

RAFAEL LIMA DE OLIVEIRA

**PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Leishmania infantum* EM
RAPOSAS (*Cerdocyon thous*) DE VIDA LIVRE E DE CATIVEIRO E EM
CÃES DOMÉSTICOS (*Canis familiaris*) EM UNIDADES DE
CONSERVAÇÃO DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

RECIFE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

RAFAEL LIMA DE OLIVEIRA

**PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Leishmania infantum* EM
RAPOSAS (*Cerdocyon thous*) DE VIDA LIVRE E DE CATIVEIRO E EM
CÃES DOMÉSTICOS (*Canis familiaris*) EM UNIDADES DE
CONSERVAÇÃO DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE

2012

Ficha catalográfica

O48p Oliveira, Rafael Lima de

Pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum* em raposas (*Cerdocyon thous*) de vida livre e de cativeiro e em cães domésticos (*Canis familiaris*) em Unidades de Conservação do Estado de Pernambuco / Rafael Lima de Oliveira – Recife, 2012.

51 f. : Il.

Orientador: Jean Carlos Ramos da Silva
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento
de Medicina Veterinária, Recife, 2012.

Referências.

1. Calazar 2. Canídeos 3. Diagnóstico 4. Sorologia 5. PCR
I. Silva, Jean Carlos Ramos da, orientador II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Leishmania infantum* EM
RAPOSAS (*Cerdocyon thous*) DE VIDA LIVRE E DE CATIVEIRO E EM
CÃES DOMÉSTICOS (*Canis familiaris*) EM UNIDADES DE
CONSERVAÇÃO DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação de Mestrado elaborada por

RAFAEL LIMA DE OLIVEIRA

Aprovada em 23 / 02 / 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. JEAN CARLOS RAMOS DA SILVA
Orientador – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. RINALDO APARECIDO MOTA
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Profa. Dra. MARIA FERNANDA MARVULO
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dr. JOSÉ SÉRGIO DE ALCANTARA E SILVA
Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília
Projeto Fauna nos Aeroportos Brasileiros

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

*Aos meus pais, por todas as conquistas alcançadas.
Aos seres que mais admiro: os animais.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades traçadas para a minha vida e a saúde concedida.

Aos meus pais amados Rinaldo e Elizabete, que me deram as diretrizes para superar os obstáculos da vida e sempre investiram o máximo possível na minha educação. Obrigado pela paciência nesses últimos meses. Amo vocês.

Ao meu amado irmão Júnior, pelo companheirismo e pelo apoio constante.

Aos amigos do Projeto Carnívoros, Ricardo, Diogo e Vanessa, pela idealização, concepção e execução deste projeto, por toda a dedicação, por acreditarem nele, por todas as dificuldades enfrentadas juntos, pelas críticas construtivas, pelos bons momentos no campo. Foi ótimo trabalhar todo este tempo com vocês.

Ao Ricardo, preciso fazer um agradecimento extra por ter enfrentado as dificuldades deste projeto sozinho inúmeras vezes. Este trabalho se deve muito à sua colaboração.

Ao Prof. Jean Carlos, por ter aceitado trabalhar nesta área de estudo, por todas as orientações que contribuíram imensamente para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, por todas as críticas verdadeiras, pelas palavras de otimismo e de incentivo, e pela grande paciência.

A Prof^a. Maria Fernanda, pela grande contribuição a esse projeto, as experiências e críticas foram muito importantes para o meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao Prof. Leucio, por todo apoio a este trabalho, por ter aceitado ser co-orientador desta pesquisa, por todo o referencial teórico e prático, que foram essenciais para o meu aprendizado, por ter cedido o laboratório e o apoio da sua equipe de orientados.

A Equipe da Biogene em especial ao Emanuel e a Ivone, por terem cedido gentilmente os kits do ELISA, as instalações do Laboratório e pelas orientações. A colaboração de vocês foi grandiosa.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, em especial ao Neurisvam, Rebecka e Fernanda, pela execução da PCR e RIFI, na maior paciência e disposição. Aprendi bastante com vocês.

Aos representantes das Unidades de Conservação: 72º Batalhão de Infantaria Motorizado (BIMTz) – Helvétius Marques (Tenente Coronel), Marcus Belo (Tenente e médico veterinário) e Josenaldo (Sargento e biólogo); Estação Ecológica de Caetés – Sandra Maria de Almeida e equipe; Estação Ecológica do Tapacurá – Paulo Martins, Maria e equipe; 10ª Brigada de Infantaria Motorizada – Gleudson Almeida (Sargento); PEDI – Silvana Paula

Valdevino da Silva (Gerente Geral), Daniel Siqueira (médico veterinário), Alex Zanotti (biólogo), Luciana Rameh (médico veterinário) e Dênisson Souza (médico veterinário); IBAMA-Pernambuco – Ana Paula Cavalcante de Pontes (Superintendente). Agradeço em nome do Projeto Carnívoros a todas as instituições pelo apoio institucional e logístico.

A Secretaria de Saúde do Governo do Estado de Pernambuco, especialmente a Gênova Oliveira, por todo apoio logístico para a realização da pesquisa em Petrolina.

Aos amigos e colegas que contribuíram na pesquisa: Mariana, George, Íriz, Débora, Pedro e Rhaysa.

Aos amigos do trabalho da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, pelo apoio nas dificuldades.

Aos meus amigos pessoais, dos quais acabei me afastando para poder dedicar ao mestrado.

A todos que colaboraram direta e indiretamente para que este trabalho fosse conduzido. Peço desculpas se esqueci de alguém. **Muito obrigado!**

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose transmitida por flebotomíneos, sendo causada por diversas espécies de *Leishmania* e que podem infectar seres humanos, e animais domésticos e selvagens. No Brasil, o crescimento no número de casos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é associado com a adaptação de seu vetor e a dispersão da *Leishmania infantum* entre os hospedeiros domésticos e silvestres no ambiente urbano e periurbano. Objetivou-se com este trabalho contribuir com o estudo epidemiológico da LVC no Estado de Pernambuco, mediante a identificação da frequência anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum* em raposas (*Cerdocyon thous*) de vida livre e de cativeiro e em cães domésticos (*Canis familiaris*) oriundos de Unidades de Conservação do Estado de Pernambuco e no seu entorno. Ao todo, foram obtidas amostras de sangue de 107 animais, sendo 18 raposas (quatro de vida livre e 14 de cativeiro) e de 89 cães (85 domiciliados e quatro errantes). Em nove raposas e três cães também foram obtidas amostras de medula óssea. Os testes de RIFI e ELISA foram realizados nas 107 amostras de sangue dos canídeos e a PCR foi realizada nas 12 amostras de medula óssea. Das 18 raposas examinadas, uma (5,5%) foi soropositiva ao ELISA e dos 89 cães examinados, 29,21% foram soropositivos pela RIFI, 35,95% pelo ELISA e 19,10% foram soropositivos em ambos os testes simultaneamente. Nenhuma das amostras foi positiva na PCR. Concluiu-se que a ocorrência de anticorpos IgG anti-*L. infantum* em uma raposa de vida livre e um cão errante no mesmo ambiente silvestre sugeriu a existência de um ciclo silvático da *Leishmania infantum* em uma das áreas de estudo. A presença de cães soropositivos no interior e no entorno de áreas silvestres indicou que estes animais podem atuar como dispersores do agente infeccioso para populações humanas e para cães não infectados. Esta é a primeira ocorrência de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum* em raposa de vida livre e em cães capturados no interior de Unidades Conservação do Estado de Pernambuco, Brasil.

Palavras chave: Calazar, canídeos, diagnóstico, sorologia, PCR.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is a zoonosis transmitted by sand flies caused by several *Leishmania* species and that can infect humans and domestic and wild animals. In Brazil, the growth in the number of cases of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is associated with the adaptation of its vector and dispersion of *Leishmania infantum* among domestic and wild hosts in urban and periurban areas. The objective of this work contribute to the epidemiological study of CVL in the state of Pernambuco by identification of the frequency IgG antibodies anti-*Leishmania infantum* in free-living and captives crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and domestic dogs (*Canis familiaris*) from Conservation Unit of the State of Pernambuco and its surroundings. Blood samples were obtained of 107 animals, 18 crab-eating foxes (four free-living and 14 captives) and of 89 dogs (85 domiciled and four strays). Bone marrow samples were obtained of nine crab-eating foxes and three dogs. The IFAT and ELISA were performed on blood samples of 107 dogs and PCR was performed on 12 samples of bone marrow. Of the 18 crab-eating foxes examined, one (5.5%) were seropositive to the ELISA and 89 dogs examined, 29.21% were positive by IFAT, 35.95% positive by ELISA and 19.10% were positive in both tests simultaneously. None of the samples was positive by PCR. It is concluded that the presence of IgG antibodies anti-*L. infantum* in a free-living crab-eating fox and in a stray dog in the wild environment suggested the existence of a local sylvatic cycle of *Leishmania infantum* in one of the areas of study. The presence of seropositive dogs inside and around of these wild areas indicated that animals can act as dispersers of the infectious agent to humans and to the non-infected dogs. This is the first occurrence of IgG antibodies to *Leishmania infantum* in free-living crab-eating fox and dogs trapped inside of the Conservation Units of the State of Pernambuco, Brazil.

Key words: Kala-azar, Canids, Diagnostic, Serology, PCR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
1.1 Objetivos.....	11
1.1.1 Objetivo geral.....	11
1.1.2 Objetivos específicos.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Distribuição geográfica e dados epidemiológicos da leishmaniose visceral	12
2.2 Leishmaniose visceral canina - Dados epidemiológicos para Pernambuco.....	13
2.3 Agente etiológico e ciclo biológico	14
2.4 Vetores	15
2.5 Outros vetores e transmissão não vetorial	16
2.6 Hospedeiros	17
2.7 Reservatórios selvagens.....	17
2.8 Reservatórios domésticos	20
2.9 Manifestações clínicas	21
2.10 Métodos diagnósticos.....	21
2.11 Unidades de Conservação do Estado de Pernambuco	23
3 REFERÊNCIAS	25
4 ARTIGO CIENTÍFICO	42
Frequência de anticorpos IgG anti-<i>Leishmania infantum</i> em raposas de vida livre e de cativeiro e em cães domésticos provenientes do interior e do entorno de Unidades de Conservação, Pernambuco, Brasil	42

1 INTRODUÇÃO

A conservação das espécies animais selvagens está sendo progressivamente ameaçada em decorrência da pressão antrópica sobre os biomas. O desflorestamento, fragmentação de habitats, a introdução de espécies invasoras (aves exóticas, roedores, pets, insetos), o consumo de recursos naturais e a expansão da agropecuária são atividades que promovem a alteração dos habitats e mudanças climáticas o que favorece a redução de populações ou a extinção de espécimes selvagens em diversos níveis tróficos (DASZAK et al., 2001; CHOMEL, 2008).

Tais mudanças ambientais interferem diretamente sobre a saúde coletiva, pois estão associadas com descarte indevido de resíduos e dejetos, poluição de aquíferos, saneamento precário, proliferação de pragas urbanas e vetores. Estes fatores promovem a dispersão de agentes infecciosos veiculados por vetores, a exemplo da malária, dengue e leishmaniose visceral (LV) (KNUDSEN e SLOOFF, 1992; PATZ et al., 2000; DESJEUX, 2001; TAUIL, 2006).

Considerada no Brasil como uma zoonose emergente, a LV é uma enfermidade de curso crônico, potencialmente letal para os seres humanos e cães. O agente infeccioso da LV é o protozoário flagelado *Leishmania (Leishmania) infantum* (= *Leishmania infantum*) (LAINSON, 2010). O flebotomíneo denominado mosquito-palha (*Lutzomyia longipalpis*) é o seu principal vetor, sendo encontrado no ambiente selvagem, rural, periurbano e urbano (RANGEL e VILELA, 2008). A *L. infantum* têm como reservatório doméstico e peridoméstico o cão, e como reservatórios selvagens a raposa (*Cerdocyon thous*) e marsupiais didelífideos (GONTIJO e MELO, 2004; LAINSON, 2010).

Até as duas últimas décadas, a LV era tratada como uma doença limitada ao ambiente rural, com cerca de 90% dos casos humanos restritos à região Nordeste. Contudo, a enfermidade tem se expandido em todas as regiões do Brasil, com ocorrência em grandes centros urbanos, causando grandes impactos para a saúde pública brasileira (BRASIL, 2009a; FURLAN, 2010; BRASIL, 2011).

A expansão desta enfermidade tem sido associada principalmente à destruição do habitat selvagem, devido à expansão da agropecuária, a migração de indivíduos infectados (seres humanos e cães) de áreas rurais para os centros urbanos, a adaptação do vetor a áreas urbanizadas e o compartilhamento do ambiente peridoméstico pelos reservatórios vertebrados (LAINSON, 1988; REBÊLO et al., 2000). Além disso, as atividades de caça e de ecoturismo

(caminhadas, acampamentos), podem promover uma maior exposição ao agente infeccioso da LV, o que favorece a dispersão da enfermidade para novas áreas (CURI et al., 2006).

De modo geral, os animais selvagens participam da cadeia epidemiológica da maioria das zoonoses e servem como reservatórios de agentes zoonóticos para animais domésticos e seres humanos, sendo que a maioria das doenças emergentes são zoonoses (KRUSE et al. 2004).

Os canídeos selvagens são importantes na epidemiologia da LV, pois têm a capacidade de dispersar o agente infeccioso para ambientes urbanizados, devido ao hábito de se deslocarem do meio selvagem para o meio urbano na busca por alimentos (LAINSON, 1988).

No Brasil, a raposa (*C. thous*) é considerada um potencial reservatório da *L. infantum* no ambiente selvagem. Neste canídeo foi isolado o agente infeccioso a partir de amostras de animais de vida livre, que se apresentavam aparentemente sadios e sem sinais de LV (SILVEIRA et al., 1982; MELLO et al., 1988). Este canídeo foi incriminado como principal fonte de infecção para os seres humanos em um surto de LV na cidade de Sobral, Ceará, onde a eliminação das raposas selvagens na região foi uma das medidas adotadas para o controle do agente infeccioso (ALENCAR, 1961). Contudo, a participação da raposa como dispersora em ambiente peridoméstico foi questionada por Courtenay et al. (2002) em um estudo na Amazônia Paraense, ao considerarem este canídeo como pouco representativo para a manutenção da *L. infantum* no ambiente peridoméstico, sem a existência de cães domésticos, que são importantes fontes de infecção do agente infeccioso da LV.

A participação do cão doméstico e das raposas na epidemiologia da LV em áreas silvestres foi avaliada em um estudo no Parque Nacional da Serra do Cipó, Minas Gerais, sendo identificados anticorpos anti-*L. infantum* em amostras de raposas de vida-livre e em cães domésticos oriundos de habitações nas proximidades dos locais de captura das raposas (CURI et al., 2006). Nesta pesquisa, os autores enfatizaram a importância de se evitar o acesso dos cães domésticos ao meio selvagem como medida de controle e prevenção da dispersão da infecção na região estudada.

Diante disto é importante avaliar a relação das duas espécies no meio selvagem e no seu entorno, a fim de identificar uma possível disseminação da *L. infantum* no ambiente natural, peridoméstico e domiciliar. No entanto, não há estudos até o presente momento referente à participação da raposa e do cão doméstico no ciclo da *L. infantum* em Unidades de Conservação no Estado de Pernambuco.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Contribuir com o estudo epidemiológico da Leishmaniose Visceral Canina no Estado de Pernambuco.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a frequência de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em raposas (*Cerdocyon thous*), e em cães domésticos (*Canis familiaris*) nas áreas estudadas pelos testes de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

- b) Realizar a pesquisa de DNA de *Leishmania infantum* por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em amostras de medula óssea de raposas e de cães domésticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral (LV), também denominada calazar (kala-azar), é uma zoonose, veiculada por vetores, com ampla distribuição mundial e que acomete o homem e os canídeos (selvagens e domésticos). Os agentes etiológicos causadores da LV são: *Leishmania (Leishmania) donovani* (Laveran & Mesnil, 1903) Ross, 1903 com ocorrência na Ásia, principalmente Índia, Bangladesh, Paquistão e na África oriental; *Leishmania (Leishmania) infantum infantum* (= *Leishmania infantum*) (Nicolle, 1908) Shaw, 2002 com distribuição em países localizados na bacia do mar mediterrâneo, oriente médio, África oriental e norte da Ásia; e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (= *Leishmania infantum*) (Cunha & Chagas, 1937) Shaw, 2002 com ocorrência nas Américas (REY, 2001; DESJEUX, 2004; LAINSON, 2010).

Considerada uma das seis principais epidemias parasitárias mundiais, a LV é segunda com maior índice de mortalidade dentre as doenças tropicais (CHAPPUIS et al., 2007). A LV é endêmica em 65 países, com uma incidência anual estimada de 500.000 novos casos, e mortalidade em 59.000 (35.000 em homens e 24.000 em mulheres). Do total de casos humanos registrados, aproximadamente 90% estão concentrados em Bangladesh, Índia, Etiópia, Quênia, Sudão e Brasil (DESJEUX, 1992; DESJEUX, 2004; CHAPPUIS et al., 2007; MATLASHEWSKI et al., 2011). É apontada como uma das enfermidades mais negligenciadas pelo setor privado, especificamente a indústria farmacêutica, pois se observa que maior número de casos de LV ocorre em pessoas que vivem em áreas pobres, que não podem manter o custo elevado do tratamento, como em zonas rurais e subúrbios de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Desta forma fica ao setor público o peso de investir em novas formas de tratamento, métodos de diagnóstico mais eficientes e profilaxia. (YAMEY e TORREELE, 2002; DESJEUX, 2004; GONTIJO e MELO, 2004; ALVAR et al., 2006; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006b).

O Brasil é considerado, no âmbito global, o terceiro mais importante foco de LV, abrangendo cerca de 90% do total de casos reportados nas Américas (BERN et al., 2008). Segundo dados do Ministério da Saúde foram registrados no Brasil um total de 64.953 casos confirmados de LV nos anos de 1990 a 2010 (BRASIL, 2011). Sendo que, na região

Nordeste, concentra-se o maior número de casos da enfermidade, cerca de 90% dos casos registrados até a década 1990 (BRASIL, 2009a; FURLAN, 2010).

Contudo nas últimas décadas, houve uma mudança no perfil epidemiológico da LV. Anteriormente, caracterizada como uma enfermidade de ocorrência notadamente no meio rural, tem se expandido para grandes centros urbanos (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). Surtos nos municípios do Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Araçatuba, Santarém, Corumbá, Teresina, Natal, São Luis, Fortaleza, Camaçari, Três Lagoas, Campo Grande e Palmas confirmam a periurbanização e urbanização da LV no Brasil (BRASIL, 2009a).

No Brasil, em diversas regiões, a emergência da LV e a expansão do número de casos em cães e humanos, têm sido atribuídas a fatores de origem antropogênica, tais como: aquecimento global, a migração de populações de áreas endêmicas rurais para a periferia de centros urbanos, a pobreza, a falta de saneamento básico, o acúmulo de dejetos, a poluição de aquíferos, a presença de criatórios urbanos, a expansão agropecuária, os desflorestamentos, a fragmentação de habitat, a introdução de espécies invasoras e sinantrópicas no domicílio e peridomicílio, a instalação de habitações próximas a florestas, a adaptação de vetores ao peridomicílio e intradomicílio, o aumento populacional de cães errantes e aproximação de reservatórios selvagens e domésticos (LAINSON, 1988; GÁLLEGO, 2004; LAINSON e RANGEL, 2005; ALVAR et al., 2006; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006b; DANTAS-TORRES et al., 2006; DINIZ et al., 2008; MAIA-ELKHOURY et al., 2008, READY, 2008).

Considerando o Estado de Pernambuco, existe a ocorrência de casos de LV em todas as suas regiões: Sertão, Sertão do São Francisco, Agreste, Zona da Mata e Região Metropolitana do Recife. Os municípios de Salgueiro, Petrolina, Caruaru, Goiana e Ilha de Itamaracá tiveram o maior número de casos registrados de LV, no período entre 1990 a 2001 (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2005). No período de 2004 a 2008, foram registrados 415 casos de LV em Pernambuco, estando entre os 10 estados com maior número de casos (BRASIL, 2009b).

2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - DADOS EPIDEMIOLÓGICOS PARA PERNAMBUCO

A leishmaniose visceral canina (LVC) possui uma ampla distribuição mundial, sendo os canídeos importantes reservatórios da *L. infantum* no Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia central, Norte da África e América do Sul (PALATNIK-DE-SOUSA e DAY, 2011). Estima-se que aproximadamente 2,5 milhões de cães domésticos estejam infectados somente no

sudoeste da Europa. Do mesmo modo, na América do Sul estão estimados em milhões o número de cães com LVC, com o maior registro de casos concentrados na Venezuela e Brasil (BANETH et al., 2008).

De acordo com dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), em Pernambuco, cerca de 2,5% da população canina é soropositiva para anticorpos anti-*L. infantum* (ALEXANDRINO, 2001). No entanto, diversos estudos têm sido realizados nos últimos anos, a fim de identificar o perfil epidemiológico da LVC no estado, e tem sido apontado que, em áreas endêmicas, as soroprevalências são mais elevadas que a média estimada pela FUNASA (DANTAS-TORRES et al., 2006a).

No município de Paulista, Região Metropolitana do Recife (RMR), Dantas-Torres et al. (2006) determinaram uma soroprevalência de 40,3% (130/322), sendo que 85,3% dos animais soropositivos apresentavam-se assintomáticos. Na Ilha de Itamaracá (RMR), Santos (2006) determinou uma soroprevalência de 4,5 % (9/199) dos cães analisados, diferentemente de Marinho (1996) que relatou uma soroprevalência de 27,7% (45/162) no mesmo município.

Em Garanhuns, Agreste Pernambucano, Santos et al. (2010) obtiveram uma prevalência de 16% (41/256), sendo que 4,9% (2/41) do animais se apresentavam sintomáticos. Em um estudo semelhante, realizado numa comunidade rural do município de São Vicente Férrer (Agreste), Dantas-Torres et al. (2010c) relataram soroprevalência de 29,3% (12/41). Os cães estudados eram considerados semidomiciliados e tinham acesso ao ambiente silvestre.

No município de Petrolina, região do Sertão do São Francisco, Santana et al. (2010) registraram uma soroprevalência de 19,33% (115/595) em cães oriundos de áreas urbanas e rurais.

Apesar das altas prevalências encontradas em municípios vizinhos, a cidade do Recife, é considerada não receptiva para a LV canina, não havendo até o presente momento o registro de casos autóctones, como também não há registro da presença instalada do vetor *Lutzomyia longipalpis* no Recife. Contudo, este município está vulnerável à ocorrência da infecção, diante de uma possível migração de animais e vetores de áreas endêmicas (DANTAS-TORRES et al., 2004; DANTAS-TORRES et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006).

2.3 AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO

Os agentes causadores da LV são protozoários da ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania* e pertencem ao Complexo *Leishmania donovani* (LAINSON, 2010).

Assim como em outras espécies de leishmânias estes protozoários são caracterizados por apresentarem duas formas em seu ciclo biológico: a forma amastigota e a forma promastigota. A forma amastigota, que é aflagelada, é um parasita intracelular do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de hospedeiros vertebrados e a forma promastigota, que possui um flagelo, se desenvolve e multiplica-se por divisão binária no tubo digestório dos hospedeiros invertebrados. Os parasitos do Complexo *L. donovani* têm tropismo pelo sistema macrofágico da pele, baço, fígado, medula óssea e linfonodos (HOMMEL, 1999; ASHFORD, 2000).

Os parasitos do Complexo *L. donovani* são adaptados à temperatura média de 37°C, fato que lhes confere a capacidade de invadir tecidos profundos, após infectarem a pele. No hospedeiro vertebrado as promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, em seguida adotam a forma aflagelada permanecendo no interior dos vacúolos parasitóforos (fagossomos). As amastigotas multiplicam-se por divisão binária, até que o excesso de parasitos provoque a ruptura do fagossomo e liberação de novas amastigotas no interstício dos tecidos ou no plasma sanguíneo. Posteriormente, serão fagocitados por novos macrófagos que reiniciarão o ciclo e transportarão os parasitos a novos tecidos (HOMMEL, 1999; REY, 2001; MEDEIROS et al., 2005).

2.4 VETORES

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (SANTOS et al., 1998). Diminutos (2 a 3 mm) e de corpo frágil, possuem fraca capacidade de vôo direto. Tem atividade no período crepuscular e noturno. No período diurno, permanecem abrigados em locais com baixa incidência luminosa, com alta umidade e temperatura moderada. Ambos os sexos fitófagos, utilizam carboidratos como fonte energética, contudo a fêmea necessita de sangue para maturar os ovos, sendo considerada hematófaga e é potencial veiculadora de *Leishmania* spp., arboviroses e bartoneloses. A ovoposição ocorre em ambientes ricos em matéria orgânica, o que favorece o desenvolvimento das larvas (ALEXANDER, 2000; REY, 2001; BRAZIL et al., 2003; AMÓRA et al., 2009).

Os flebotomíneos se adaptam com facilidade ao ambiente doméstico e peridoméstico. Os principais fatores que promovem a atração e permanência dos mosquitos nestes ambientes são a existência de animais domésticos, principalmente aves e suínos, dejetos e o acúmulo de lixo orgânico, acredita-se também que a iluminação das habitações possa atrair os mosquitos

do seu ambiente natural (LAINSON, 1988; REBÊLO, 2001; ALEXANDER et al., 2002; FELICIANGELI, 2004; LAINSON e RANGEL, 2005).

As principais espécies vetoras dos agentes etiológicos da LV pertencem ao gênero *Lutzomyia*, nas Américas, e ao gênero *Phlebotomus*, na África, Ásia e Europa (REY, 2001). O *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor da *L. infantum* no Brasil e é considerada a espécie mais sinantrópica do novo mundo. Tem ocorrência nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste (SHAW, 1999; LAINSON e RANGEL, 2005). O *Lutzomyia cruzi* é considerado vetor nos Estados do Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (GALATI et al., 1997; MISSAWA e LIMA, 2006).

Em Pernambuco, há registro de 37 espécies de flebotomíneos, sendo que seis espécies ainda necessitam de confirmação. O *L. longipalpis* está disperso em todos os biomas do estado, e este vetor está bem adaptado tanto ao clima semi-árido da Caatinga quanto ao clima úmido e quente da Mata atlântica, e esta adaptação associa-se à ocorrência de casos de LV em praticamente todo o território do estado (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006a; DANTAS-TORRES et al., 2010a). Outro flebotomíneo, da espécie *Migonemyia migonei* é suspeito de ser vetor da *L. infantum* no município pernambucano de São Vicente Férrer (CARVALHO et al., 2007).

2.5 OUTROS VETORES E TRANSMISSÃO NÃO VETORIAL

Tem sido relatada ocorrência de casos de LV canina em locais onde a presença do vetor *L. longipalpis* ou de outras espécies de flebotomíneos é pouco expressiva ou inexistente e essa discordância no aspecto epidemiológico do ciclo do agente motivaram suspeitas quanto à participação de outras espécies de vetores ou transmissão vertical e horizontal (SCHANTZ et al., 2005; SILVA et al., 2008b; COLOMBO et al., 2011).

Trabalhos recentes têm investigado a suspeita da capacidade vetorial do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), sendo identificada a presença de DNA e RNA de *L. infantum* em carrapatos obtidos de cães diagnosticados com LV. Apesar de ainda não ser considerado um vetor, os resultados indicaram que existe uma adaptação do protozoário ao aracnídeo (COUTINHO et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2010b; COLOMBO et al., 2011; DANTAS-TORRES, 2011). Provas moleculares também identificaram o DNA de *L. infantum* em pulgas colhidas de cães com LV, mas a sua participação como vetor não foi relatada (COLOMBO et al., 2011).

A transmissão vertical (transmamária ou transplacentar) de *L. infantum* foi demonstrada experimentalmente em cães da raça beagle, e em cães naturalmente infectados

(ROSYPAL et al., 2005; PANGRAZIO et al., 2009; SILVA et al., 2009b), sendo considerada, nos Estados Unidos da América, o principal modo de transmissão de *L. infantum*, devido à ausência de vetores competentes (BOGGIATTO et al., 2011).

Estudos recentes demonstraram um tropismo da *L. infantum* ao sistema genital masculino do cão, provocando lesões inflamatórias no epidídimo, prepúcio e glândula do pênis, além da confirmação da presença de DNA do parasita no sêmen (DINIZ et al., 2005). Posteriormente, a transmissão venérea (horizontal) de machos para fêmeas foi confirmada por provas moleculares e sorológicas (SILVA et al., 2009a). Esses resultados evidenciaram a possibilidade de disseminação da *L. infantum* sem a necessidade de vetores, e o possível impacto dos cães errantes não castrados na epidemiologia da LV no Brasil (BENITES et al., 2011).

2.6 HOSPEDEIROS

A *L. infantum* pode parasitar dezenas de espécies de mamíferos, e esta adaptação permite a dispersão do protozoário e perpetuação de seu ciclo biológico no ambiente selvagem, rural, e urbano. No entanto, os hospedeiros de maior relevância são os seres humanos e cães domésticos, em decorrência dos impactos para a saúde pública humana e veterinária (SILVEIRA et al., 1982; PASSATINO, 2006; LAINSON, 2010).

Outros hospedeiros importantes na cadeia epidemiológica da *L. infantum* são os canídeos selvagens, marsupiais didelfídeos (gambás), roedores selvagens e domésticos, felinos selvagens e o gato doméstico (DEANE e DEANE, 1955; LAINSON et al., 2002; DI BELLA et al., 2003; CABRERA et al., 2003; CURI et al., 2006; LUPPI et al., 2008; SILVA et al., 2008a; DAHROUG et al., 2010; ROQUE et al., 2010).

2.7 RESERVATÓRIOS SELVAGENS

Os canídeos selvagens são considerados os principais reservatórios naturais da *L. infantum* na Europa, Ásia central, Oriente Médio, Norte da África e Américas, (DEANE e DEANE, 1954; BETTINI e GRANDONI 1986; CRIADO-FORNELIO et al., 2000; FALLAH et al., 2011).

No velho mundo, a raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*), o chacal-dourado (*Canis aureus*), e o lobo-cinzento (*Canis lupus*) são considerados reservatórios selvagens da *L. infantum* (BETTINI e GRANDONI, 1986; ASHFORD e BETTINI, 1987).

No Brasil, apenas a raposa (*Cerdocyon thous*) é considerada, reservatório natural da *L. infantum* (LAINSON et al., 1969; SILVEIRA et al., 1982; LAINSON et al., 1990;

COURTENAY et al., 1996). No entanto, estudos recentes apontaram que a raposinha-do-campo (*Lycalopex vetulus*), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) podem ter participação no ciclo silvestre e peridoméstico da *L. infantum* (CURI et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2008; LUPPI et al., 2008; SOUZA et al., 2010).

Considerando a raposa, existem relatos de infecção natural por *L. infantum* nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste (DEANE e DEANE, 1954; LAINSON et al., 1969; MELLO et al., 1988; CURI et al., 2006).

A participação desta espécie no ciclo enzoótico e antropozoonótico da *L. infantum* tem sido atribuída primeiramente às pressões antrópicas sobre as áreas naturais, como desflorestamentos e consequente fragmentação de habitat, desta maneira, permitindo que as raposas se desloquem do ambiente selvagem para os locais habitados, facilitado pela formação de campos abertos e estradas. Desta forma, é atribuída às raposas infectadas, associada à adaptação do flebótomo ao peridomicílio, a capacidade de dispersar a *L. infantum* para áreas livres do agente etiológico (LAINSON, 1988). Como estes animais costumam percorrer longas distâncias em busca de alimentos (4-5 km), podem ser atraídos por aves domésticas e dejetos dos domicílios e desta forma compartilhar mesmo o ambiente com os cães e o flebótomo, o que favorece a instalação do ciclo enzoótico e posteriormente antropozoonótico da LV (LAINSON, 1988; MACDONALD e COURTENAY, 1996; TROVATI et al., 2007; ROCHA et al., 2008).

Os primeiros relatos de LV em raposas foram realizados por Deane e Deane (1954; 1955) no município de Sobral, Ceará, ao descreverem a infecção natural em quatro raposinhas-do-campo, e uma destas apresentava os sinais clínicos da enfermidade. No entanto, após estudos de morfometria de crânio e dentição, Courtenay et al. (1996) confirmaram que os relatados por Deane e Deane (1954), eram da espécie de raposa *Cerdocyon thous*. Alencar (1961) relatou também em Sobral, a infecção em 4% das raposas capturadas (7/173), todas aparentemente hígdas.

Lainson et al. (1969) sugeriram que a raposa atua como reservatório da *L. infantum*, anteriormente denominada *L. donovani*, após identificarem a infecção em uma raposa sadia, oriunda da periferia de Belém, Pará. Na mesma região, em Salvaterra, Ilha de Marajó, num estudo motivado após a ocorrência de um óbito humano por LV, Silveira et al. (1982) relataram a infecção por *L. infantum* em uma raposa de vida livre capturada.

Em Corumbá, Mato Grosso do Sul, Mello et al. (1988) descreveram a infecção natural em 9,1% (1/11) das raposas de vida livre estudadas.

Na ilha de Marajó, foi relatada por Garcez et al. (1996) a ocorrência de 77,7 % (7/9) de anticorpos anti-*L. infantum* em raposas capturadas em áreas de floresta nas proximidades do município de Salvaterra, região endêmica para LV canina e humana.

Um importante estudo realizado por Courtenay et al. (2002) avaliou a participação da raposa no ciclo peridoméstico da *L. infantum* na Ilha de Marajó. Das amostras analisadas foram positivas: 74% (54/73) ao ELISA, 15,2% (10/66) à PCR e 25,8% (8/31) na cultura. Destes, uma raposa apresentou sinais compatíveis com LV. Do total de animais positivos, 26 foram selecionados e expostos a 1469 flebotomíneos, não sendo, contudo detectada infecção dos vetores por *L. infantum* após dissecação dos insetos. A partir destes resultados os autores sugeriram que as raposas não são importantes no ciclo zoonótico da *L. infantum* na região amazônica, se não houver a presença de cães domésticos, que atuam como perpetuadores do ciclo do parasita.

Em contrapartida a esta afirmação, Gomes et al. (2007) enfatizaram a importância da raposa na cadeia epidemiológica da LV em Teresina, Piauí. Neste município, onde a LV é endêmica, foram encontradas em amostras de raposas capturadas a presença de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis*. Altos títulos foram identificados nas raposas, significativamente superiores aos encontrados nos cães e seres humanos testados na mesma região, sendo que a presença de alta titularidade indica intensa relação do flebotomo com a raposa. Três destas raposas estavam infectadas, com o diagnóstico de LV confirmado pela microscopia direta e por provas moleculares. A partir desses achados sugeriu-se a existência de um foco natural da LV em Teresina, e que a transmissão aos seres humanos não depende somente da presença do cão doméstico (GOMES et al., 2007; DRUMOND e COSTA, 2011).

No Parque Nacional da Serra do Cipó, Minas Gerais, Curi et al. (2006) relataram a ocorrência de infecção em 16,6% (2/12) das raposas, capturadas.

Também foi relatada a infecção por *L. infantum* em raposas de cativeiro. Na Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte (FZB), Minas Gerais, Luppi et al. (2008) registraram a infecção em um indivíduo soropositivo ao ELISA e à RIFI. Souza et al. (2010) relataram no zoológico da Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, a infecção por *L. infantum* em seis raposas pela técnica da PCR. Uma raposa apresentou sinais compatíveis com LV.

No Zoológico de Ilha Solteira, São Paulo, Tenório et al. (2011) confirmaram por provas parasitológicas, sorológicas e moleculares a infecção por *L. infantum* em uma raposa que apresentava sinais compatíveis com LV, e veio a óbito em decorrência da evolução da doença.

Contudo, no Estado de Pernambuco de acordo não existem relatos da ocorrência de *L. infantum* em raposas.

A raposa é um carnívoro terrestre de médio porte, de hábito crepuscular e noturno (BERTA, 1982). Onívoro oportunista, pode se alimentar de frutas, artrópodes, pequenos vertebrados e carne em decomposição (COURTENAY e MAFFEI, 2004). No Brasil, é encontrada na Mata Atlântica, Caatinga, Amazônia (menos em planícies da Bacia do Rio Amazonas), Pantanal e Cerrado (MACDONALD e COURTENEY, 1996; JUAREZ e MARINHO-FILHO, 2002; JÁCOMO et al., 2004). Foi relatada a existência de raposas em todas as regiões do estado de Pernambuco (MONTEIRO DA CRUZ et al., 2002).

2.8 RESERVATÓRIOS DOMÉSTICOS

Os reservatórios primários da *Leishmania* são mamíferos selvagens, como os roedores, marsupiais e canídeos selvagens. Contudo, com o crescente processo de domicialização do ciclo zoonótico de transmissão da LV, os animais sinantrópicos e domésticos se tornaram importantes reservatórios da infecção (TRAVI et al., 1998; DANTAS-TORRES, 2007)

No ciclo doméstico e peridoméstico da LV o cão (*Canis familiaris*) tem um papel importante como reservatório da *L. infantum*, sendo a principal fonte de infecção para o vetor, e potencial dispersor do ciclo antropozoonótico. Esta importância é devida a características atribuídas aos cães que são favoráveis à disseminação e manutenção ciclo de transmissão do parasito no ambiente. Apresentam parasitismo cutâneo intenso das formas amastigotas, o que propicia a ingestão da *Leishmania* spp. pelo flebótomo durante o repasto sanguíneo. Em regiões endêmicas para LV, a proporção de animais assintomáticos é elevada, dificultando a detecção de animais doentes. Podem ser portadores da infecção por anos sem manifestar sinais clínicos, porém permanecendo como potenciais fontes de infecção para os vetores. O crescimento exponencial e sem controle da população de cães nos domicílios e peridomicílios é um fator de risco para a dispersão da LV. Além da estreita relação mantida entre seres humanos e cães, que pode favorecer a exposição do agente infeccioso a indivíduos suscetíveis como as crianças e portadores de HIV (ASHFORD, 1996; ASHFORD et al., 1998; LAINSON e RANGEL, 2005; LAINSON e SHAW, 2005; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006b; GIUNCHETTI et al., 2006; DINIZ et al., 2008; VERÇOSA et al., 2008).

Devido ao papel de reservatório na cadeia epidemiológica da LV, o cão doméstico é o principal alvo para o controle do número de casos em humanos (TESH, 1995). As opções de tratamento para os cães são limitadas, de alto custo e consideradas pouco efetivas para eliminar totalmente o parasita do organismo canino, além da restrição do contato do vetor

com os cães ser dificultosa. Desta forma, tem sido adotado no Brasil e em alguns países onde a LV é endêmica, a eliminação de cães sorologicamente positivos, sejam sintomáticos ou assintomáticos como medida de controle mais viável no âmbito da saúde pública (REITHINGER e DAVIES, 1999; BRASIL, 2006).

A participação do cão doméstico na epidemiologia da LV também tem sido relatada em ambientes selvagens. Em um estudo realizado em vilarejos localizados na floresta amazônica, Estado do Pará, Courtenay et. al (2002) sugeriram que as raposas consideradas reservatórios naturais, tem pouca influência na disseminação do parasito aos seres humanos, e incriminaram os cães como principal dispersor da *L. infantum* naquela região. Curi et al. (2006) identificaram a presença de cães domésticos asselvajados soropositivos para *L. infantum* no Parque nacional da Serra do Cipó, Minas Gerais, sendo evidenciado que os mesmos podem atuar como reservatórios do parasita e de outros agentes enzoóticos no meio selvagem.

2.9 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A LV é uma enfermidade de caráter multissistêmico, de curso crônico e potencialmente letal para os cães e seres humanos. A manifestação dos sinais clínicos varia de acordo com a resposta imunológica do indivíduo, sendo que o cão infectado pode apresentar-se de modo sintomático ou assintomático por longos períodos, variando de meses a anos. No entanto a LV nos cães é caracterizada pela emaciação, caquexia, alopecia, dermatoses, principalmente nas orelhas, focinho e perioculares, onicogribose, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, enterorragia, artrites e paresia dos membros posteriores (FEITOSA et al., 2000; BRASIL, 2006; EUGÊNIO et al., 2008; PIMENTEL et al., 2008; QUEIROZ et al., 2010). Diferentemente dos sintomas no homem, o cão com LV pode manifestar as síndromes cutânea e visceral concomitantemente (GÁLLEGO, 2004).

Os canídeos selvagens infectados por *L. infantum* podem apresentar sinais clínicos semelhantes ao do cão doméstico, como também irem a óbito em decorrência da evolução da doença (DEANE e DEANE, 1954; COURTENAY et al., 2002; SOUZA et al., 2010; TENÓRIO et al., 2011).

2.10 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico clínico da LVC é um desafio, pois a maioria dos indivíduos sintomáticos apresenta sinais inespecíficos compatíveis com inúmeras enfermidades, sendo necessário para confirmação da infecção o emprego de testes diagnósticos. Os testes

disponíveis para o diagnóstico da LVC são o parasitológico direto, isolamento em meio de cultura (*in vitro*) ou em animais susceptíveis (*in vivo*), sorológicos e moleculares (BRASIL, 2009a; ROSYPAL et al., 2007).

No parasitológico direto, as formas amastigotas são demonstradas em lâminas de vidro a partir de aspirados de baço, medula óssea, linfonodos ou fragmentos de pele. A sensibilidade desta técnica é variável (54 a 98%), contudo é considerada como “padrão-ouro” para o diagnóstico de LVC (GONTIJO e MELO, 2004; BRASIL, 2006; LEAL, 2009). Considerada também como um exame parasitológico, a Imunohistoquímica (IHQ) tem sido demonstrada como um eficiente método para o diagnóstico da LCV, apresentando sensibilidade superior ao exame histopatológico na detecção de formas amastigotas (LUPPI et al., 2008; QUEIROZ et al., 2010).

No isolamento *in vitro*, as formas amastigotas obtidas nos aspirados de tecidos são cultivadas artificialmente em meios de cultura. Os parasitas podem se desenvolver a partir de quatro dias a seis semanas, modificando-se em promastigotas. O meio de cultura mais comumente empregado é o NNN (Neal, Novy e Nicolle) (BRASIL, 2009a; LEAL, 2009).

No isolamento *in vivo*, o material colhido dos aspirados é inoculado em hamster (*Mesocricetus auratus*), que poderá então desenvolver a infecção. Esta técnica oferece boa sensibilidade, porém requer de meses a um ano para obter resultado positivo, não sendo viável como um método de rotina (REY, 2001; BRASIL, 2009a; LEAL, 2009).

Os testes sorológicos baseiam-se na identificação de anticorpos anti-*Leishmania* no soro sanguíneo do indivíduo. Podem ser empregados para o diagnóstico sorológico de LVC os seguintes métodos: a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), a Prova de imunoabsorção enzimática – *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA), a Reação de Fixação de Complemento (RFC), a Hemaglutinação Indireta (HAI), a Imunodifusão (ID), e Aglutinação Direta (DAT) (FEITOSA et al., 2000; REY, 2001; MACHADO et al., 2008; QUEIROZ et al., 2010). Os dois primeiros testes sorológicos citados são recomendados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico de LVC em cães, sendo o ELISA utilizado para triagem de animais suspeitos e a RIFI para confirmação dos animais sororreagentes, ou indeterminados (zona cinza) ao ELISA, ou como um teste de rotina (BRASIL, 2009a). O emprego das duas provas sorológicas concomitantemente pode apresentar uma sensibilidade de 92% (LIRA et al., 2006).

O uso da Reação em Cadeia da Polimerase – *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para o diagnóstico da LVC em cães tem se mostrado muito útil, devido a sua alta sensibilidade e

especificidade, principalmente em animais assintomáticos (XAVIER et al., 2006; QUEIROZ et al., 2010).

Em raposas e em outros canídeos selvagens, têm sido empregados com sucesso alguns dos métodos utilizados em cães para identificar a infecção por *L. infantum*. Os seguintes métodos diagnósticos foram relatados em raposas: microscopia direta de aspirados de medula, linfonodos, fígado e baço; Imunohistoquímica; isolamento *in vitro*; isolamento *in vivo*; histopatológico de tecidos; RIFI; ELISA; DAT e PCR (DEANE e DEANE, 1954; ALENCAR, 1961; LAINSON et al., 1969; SILVEIRA et al., 1982; MELLO et al., 1988; GARCEZ et al., 1996; COURTENAY et al., 2002; CURI et al., 2006; LUPPI et al., 2008; SOUZA et al., 2010; TENÓRIO et al., 2011).

2.11 UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DO ESTADO DE PERNAMBUCO

O Estado de Pernambuco possui atualmente 68 Unidades de Conservação (UCs) Estaduais, sendo 32 na categoria de Proteção Integral e 36 na categoria de Uso Sustentável. Entre as Unidades de Proteção Integral estão uma Estação Ecológica (ESEC), quatro Parques Estaduais (PE) e 27 Refúgios da Vida Silvestre (RVS). Como Unidades de Uso Sustentável, estão 18 Áreas de Proteção Ambiental (APAs), oito Reservas de Floresta Urbana (FURBs) e 10 Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPNNs) (PERNAMBUCO, 2012b).

Dentre as áreas silvestres integrantes desta pesquisa, quatro são consideradas UC: o Parque Estadual de Dois Irmãos, o Refúgio da Vida Silvestre Mata do Curado, A Estação Ecológica de Caetés e a Estação Ecológica do Tapacurá.

O Parque Estadual de Dois Irmãos (PEDI) (08° 09' S, 34 ° 52' O) é uma UC de Proteção Integral que possui uma área de 387,40 ha e localiza-se na região Metropolitana do Recife. É administrado pela Secretaria de Meio Ambiente e Sustentabilidade (SEMAS) e passou a ser considerado uma UC desde 1987. Nele, encontra-se instalado o Horto Zoobotânico da cidade do Recife, que ocupa uma área de 14 ha do Parque Estadual (PERNAMBUCO, 1987; MONTEIRO DA CRUZ et al., 2002; PERNAMBUCO, 2012a).

O Refúgio da Vida Silvestre Mata do Curado (08° 04' S, 34° 57' O) é uma UC Estadual de Proteção Integral, localizada no município do Recife, a 12 km do centro da capital (PERNAMBUCO, 2012a). Tornou-se área de preservação em 1987, a partir da Lei nº 9.989. Possui uma área de 102,96 ha, de clima tropical e com índice pluviométrico de 2000 mm. Encontra-se dentro da área ocupada pelo Quartel General do Comando Militar do Nordeste (CMNE) onde está localizada a 10ª Brigada de Infantaria Motorizada (BRASIL, 2007).

A Estação Ecológica de Caetés (07° 55' S, 34° 55' O) situa-se nas proximidades do Conjunto Habitacional Caetés I e ao Parque Industrial de Paulista, ocupa uma área de 157 ha, sendo pertencente ao Município de Paulista, Região Metropolitana do Recife. Esta UC de Proteção Integral foi elevada à categoria de Estação Ecológica, até então Reserva Ecológica, por meio da Lei Estadual nº 11.622/98. Apesar de estar situada no município de Paulista a população do seu entorno pertence ao Município de Abreu e Lima (PERNAMBUCO, 2006). A ESEC de Caetés e a APA de Guadalupe são as únicas que possuem Plano de Manejo (PM) e Conselho Gestor (CG) (PERNAMBUCO, 2012b). Sua vegetação é classificada como floresta ombrófila de terras baixas (VELOSO, 1992).

A Estação Ecológica do Tapacurá (08° 07' S, 34 ° 55' O) está localizada no Oeste do município de São Lourenço da Mata (Zona da Mata), estando mais próxima dos centros urbanos dos municípios de Glória do Goitá e Chã de Alegria. Pertence à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e atualmente é um *campus* avançado da mesma. Esta UC foi criada em 1975, como compensação ao enchimento do lago da Barragem do Rio Tapacurá. É composta por uma vegetação típica de Mata Atlântica interceptada por canaviais, ocupa uma área de 776 ha (MONTEIRO DA CRUZ, 1998; MONTEIRO DA CRUZ et al., 2002).

O 72º Batalhão de Infantaria Motorizado (BIMTz) (09° 23' S, 40° 28' O) está localizado no município de Petrolina, no Vale do Rio São Francisco. Possui em sua área de responsabilidade, 40 municípios: 37 em Pernambuco e 3 na Bahia. Na área ocupada pelo batalhão encontra-se preservada uma área de vegetação de caatinga com aproximadamente 3.000.000m², que está inserida na área urbana de Petrolina. No mesmo está instalado o Parque Zoobotânico Bioma Caatinga (BRASIL, 2007). Esta área silvestre ainda não é considerada Unidade de Conservação.

3 REFERÊNCIAS

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

ALEXANDER, B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, n. 2, p. 109-122, 2000.

ALEXANDER, B.; DE CARVALHO, R. L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M. H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1480-1485, 2002.

ALEXANDRINO, A. C. **Diagnóstico e controle da leishmaniose visceral: considerações sobre Pernambuco**. 2001. 191f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2001.

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

AMÓRA, S. S. A.; BEVILAQUA, C. M. L.; FEIJÓ, F. M. C.; SILVA, M. A.; PEREIRA, R. H. M. A.; SILVA, S. C.; ALVES, N. D.; FREIRE, F. A. M.; OLIVEIRA, D. M. Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), a potential biological control agent of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). **Biological Control**, v. 50, n. 3, p. 329-335, 2009.

ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M. C.; SAMPAIO, D. P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 53-57, 1998.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

ASHFORD, R. W.; BETTINI, S. Ecology and epidemiology: old world. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. 1. ed. London: Academic Press, 1987. p. 365-424.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGU, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BENITES, A. P.; FERNANDES, C. E.; BRUM, K. B.; ABDO, M. A. G. S. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 72-77, 2011.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 10, p. e313, 2008.

BERTA, A. *Cerdocyon thous*. **Mammalian Species**, v. 186, p. 1-4, 1982.

BETTINI, S.; GRADONI, L. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. **Insect Science and its Application**, v. 7, p. 241-245, 1986.

BOGGIATTO, P. M.; GIBSON-CORLEY, K. N.; METZ, K.; GALLUP, J. M.; HOSTETTER, J. M.; MULLIN, K.; PETERSEN, C. A. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. e1019, 2011.

BRASIL. Ministério da Defesa. 72º BI Mtz - Uma OM preocupada com a preservação ambiental. **Revista Verde-Oliva**, v. 194, p. 36-38, 2007.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria Nacional de vigilância em saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf>. Acesso em 29 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, DF, 2009a. 816 p.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria Nacional de vigilância em saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF, 2006, 120 p.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria Nacional de vigilância em saúde. **Relatório de Situação - Pernambuco**. Brasília, DF, 2009b. 56 p.

BRAZIL, B. G.; LINO-NETO, J.; BRAZIL, R. P. Preparation of sand fly (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) specimens for histological studies. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, p. 287-290, 2003.

CABRERA, M. A. A.; DE PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCHI, C. A.; AGUIAR, G. M.; XAVIER, S. C. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of some risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CARVALHO, M. R.; LIMA, B. S.; MARINHO-JÚNIOR, J. F.; SILVA, F. J.; VALENÇA, H. F.; ALMEIDA, F. A.; SILVA, A. L.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Phlebotomine sandfly species from an american visceral leishmaniasis area in the northern rainforest region of Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 1227-1232, 2007.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 873-882, 2007.

CHOMEL, B. B. Control and prevention of emerging parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1211-1217, 2008.

COLOMBO, F. A.; ODORIZZI, R. M. F. N.; LAURENTI, M. D.; GALATI, E. A. B.; CANAVEZ, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v. 109, n. 2, p. 267-274, 2011.

COURTENAY, O.; MAFFEI, L. *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766). In: SILLERO-ZUBIRI, C; HOFFMAN, M.; MACDONALD, D. W. **Canids: Foxes, wolves, jackals and dogs. Status Survey and Conservation Action Plan**. 1. ed. Oxford: Information Press, 2004. Cap. 3, p. 32-38.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; DYE, C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. **Parasitology**, v. 125, p. 407-414, 2002.

COURTENAY, O.; SANTANA, E. W.; JOHNSON, P. J.; VASCONCELOS, I. A.; VASCONCELOS, A. W. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 498-502, 1996.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149-155, 2005.

CRIADO-FORNELIO, A.; GUTIERREZ-GARCIA, L.; RODRIGUEZ-CAABEIRO, F.; REUS-GARCIA, E.; ROLDAN-SORIANO, M. A.; DIAZ-SANCHEZ, M. A. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 245-251, 2000.

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.

DAHROUG, M. A. A.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V. R. F.; DUTRA, V.; TURBINO, N. C. M. R.; NAKASATO, L.; SOUZA, R. L. *Leishmania (Leishmania) chagasi* in captive wild felids in Brazil. **Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 1, p. 73-74, 2010.

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

DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 155-159, 2011.

DANTAS-TORRES, F.; ANDRADE, A. J.; TENÓRIO, K. E.; ANDRADE-FILHO, J. D.; BALBINO, V. Q.; BRANDÃO-FILHO, S. P. 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, 2010a.

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, n. 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, 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.

DANTAS-TORRES, F.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C.; ACIOLI, R. V.; LIMA, O. C. Classificação do município do Recife quanto à transmissão da leishmaniose visceral canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p. 234, 2004.

DANTAS-TORRES, F.; FAUSTINO, M. A. G.; LIMA, O. C. C.; ACIOLI, R. V. Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 444-445, 2005.

DANTAS-TORRES, F.; LORUSSO, V.; TESTINI, G.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L. A.; STANNECK, D.; MENCKE, N.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; ALVES, L. C.; OTRANTO, D. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. **Parasitology Research**, v. 106, n. 4, p. 857-860, 2010b.

DANTAS-TORRES, F.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L. A.; MELO, M. F.; SILVA, F. J.; SILVA, A. L.; ALMEIDA, E. L.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Cutaneous and visceral leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 313-317, 2010c.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta Tropica**, v. 78, p. 103-116, 2001.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatórios da *L. donovani* em área endêmica do calazar no Ceará. **Hospital**, v. 48, p. 61-76, 1955.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **Hospital**, v. 45, p. 419-421, 1954.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Statistics Quarterly**, v. 45, p. 267-275, 1992.

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

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 239-243, 2001.

DI BELLA, C.; VITALE, F.; RUSSO, G.; GRECO, A.; MILAZZO, C.; ALOISE, G.; CAGNIN, M. Are rodents a potential reservoir for *Leishmania infantum* in Italy? **Journal of Mountain Ecology**, v. 7, p. 125-129, 2003.

DINIZ, S. A.; MELO, M. S.; BORGES, A. M.; BUENO, R.; REIS, B. P.; TAFURI, W. L.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 650-658, 2005.

DINIZ, S. A.; SILVA, F. L.; CARVALHO-NETA, A. C.; BUENO, R.; GUERRA, R. M.; ABREU-SILVA, A. L.; SANTOS, R. L. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 1, p. 24-33, 2008.

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 1, p. 3-11, 2011.

EUGÊNIO, F. R.; SILVA, A. A. L.; LUVIZOTO, M. C. R.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; BONELLO, F. L. Estudo clínico-laboratorial das articulações na leishmaniose experimental em cães. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 2, p. 278-287, 2008.

FALLAH, E.; FARSHCHIAN, M.; KHANMOHAMMADI, M. Molecular and seroepidemiological study of *Leishmania infantum* infection among humans, dogs and wild canines from Azarshahr (new endemic focus), Iran. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 10, p. 1237-1242, 2011.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

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

FIGUEIREDO, F. B.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA, S. A.; FEDULO, L. P.; MENEZES, R. C.; BALTHAZAR, D. A.; SCHUBACH, T. M.; MADEIRA, M. F. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene**, v. 102, n. 2, p. 200-201, 2008.

FURLAN, M. B. G. Epidemia de leishmaniose visceral em Campo Grande-MS. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19, n. 1, p. 15-24, 2010.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO-JUNIOR, F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 23, n. 2, p. 661-676, 2004.

GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T. Teste de aglutinação direta no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral no Estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 165-180, 1996.

GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; REIS, A. B. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 100-107, 2006.

GOMES, R. B.; MENDONÇA, I. L.; SILVA, V. C.; RUAS, G.; SILVA, M. B.; CRUZ, M. S. P.; BARRAL, A.; COSTA, C. H. N. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene**, v. 101, p. 127-33, 2007.

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.

HOMMEL, M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. **Journal of Infection**, v. 39, p. 101-111, 1999.

JÁCOMO, A. T. A.; LEANDRO, S.; DINIZ-FILHO J. A. F. Niche separation between the maned-wolf *Chrysocyon brachyurus*, the crab-eating-fox *Dusicyon thous* and the hoary-fox *Dusicyon vetulus* in central Brazil. **Journal of Zoology**, v. 262, p. 99-106, 2004.

JUAREZ, K. J.; MARINHO-FILHO, J. Diet, habitat use, and home ranges of sympatric canids in central Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 83, n. 4, p. 925-933, 2002.

KNUDSEN, A. B.; SLOOFF, R. Disease problems in rapid urbanization: new approaches to vector control. **Bulletin of The World Health Organization**, v. 70, p. 1-6, 1992.

KRUSE, H.; KIRKEMO, A. M.; HANDELAND, K. Wildlife as source of zoonotic infections. **Emerging Infectious Disease**, v. 10, n. 12, p. 2067-72, 2004.

LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences**, v. 321, n. 1207, p. 389-404, 1988.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J. J.; MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O.; SOUZA, A. A.; SILVEIRA, F. T. Amazonian visceral leishmaniasis - distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 135-137, 1990.

LAINSON, R.; ISHIKAWA, E. A. Y.; SILVEIRA, F. T. American visceral leishmaniasis: wild animal hosts. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene**, v. 96, p. 630-631, 2002.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of american visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827. 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in the new world. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Volume 5: Parasitology**. 10. ed. London: Arnold, 2005. p. 313-349.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; LINS, Z. C. Leishmaniasis in Brazil: IV. The fox, *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para state, Brazil. **Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 6, p. 741-745, 1969.

LEAL, C. R. B. Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 69, p. 14-18, 2009.

LIRA, R. A.; CAVALCANTI, M. P.; NAKAZAWA, M.; FERREIRA, A. G.; SILVA, E. D.; ABATH, F. G.; ALVES, L. C.; SOUZA, W. V.; GOMES, Y. M. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 11-16, 2006.

LUPPI, M. M.; MALTA, M. C.; SILVA, T. M.; SILVA, F. L.; MOTTA, R. O.; MIRANDA, I.; ECCO, R.; SANTOS, R. L. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 146-151, 2008.

MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O. Enduring social relationships in a population of crab-eating zorro, *Cerdocyon thous*, in Amazonian Brazil. **Journal of Zoology London**, v. 239, p. 329-355, 1996.

MACHADO, J. G.; TRONCARELLI, M. Z.; HOFFMANN, J. L.; CAMARGO, L. B.; FACCIOLI, P. Y.; MENOZZI, B. D.; LANGONI, H. Comparação do ensaio imunoenzimático com a imunofluorescência indireta no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, p. 85-90, 2008.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MARINHO, M. L. **Inquérito sorológico para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina no município de Itamaracá, estado de Pernambuco**. 1996. 43f. Dissertação (Mestrado). Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2006.

MATLASHEWSKI, G.; ARANA, B.; KROEGER, A.; BATTACHARYA, S.; SUNDAR, S.; DAS, P.; SINHA, P. K.; RIJAL, S.; MONDAL, D.; ZILBERSTEIN, D.; ALVAR, J. Visceral leishmaniasis: elimination with existing interventions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 322-325, 2011.

MEDEIROS, I. M.; NASCIMENTO, E. L. T.; HINRICHSEN, S. L. Leishmanioses (visceral e tegumentar). In: HINRICHSEN, S. L. **DIP - Doenças Infeciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 398-409.

MELLO, D. A.; REGO-JR, F. A.; OSHAZO, E.; NUNES, V. L. B. *Cerdocyon thous* (L) (Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas, 1973) in Corumbá, Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 2, p. 259, 1988.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. Spatial distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) and *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) in the State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 337-340, 2006.

MONTEIRO DA CRUZ, M. A. O. **Dinâmica reprodutiva de uma população de sagüis-do-nordeste (*Callithrix jacchus*) na Estação Ecológica do Tapacurá**, PE. 1998. 191 f. Tese (Doutorado) - Psicologia Experimental. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

MONTEIRO DA CRUZ, M. A. O.; CABRAL, M. C. C.; SILVA, L. A. M.; CAMPELLO, M. L. C. B. Diversidade da mastofauna no estado de Pernambuco. In: TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Diagnóstico da biodiversidade de Pernambuco**. 1. ed. Recife: Massangana, 2002. p. 557-579.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DAY, M. J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 197, 2011.

PANGRAZIO, K. K.; COSTA, E. A.; AMARILLA, S. P.; CINO, A. G.; SILVA, T. M.; PAIXÃO, T. A.; COSTA, L. F.; DENGUES, E. G.; DIAZ, A. A.; SANTOS, R. L. 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.

PASSATINO, A. Medico-legal considerations of canine leishmaniosis in Italy: an overview of an emerging disease with reference to the buying and selling of dogs. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 25, n. 3, p. 1111-1123, 2006.

PATZ, J. A.; GRACZYK, T. K.; GELLER, N.; VITTOR, A. Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1395-1405, 2000.

PERNAMBUCO. Agência Estadual de Meio Ambiente. Mapa Estadual das Unidades de Conservação. Disponível em:

<<http://www.cprh.pe.gov.br/downloads/MapaEstadualDeUnidadesDeConservacao.pdf>>.

Acesso em 23 de fev. 2012a.

PERNAMBUCO. Agência Estadual de Meio Ambiente. Estratégia para Criação e Implantação de Conselhos Gestores das Unidades de Conservação (UCs) de Pernambuco.

Disponível em: <<http://www.comunidades.pe.gov.br>>. Acesso em 29 de fev. 2012b.

PERNAMBUCO. Agência Estadual de Meio Ambiente. Unidades de Conservação Estaduais.

Disponível em:

<http://www.cprh.pe.gov.br/ARQUIVOS_ANEXO/tabela%20UCs;2238;20090825.pdf>.

Acesso em 29 de dez. 2011.

PERNAMBUCO. Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. **Plano de Manejo Fase I - Estação Ecológica de Caetés**. Recife, 2006. 63 p.

PERNAMBUCO. CODEPE/FIDEM. **Reservas ecológicas da região metropolitana do Recife**. Recife, 1987. 108 p.

PIMENTEL, D. S.; ALBUQUERQUE, E. R.; FAUSTINO, M. A. G.; MAIA, F. C. L.; RAMOS, R. A. N.; ALVES, L. C. A Alterações estruturais hepáticas e esplênicas em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937). **Medicina Veterinária**, Recife, v. 2, n. 2, p. 23-27, 2008.

QUEIROZ, N. M. G. P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; NUNES, C. M.; STARKE-BUZETTI, W. A. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n.12, p. 2948-2952, 2008.

READY, P. D. Leishmaniasis emergence and climate change. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 27, p. 399-412, 2008.

REBÊLO, J. M. M. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. 221-227, 2001.

REBÊLO, J. M. M.; OLIVEIRA, S. T.; BARROS, V. L. L.; SILVA, F. S.; COSTA, J. M. L.; FERREIRA, L. A.; SILVA, A. R. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de Lagoas, município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2000.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of american cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 4, p. 530-541, 1999.

REY, L. O complexo "*Leishmania donovani*" e a leishmaniose visceral, In: REY, L. **Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem**. 2. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2001, Cap. 19, p. 251-266.

ROCHA, V. J.; AGUIAR, L. M.; SILVA-PEREIRA, J.; MORO-RIOS, R. F. , PASSOS, F. C. Feeding habits of the crab-eating fox, *Cerdocyon thous* (Carnivora: Canidae), in a mosaic area with native and exotic vegetation in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 4, p. 594-600, 2008.

ROQUE, A. L. R.; CUPOLILLO, E.; MARCHEVSKY, R. S.; JANSEN, A. M. *Thrichomys laurentius* (Rodentia: Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, p. e589, 2010.

ROSYPAL, A. C.; CORTÉS-VECINO, J. A.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; TIDWELL, R. R.; LINDSAY, D. S. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p.172-177, 2007.

ROSYPAL, A. C.; TROY, G. C.; ZAJAC, A. M.; FRANK, G.; LINDSAY, D. S. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 970-972, 2005.

SANTANA, M. A.; PIMENTEL, D. S.; MAIA, C. S.; RAMOS, R. A. N.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Inquérito sorológico da leishmaniose visceral canina no município de Petrolina. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO - JEPEX, 10, 2010, Recife. **Anais ... 2010**. Cd-rom.

SANTOS, C. A. C. **Percepção, epidemiologia e aspectos clínicos da Leishmaniose visceral canina em área urbana do Estado de Pernambuco**. 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado). Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2006.

SANTOS, J. M. L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M. R. F.; LINO, F. R. L.; ANDRADE, L. S. S.; SOUZA, R. C. A.; BRITO, F. L. C.; BRANDÃO-FILHO, S. P. 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.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; PAIVA-HOFFMANN, M.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of american visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SCHANTZ, P. M.; STEURER, F. J.; DUPREY, Z. H.; KURPEL, K. P.; BARR, S. C.; JACKSON, J. E.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEVY, M. G.; FOX, J. C. Autochthonous visceral leishmaniasis in dogs in North America. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, p. 1316-1322, 2005.

SHAW, J. J. The relationship of sand fly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brazil. In: BURGER, J. **Contributions to the knowledge of Diptera**. Florida: Associated Publishers, 1999. p. 503-517.

SILVA, A. V. M.; CANDIDO, C. D. S.; PEREIRA, D. P.; BRAZIL, R. P.; CARREIRA, J. C. A. The first record of american visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropical**, v. 105, p. 92-94, 2008a.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 55-59, 2009a.

SILVA, M. R.; MARQUES, M. J.; ROMANHA, A. J.; SANTA-ROSA, I. C.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Autochthonous canine visceral leishmaniasis in a non-endemic area: Bom Sucesso, Minas Gerais State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 281-286, 2008b.

SILVA, S. M.; RIBEIRO, V. M.; RIBEIRO, R. R.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 159-162, 2009b.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; POVOA, M. M. Leishmaniasis in Brazil. XVIII: Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L.) as a reservoir of amazonian visceral leishmaniasis. **Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 830-832, 1982.

SOUZA, N. P.; ALMEIDA, A. B. P.; FREITAS, T. P. T.; PAZ, R. C. R.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V. R. F. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 333-335, 2010.

TAUIL, P. L. Perspectives of vector borne diseases control in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 275-277, 2006.

TENÓRIO, M. S.; SOUSA, L. O.; PAIXÃO, M. S.; ALVES, M. F.; PAULAN, S. C.; LIMA, F. L.; JUSI, M. M. G.; TASCA, K. I.; MACHADO, R. Z.; STARKE-BUZETTI, W. A. Visceral leishmaniasis in a captive crab-eating fox *Cerdocyon thous*. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n. 4, p. 608-616, 2011.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, p. 287-292, 1995.

TRAVI, B. L.; OSORIO, Y.; BECERRA, M. T.; ADLER, G. H. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene**, v. 92, n. 3, p. 275-278, 1998.

TROVATI, R. G.; BRITO, B. A.; DUARTE, J. M. B. Área de uso e utilização de habitat de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous* LINNAEUS, 1766) no cerrado da região central do TOCANTINS, BRASIL. **Mastozoología Neotropical**, v. 14, n. 1, p. 61-68, 2007.

VELOSO, H. P. Sistema fitogeográfico. In: **Manual técnico da vegetação brasileira**. Instituto Brasileiro de geografia e estatística, Rio de Janeiro, p. 9-38, 1992.

VERÇOSA, B. L. A.; LEMOS, C. M.; MENDONÇA, I. L.; SILVA, S. M. M. S.; CARVALHO, S. M.; GOTO, H.; COSTA, F. A. L. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 45, 2008.

XAVIER, S. C.; ANDRADE, H. M.; MONTE, S. J.; CHIARELLI, I. M.; LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Comparison of paraffin - embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n. 17, p. 1-7, 2006.

YAMEY, G.; TORREELE, E. The world's most neglected diseases. **British Medical Journal**, v. 325, n. 7357, 176-177, 2002.

4 ARTIGO CIENTÍFICO¹

Frequência de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum* em raposas de vida livre e de cativeiro e em cães domésticos provenientes do interior e do entorno de Unidades de Conservação, Pernambuco, Brasil

²R. L. Oliveira • R. C. S. C. Cunha • V. O. Ribeiro • D. L. Franco • G. J. A. Costa • N. R. Guerra • I. M. Queiroz • M. F. V. Marvulo • L. C. Alves • J. C. R. Silva

Resumo A raposa (*Cerdocyon thous*) e cão doméstico (*Canis familiaris*) são considerados os principais reservatórios da *Leishmania infantum* no Brasil. Desta forma, objetivou-se nesta pesquisa contribuir para o estudo epidemiológico da LVC em Pernambuco mediante a identificação da frequência de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em raposas e cães em cinco áreas silvestres do Estado. Foram obtidas amostras de sangue de 107 animais, sendo 18 raposas – quatro de vida livre e 14 de cativeiro – e 89 cães provenientes do interior e do entorno das áreas de estudo. Amostras de medula óssea foram obtidas de 12 animais. Os testes de ELISA e RIFI foram realizados nas amostras dos 107 canídeos e a PCR nas 12 amostras de medula óssea. Das 18 raposas examinadas, uma de vida livre (5,5%) foi soropositiva ao ELISA e dos 89 cães examinados, 29,21% foram soropositivos pela RIFI, 35,95% pelo ELISA e 19,10% foram soropositivos em ambos os testes. Nenhuma amostra foi positiva na PCR. Relata-se a primeira ocorrência de anticorpos anti-*L. infantum* em raposa de vida livre e em cães capturados no interior de áreas silvestres do Estado de Pernambuco. Os resultados demonstram a existência de um provável ciclo silvático da *Leishmania infantum* em uma das áreas de estudo, e a presença de cães soropositivos em áreas silvestres e no seu entorno indicaram a dispersão do agente infeccioso para o ambiente peridomiciliar e domiciliar.

Palavras-chave: Canídeos. Leishmaniose Visceral. PCR. Sorodiagnóstico.

¹ Artigo científico redigido de acordo com as normas da Revista “*Parasitology Research*”, Alemanha.

R. L. Oliveira. Centro de Ciências Agrárias, Campus II, Areia, Paraíba, Brasil. e-mail: rafaelima@gmail.com

R. C. S. C. Cunha. Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

M. F. V. Marvulo • G. J. A. Costa • J. C. R. Silva • L. C. Alves • V. O. Ribeiro. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

D. L. Franco. Zootecnista autônomo. Olinda, Pernambuco, Brasil.

N. R. Guerra. Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

I. M. Queiroz. Empresa Biogene Indústria e Comércio Ltda., Recife, Pernambuco, Brasil.

Introdução

No Brasil a Leishmaniose Visceral (LV) encontra-se tanto em áreas rurais, como em grandes centros urbanos (Gontijo e Melo 2004; Costa 2008), apresentando diferentes perfis epidemiológicos na dependência da presença do vetor e dos reservatórios silvestres (Gomes et al. 2007; Luppi et al. 2008) e domésticos (Courtenay et al. 2002; Lainson e Rangel 2005; Danta-Torres 2010).

Neste sentido, várias espécies de mamíferos têm sido encontradas naturalmente infectadas por *Leishmania (Leishmania) infantum* (= *Leishmania infantum*), particularmente os canídeos silvestres (Lainson 2010) e marsupiais (Gontijo e Melo 2004) que constituem um importante elo na cadeia epidemiológica na interface dos ciclos silvestre e urbano da LV no Brasil (Lainson e Rangel 2005). Não obstante, o cão doméstico tem sido apontado como o principal reservatório urbano da infecção e fonte de infecção para o vetor (Moreira et al. 2003; Lainson 2010).

Desta forma, a presença de espécies de animais domésticas e silvestres no peridomicílio têm sido associada ao aumento de casos de LV (Wijeyaratne et al. 1994; Cabrera et al. 2003). Semelhante a LV, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) tem sido detectada em vários estados do Brasil com diferentes taxas de prevalência (Lainson 2010; Deane e Deane 1954; Lainson et al. 1969; Nunes et al. 2001; Camargo-Neves 2001; Dantas-Torres 2006; Curi et al. 2006), notadamente na região nordeste (Gontijo e Melo 2004).

Em Pernambuco tem se registrado a ocorrência de casos de LV e LVC tanto em áreas rurais e quanto em áreas urbanas (Dantas-Torres e Brandão-Filho 2006; Dantas-Torres et al. 2006; Santos et al. 2010). No entanto, não há estudos de ocorrência de infecção por *Leishmania infantum* em raposas e cães domésticos no interior e no entorno de Unidades de Conservação (UCs) do Estado de Pernambuco.

Diante disso, objetivou-se neste trabalho contribuir com o estudo epidemiológico da LVC em Pernambuco, mediante avaliação da frequência de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum* em raposas de vida livre e de cativeiro e cães domésticos provenientes do entorno e do interior de UCs.

Material e métodos

Áreas de Estudo

O estudo foi realizado no período de agosto de 2010 a setembro de 2011, em cinco áreas silvestres do Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Quatro estão localizadas na Região Metropolitana do Recife, pertencentes ao bioma Mata Atlântica, Zona da Mata do Estado de Pernambuco e estão na categoria de Unidades de Conservação (UC), sendo: a Estação Ecológica (ESEC) do Tapacurá (08°07'S, 34°55'O), São Lourenço da Mata; a Estação Ecológica de Caetés (07°55'S, 34°55'O), Paulista; o Parque Estadual Dois Irmãos (PEDI) (08°09'S, 34°52'O) e a Mata do Curado (08°04'S, 34°57'O), Recife. Parte deste trabalho, também foi realizado no bioma Caatinga, em uma área silvestre adjunta ao 72º Batalhão de Infantaria Motorizado (72ºBIMTz) (09°23'S, 40°28'O), na área urbana do município de Petrolina, região do Sertão do Estado. Todas as áreas de estudos possuem populações humanas no seu entorno, onde existem criações de animais domésticos, sejam de companhia e/ou de produção. Também foram obtidas amostras de raposas mantidas em cativeiro no Centro de

Triagem de Animais Selvagens (CETAS) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA e no Zoológico do Parque Estadual Dois Irmãos, ambos situados na cidade do Recife.

Animais, captura, contenção e marcação

Foram utilizadas neste estudo um total de 18 raposas (*Cerdocyon thous*), oito machos e dez fêmeas, sendo as raposas de vida livre provenientes do 72º BIMTz (n=2) e da ESEC de Caetés (n=2), e as raposas de cativeiro do Zoológico do Parque Estadual Dois Irmãos (n=9) e do CETAS-IBAMA (n=5). Também foram obtidas amostras de 89 cães domésticos (*Canis familiaris*), 49 machos e 40 fêmeas, sendo 85 cães domiciliados obtidos em moradias situadas no entorno do PEDI (n=20), da ESEC de Caetés (n=27), da Mata do Curado (n=19) e da ESEC do Tapacurá (n=19). Os outros quatro cães errantes foram capturados no interior do 72º BIMTz (n=1), da ESEC do Tapacurá (n=1) e do PEDI (n=2).

Para a captura das raposas de vida livre e dos cães errantes utilizaram-se armadilhas (Gabrisa Ltda., Cafelândia, SP, Brasil) de arame galvanizado (120x60x40 cm) do tipo *Tomahawk*, que foram distribuídas próximas a locais que apresentavam vestígios indicativos da presença de canídeos. Como isca utilizou-se carnes e ovos de ave doméstica. A espacialização dos locais de captura foram georreferenciados com auxílio do receptor de sistema de posicionamento global (*Global Positioning System*) *Garmin Oregon 550* (Garmin Ltd, Olathe, KS, USA), o qual foi configurado para fornecer as posições com coordenadas planas na projeção UTM (Universal Transverse Mercator), no Sistema SAD-69 (South American Datum de 1969), correspondente ao sistema de coordenadas da Base Cartográfica de cada uma das regiões estudadas.

Para a contenção química administraram-se a associação de cloridrato de cetamina (Syntec, Cotia, SP, Brasil) (10mg/kg) e cloridrato de xilazina (Syntec) (2mg/kg) por via intramuscular. Os parâmetros fisiológicos temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória foram monitorados a cada 10 minutos. As raposas e os cães foram identificados por meio de aplicação de *microchip* e tatuagem e após o retorno anestésico foram devolvidos no local de captura.

Colheita e acondicionamento das amostras

Foram colhidas amostras de sangue dos 107 animais para a realização dos testes sorológicos e em 12 indivíduos, deste total, foram colhidas amostras de medula óssea, para a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A colheita sanguínea foi realizada por punção da veia cefálica ou safena lateral. As amostras de medula óssea foram obtidas por punção aspirativa da cartilagem xifóide do esterno, e acondicionadas a -20°C até a realização da PCR.

Procedimento Laboratorial

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi realizada de acordo com a técnica padronizada por Oliveira et al. (2008), utilizando o conjugado com anticorpos anti-IgG de cão doméstico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), usando como ponto de corte a diluição de 1:40. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência BX-FLA (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japan).

Para a execução do teste ELISA foi empregado o *Kit Elisa/S7* (Biogene Ind. e Com. Ltda., Recife, PE, Brasil). O referido *kit* possui como antígeno o fragmento S7 da proteína recombinante HSP70 da *L. infantum*. Os

testes foram realizados de acordo com as especificações do fabricante do *kit* e a leitura da placa foi realizada no espectrofotômetro ELx800 (BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, USA) com densidade óptica de 450nm.

A extração de DNA foi realizada em amostras de medula óssea, no volume de 200µL, utilizando o kit de extração QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA), seguindo as especificações do fabricante.

A PCR para o complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* foi executada com o método proposto por Cortes et al. (2004), utilizando os *primers* MC₁ (5' – GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG – 3') e MC₂ (5' – CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG – 3').

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 2% corado com *Blue-Green* (LGC Biotecnologia Ltda., Cotia, SP, Brasil) em tampão de corrida TEB 1X (Tris-ácido bórico 900mM; EDTA 20mM; pH 8,0). A eletroforese foi realizada a 100V/100mA durante 30 minutos, fazendo-se uso de um marcador de peso molecular de 100 pares de base, bem como de controle positivo e negativo como parâmetros para melhor caracterização dos produtos amplificados. Após as corridas, os géis foram visualizados e analisados por meio de um transluminador ultravioleta, acoplado a um computador com o programa de análise de imagens *EagleEye II* (Stratagene California, La Jolla, CA, USA).

Análise de dados

Os resultados dos animais soropositivos foram calculados por frequência (%), na qual utilizou-se o programa EpiInfo 6.0 (CDC, Atlanta, GA, USA).

Resultados

Não foram detectados anticorpos IgG anti-*L. infantum* pela RIFI nas amostras das 18 raposas estudadas. No teste de ELISA 5,5% (1/18) das raposas de vida livre foi reagente ao teste.

Com relação aos cães, a frequência de anticorpos anti-*L. infantum* foi de 29,21% (26/89) e 35,95% (32/89) pela RIFI e no teste ELISA respectivamente. A frequência de animais soropositivos de acordo com a localidade apresenta-se na Tabela 1. Considerando a frequência dos animais soropositivos em ambos os testes simultaneamente correspondeu a 19,10% (17/89) dos indivíduos.

As 12 amostras examinadas pela PCR foram negativas, correspondendo a quatro raposas de vida livre, cinco raposas de cativeiro e três cães errantes. Neste total, estão incluídas a raposa soropositiva no teste ELISA, oriunda do 72º BIMTz, um cão errante do soropositivos no ELISA e RIFI, também oriundo do 72º BIMTz e um cão errante soropositivo na RIFI, proveniente da ESEC do Tapacurá.

Tabela 1 Frequência de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum* em raposas e cães domésticos obtidos pelos testes de RIFI, ELISA e com ambos os testes simultaneamente.

Espécie	Localidade	RIFI	ELISA	RIFI e ELISA
		NP/NE - FR	NP/NE - FR	NP/NE - FR
Raposa (<i>Cerdocyon thous</i>)	72° BIMTz	0/2	1/2 - 50,0%	0/2
	ESEC de Caetés	0/2	0/2	0/2
	Zoo do PEDI	0/9	0/9	0/9
	CETAS	0/5	0/5	0/5
Cão doméstico (<i>Canis familiaris</i>)	72° BIMTz	1/1 - 100%	1/1 - 100%	1/1 - 100%
	ESEC de Caetés	3/27 - 11,1%	6/27 - 22,2%	2/27 - 7,4%
	ESEC do Tapacurá	7/20 - 35%	13/20 - 65,0%	6/20 - 30,0%
	Mata do Curado	4/19 - 21,0%	2/19 - 10,5%	1/19 - 5,2%
	PEDI	10/22 - 45,4%	10/22 - 45,4%	7/22 - 31,8%

BIMTz Batalhão de Infantaria Motorizada, CETAS Centro de Triagem de Animais Silvestres, ESEC Estação ecológica, FR Frequência relativa, NE números de examinados, NP número de positivos, PEDI Parque Estadual Dois Irmãos, Zoo do PEDI Zoológico do Parque Estadual Dois Irmãos

Discussão

A identificação de anticorpos IgG anti-*L. infantum* em uma raposa de vida livre do 72°BIMTz em Petrolina pelo teste ELISA, concorda com dados obtidos nos Estados do Pará e Minas Gerais, onde foram detectadas raposas soropositivas no ambiente selvagem (Courtenay et al. 1994; Courtenay et al. 2002; Curi et al. 2006). O referido animal não apresentava sinais sugestivos de LVC. Diante disso, é provável a ocorrência de infecção natural por *L. infantum* nas raposas nesta área silvestre e, possivelmente, reforça a afirmação de que esta espécie pode atuar como reservatório assintomático do agente etiológico (Lainson 1988). Contudo, o número de amostras utilizadas foi inferior a estudos antecedentes de ocorrência de anticorpos anti-*L. infantum* em raposas de vida livre (Courtenay et al. 1994; Courtenay et al. 2002; Curi et al. 2006), o que torna importante a execução de outras pesquisas a fim de estimar a população de raposas nesta área silvestre, e assim, avaliar a ocorrência de animais infectados e seu papel como reservatório da *L. infantum*.

Como não foram identificadas raposas soropositivas na ESEC de Caetés, é possível que não tenha ocorrido o contato da *L. infantum* com estes indivíduos, o que pode sugerir a inexistência de um ciclo silvático da *L. infantum* nesta mata. Contudo, são necessários mais estudos para determinar a população de raposas existentes nesta localidade e verificar se o número de amostras obtidas foi representativo para confirmar esta hipótese.

Mesmo não sendo identificada a presença de anticorpos anti-*L. infantum* nas raposas do Zoológico do PEDI e no CETAS, estes resultados são considerados importantes para a adoção de medidas de prevenção do agente infeccioso nestas instituições. Em trabalhos semelhantes, Luppi et al. (2008) e Tenório et al. (2011), relataram a importância da execução de testes para o diagnóstico de LVC em raposas e em outros canídeos selvagens de cativeiro, com o objetivo de identificar precocemente animais infectados, e assim minimizar a disseminação do agente infeccioso para os espécimes susceptíveis.

Considerando que estas raposas de cativeiro não estavam infectadas por *L. infantum*, e que possivelmente existem cães infectados no entorno do PEDI, torna-se importante a implementação de medidas que evitem o acesso de cães errantes nas proximidades do ambiente compartilhado pelas raposas, monitorar o perfil sorológico destes animais com a realização periódica de exames para o diagnóstico de LVC e prevenir um

possível contato com vetores com o uso de colares impregnados com deltametrina ou anti-parasitários *spot-on* (Gramiccia e Grandoni 2005; Luppi et al. 2008).

A captura de um cão errante, soropositivo na RIFI e no teste ELISA, em um local próximo (<500m) ao ponto de captura de uma raposa soropositiva, no 72°BIMTz, pode indicar a circulação do agente infeccioso no ambiente compartilhado por estes canídeos. Isto reafirma a hipótese de que os cães podem ser potenciais dispersores do agente infeccioso ao se deslocarem entre o ambiente silvestre e urbano²⁷, como também podem ser perpetuadores do ciclo do parasito no meio silvestre (Courtenay et al. 2002; Woodroffe et al. 2004). Ressalta-se também que os cães podem ser veiculadores de agentes enzoóticos para as espécies de canídeos selvagens (Curi et al. 2006; Aguirre 2009).

No entorno da ESEC do Tapacurá foram observados aspectos favoráveis à disseminação da *L. infantum*, como a pobreza (Alvar et al. 2006), habitações próximas as áreas silvestres (Diniz et al. 2008) (>300m), criatórios com a predominância de aves domésticas (Alexander et al. 2002) e cães de hábitos semidomiciliares (Barbosa et al. 2010). Esses fatores foram considerados fatores de risco para a ocorrência da LV em humanos e LVC em cães por Dantas-Torres et al. (2005). Além disso, foi evidenciado o acesso de cães ao ambiente silvestre, mediante identificação de pegadas em vários pontos da floresta e com a captura de um cão soropositivo para *L. infantum* pela RIFI no interior da ESEC do Tapacurá. Devido à associação desses aspectos com a alta frequência de animais soropositivos, sugere-se que os cães dessa região podem atuar como dispersores da *L. infantum* para seres humanos e cães não infectados.

O entorno da ESEC Caetés é o mais urbanizado dentre as localidades estudadas, onde a maioria residências possui saneamento, coleta regular de resíduos e os moradores apresentam melhores condições socioeconômicas quando comparada a população da ESEC do Tapacurá. Nestas propriedades não há criatórios de animais de produção e os cães estudados eram domiciliados. Em contrapartida, as moradias localizam-se às margens da borda da UC (<100m), sendo um fator que contribui para um possível deslocamento dos vetores do meio silvestre, além disto, foi observada a ocorrência de cães errantes na região, que podem atuar como reservatórios e promover a dispersão da *L. infantum*. Desta forma, mesmo com fatores antropogênicos desfavoráveis ao estabelecimento do ciclo da *L. infantum* na área estudada, como também não foram identificados anticorpos anti-*L. infantum* nas raposas desta UC, a ocorrência de cães soropositivos ainda pode sugerir a existência do agente infeccioso da LVC nesta localidade.

No entorno do PEDI foram observadas frequências elevadas de cães soropositivos para anticorpos anti-*L. infantum*, sendo semelhantes ao da ESEC do Tapacurá. Nesta localidade, as moradias pesquisadas localizam-se nos limites da UC (>20m), com algumas delas inseridas na mata, e apesar de os cães serem considerados domiciliados, esta proximidade com a floresta pode expor estes animais ao possível ciclo silvático da *L. infantum*. Além disso, foi comprovada a presença de cães errantes na UC, após a captura de dois exemplares no interior desta mata e sendo detectados anticorpos anti-*L. infantum*, pela RIFI e pelo teste ELISA, em um destes cães. Assim, esta proximidade com a mata pode ser um fator importante para justificar a alta frequência nos cães do entorno do PEDI. Este fator também foi relatado por Barbosa et al. (2010) no Estado do Maranhão, onde foram identificadas maiores frequências de cães soropositivos nas áreas próximas à mata em relação aos cães das áreas urbanizadas.

Na Mata do Curado a ocorrência de cães soropositivos foi inferior às demais área de estudo. Esta UC situa-se no território do Quartel General do Comando Militar do Nordeste (CMNE), onde mescla sua área de

mata com prédios e habitações militares e uma comunidade civil, sendo que as propriedades estudadas apresentam um estreito contato com a floresta. Nas moradias também foram observadas criações de animais de produção e cães domiciliados, como também ausência de barreiras físicas que possam restringir o acesso dos cães domésticos à mata ou a outras propriedades, o que se assemelha aos aspectos favoráveis ao ciclo da *L. infantum* observados na ESEC do Tapacurá e PEDI. Contudo, esta interação com o ambiente silvestre parece não ter relação significativa para o estabelecimento do ciclo peridomiciliar da *L. infantum*, a exemplo do que pode ocorrer na ESEC do Tapacurá e no PEDI.

Apesar da detecção de cães soropositivos no PEDI e na Mata do Curado, o município do Recife foi classificado como não receptivo para a transmissão LVC, pois não foram confirmados casos autóctones e não há evidências do estabelecimento de populações de *Lutzomyia longipalpis* no Recife (Dantas-Torres et al. 2005; Dantas-Torres 2006). Uma hipótese para existência de animais soropositivos nestas localidades seria o estabelecimento predecessor de cães infectados provenientes de outros municípios (Dantas-Torres et al. 2005), associada à disseminação da infecção por transmissão venérea (Benites et al. 2005) e/ou vertical (Silva et al. 2009). De certa forma é necessária a execução de pesquisas para confirmar nestas localidades a presença do agente etiológico mediante provas parasitológicas e moleculares, além da presença de vetores.

Apesar de os resultados indicarem que houve o contato da *L. infantum* com cães domésticos das cinco localidades estudadas, as provas sorológicas empregadas são susceptíveis à ocorrência de reações cruzadas com outros parasitas. No entanto, pelo menos um indivíduo foi identificado em cada localidade como soropositivo simultaneamente ao ELISA e RIFI, o que oferece uma maior confiabilidade na detecção de anticorpos anti-*L. infantum* (Zanette 2006; Lira et al. 2006).

A não detecção do DNA de *L. infantum* nas 12 amostras de medula óssea demonstra que há ausência de infecção por *L. infantum* nestes animais. Contudo, houve uma discordância com os testes sorológicos em três amostras de animais soropositivos. Diante disso, é possível que a PCR tenha sido pouco sensível para este tipo amostra. Tem sido relatada, que a PCR realizada somente em amostras de medula óssea, ofereceram sensibilidade inferior a PCR realizada com outros tipos de tecidos (Jusi et al. 2011; Tenório et al. 2011). No entanto, a colheita de amostras por métodos demasiadamente invasivos não estavam nas diretrizes desta pesquisa.

Porém, a técnica da PCR em tempo Real (qPCR) demonstrou alta sensibilidade na detecção de DNA de *L. infantum* em amostras de sangue de lobos-cinzentos (*Canis lupus*) na Europa (Sastre et al. 2008), na qual a colheita é consideravelmente menos invasiva, e que pode proporcionar uma nova perspectiva para o diagnóstico de LVC em canídeos selvagens no Brasil.

Por fim, as frequências de cães soropositivos obtidas neste estudo estão em concordância com os dados registrados por Courtenay et al. (1994) na Amazônia brasileira e por Amora et al. (2006) no estado do Rio Grande do Norte em que foram identificadas maiores taxas em cães de áreas rurais do que em áreas urbanas, como é o caso da ESEC do Tapacurá, que localiza-se em um ambiente essencialmente rural, quando comparada ao entorno da ESEC de Caetés e a Mata do Curado. O PEDI também se encontra próximo ao ambiente urbano, mas apresentou a altas frequências de cães soropositivos no seu entorno, fato que pode estar associado em estreito contato das moradias com a área silvestre associado à transmissão não vetorial. De modo geral, a proximidade de cães errantes, domiciliados ou semidomiciliados com os fragmentos de mata pode ser favorável à existência de LVC nestas localidades.

Conclusões

Diante da identificação de anticorpos anti-*L. infantum* em uma raposa de vida livre e um cão doméstico no 72° BIMTz, é provável a existência de um ciclo silvático e peridoméstico da *L. infantum* nesta área de estudo. A presença de cães soropositivos no interior e no entorno das áreas silvestres estudadas evidencia uma possível circulação da *L. infantum* no ambiente peridomiciliar e/ou domiciliar.

Agradecimentos Aos integrantes do Projeto Carnívoros, da Empresa Biogene, do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos (DMV-UFRPE), aos técnicos do Zoológico do PEDI, aos responsáveis pelas Unidades de Conservação e ao Instituto Brasileiro para Medicina da Conservação - Tríade. Esta pesquisa possuiu financiamento da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) nº APQ-1450-5.05/10.

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter conflitos de interesses.

Padrões éticos

Este estudo obteve as autorizações do IBAMA nº 23608-1 e do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) nº 024/2010 8481/2010 B02.

Referências

1. Aguirre AA (2009) Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. *Parasit Vectors* 26:-S7
2. Alexander B, de Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH (2002) Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis* 8:1480-5
3. Alvar J, Yactayo S, Bern C (2006) Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 22:552-7
4. Amora SSA, Santos MJP, Alves ND, Costa SCG, Calabrese KS, Monteiro AJ et al (2006) Fatores relacionados com a positividade de cães para Leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Ciência Rural* 36:1854-9
5. Barbosa DS, Rocha AL, Santana AA, Souza CSF, Dias RA, Costa-Júnior LM et al (2010) Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. *Ci Anim Bras* 11:653-9
6. Benites AP, Fernandes CE, Brum KB, Abdo MAGS (2011) Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31:72-7
7. Cabrera MAA, De Paula AA, Camacho LAB, Marzochi CA, Aguiar GM, Xavier SC et al (2003) Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of some risk factors. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 45:79-83

8. Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lages LC, Spinola RMF et al (2001) Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cad Saúde Pública* 17:1263-7
9. Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L (2004) PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. – specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98:12-7
10. Costa CHN (2008) Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad. Saúde Pública* 24:2959-63
11. Courtenay O, Macdonald DW, Lainson R, Shaw JJ, Dye C (1994) Epidemiology of canine leishmaniasis: a comparative serological study of dogs and foxes in Amazon Brazil. *Parasitology* 109:273-9
12. Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Dye C (2002) Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology* 125:407-14
13. Curi NH, Miranda I, Talamoni AS (2006) Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:99-101
14. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP (2006) Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 39:352-6
15. Dantas-Torres F, Brito MEF, Brandão-Filho SP (2006) Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol* 140:54-60
16. Dantas-Torres F, Faustino MA, Lima OC, Acioli RV (2005) Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 38:444-5
17. Dantas-Torres F (2009) Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors* 2:-1
18. Dantas-Torres F (2006) Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Rev Saúde Pública* 40:537-41
19. Dantas-Torres F (2007) The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (leishmania) infantum* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 149:139-46
20. Deane LM, Deane MP (1954) Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *Hospital* 45:419-21
21. Diniz SA, Silva FL, Carvalho-Neta AC et al (2008) Animal reservoirs for visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 2:24-33
22. Gomes RB, Mendonça IL, Silva VC, Ruas J, Silva MB, Cruz MS et al (2007) Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 101:127-33
23. Gontijo CMF, Melo MN (2004) Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 7:338-49
24. Gramiccia M, Gradoni L (2005) The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol* 35:1169-80
25. Jusi MM, Starke-Buzetti WA, Oliveira TM, Tenório Mda S, Sousa Lde O, Machado RZ (2011) Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 20:219-22

26. Lainson R, Rangel EF (2005) *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 100: 811-27
27. Lainson R, Shaw JJ, Lins ZC (1969) Leishmaniasis in Brazil: IV. The fox, *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para state, Brazil. Trans. Roy Soc Trop Med Hyg 63:741-5
28. Lainson R (1988) Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 321:389-404
29. Lainson R (2010) Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. Rev Pan-Amaz Saude 1:13-32
30. Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AG, Silva ED, Abath FG et al (2006) Canine visceral leishmaniasis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. Vet Parasitol 137:11-6
31. Luppi MM, Malta MC, Silva TM, Silva FL, Motta RO, Miranda I et al (2008) Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. Vet Parasitol 155:146-51
32. Moreira ED Jr, de Souza VM, Sreenivasan M, Lopes NL, Barreto RB, de Carvalho LP (2003) Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. Am J Trop Med Hyg 69:393-7
33. Nunes VLB, Galati EAB, Nunes DB, Zinezzi RO, Savani ESMM, Ishikawa E et al (2001) Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 34:301-2
34. Oliveira TM, Furuta PI, de Carvalho D, Machado RZ (2008) A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. Rev Bras Parasitol Vet 17:7-11
35. Santos JML, Dantas-Torres F, Mattos MRF, Lino FR, Lima A, Lilian SS et al (2010) Prevalência de anticorpos antileishmania spp em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop 43:41-5
36. Sastre N, Francino O, Ramírez O, Enseñat C, Sánchez A, Altet L (2008) Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. Vet Parasitol 158:117-20
37. Silva SM, Ribeiro VM, Ribeiro RR, Tafuri WL, Melo MN, Michalick MS (2009) First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. Vet Parasitol 166:159-62
38. Tenório MS, Oliveira e Sousa L, Paixão MS, Alves MF, Paulan SC, Lima FL et al (2011) Visceral leishmaniasis in a captive crab-eating fox *Cerdocyon thous*. J Zoo Wildl Med 42:608-16
39. Wijeyaratne PM, Arsenault LK, Murphy CJ (1994) Endemic disease and development: the leishmaniasis. Acta Trop 56:349-64
40. Woodroffe R, Cleaveland S, Courtenay DO, Laurenson MK, Artois M (2004) Infectious disease in the management and conservation of wild canids. In: Macdonald DW, Sillero-Zubiri C. The Biology & Conservation of Wild Canids. Oxford University Press, Oxford, pp 123-42
41. Zanette MF (2006) Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Dissertation, Universidade Estadual Paulista