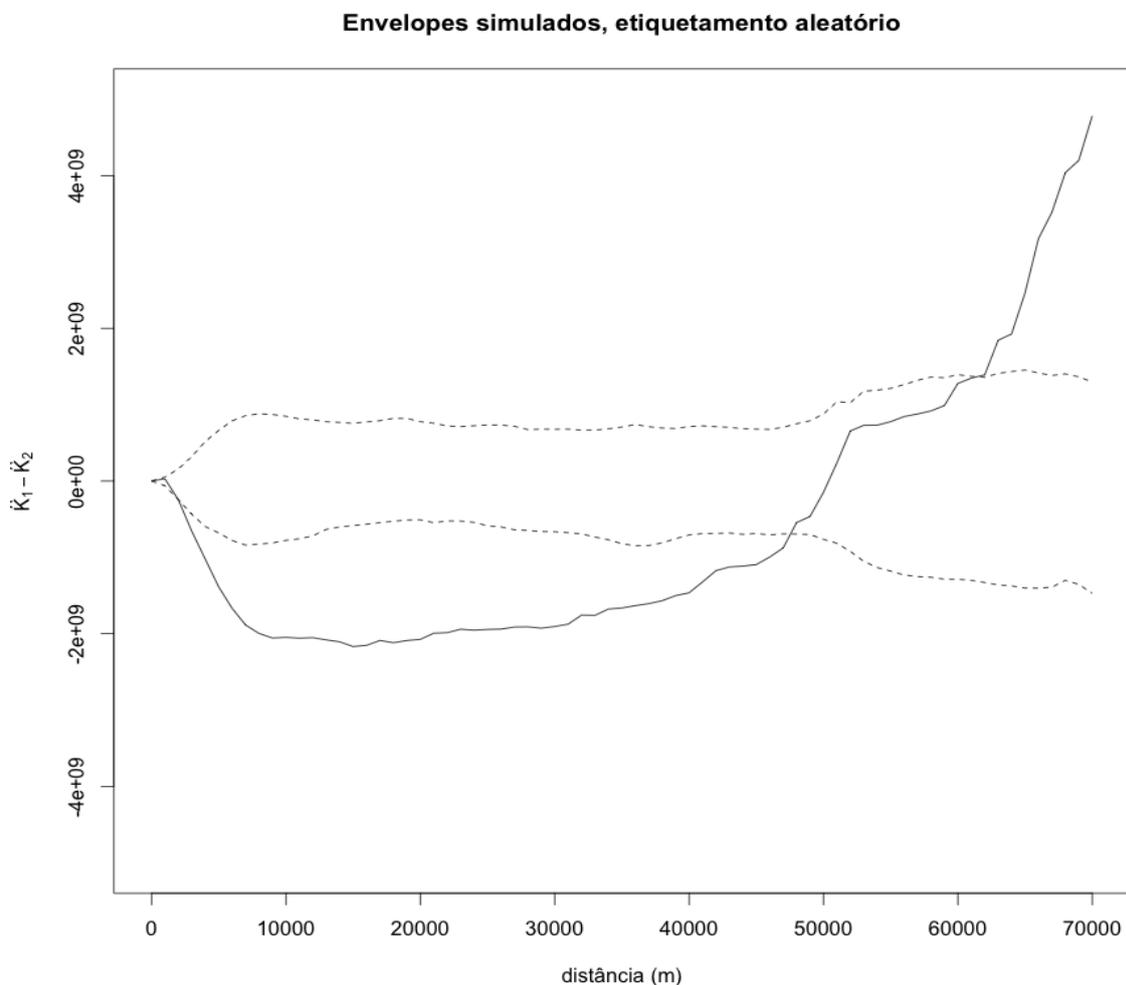
Variável	<i>Odds ratio</i> (95% IC)	<i>p</i>
Presença de área verde próximo à residência	3,63 [2,40 – 5,49]	< 0,001
Raça - sem raça definida	2,11 [1,09 – 4,07]	0,025
Sexo - macho	1,51 [1,03 – 2,23]	0,034

IC: intervalo de confiança

5.2.5 Análise espacial

A análise de cluster espacial para casos controle pode ser observada na Figura 6, que permite verificar a formação de aglomerados, uma vez que o padrão verificado pela distribuição dos casos não foi aleatória, pois a curva dada por $K_1(h) - K_2(h)$ ultrapassou os limites superior e inferior à área aleatória do envelope.

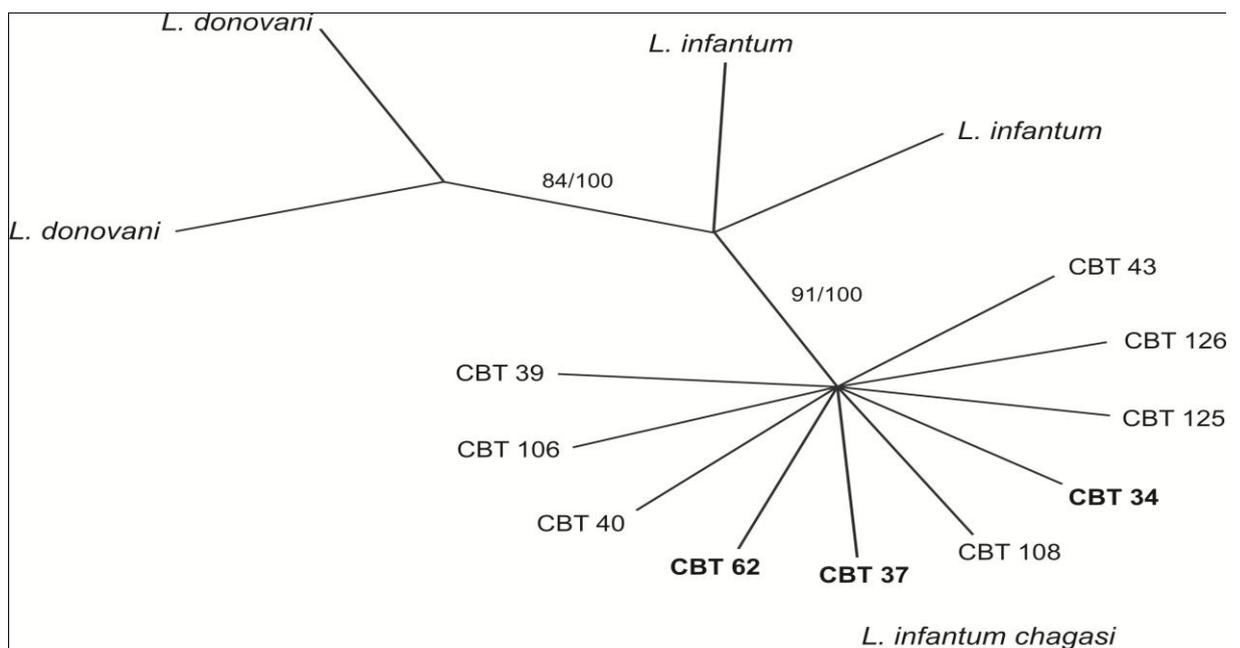
Figura 6 - Diferença entre os valores da função K para animais sororreagentes e não reagentes em função da distância em metros.



5.3 Isolamento de *Leishmania* spp

Foram obtidos três isolados provenientes do CCZ de Petrolina, PE: CBT34, CBT37 e CBT62. A posição filogenética com base em genes V7V8 SSU rDNA e gGAPDH concatenados e segregados as espécies do complexo *Leishmania donovani* e os isolados de Petrolina foram agrupados em um único ramo (91% de bootstrap / 100% de probabilidade posterior e 100% de similaridade) com *L. infantum chagasi* no Brasil (Figura 7).

Figura 7 – Parcimônia e inferências Bayesianas baseadas na região V7V8 SSU rRNA e gGAPDH concatenadas. As sequências obtidas neste estudo estão em negrito.



6 DISCUSSÃO

Petrolina se caracteriza por se constituir, na última década, em um polo regional de expansão da agroindústria exportadora, particularmente da fruticultura regional. Este fato gerou importantes mudanças na sua dinâmica populacional, determinando intensos processos migratórios, que resultam em sérias consequências na ocupação do espaço geográfico. Neste contexto, o processo de urbanização se apresenta acoplando novos fatores de risco, em relação aos já existentes, e ainda contribuindo para o surgimento de novas doenças. Neste cenário se destaca a leishmaniose visceral ou calazar que, por seu potencial de expansão, representa um relevante problema de saúde pública no município estudado.

Cesse et al. (2001) realizaram um estudo de corte transversal na área urbana de Petrolina, a partir da investigação dos registros de casos humanos no período de 1992 a 1997, constatando que nesses anos houve um aumento no registro e na distribuição espacial da LV em bairros urbanos, com a maior concentração desses casos nas áreas periféricas, com contato com mata local, denominada pelos autores como “franja” e, no ano de 1995 ocorreu aumento acentuado nos registros dos casos da doença, sugerindo que houve um pico epidêmico de LV em Petrolina nesse período.

No presente estudo, quanto ao perfil epidemiológico dos casos humanos de LV notificados no período de 2007 a 2013 no município de Petrolina, considerando-se o preenchimento incompleto dos prontuários, a baixa taxa de exames laboratoriais para confirmar o diagnóstico, entre outros fatores, acredita-se que há uma subnotificação de casos de LV em Petrolina. Este estudo foi baseado em um banco de dados secundário do Ministério da Saúde alimentado por funcionários da Secretaria Municipal de Saúde, portanto, pode haver falha ou ausência de dados que dificultou um aprofundamento analítico da situação epidemiológica da leishmaniose visceral na área de estudo.

A LV é considerada endêmica em Petrolina. A série de casos humanos relatados aqui demonstra que o comportamento da doença é semelhante ao observado em outras localidades do Brasil em que acomete principalmente crianças e jovens. Os resultados mostraram que a maior parte dos casos da doença foi encontrada na população com idade entre um e quatro anos, seguido pela faixa

etária entre cinco e nove anos, fato semelhante ao descrito por Cesse et al. (2001) na década de 90, na mesma área de estudo, sugerindo que em relação a essa variável a doença tem mantido as mesmas características, o que pode ser justificado pelas condições precárias de sobrevivência da população, gerando casos de desnutrição e, conseqüentemente condições de imunossupressão que normalmente pode ser verificada em áreas endêmicas.

Botelho e Natal (2009), Prado et al. (2011) e Brazuna et al. (2012) também constataram maior incidência de LV em pacientes com até nove anos de idade. Este quadro pode estar relacionado à imunidade em longo prazo que ainda não está totalmente desenvolvida, ou até mesmo a uma maior exposição dessa classe ao vetor. Por sua vez, esses dados também indicam uma alta força de infecção, com a transmissão no ambiente peridoméstico ou mesmo no interior. De fato, reconhece-se que *L. longipalpis* é altamente adaptado para ambientes peridomésticos (por exemplo, em galinheiros) (COSTA et al., 2013), eventualmente, invadindo as casas onde eles podem se alimentar de humanos e animais domésticos, como cães, reforçando a observação que a transmissão da LV ocorre mais em domicílio e peridomicílio (MESTRE; FONTES, 2007).

Marzochi et al. (2009) mencionam que a maior proximidade das crianças com os cães, principais fonte de infecção no ambiente doméstico, seria um fator relacionado ao aumento na incidência da doença.

Verificou-se uma maior frequência da LV no sexo masculino, resultado este, também encontrado por Botelho e Natal (2009), Alvarenga et al. (2010), Prado et al. (2011) e Brazuna et al. (2012) que apontam este sexo como mais susceptível à infecção, fato este, possivelmente relacionado a uma maior exposição desse gênero a ambientes associados a risco.

No Brasil, apesar de não está totalmente esclarecido, a literatura aponta o sexo masculino como mais suscetível a LV (PASTORINO et al., 2002; BRASIL, 2003). Em Roraima (GUERRA, et al., 2004) ocorreu predomínio do sexo masculino, como também observado em Minas Gerais (MAGALHÃES et al., 1980) e em outras áreas de ocorrência da doença onde persiste o maior número de casos masculinos (NUNES et al., 1988; COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990; MARZOCHI; MARZOCHI; CARVALHO, 1994; BRASIL, 1999; PASTORINO et al., 2002).

Dentre as ocorrências válidas no que diz respeito à escolaridade, a maioria possuía a 4ª série do ensino fundamental incompleta, o que pode ser explicado pela faixa etária mais atingida ser a infantil, e se levarmos em conta que 46,3% das fichas encontrava-se em branco para esse campo. Oliveira et al. (2008b) identificou a baixa renda familiar e baixo nível de escolaridade como fatores de risco para infecção assintomática em contatos familiares de pacientes com LV. Barão et al. (2007) menciona que mesmo em área de baixa endemicidade, a distribuição dos casos assintomáticos segue um gradiente socioeconômico. Oliveira e Maciel (2003), em estudo conduzido em João Pessoa/PB, encontraram uma maior ocorrência de LV nas pessoas com índices mais baixos de escolaridade e baixa renda familiar. Contrapondo esses achados, Caldas et al. (2002) aponta em sua pesquisa que analfabetismo não se mostrou associado ao risco aumentado de infecção.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana e canina. Embora exista uma grande oferta de testes para o seu diagnóstico, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade. Nos casos humanos, o diagnóstico é rotineiramente realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos. Entretanto, um diagnóstico definitivo requer a demonstração do parasita através de métodos parasitológicos (GONTIJO; MELO, 2004).

O principal método de diagnóstico empregado nos pacientes em Petrolina foi o clínico-epidemiológico (59,4%), discordando do que é geralmente descrito em outros estudos como o de Alvarenga et al. (2010) que relatou uma percentagem de 89,5% do critério de confirmação da doença sendo obtido por meio de exames laboratoriais, onde apenas em casos em que não foi possível a confirmação parasitológica o critério clínico-epidemiológico foi utilizado (10,5%). O exame direto para parasitas também foi o método mais empregado para confirmar o diagnóstico no estudo de Brazuna et al. (2012) e Botelho e Natal (2009), com 76,8% e 80%, respectivamente. A realização de exames laboratoriais na minoria dos casos é um fato que deve ser retificado, uma vez que este é um critério de suma importância para confirmação do diagnóstico de qualquer doença, principalmente quando esta não apresenta sinais clínicos patognomônicos.

Apesar de ser uma doença de notificação compulsória, os dados disponíveis são baseados na detecção passiva de casos. O número de pessoas expostas à

infecção ou infectadas sem sintomas é maior do que o número de casos detectado. O diagnóstico e tratamento medicamentoso são essenciais não só para curar o doente, mas também para diminuir a ocorrência da LV (BERN; CHOWDHURY, 2006). Neste caso, quando não instituído o tratamento adequado, a letalidade da LV pode alcançar 10% dos casos (GONTIJO; MELO, 2004).

No Brasil foram registrados 3.151 óbitos por LV no período de 2000 a 2013 com 49,8% dos casos ocorrendo na região Nordeste. Em Pernambuco, nesse mesmo período foram notificados 122 óbitos. Entretanto, no município estudado só ocorreu um óbito, divergindo de outros estudos que obtiveram uma letalidade maior (QUEIROZ; ALVES; CORREIA, 2004; PEDROSA; ROCHA, 2004; OLIVEIRA et al., 2006). Além disso, os dados nacionais baseados em sistemas de notificação possivelmente subestimam o real número de óbitos decorrentes da LV no país, em virtude do seguimento incompleto dos casos. Nesse sentido, desperta-se a atenção para a qualidade dos dados aqui apresentados, uma vez que o percentual de informações ignoradas foi alto na maioria das variáveis estudadas. Saliencia-se que as possibilidades de utilização dos sistemas de informação em saúde para o acompanhamento e estudos epidemiológicos dependem, em grande medida, do grau de cobertura dos eventos, das variáveis registradas nestes sistemas e da qualidade dos dados registrados.

A presença de co-infecção por HIV foi observada em 14,5% dos pacientes, percentual mais expressivo do que os encontrados por Botelho e Natal (2009) e Brazuna et al. (2012) que relataram 5% e 7,1%, respectivamente. Vale ressaltar que 43,5% das fichas preenchidas no momento da consulta estavam sem informação para este critério; portanto, esta é uma variável que pode estar subestimada pelo não preenchimento da avaliação médica durante o exame clínico do paciente. Da mesma forma, esta informação é de extrema importância uma vez que a co-infecção com HIV pode influenciar o resultado de casos.

Mesmo considerando as limitações inerentes do uso de dados secundários, isto não só indica que as medidas de controle em vigor não estão sendo eficazes para reduzir a incidência da doença em humanos, mas também um acesso limitado aos serviços básicos de saúde (por exemplo, testes de diagnóstico), que podem prejudicar o diagnóstico e tratamento precoce dos casos. Sob estas condições, o

risco de um desfecho fatal pode ser elevado, particularmente em pacientes imunossuprimidos, tais como indivíduos LV-HIV co-infectados. Como tal, mais ênfase na importância do diagnóstico precoce e tratamento de pacientes humanos devem ser estabelecidos.

O cão doméstico apresenta um importante parasitismo na pele que favorece a infecção do vetor, sendo considerado o principal reservatório da *L. infantum chagasi* (LAINSON; SHAW, 1987). Do ponto de vista epidemiológico, a doença em caninos deve ser considerada, pois é mais prevalente do que a doença em seres humanos, normalmente precede a ocorrência de casos humanos, e por causa da elevada competência de cães infectados, incluindo aqueles que são assintomáticos, para transmitir o parasita ao vetor (MARZOCHI et al., 1985; LAURENTI et al., 2013).

É de extrema importância o diagnóstico da LV em seus reservatórios, a fim de controlar a doença e compreender sua epidemiologia, identificando os potenciais fatores de risco (GRAMICCIA; GRADONI, 2005), uma vez que, os cães infectados representam um reservatório ativo para a transmissão do parasita, devido sua proximidade constante com o homem.

Este estudo consiste na primeira descrição epidemiológica da LVC no município de Petrolina, visto que dados sobre a doença em cães são escassos e com o aumento crescente do número de casos humanos notificados no município, é de grande importância o conhecimento dos fatores inerentes aos principais reservatórios domésticos da LV no município estudado. Vale ressaltar que poucos estudos foram desenvolvidos, contudo, restrito a pequenas áreas, a um pequeno número de animais e, em proximidade com os casos humanos. Nesse contexto, o presente estudo compreendeu todas as áreas do município, com o número de animais a serem avaliados mediante a população humana residente em cada área, pretendendo dessa forma, obter dados sobre a real situação epidemiológica da LV no município de Petrolina bem como a sua distribuição nas áreas urbanas e rurais.

Alguns trabalhos apontam a escolha dos testes sorológicos como de extrema importância para um bom inquérito epidemiológico (FRANÇA-SILVA et al., 2003; GÁLLEGO, 2004). A reação de imunofluorescência indireta é uma técnica sorológica que apresenta alta sensibilidade e especificidade entre 60% a 100%, baixo custo e fácil execução (BRASIL, 2003; ALVAR et al., 2004; ALMEIDA; JESUS; SOUSA-

ATTA, 2005; DA SILVA et al., 2013), assim como o ensaio imunoenzimático indireto, mas reações cruzadas com anticorpos de outras doenças têm sido relatadas (ZANETTE et al., 2014). Entretanto, em dezembro de 2011, o Programa de Prevenção e Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde que preconizava a utilização das provas sorológicas ELISA, para triagem dos cães suspeitos, e RIFI, como teste confirmatório para o diagnóstico de cães, com posterior eliminação dos animais soropositivos, foi substituído por um novo protocolo, que inclui o teste rápido imunocromatográfico DPP[®], como teste de triagem, substituindo a RIFI e, o teste ELISA, como confirmatório. Entretanto, neste estudo utilizamos a RIFI como teste confirmatório, seguindo as recomendações da Organização Mundial de Saúde, que considera RIFI como teste padrão, onde epidemiologicamente, títulos iguais ou superiores a 1/40 devem ser considerados positivos.

No presente estudo, dos animais submetidos à RIFI, 14,5% dos cães foram sororreagentes para presença de anticorpos anti-*L. infantum chagasi*. Ao ELISA, a presença de anticorpos foi detectada em 37,3% cães. Estes valores são superiores aos relatados em outras áreas endêmicas do nordeste (PARANHOS-SILVA et al., 1996; QUEIROZ et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010) e inferiores aos verificados por Silva et al. (2014) com 65,7% a RIFI e 71,6% ao ELISA.

A soroprevalência da doença apresenta-se bastante variável, dependente da região estudada e método sorológico empregado (FRANÇA-SILVA et al., 2003). No Brasil, estudos epidemiológicos em áreas endêmicas tem demonstrado uma prevalência entre 1,9% a 75% (CORTADA et al., 2004; ROSARIO et al., 2005; FALQUETO et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; ALMEIDA; MENDONÇA; SOUSA, 2010; BARBOSA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2010; COURA-VITAL et al., 2011; FELIPE et al., 2011; WANG et al., 2011; SILVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2014; SCHWANKE et al., 2014; ZUBEN et al., 2014).

A prevalência de anticorpos anti-*L. infantum chagasi* na população canina do município de Petrolina foi de 11,2% inferior àquelas encontradas em outros municípios de Pernambuco, como Paulista e Garanhuns com 40,3% e 16%, respectivamente. Entretanto, a prevalência aqui encontrada é bastante expressiva quando comparada à estimativa média em todo o estado, com 2,5%

(ALEXANDRINO, 2001; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a; SANTOS et al., 2010). Quando comparada com outras áreas endêmicas do sudeste, região metropolitana de Salvador, sul da Bahia, Belém também se encontra inferior (CAMARGO-NEVES et al., 2001; BARBOZA et al., 2006; JULIÃO et al., 2007; SILVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2013; LEÇA-JUNIOR et al., 2015).

O município de Petrolina apresentou prevalência superior à encontrada por Almeida et al. (2009) com 3,4% na cidade de Cuiabá, Oliveira et al. (2010) no município de Dias D'Ávila com 3,2%, Dias et al. (2011) em Minas Gerais com 4,2%, Borges et al. (2014) no município de Juatuba, integrante da Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, com 10,6%. Essa variação poderia estar relacionada ao ponto de corte adotado no teste sorológico ou à forma de seleção dos cães e da definição de população adotada (JULIÃO et al., 2007).

A evidência sorológica observada neste estudo demonstrou a participação de cães como potenciais reservatórios para este parasita no ambiente doméstico, principalmente em áreas de ocorrência de leishmaniose em seres humanos - típicos da região estudada. Estes achados corroboram outros estudos epidemiológicos sobre este agente etiológico (ALMEIDA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2013).

No município de Petrolina há somente um estudo de pesquisa sorológica realizada em cães residentes nas áreas onde os casos humanos foram verificados. Dos 600 cães avaliados 19,16% foram sororreagentes, sendo que 73,04% pertenciam à zona urbana. Quando foi realizada a sobreposição dos mapas, nenhuma associação entre casos caninos e humanos foi encontrada, e os autores concluíram que a enfermidade se encontra em fase de urbanização, mas sem associação entre casos humanos e caninos (MAIA et al., 2014).

No Brasil a LV tem passado por uma mudança na sua epidemiologia, com inúmeros casos da doença no ambiente urbano, tendo o cão papel fundamental nessa expansão, principalmente em áreas endêmicas (FRANÇA-SILVA et al., 2003). Entretanto, no presente estudo verificou-se uma prevalência maior em áreas rurais corroborando com os achados de Courtenay et al. (1994), Santos et al. (2005), Oliveira et al. (2010), Silva et al. (2013). Nessas áreas, os cães têm mais acesso a áreas livres, ruas, movendo-se para além dos ambientes domésticos e, por causa

desta mobilidade, eles podem ser mais expostos a fatores que aumentam a probabilidade de infecção por *Leishmania* spp.

De acordo com Oliveira et al. (2010), a variação na prevalência entre as áreas rurais e urbanas está intrinsecamente ligada à doméstica e condições ambientais peridomésticas para o desenvolvimento de infecção, o que pode incluir o vetor, população canina, alterações causada pela presença humana, a acumulação de lixo e outras matérias orgânicas, e falta de saneamento (CAMARGO-NEVES et al., 2003; GRAMICCIA; GRADONI, 2005). Além disso, as áreas rurais têm maior diversidade de animais que as urbanas, seja doméstico ou selvagem, bem como a presença de matas ciliares ou fragmentos florestais, que são fatores predisponentes para a presença de flebotomíneos.

No presente estudo foi verificada associação entre a presença de anticorpos e a predisposição sexual, sendo o sexo considerado fator de risco. Os machos apresentaram 1,51 [1,03 - 2,23] mais risco de adquirir anticorpos anti-*L. infantum chagasi* que as fêmeas, corroborando com Dantas-Torres, Brito e Brandão-Filho (2006), Julião et al. (2007), Miranda et al. (2008), Garcia et al. (2009) e Oliveira et al. (2010).

Embora algumas raças de cães sejam mais predispostas ao desenvolvimento da doença (FRANÇA-SILVA et al., 2003; MIRANDA et al., 2008; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012), na população canina estudada os cães SRD obtiveram soroprevalência maior ($p = 0,025$), sendo considerado fator de risco, esses animais apresentam 2,11 [1,09 – 4,07] mais risco de adquirir anticorpos anti-*L. infantum chagasi* que os cães de raça definida, assim como verificado por Oliveira et al. (2010) e Silva et al. (2013). Muitas vezes esses animais permanecem soltos na residência, com acesso livre a rua, e sem os devidos cuidados, geralmente são removidos das ruas e, apesar de receberem abrigo e comida, permanecem sem cuidados adequados pelos proprietários devidos muitas vezes a razões econômicas, ao contrário de alguns animais com raça definida.

Os cães de médio porte foram mais sororreagentes que as demais categorias, fato este que pode está associado a esses animais terem acesso tanto ao ambiente intradomicílio quanto ao peridomicílio, e dessa forma maior exposição aos vetores. Esses animais podem ainda serem utilizados como cães de guarda, e

consequentemente terão maior exposição. Na literatura têm-se associado a maior frequência de casos aos cães de porte grande, pois estes têm a finalidade de guarda, habitando ambiente peridomiciliar e ficando assim mais expostos ao vetor (FEITOSA et al., 2000).

Não houve predisposição etária para a ocorrência da doença. Apesar de a literatura afirmar que cães com menos de três anos e entre oito e dez anos apresentarem uma maior predisposição para adquirir a infecção (PALTRINIERI et al., 2010). Entretanto, França-Silva et al. (2003) observaram que os cães, independente da idade, têm a mesma probabilidade de contrair leishmaniose, não excluindo a importância das outras faixas etárias na epidemiologia da doença canina.

Muitos estudos têm avaliado os sinais clínicos de animais infectados por *Leishmania* spp. (MATOS et al., 2006; ALMEIDA et al., 2009; ALMEIDA; MENDONÇA; SOUSA, 2010; OLIVEIRA et al., 2010). Quanto à manifestação clínica e as taxas de soropositividade, 60,7% dos animais sororreagentes eram sintomáticos, em comparação com 39,3% dos animais assintomáticos, em concordância com os estudos realizados por Sousa e Almeida (2008), Almeida, Mendonça e Sousa (2010), Figueiredo et al. (2014). Os sinais mais evidentes foram linfadenopatia, lesões de pele, incluindo ulcerações em membros, orelhas, onicogribose, palidez de mucosas e alopecia nos membros, olhos e narinas, em concordância com os achados de Feitosa et al. (2000), Gallego (2004), Santos et al. (2005) e Almeida et al. (2009). Os sinais clínicos observados nos cães sororreagentes desse estudo estão entre os mais frequentemente presentes em inquéritos epidemiológicos realizados no Nordeste (ALMEIDA et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006; RONDON et al., 2008).

Todavia Baneth e Aroch (2008) afirmam que estudos populacionais em áreas endêmicas têm demonstrado que uma proporção da população canina desenvolve a doença sintomática, outra tem infecção assintomática persistente, enquanto outra é resistente à infecção ou intermitentemente sem desenvolver sinais clínicos. Já para Moshfe et al. (2009), estudos soroepidemiológicos da LVC têm revelado um grande número de animais soropositivos assintomáticos, dessa forma, os cães assintomáticos infectados por *Leishmania*, bem como os sintomáticos, podem ter um

papel importante na manutenção da infecção e, provavelmente, no estabelecimento do ciclo doméstico de transmissão do parasita nas áreas endêmicas de LV.

Estudos elucidam a proximidade da moradia dos cães com áreas de mata e/ou vegetação abundante como fatores de risco para a infecção por *Leishmania* spp, como evidenciado neste estudo, onde os cães que residiam nessas áreas obtiveram 3,63 [2,40 – 5,49] mais risco de adquirir anticorpos anti-*L. infantum chagasi* que os demais cães. Este fato pode estar associado a um ambiente de modificação ambiental recente, com presença significativa de matéria orgânica necessária para o desenvolvimento do vetor, e consequente manutenção da doença nessas áreas. A proximidade dos lugares com vegetação mais densa pode facilitar a transmissão, proporcionando melhores condições para a manutenção tanto de populações de flebotomíneos quanto a de reservatórios, favorecendo uma interação entre os ciclos selvagens e peridomicílio de doença (BARBOSA et al., 2010; BIGELI; OLIVEIRA JÚNIOR; TELES, 2012; LOPES et al., 2014).

De acordo com Santos et al. (2005), a presença de vegetação abundante propiciam alta umidade oferecendo excelentes condições para a presença de flebotomíneos, que disseminam os agentes etiológicos desta doença. Em um estudo realizado por Almeida, Mendonça e Sousa (2010), os autores observaram que alguns dos animais soropositivos tiveram acesso a florestas remanescentes e córregos, rios ou reservatórios tiveram mais chances de adquirir a infecção. Belo et al. (2013), utilizando análise espacial, observaram que a presença de áreas verdes, de modo geral aumenta o risco para LVC e as áreas de transição entre a zona urbana e rural, tem demonstrado ser áreas importantes para ocorrência da doença. A LVC é uma doença de natureza local e os fatores de risco podem variar de uma região para outra. No entanto, parece bastante claro que o estilo de vida particular de cada cão pode favorecer a exposição aos vetores (SANTOS et al., 2010).

Pela análise espacial (Figura 6), verificou-se que, dentro de um raio de até 70 km a partir de cada ponto, houve a formação de aglomerados de animais sororreagentes para presença de anticorpos anti-*L. infantum chagasi*. Estes resultados reforçam, portanto, que a LVC encontra-se distribuída de forma heterogênea no município de Petrolina, o que também foi verificado por Camargo-Neves et al. (2001), em Araçatuba, São Paulo, Lopes et al. (2010), em Belo

Horizonte, Minas Gerais, e Borges et al. (2014) no município de Juatuba, região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais. Trabalhos que avaliam a distribuição espacial da LV são importantes para o direcionamento das ações de prevenção e controle adequadas (BORGES et al., 2014). Além disso, o conhecimento dos casos de LVC pode servir de indicador para o surgimento de novos casos humanos, uma vez que a infecção no cão normalmente precede a doença no homem, como verificado por OLIVEIRA et al. (2001) em Belo Horizonte, Minas Gerais.

A realização de inquéritos sorológicos em cães como realizado neste trabalho, pode ser considerada de extrema importância no controle do reservatório canino. A identificação dos casos serve de ferramenta para direcionar e priorizar ações específicas para cada área do município e poderá auxiliar na detecção de focos silenciosos da doença, uma vez que, o estudo anterior realizado através da sorologia de cães de proximidades com a ocorrência dos casos humanos revelou que a doença encontrava-se urbanizada, entretanto, no presente estudo ao analisar todo o município, verificou que a doença encontra-se distribuída de forma heterogênea, com prevalência maior em áreas rurais.

Os isolados provenientes de cães capturados e/ou encaminhados ao CCZ de Petrolina confirmam a presença do agente no município, e a partir das análises filogenéticas observou-se que todos os isolados foram idênticos entre si com 100% de similaridade com *Leishmania infantum chagasi*, corroborando os resultados de Marcili et al. (2014), que verificaram identidade de 100% entre isolados provenientes de diferentes regiões geográficas do país (Bahia, Ceará, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo).

7 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstraram claramente que a transmissão da LV ainda ocorre em Petrolina em níveis moderados a elevados.

O município de Petrolina apresentou uma alta prevalência canina de anticorpos anti-*L. infantum chagasi*, distribuída de forma heterogênea, com prevalência maior nas áreas rurais como observada na maioria das áreas endêmicas, e compatível com a casuística humana no município.

Foram detectados como potenciais fatores de risco para LVC a presença de áreas verdes próximo à residência, a raça – animais sem raça definida e o sexo - os machos. Houve a formação de agrupamentos de acordo com a ocorrência de cães sororreagentes para LV.

A identificação dos isolados de cães provenientes do CCZ evidenciou similaridade com a *Leishmania infantum chagasi*.

REFERÊNCIAS

AFONSO, M. M. S. et al. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of american visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, n. 2012, p. 1-5, 2012.

AGA, E. et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **Journal of Immunology**, v. 169, p. 898-905, 2002.

AGUIAR, V. et al. Distribuição dos casos de leishmaniose visceral humana em Pernambuco, Brasil em 2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, s. 2, p. 39-40, 2003.

ALENCAR, J. E. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.3, p. 175-180, 1961.

ALEXANDRINO A.C. **Diagnóstico e controle da leishmaniose visceral: considerações sobre Pernambuco**. Recife. 2001. Tese (Doutorado em Ciências). - Universidade Federal de Pernambuco, 2001.

AL-JURAYYAN, N.A. et al. The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 41, n. 3, p. 143-8, 1995.

ALMEIDA, A. B. P. F. et al. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 156-159, 2009.

ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Ciência Rural*, v. 40, n. 7, p. 1610-1615, 2010.

ALMEIDA, M.A.; JESUS, E.E.; SOUSA-ATTA, M.L. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, 127, 227-232, 2005.

ALMEIDA, M.A.O. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.227-232, 2005.

ALMEIDA, P.S. et al. Predicting the geographic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, n.8, p. 992-996, 2013.

ALVAR, J. et al. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVAR, J. et al. WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n.5, p. 1-12, 2012.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.

ALVARENGA, D. G. et al. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p.194-197, 2010.

ÁLVAREZ-NEBREDA, M. L. et al. Unusual duodenal presentation of leishmaniasis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 58, n. 12, p. 1321-1322, 2005.

AMUSATEGUI, I. et al. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, v.18, p.147-156, 2003.

ANSTEAD, G.M. et al. Mal nutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 4709-4718, 2001.

ARAÚJO, V.A. et al. Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Pará State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. **Parasitology**, v. 140, p. 455-460, 2013.

ASSCHE, T. V. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**, v.51, p. 337-351, 2011.

ASSIS, J. et al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.

AYLLON, T. et al. Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases Prediction and Prevention**, v. 1149, n. 1, p.361-364, 2008.

AYLLÓN, T. et al. Vector-borne diseases in client-owned and straycats from Madrid Spain. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, p. 143-150, 2012.

BADARÓ, R. et al. A propective study of visceral leishmaniasis in na endemic area of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n.4, p. 639-49, 1986.

BAILEY, T. C.; GATRELL, A. C. **Interactive spatial data analysis**. Harlow: Prentice Hall, 1995. 413p.

BALBINO, V. Q. et al. Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzmoyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. **Acta Tropica**, p. 15-24, 2006.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on na expanding zoonosis: par tone. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: Greene CE. (eds). **Infectious Diseases of the dog and cat**. 3 th edition. Saunders Elsevier: Saint Louis, 685-698, 2006.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. **The Veterinary Journal**, v. 175, n.1, p. 14-15, 2008.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. cap. 73, p. 735-748.

BARÃO, S. C. et al. Human Asymptomatic infection in visceral leishmaniasis: A seroprevalence study in na urban área of low endemicity. Preliminary Results. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n.6, p.1051-1053, 2007.

BARBIÉRI, C.I. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006.

BARBOSA, D. S. et al. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 653-659, 2010.

BARBOSA, D. S. et al. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 653-659, 2010.

BARBOZA, D. C. P. M. et al. Estudo de coorte em áreas de risco para leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 152-163, 2006.

BECK, A. et al. A case of visceral leishmaniosis in a gray wolf (*Canis lupus*) from Croatia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, p. 451-456, 2008.

BELINCHON-LORENZO, S. et al. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by real time PCR in hair of dogs with leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 43-50, 2013.

BERN, C; CHOWDHURY, R. The epidemiology of visceral leishmaniasis in Bangladesh: prospects for improved control. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 275-288, 2006.

BIGELI, J. G.; OLIVEIRA JR, W. P.; TELES, N. M. M. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.1, p.18-23, 2012.

BIGELI, J.G.; OLIVEIRA JUNIOR, W.P.; TELES, N.M.M. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.1, p.18-23, 2012.

BILDIK, A. et al. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 77, n. 1, p. 63-66, 2004.

BOARINO, A. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, p. 647-653, 2005.

BOGGIATTO, P.M. Et al. Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.5, p.4, 2011.

BORGES, L. F. N. M. et al. Prevalência e distribuição espacial da leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v.44, n.2, p.352-357, 2014.

BOTELHO, A. C. A.; NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n.5, p. 503-508, 2009.

BOURDEAU, P. et al. Management of canine leishmaniosis in endemic SW European regions: A questionnaire-based multinational survey. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 110, 2014.

BRACHELENTE, C. et al. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T-helper-2- biased immune response. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 166-175, 2005.

BRAGA, A.R.; LANGONI, H.; LUCHEIS, S.B. Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, p. 5, 2014.

BRAGA, M. D. M. et al. Controle do calazar canino comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imunoenzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 419-424, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose visceral: Recomendacoes clinicas para a redução da letalidade**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: MS, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. p. 120.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. Brasília, DF, [s.n.], 1990-2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_incidência_05_09_11.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2013, 2012

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

BRASIL. Ministério Nacional de Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar): Normas Técnicas.** Brasília; Ministério Nacional da Saúde; 1999. 85p.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e parasitárias.** 8.ed. Brasília, DF, 2010.

BRAZUNA, J. C. M. et al. Profile and geographic distribution of reported cases of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil, from 2002 to 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 601-606, 2012.

BRESCIANI, K.D. et al. Occurrence de *Leishmania* spp. in domestic cats from Araçatuba. SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 127-129, 2010.

BRITTI, D. et al. Superoxide dismutase and Glutathione peroxidase in the blood of dogs with leishmaniasis. **Veterinary Research Communication**, v. 32, n. 1, p. 251-254, 2008.

CABRERA, M. A. A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CALDAS, A. J. M. et al. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 21-28, 2002.

CAMARGO, T.C. **Avaliação do conhecimento sobre leishmaniose visceral canina na população e clínicos veterinários do município de Cotia (SP).** Universidade Cruzeiro do Sul – Mestrado em Ciências da Saúde. São Paulo – SP, 2010.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. et al. Avaliação da efetividade da utilização de coleiras impregnadas com deltametrina 4% para o controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo: resultados preliminares. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 12, n. 1, p. 7-14, 2004.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 5, p. 1263-1267, 2001.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; GOMES, A. C.; ANTUNES, J.L.F. Correlation of the presence of phlebotominae species (Diptera: Psychodidae) with records of American tegumentary leishmaniasis cases in the State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.4, p.299-306, 2002.

CARDIA, D.F.F. et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in cats from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 634-637, 2013.

CARDOSO, L. et al. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, p. 35-41, 2007.

CARDOSO, L. et al. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1-2, p. 37-42, 2010.

CARDOSO, L. et al. Sero-epidemiological study of *Leishmania* spp. Infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 21-32, 2004.

CARVALHO, MR. **Ecoepidemiologia da leishmaniose visceral americana na zona da mata norte de Pernambuco**. 2005.120 f: Dissertação (Mestrado) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife, 2005.

CERF, B. J. et al. Mal nutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 156, n. 6, p. 1030-33, 1987.

CERQUEIRA, E. J. L. et al. Inoculação experimental de *Equus asinus* com *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 6, p. 695-701, 2003.

CESSE, E. A. P. et al. Organização do espaço urbano e expansão do calazar. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 1, n. 2, p. 167-176, 2001.

CHARMOY, M. et al. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

CHATZIS, M. K. et al. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. **Veterinary Parasitology**, v. 202, p. 217–225, 2014.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **VetLearn**, v. 25, p. 358-368, 2003.

CLEMENTE, W.T. et al. High prevalence of asymptomatic *Leishmania* spp. infection among liver transplant recipients and donors from an endemic area of Brazil. **American Journal of Transplantation**, v. 14, p. 96-101, 2014.

COELHO, W.M. et al. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, p. 281- 282, 2011.

COELHO, W.M. et al. Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo Brazil: case report. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, p. 256-258, 2010.

COLOMBO, F.A. et al. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v. 109, p. 267-274, 2011.

CORTADA, V. M. et al. Canine visceral leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Veterinary Research**. v. 28, p. 365-374, 2004.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 361-72, 1990.

COSTA, F.A. et al. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 6, p. 677-684, 2003.

COSTA, P. L. et al. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 126, p. 99-102, 2013.

COSTA, T.A.C. et al. Occurrence of leishmaniasis in cats from endemic area for visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, p. 213-217, 2010.

COTA, G. F. et al. Diarrheal Syndrome in a Patient Co-Infected with *Leishmania infantum* and *Schistosoma mansoni*. **Case Reports in Medicine**, v. 2012, p. 4, 2012.

COURA-VITAL, W. et al. Evaluation of changes in canine diagnosis protocol adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a new protocol for diagnosis. **PLOS ONE**, v. 9, p. e91009, 2013.

COURA-VITAL, W. et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p.1-10, 2011.

COURTENAY, O. et al. Epidemiology of canine leishmaniasis: a comparative serological study of dogs and foxes in Amazon Brazil. **Parasitology**, v. 109, p. 273-279, 1994.

COURTENAY, O. et al. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n.1, p. e2583, 2014.

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 320-325, 2007.

COUTINHO, M.T. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149-155, 2005.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, n. 2, p. 132-41, 2002.

CURI, N. H. A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian national park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101 p. 99-101, 2006.

DA SILVA, A.V. et al. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v. 105, p. 92-94, 2008.

DA SILVA, D.A. et al. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **The Veterinary Journal**, v. 195, p. 252-253, 2013.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniasis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, 2009.

DANTAS-TORRES, F. et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* tick from Brazil and Italy. **Parasitology Research**, v. 106, p. 857-860, 2010b.

DANTAS-TORRES, F. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 733-736, 2010.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 3, p. 537-541, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) brazileinsis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139-146, 2007.

DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends in Parasitology**, v. 27, p. 155-159, 2011.

DANTAS-TORRES, F., OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites and Vectors**, v. 7, p. 22, 2014.

DANTAS-TORRES, F.; ALMEIDA, F.S.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Phlebotomine sandflies of an urban focus of visceral leishmaniasis, Pernambuco state. **Revista de Patologia Tropical**, v.34, p.157-160, 2005.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO FILHO, S. P. Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, s. 1, p. 411-412, 2005.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.4, p. 352-356, 2006a.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO FILHO, S. P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006b.

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

DAVIES, C. R. et al. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 4, p. 925-950, 2000.

DE ALMEIDA, M.C. et al. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 861-870, 2003.

DEANE, L. M.; DEANE, M.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 198-212, 1962.

DEANE, L.M. Leishmaniose Visceral no Brasil. Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro, 1956.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DI MUCCIO, T. et al. Diagnostic value of conjunctival swab sampling associated with nested PCR for different categories of dogs naturally exposed to *Leishmania infantum* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p.2651-2659, 2012.

DIAS, E. S. et al. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, p. 101-111, 2011.

DIAS-LIMA, A. G.; GUEDES, M. L. S.; SHERLOCK, I. A. Horizontal stratification of the sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in a transitional vegetation between caatinga and tropical rain forest, state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 733-737, 2003.

DIETZE, R. Diagnóstico sorológico e parasitológico da leishmaniose visceral. In: CONSULTA DE LOS EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL EM LAS AMÉRICAS, 1., 2006, Rio de Janeiro. Informe final de la reunion de expertos OPAS/OMS sobre Leishmaniasis em las Américas. Rio de Janeiro: Organización-Panamericana de salud, 2006. P. 63-65.

DYE, C.; WILLIAMS, B.G. Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. **Proceedings Biological sciences**, v. 254, n. 1339, p. 33-9, 1993.

EL TAI, N.O. et al. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. **Experimental Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 35-44, 2001.

ELLUL, P.; PISCOPO, T.; VASSALLO, M. Visceral leishmaniasis diagnosed on duodenal biopsy. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 7, p. A26, 2007.

ELNAIEM, D.E.A. et al. Risk mapping of visceral leishmaniasis: the role of local variation in rainfall and altitude on the presence and incidence of kala-azar in eastern sudan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 1, p. 10-17, 2003.

FALQUETO, A. et al. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of Southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 559-65, 2009.

FARIA, A.R. et al. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. e1310, 2011.

FEITOSA, F. L. F. et al. Estudo soroepidemiológico de leishmaniose em equinos na região de Araçatuba-SP, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 2013, In Press.

FEITOSA, M.M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, n.28, p.36-44, 2000.

FEITOSA, M.M. Leishmaniose visceral: um desafio crescent. **Intervet Pet**, p. 114, 2001.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n.1, p. 71-80, 2004.

FELIPE, I. M. A. et al. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 207-211, 2011.

FERNÁNDEZ-BELLON, H. et al. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 181-185, 2006.

FERREIRA, Eduardo de Castro. **Estudo dos hospedeiros de *Leishmania* em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**. 2010. 148 f: Tese (Doutorado em Ciências na área de concentração:

Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Centro de Pesquisas René Rachou/ FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2010.

FERREIRA, M. G. P. A. et al. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 150-154, 2009.

FERRER L., et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **The Veterinary Record**, v. 136, p. 514-516, 1999.

FERRER, L. et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, v. 136, n. 20, p. 514-516, 1995.

FERRER, L. et al. Skin-lesions in canine leishmaniasis. **Journal Small Animal Practice**, v. 29, p. 381-388, 1988.

FIGUEIREDO, M. J. F. M. et al. Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.1, p. 102-106, 2014.

FISA, R. et al. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymphnode and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 105-111, 2001.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic área of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 161-173, 2003.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniosis in the endemic área of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 213-220, 2005.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.

FREITAS, E. et al. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p.159-167, 2006.

GALATI, E. A. B. et al. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de Leishmaniose visceral no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: las leishmaniosis. **Review Scientific and Technical Office International des Epizooties**, v.23, n.2, p.661-676, 2004.

GARCIA, A. M. et al. História natural da infecção causada por *Leishmania chagasi* em cães (*Canis familiaris*) domiciliados em área endêmica da Ilha de São Luís- Maranhão, Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 195, p. 147-155, 2009.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of comparative Pathology**, v. 135, p. 100-107, 2006.

GOMES, Y. M. et al. Diagnosis of canine visceral Leishmaniasis: biotechnological advances. **Veterinary Journal**, v. 31, p. 26-36, 2006.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p. 338-349, 2004.

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

GRECH, V. et al. Visceral leishmaniasis in Malta- an 18 year pediatric, population based study. **Archives of Disease in Childhood**, v. 82, n. 5, p. 381-85, 2000.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3ª edição. Philadelphia: Saunders Elsevier 2006. 1440 p.

GREVOT, A. et al. Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. **Parasite**, v.12, p.271-275, 2005.

GRIMALDI, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPPCVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 54-59, 2012.

GUERRA, J. A. O. et al. Leishmaniose visceral entre índios no Estado de Roraima, Brasil. Aspectos clínicoepidemiológicos de casos observados no período de 1989 a 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 4, p. 305-311, 2004.

HAMILTON, P.B. et al. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p.1393-1404, 2004.

HAMILTON, P.B.; GIBSON, W.C.; STEVENS, J.R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 15-25, 2007.

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

HATAM, G. R. et al. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 3, p. 313-316, 2009.

HATAM, G.R. et al. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, p. 313-316, 2010.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HICKS, L. et al. Visceral leishmaniasis presenting with intestinal failure: a case report and literature review. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 21, n. 1, p. 117-122, 2009.

HIDE, M.; BRAS-GONCALVES, R.; BANULS, A.L. Specific cpb copies within the *Leishmania donovani* complex: evolutionary interpretations and potential clinical implications in humans. **Parasitology**, v.134, p. 379-389, 2007.

HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S. 2000. **Applied logistic regression**. John Wiley and Sons, New York. 375p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico 2010: Resultado da amostra**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/link.php?uf=PE>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

IBRAHIM, M.E.; BARKER, D.C. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 1, p. 61-68, 2001.

IKEDA-GARCIA, F. A.; FEITOSA, M. M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, ano. XI, n. 62, p. 32-38, 2006.

ISHKAWA, E. A. Y. et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p.111-121, 2002.

JULIÃO, F. S. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 8, p. 319-324, 2007.

JUSI, M. M. G. et al. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 219-222, 2011.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 9, p. 604-615, 2011.

KESARI, S. et al. Study of house-level risk factors associated in the transmission of Indian Kala-azar. **Parasites & Vectors**, v.3, n.94, p.1-5, 2010.

KHALIL. E.A.G. et al. Safety and efficacy of single dose versus multiple doses of ambisome for treatment of visceral leishmaniasis in eastern Africa: a randomised trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n.1, e2613, 2014.

KHAN, M.G.M. et al. Comparison of PCR-based diagnoses for visceral leishmaniasis in Bangladesh. **Parasitology International**, 63, 327-331, 2014.

KILLICK-KENDRICK, R. et al. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v.11, n. 2, p.105-111, 1997.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, n. 1, p 1-24, 1990.

KILLICK-KENDRICK, R. The life cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 65, p. 37-42, 1990.

KOEHLER, K. et al. Cutaneous leishmaniasis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 1-2, p. 9-17, 2002.

KOUAM, M. K. et al. seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 170-175, 2010.

KOUTINAS, A.F. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 5, p. 376-383, 1999.

KUHLS, K. et al. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 11-12, p. 1224-34, 2005.

KUHLS, K. et al. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. 1155, 2011.

LAGUNA, F. et al. Gastrointestinal leishmaniasis in human immunodeficiency virus infected patients: report of five cases and review. **Clinical Infectious Diseases**, v.19, n. 1, p. 48-53, 1994.

LAINSON, R. et al. Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 135-137, 1990.

LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W.; Killick-Kendrick, R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. v.1. London: Academic Press, p. 1-120, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Observations on the development of *Leishmania* (*L.*) *chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 63, p. 134-145, 1988.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes: trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210- 214, 2003.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, v. 213, p. 183-191, 2008.

LAUFS, H. et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, v.70, n.2, p. 826-835, 2002.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na LVA canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 67, p. 13-23, 2009.

LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 296-300, 2013.

LAURENTI, M. D.; MARCONDES, M.; ROSSI, C. N.; IKEDA-GARCIA, F. A.; TOMOKANE, T. Y.; RIZZARDI, R. L.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; CORBETT, C. E. P. Canine leishmaniasis: potential of symptomatic and asymptomatic dogs on the parasite transmissibility to the vector. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 14., 2009. **Anais...** Lucknow: Abstract Book WorldLeish4, 2009. p. 271.

LAURENTI, Márcia Dalastra. **Patologia e patogenia das leishmanioses**. 2010. 84 f: Tese (Professor Livre- Docente) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LEÇA JUNIOR, N .F. et al. Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil. **Acta Tropica**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.008>

LEONTIDES, L.S. et al. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. Infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 19–27, 2002.

LEVINE, N. D. et al. A newly revised classification of the Protozoa. **The Journal of Protozoology**, v.27, p. 37-58, 1980.

LIMA, H. et al. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 412-414, 2008.

LOMBARDO, G. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 1, p. 10-17, 2012.

LOPES, E.G.P. et al. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte- MG, 1993 a 2007. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1062-1071, 2010.

LOPES, P. M. et al. Seroprevalence and risk factors associated with visceral leishmaniasis in dogs in Jaciara, State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 791-795, 2014.

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 9375-9380, 2007.

LUPPI, M.M. et al. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 146-151, 2008.

MACHADO, J. G.; HOFFMANN, J. L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral. **Clínica Veterinária**, n. 71, p. 50-58, 2007.

MACIEL, B.L.L. et al. Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 4, p. 591-8, 2008.

MADEIRA, M.F. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 551-555, 2003.

MAGALHÃES, P. A. et al. Calazar na Zona do Rio Doce – Minas Gerais. Resultados de medidas profiláticas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 22, p. 197-202, 1980.

MAIA DA SILVA, F. M. et al. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 129, p. 549-561, 2004.

MAIA, C. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 142-144, 2009.

MAIA, C. S. et al. Análise espacial da leishmaniose visceral americana no município de Petrolina, Pernambuco, Brasil. **Hygeia**, v. 10, n. 18), p.167-176, 2014.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-287, 2008.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, 2008.

MALTA, M.C. et al. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.169, p. 193-197, 2010.

MANCIANTI, F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? **Parassitologia**, v. 46, p. 203-206, 2004.

MANDELL, G.L. et al. **Principles and practice of infectious diseases**, 6th Ed. Philadelphia (PA): Elsevier Churchill Livingstone; 2005 p. 2428-2442.

MANNA, L. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.

MARCILI, A. et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, p. 641-655, 2009a.

MARCILI, A. et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 44-51, 2014.

MARCILI, A. et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 615-623, 2009b.

MARCONDES, M. et al. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 15-19, 2011.

MARLET, M. V. L. et al. Emergence or reemergence of visceral leishmaniasis in areas of Somalia, north-eastern Kenya and southeastern Ethiopia in 2000-2001. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, p. 515-518, 2003.

MAROLI, M. et al. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, n. 4, p. 358-363, 2001.

MAROLI, M. et al. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 357-360, 2007.

MARQUES, M. I. L. M. **Leishmaniose canina**. 2008. 131 f: Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.

MÁRTIN-SÁNCHEZ, J. et al. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 267-273, 2007.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v 42, n. 5, p. 570-580, 2009.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, v. 10, p. 34-37, 1994.

MARZOCHI, M.C.A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, n. 4, p.349-357, 1985.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; CARVALHO, R. W. Leishmaniose visceral canina em Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, v. 10, n. 1, p. 34-37, 1994.

MATOS, M. M. et al. Ocorrência da leishmaniose visceral em cães em Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal**, v.16, n.1, p. 51-54, 2006.

MAURICIO, I.L. et al. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, 122, 393-403, 2001.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. **Parasitology**, 128, 263-267, 2004.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 188-9, 2000.

MAURICIO, I.L. et al. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 237-46, 1999.

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: Desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, suplemento I, p. 41-45, 2004.

MESTRE, G. L.C.; FONTES, C.J.F. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 42-48, 2007.

METTLER, M. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

MICHALICK, M. S.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 67-83.

MICHALSKY, E.M. et al. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n.1, p. 58-62, 2011.

MIRANDA, S. et al. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 85, N. 1, P. 35-38, 2008.

MIRÓ, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v. 24 n. 8, p. 371-378, 2008.

MIRZAEI, A. et al. Molecular detection and conventional identification of *Leishmania* species in reservoir hosts of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Fars Province, south of Iran. **Iranian Journal Parasitology**, v. 8, n. 2, p. 280-288, 2013.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365-368, 2008.

MOLINA, R. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 491-493, 1994.

MOLINA, R. et al. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 268-271, 2012.

MOREIRA, M. A. B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 245-252, 2007.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitology**, v. 8, n. 9, p. 399-405, 2002.

MORILLAS-MARQUEZ, F. et al. *Leishmania infantum* (Protozoa, kinetoplastida): transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing. **Experimental Parasitology**, v. 100, p. 71-74, 2002.

MOSHFE, A. et al. Canine visceral leishmaniasis: Asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. **Acta Tropica**, v. 112, n.2, p.101-105, 2009.

NAUCKE, T.J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 67, 2012.

NETO, L. S. et al. Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti *Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*. **Parasitology**, v. 177, p.374-377, 2011.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 6, p. 754-765, 2008.

NEVES, D. P. Leishmaniose Visceral Americana. In: _____. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 67-83.

NEVES, D. P., et al. **Parasitologia Humana**. 9^o ed. Editora Atheneu. São Paulo; 1997. Cap. 06 e 09.

NICHOLAS, K.B., NICHOLAS JR., H.B., DEERFIELD, D.W. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. **EMBNEW NEWS**, v. 4, p. 14, 1997.

NUNES, C. M. et al. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

NUNES, V. L. B. et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, n. 1/2, p. 17- 21, 1988.

OLIVEIRA, A. L. L. et al. Asymptomatic infection in family contacts of patients with human visceral leishmaniasis in Três Lagoas, MAto Grosso do Sul State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n.12, p. 2827-2833, 2008b.

OLIVEIRA, A. N. et al. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 446-450, 2006.

OLIVEIRA, C. D. L. et al. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 5, p. 1231-1239, 2001.

OLIVEIRA, D.M.S. et al. Distribution of phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) across an urban-rural gradient in an area of endemic visceral leishmaniasis in northern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, n.8, p.1039-1044, 2011.

OLIVEIRA, L. C. P. et al. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n.4, p.400-404, 2010.

OLIVEIRA, M.R.; MACIEL, J.N. Aspectos sócio-econômicos da Leishmaniose Visceral em João Pessoa- Paraíba – **Brasil Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.7, n.1, p.63-70, 2003.

OLIVEIRA, T. M. F. S. et al. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008a.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. Fleas and ticks as vectors of *Leishmania* spp. to dogs: caution is needed. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 102, p. 173-174, 2010.

OWENS, S. D. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1076-1083, 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.

PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 36, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PANGRAZIO, K.K. et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 327-331, 2009.

PAPADOGIANNAKIS, E. et al. Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. **Zoonoses and Public Health Journal**, v. 57, p. 23-25, 2010.

PARANHOS-SILVA, M. et al. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, p. 39-44, 1996.

PASSOS-DIAS, F. O.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1373-1380, 2003.

PASTORINO, A. C. et al. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 2, p. 120-127, 2002.

PAZ, G. F. et al. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 106, n. 2, p. 523-528, 2010.

PEDROSA, C.M.; ROCHA, E.M. da. Clinical and epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in children up to 15 years of age in Alagoas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 4, p. 300-4, 2004.

PENNISI, M.G. et al. Case report of leishmaniasis in four cats. **Veterinary Research Communications**, v.28, p.363-366, 2004.

PEREIRA, G. et al. Leishmaniose visceral em Pernambuco: dados epidemiológicos. **Boletim Trimestral da Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias**, v.5, n.1, p. 53-70, 1985.

PEREIRA, M.R. et al. Comparison between conventional and real-time PCR assays for diagnosis of visceral leishmaniasis. Hindawi Publishing Corporation. **BioMed Research International**, v.4, p.2 , 2014.

PESSOA, F.A.C.; MEDEIROS, J.F.; BARRETT, T.V. Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 593-599, 2007.

PESSOA, S. B. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1972.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, p. 970-974, 2008.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PITTA-PEREIRA, D. et al. 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**, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.

POLI, A. et al. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.181-191, 2002.

PORROZZI, R. et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 544-548, 2007.

PORTÚS, M. et al. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). **Revista Ibérica de Parasitología**, v. 62, n. 3-4, p. 72-76, 2002.

PRADO, P. F. et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, state of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and

2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 561-566, 2011.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**, v. 1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 713-732, 2005.

QUARESMA, P.F. et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, p. 579- 585, 2011.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 141-146, 2004.

QUEIROZ, M.F.M. et al. Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, state of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n. 3, p. 313-317, 2012.

QUEIROZ, N. M. et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 1-2, p. 1-8, 2011.

QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 34-40, 2010.

QUEIROZ, P.V.S. et al. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 267-273, 2009.

QUINNELL, R. J.; DYE, C.; SHAW, J. J. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 6, n. 3, p.195-200, 1992.

QUISPE TINTAYA, K.W. et al. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metallo protease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1035-1043, 2004.

REILING, L. et al. Overexpression of a single *Leishmania major* gene enhances parasite infectivity in vivo and in vitro. **Molecular Microbiology**, v.76, n.5, p.1175-1190, 2010.

REIS, A. B. et al. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 341-349, 2010.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 289-290, 2002.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C. Molecular diagnosis of Leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p. 21-25, 2007.

REY, L. *Leishmania* e Leishmaníases: Os Parasitos. In:_____. Parasitologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.214-226, 2001a.

REY, L. O Complexo “*Leishmania donovani*” e a Leishmaníase Visceral. In:_____. Parasitologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.253-266, 2001b.

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505-510, 2009.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania* – Host-Cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, p. 292-297, 2000.

RODRIGUES, A.C. et al. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 132, p. 215-224, 2006.

ROLÃO, N. et al. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. **Parasite**, v. 12, n. 2, p. 183-186, 2005.

ROMERO, G.A.S. BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.19, n. 4, p. e584, 2010.

RONDON, F. C. M. et al. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1-2, p. 24-31, 2008.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

ROSÁRIO, E. Y. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.

ROSENTHAL, E. et al. HIV and *Leishmania* coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical locations of *Leishmania*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 1093-1095, 2000.

ROSYPAL, A.C. et al. Survey of antibodies to *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in gray and red fox populations from North Carolina and Virginia. **Journal of Parasitology**, v. 96, p. 1230-1231, 2010.

SALAM, M.A., KHAN, Md.G.M. e MONDAL D. Urine antigen detection by latex agglutination test for diagnosis and assessment of initial cure of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n.5, p. 269-72, 2011.

SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I.C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SANTIAGO, M.E. et al. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 283-290, 2007.

SANTOS - GOMES, G.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine experimental infection : intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 2, p. 193-198, 2000.

SANTOS, G. P. L. et al. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de Epidemiology of canine leishmaniasis leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n.2, p.161-166, 2005.

SANTOS, J. M. L. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 41-45, 2010.

SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical Veterinarian Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SARAIVA, L. et al. Information system and geographic information system tools in the data analyses of the control program for Visceral Leishmaniasis from 2006 to 2010 in the sanitary district of Venda Nova, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Hindawi Publishing Corporation. **Journal of Tropical Medicine**, 2012.

SARAIVA, L. et al. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, p. 1159-1163, 2009.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 82-86, 2005.

SARKARI, B. et al. Seroprevalence of feline leishmaniasis in areas of Iran where *Leishmania infantum* is endemic. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 103, n. 3, p. 275, 2009.

SCHALLIG, H.D.F.H. et al. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 3, p. 387-93, 2007.

SCHWANKE, K. et al. Diagnóstico molecular e frequência de anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi* em cães do município de Belém, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34, 255-260, 2014.

SCOTT, D. W.; WILLIAM, H. M.; GRIFFIN, G. E. Viral, rickettsial and protozoal skin disease. In: _____. **Müller & Kirk's: small animal dermatology**. 6. ed. Philadelphia Saunders Company, 2001, p. 517-542.

SHERLOCK I. A. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79 p. 511, 1984.

SHERRY, K. et al. A serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the Island of Ibiza (Spain). **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 3, p. 239-245, 2011.

SILVA, A. R. S. et al. Osteoartrite por *Leishmania* sp. em cão Pitt Bull – Relato de caso. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 730-732, 2007.

SILVA, A.V.M. et al. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos . **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, 2005.

SILVA, C. B. et al. Seroepidemiological aspects of *Leishmania* spp. in dogs in the Itaguaí micro-region, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 39-45, 2013.

SILVA, D. F.; VASCONCELOS, S. D. A ten year (1990-1999) survey on leishmaniasis incidence in Pernambuco state, northeastern Brazil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 32, n. 1, p. 51-61, 2002.

SILVA, E.S. et al. Visceral leishmaniasis in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. **Veterinary Record**, v. 147, p. 421-2, 2000.

SILVA, F.L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 55–59, 2009.

SILVA, J. P. et al. Fatores associados a infecção por *Leishmania chagasi* em cães domiciliados de Teresina, Estado do Piauí, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 480-484, 2012.

SILVA, R.C.N. et al. Detection of antibodies against *Leishmania infantum* in cats (*Felis catus*) from the state of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 1-2, 2014.

SILVA, S.M. et al. First report infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.174, p. 150-154, 2010.

SILVEIRA, F. T. et al. A crosssectional study of canine *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil ratifies a higher prevalence of specific IgG-antibody response than delayedtype hypersensitivity in symptomatic and asymptomatic dogs. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1513-1522, 2012.

SOARES, I.R. et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 665– 669, 2013.

SOARES, M. R. A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil, relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Tropica*, v. 117, p. 6-9, 2011.

SOBRINHO, L. S. V. et al. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1-2, p. 302-306, 2012.

SOLANO-GALLEGO et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 98, 2012.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p. 320-323, 2003.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 4, p. 676-680, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vector**, v.4, p. 86, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560-563, 2001.

SOLCÀ, M.S. et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, p. 133–140, 2012.

SOUSA, V.R.F.; ALMEIDA, A. B. P.F. Co-infecção entre leishmaniose visceral e ehrlichiose monocítica em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 36, n.2, p. 113-117, 2008.

SOUZA, K.C.M. et al. Serological detection of *Toxoplasma gondii*, *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* in cats from an area endemic for leishmaniasis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 4, p. 449-455, 2014.

- SPADA, E. et al. Serological and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* Infection in Stray Cats in a Nonendemic Area in Northern Italy. **Parasitology**, v. 1, p. 1- 6, 2013.
- SPLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. p. 450-458.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. **Journal of Global Infectious Diseases**,v. 2, p. 159-166, 2010.
- SWOFFORD, D. L. **PAUP**: Phylogenetic analysis using parsimony. Beta Version 4.0b 10. Sanderland, Massachusetts, USA: sinauer and Associates. 2002.
- TABAR, M.D. et al. Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. **Journal of Small Animal Practice**, v. 49, n. 7, p. 325-328, 2008.
- TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.
- THOMPSON, J.D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.
- TISEO, D. et al. Isolated laryngeal leishmaniasis in an immunocompetent patient: a case report. **Infezioni in Medicina**, v. 16, n. 4, p. 233-235, 2008.
- TRAVI, B. L. et al. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Tripanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Colombia. **American journal Tropical Medicine Hygiene**,v. 50, p. 557-565, 1994.
- TROTTA, M. et al. Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and rickettsiae in ticks removed from dogs living in Italy. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, p. 293-296, 2012.
- TROTZ-WILLIAMS, L.; GRADONI, L. Diseases risks for the travelling pet Leishmaniasis. **In Practice**, v. 25, n. 4, p. 190-197, 2003.
- ULIANA, S.R. et al. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. **Experimental Parasitology**, v. 72, p. 157-163, 1991.

VIANA, G.M.C. et al. Relationship between rainfall and temperature: observations on the cases of visceral leishmaniasis in São Luis Island, State of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n.6, p. 722-724, 2011.

VIANNA, M. S. R. Sobre a transmissão da leishmaniose visceral. Saúde-Rio: Secretaria Municipal de Saúde, Rio de Janeiro, 19 dez. 2001.

VIDES, J. P. et al. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 1-2, 22-28, 2011.

VITA, S. et al. Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. **Veterinary Research Communications**, v. 29, Supl. 2, p. 319-321, 2005.

WANG, J. Y. et al. The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in western China detected by PCR and serological tests. **Parasites & Vectors**, v. 4, p.69, 2011.

WHO. World Health Organization. Control of the Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of leishmaniasis, Geneva. 22-26 March 2010. Disponível em : http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso em 10/mar/2012.

WOLFF, M. et al. Phlebotominae fauna (Diptera : Psychodidae) in the Departmente of Amazonas, Colombia. **Neotropical Entomology**, v. 32, n.3, p. 523-526, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Magnitude of the problem.**

Disponível em:<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html>. Acesso em: 01 dez. 2012.

ZANET, S. et al. Epidemiology of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in *Rattus rattus* in absence of domestic reservoir and definitive hosts. **Veterinary Parasitology**, v. 199, p. 247- 249, 2014.

ZANETTE, M. F. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 105-107, 2014.

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral**

canina. 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filholl, Araçatuba, 2006.

ZATELLI, A. et al. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n.5, p. 558-561,2003.

ZEMANOVA, E. et al. Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 6, p. 613-7, 2004.

ZUBEN, A. P. B. V. et al. The first canine visceral leishmaniasis outbreak in Campinas, State of São Paulo Southeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 385-388, 2014.

Anexos

ANEXO A - Ficha clínica e Questionário

ANIMAL N°		NOME:		DATA:	
RAÇA:		IDADE:		SEXO: F () M ()	
PORTE: P () M () G ()					
PROPRIETARIO:					
BAIRRO:			ENDEREÇO:		
COORDENADAS GEOGRÁFICAS:					
VACINADO P/ LEISHMANIOSE: SIM () NÃO ()					
		PRESENTE		AUSENTE	
LINFOADENOPATIA: Generalizada		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Localizada:		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Linf. Submandibular		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Linf. Pré- escapular		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Linf. Poplíteo		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
SINAIS VISCERAIS: Caquexia		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Apatia		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Epistaxe		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Icterícia		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Mucosas pálidas		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Hepatoesplenomegalia		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
SINAIS CUTÂNEOS: Alopecia		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Descamação		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Úlceras		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Onicogrifose		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Lesões oculares		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Conjuntivite		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES CUTÂNEAS:					
Ao redor das orelhas		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Ao redor dos olhos		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Face		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Membros		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Outras localizações		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Generalizada		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
PRESENÇA DE ÁREA VERDE: () Próximo a residência () Residência sem mata próxima					
ANIMAL SAI A RUA: () sim () não			CONTATO COM OUTROS ANIMAIS: () sim () não		
CONTATO COM MATA? Caatinga? () sim () não					
CONTATO COM ANIMAIS SILVESTRES? () sim () não Quais?					
NOTIFICAÇÃO DE CASOS HUMANOS COM LEISHMANIOSE NO DOMICÍLIO E/OU PRÓXIMO?					
() SIM NO DOMICÍLIO () SIM/VIZINHO () NÃO					
GALINHEIRO NA RESIDÊNCIA: () sim () não					
LEVA AO VETERINÁRIO: () sim () não Qual frequência?					
OBSERVAÇÕES:					

() QUESTIONÁRIO () SANGUE					

ANEXO B - Parecer Bioética



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
COMITÊ DE ÉTICA E DEONTOLOGIA EM ESTUDOS E PESQUISAS - CEDEP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo epidemiológico da Leishmaniose Visceral na região do Vale do São Francisco, Pernambuco", protocolo nº 0002/190213, que utiliza 1.152 animais da espécie *Canis familiaris*, sob a responsabilidade de **Maurício Claudio Horta**, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Certify that the project entitled "Epidemiological study of Visceral Leishmaniosis in São Francisco Valley, Pernambuco State", protocol number 0002/190213, utilizing 1.152 animal species *Canis familiaris*, under the responsibility **Maurício Claudio Horta**, being in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by Committee of Ethics and Deontology Studies and Research at the Federal University of Vale do São Francisco.

Petrolina, 13 de fevereiro de 2014.

Prof. Márcia Bento Moreira

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIVASF

Prof. Alexandre H. Reis

Coordenador do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas – CEDEP/UNIVASF