



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESPACIAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* spp NO MUNICÍPIO DE
EXU, PERNAMBUCO, BRASIL.**

WAGNER WESLEY ARAÚJO ANDRADE

Recife, 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESPACIAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* spp NO MUNICÍPIO DE
EXU, PERNAMBUCO

WAGNER WESLEY ARAÚJO ANDRADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves.

07 de março de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESPACIAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* spp NO MUNICÍPIO
DE EXU, PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta Universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as normas de ética científica.

WAGNER WESLEY ARAÚJO ANDRADE

Data 07 DE MARÇO DE 2019

ORIENTADOR:

Dr. Leucio Câmara Alves Departamento de
Medicina Veterinária – UFRPE

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Rafael Antônio do Nascimento
Ramos Unidade Acadêmica de
Garanhuns – UFRPE

Dr. Victor Fernando Santana Lima
Departamento de Medicina Veterinária –
UFS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A553c Andrade, Wagner Wesley Araújo
Caracterização molecular e espacial de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. no município de Exu, Pernambuco,
Brasil / Wagner Wesley Araújo Andrade. – 2019.
62 f.: il.

Orientador: Leucio Câmara Alves.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Leishmaniose – Exu (PE) 2. Epidemiologia veterinária
3. Cão – Doenças – Diagnóstico I. Alves, Leucio Câmara,

orient.

II. Título

CDD 636.089

FONTE FINANCIADORA

CAPES – Bolsista do primeiro semestre de 2018 ao primeiro semestre de 2019.

Dedico este trabalho a maior força motriz do universo: ao Deus da minha vida. Ademais, dedico tudo aqui produzido a todos e todas que me ajudaram de forma direta e indireta a concretizar esse objetivo que representa uma parte do meu sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**. Parece simples e clichê, mas nada aqui nesse trabalho seria possível sem o relacionamento íntimo, direto e intenso que tenho com o meu Deus. Não consigo personificá-lo, nem muito menos concretizá-lo com um simples vernáculo de qualquer idioma que seja. No entanto, consigo senti-lo e entender todos os planos que ele tem para a minha vida, principalmente no ano de 2018 em que houve tantas provações. Esse mestrado, com certeza, é a prova de que os planos de Deus são maiores e mais bonitos que os meus para mim. Tudo só foi e é possível, pois essa “força estranha” se fez constantemente presente. Sou o que sou e consigo sonhar com o que quero ser, pois a tua misericórdia, teu amor e tua glória são para sempre. Obrigado, Deus.

A **painho e mãinha**, os meus maiores admiradores. A distância, a saudade, os atritos, tudo vale a pena quando sabemos que há pessoas que torcem por você e seriam capazes de dar a própria vida em troca da realização dos seus sonhos. Assim são meus pais. Louvo a Deus pela vida deles.

Ao meu **orientador** e - como costumo dizer - meu pai científico: **Prof, Dr. Leucio Câmara Alves**, ou simplesmente “Professor”. Não tenho palavras para descrever a admiração, respeito e carinho que sinto por ele. Uma pessoa que na mesma intensidade que me cobra, sabe me encorajar e me estimular a ser sempre a minha melhor versão. Jamais esquecerei sua frase: “Se você não acreditar em você, ninguém vai acreditar”. Sou grato a Deus pela vida dele e de toda sua família.

Ao meu amado **Laboratório de Doenças Parasitárias**. Um ambiente que me renova, me alegria e me enriquece. Nas pessoas de **Vanuza, Talita, Inês, Carol e Professora Aparecida** e todos e todas que compõem esse ambiente saudável, sou imensamente grato.

A toda minha **equipe de coletas** que, apesar de na época termos passado por um processo difícil e doloroso, sempre se mostraram dispostos e eficientes no desempenho do trabalho. Meu muito obrigado e minha sincera admiração a **Victor Fernando, Janilene Oliveira, Amanda Pina, Caio Cavalcanti, Victor Huaranga, Winny Gomes, Laís Berenguer, Samantha Farias e Vanuza Meireles**. Que Deus abençoe todos vocês.

A todos meus amigos, minhas amigas e demais familiares que me apoiaram no desenvolvimento desse trabalho. Peço desculpas pelas ausências e reafirmo meu amor e admiração por cada um de vocês.

Ao Médico Veterinário **Fernando “Baiá”** e **toda equipe da Secretaria de Saúde do município de Exu** que nos recebeu tão bem e nos ajudou de forma crucial no desenvolvimento desse trabalho. Desejo mais desenvolvimento para essa cidade linda, agradeço por tudo e me coloco a disposição para ajudar sempre que precisarem.

A **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, minha casa, e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical - PPGCAT** do qual tenho orgulho de ser discente.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela concessão da bolsa de mestrado, meu obrigado.

Minha trajetória acadêmica começou quando eu saí de Carnaíba para ver o mundo por uma nova ótica (ou novas óticas). Eu sou fruto de tudo aquilo que me inspira e, com certeza, todos que estiveram comigo durante esse momento têm sua parcela de fonte inspiradora para mim. Estar próximo de grandes pessoas me obriga a crescer. Obrigado por estarem ao meu lado nesse processo evolutivo.

SUMÁRIO

1. QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. AGENTE ETIOLÓGICO	03
2.2. CICLO DE TRANSMISSÃO	05
2.3. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL	06
2.3.1. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	07
2.3.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL	09
2.3.3. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM CÃES	09
2.4. DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES NA ESPÉCIE CANINA	10
2.4.1 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	10
2.4.2. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	10
2.4.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	11
2.5. GEORREFERENCIAMENTO ASSOCIADO À EPIDEMIOLOGIA E AO DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES	12
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
4. OBJETIVOS	26
4.1 OBJETIVO GERAL	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
Capítulo I: CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA, MOLECULAR E ESPACIAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>Leishmania</i> spp NO MUNICÍPIO DE EXU, PERNAMBUCO, BRASIL.	27
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de Transmissão de <i>Leishmania</i> spp.	05
Figura 2.	Propagação da Leishmaniose Visceral para áreas urbanas no Brasil (1981-2009)	06

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA, MOLECULAR E ESPACIAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* spp NO MUNICÍPIO DE EXU, PERNAMBUCO, BRASIL.

Figura 1.	Localização geográfica do município de Exu.	31
Figura 2.	Densidade espacial dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> na zona urbana e rural do Município de Exu.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica do complexo *Leishmania* e seus subgêneros 04

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA, MOLECULAR E ESPACIAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* spp NO MUNICÍPIO DE EXU, PERNAMBUCO, BRASIL.

Tabela 1. Distribuição geográfica dos casos humanos de LT e LV no município de Exu, Pernambuco. 35

Tabela 2. Número de cães infectados com *Leishmania infantum* no Município de Exu, Pernambuco. 36

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
“P”	Fascículo
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
bp	Pares de base
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático indireto
Km	Quilômetros
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
min	Minutos
n=	Número
PCR	Reação em cadeia de polimerase
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
TAE	Tampão
Tris-Acetato	EDTA
WHO	World Health Organization

APÊNDICES

CAPÍTULO I

**CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA MOLECULAR E ESPACIAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* spp NO MUNICÍPIO DE
EXU, PERNAMBUCO, BRASIL.**

Apêndice 1. Termo de Livre esclarecimento. 42

RESUMO

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por parasitos intracelulares obrigatórios pertencentes ao gênero *Leishmania* e subgêneros *Leishmania*, *Viania* e *Mundinia* que acometem cerca de 350 milhões de pessoas ao redor do mundo. O estado de Pernambuco é historicamente endêmico para as duas principais apresentações clínicas da doença: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT). O cão doméstico ainda é considerado como sendo o principal hospedeiro urbano para *Leishmania infantum* e de significativa na transmissão de *Leishmania brasiliensis*, espécies que causam quadros de LV e LT, respectivamente. O município de Exu, localizado no sertão do estado de Pernambuco, registrou na sua zona urbana e rural, um total de 27 casos de LV e LT em humanos nos últimos 5 anos (2013-2018). Utilizando amostras de sangue total 260 cães (255 da zona urbana e 5 da zona rural) do município, constatou-se que 27,84% (71/255) cães foram reagentes no teste sorológico imunocromatográfico DPP® LVC (BioManguinhos), enquanto 40% (2/5) dos cães coletados na zona rural foram reagente na imunocromatografia. Após a triagem sorológica, todas as 71 amostras foram submetidas diagnóstico molecular de *Leishmania spp*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) brasiliensis* através de PCR convencional. Através do georreferenciamento desses dados, Foi possível concluir que a LVC na zona urbana do município de Exu está intimamente relacionada aos casos de LV em humanos e representam um caráter de vigilância para os locais onde a doença em humanos ainda não se faz presente na zona urbana.

Palavras chaves: doenças negligenciadas, saúde pública, vigilância, zoonose

ABSTRACT

Leishmaniasis are anthroponosis caused by obligate intracellular parasites belonging to the genus *Leishmania* and subgenus *Leishmania*, *Viania* and *Mundinia* that affect around 350 million people around the world. The state of Pernambuco is historically endemic for the two main clinical presentations of the disease: Visceral Leishmaniasis (LV) and Tegumentary Leishmaniasis (LT). The domestic dog is still considered the main urban host for *Leishmania infantum* and significant in the transmission of *Leishmania brasiliensis*, species that cause LV and LT, respectively. The municipality of Exu, located in the southeastern state of Pernambuco, recorded in its urban and rural areas a total of 27 cases of LV and LT in humans in the last 5 years (2013-2018). Using 260 dogs (255 urban and 5 rural), 27.84% (71/255) dogs were reactive in the serum immunochromatographic test DPP® LVC (BioManguinhos), while 40 % (2/5) of the dogs collected in the rural area were reagent in the immunochromatography. After serological screening, all 71 samples were submitted to molecular diagnosis of *Leishmania spp*, *L. (L.) infantum* and *L. (V.) brasiliensis* by conventional PCR. Through the georeferencing of these data, it was possible to conclude that LVC in the urban area of the city of Exu is closely related to the cases of VL in humans and represent a surveillance character for the places where the disease in humans is not yet present in the urban zone .

Keywords: neglected diseases, public health, surveillance, zoonosis

1. QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA

As leishmanioses são doenças negligenciadas antroponozoonóticas causadas por parasitos intracelulares obrigatórios de caráter digenético pertencentes a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e subgêneros *Leishmania*, *Viania* e *Mundinia* que atingem cerca de 350 milhões de pessoas ao redor do mundo (BREDOR, 2003; MIRANDA et al, 2011; ABASI et al, 2014; AKHOUNDI et al, 2016; ESPINOSA et al, 2016; WHO, 2017).

Cerca de 30 espécies de *Leishmania* têm sido reportadas como sendo capazes de infectar animais domésticos, silvestres e seres humanos causando quadros patogênicos de Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT) (LAISON e SHAW, 1978; LAISON et al, 1987, BREDOR, 2003).

Estando presentes em todos os estados da federação, no Brasil são reconhecidas pelo menos oito espécies de *Leishmania* capazes de infectar animais domésticos, silvestres e seres humanos causando quadros patogênicos de Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT) (LAISON e SHAW, 1978; LAISON et al, 1987, BREDOR, 2003; SILVEIRA et al., 2002; FREITAS, 2010; AKHOUNDI et al, 2016; ESPINOSA et al, 2016), tendo como principais espécies envolvidas a *Leishmania* (*L.*) *infantum* e *L.*(*Viannia.*) *braziliensis*, respectivamente (VALE e FURTADO, 2005).

Nos últimos anos ocorreram alterações no perfil de transmissão, e hoje a LV encontra-se urbanizada em várias cidades brasileiras de médio e grande porte com a interação da interface silvestre, sinantrópica e ambiente domiciliar (ARIAS et al., 1981; LAINSON et al., 1981; LAINSON et al., 1982; CORREDOR et al., 1989; LAINSON et al., 1989; TRAVI et al., 1998; GOES et al., 2012; RICHINI-PEREIRA et al., 2014; TRUPPEL et al., 2014; ABID et al., 2015; GONZÁLEZ et al., 2015; KASSAHUN et al., 2015; PAIZ et al., 2015; PAŞA et al., 2015, CALDART, 2017), tendo o o cão como principal reservatório nos centros urbanos (LAINSON e RANGEL, 2005; BELO et al, 2013). Por outro lado, a domiciliação da transmissão da LT tem sido sugerida pela associação observada entre a infecção em humanos e animais domésticos, como cães e equídeos, em ambientes peridomésticos (PITTNER, et al., 2009; BRITO et al. 2009).

O Estado de Pernambuco é historicamente endêmico para LV (LEITE, 2016) e a LT é endêmica em todas as regiões, predominantemente na região Agreste e Zona da Mata Atlântica (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; ANDRADE et al., 2005; ANDRADE

et al., 2009, BRASIL, 2011), com a participação efetiva na cadeia epidemiológica de ambas o cão doméstico (DANTAS-TORRES, 2010).

O uso de técnicas sorológicas e moleculares para o diagnóstico das leishmanioses em reservatórios urbanos tem demonstrado ser uma ferramenta útil para uma melhor compreensão da dispersão do parasito em várias localidades do Brasil (SILVA et al., 2006; FERREIRA et al., 2007; RONDON et al., 2008; TRONCARELLI et al., 2009; FREHSE et al., 2010; VIOL et al., 2012; DANTAS-TORRES et al., 2010 SOUZA et.al., 2014; MARQUES, 2017; LINS et.al., 2018). Aliado ao diagnóstico, as ferramentas de georreferenciamento, tem contribuído para tomadas de decisões para o enfrentamento dos agravos dentro da maior até a menor esfera geográfica (MARQUES, 2017; LINS et.al., 2018).

Diante exposto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar, através de métodos soro-epidemiológicos, moleculares e de georreferenciamento cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp no município de Exu, Pernambuco, Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As leishmanioses são doenças transmitida por vetores, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (WHO, 2017) que encontram-se concentradas em áreas tropicais e subtropicais do planeta, notadamente em 89 países do continente Europeu, África, Ásia e Américas (ALVAR et al, 2012). Essas enfermidades são consideradas de caráter antropozoonótico e representam um significativo problema de saúde pública (NEVES, 1998, WHO, 2017). Nas Américas, a LV é frequente em 12 países, sendo o Brasil o responsável por quase a totalidade dos casos humanos notificados (96% dos casos), enquanto a forma tegumentar (LT) está dispersa em 20 países (PAHO, 2017).

A sintaxe se apresenta no plural, pois consiste em um termo global usado para denominar um conjunto de afecções patológicas que estão associadas à infecção de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de um hospedeiro vertebrado, cujas sintomatologias variam, principalmente, de lesões cutâneas (lesões graves e mutilantes) a lesões viscerais (WHO, 2011). Essas apresentações clínicas podem caracterizar quadros de Leishmaniose Tegumentar (LT) (e suas variações cutânea e mucocutânea) e Leishmaniose Visceral (LV) (LAISON e SHAW, 1978; LAISON et al, 1987).

A Organização Mundial de Saúde, desde 2006, considera as Leishmanioses dentro do quadro das seis endemias emergentes prioritárias para a saúde pública mundial devido à sua distribuição geográfica, sendo mais frequente em países em desenvolvimento (OMS, 2006).

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

As Leishmanioses são causadas por espécies diferentes de protozoários do gênero *Leishmania*. Estes parasitos possuem comportamento intracelular obrigatório no sistema fagocítico mononuclear, apresentando-se em duas formas: promastigota e amastigota (GÁLLEGO, 2004; BRASIL, 2007).

Os protozoários pertencentes a este gênero estão subdivididos em três subgêneros: *Leishmania*, *Viannia* e *Mundinia* (AKHOUNDI et al, 2016; ESPINOSA et al, 2016) (Tabela 1). No Brasil são descritos oito espécies, sendo duas do subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; e seis do subgênero *Viannia*: *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) naiffi* (LAINSON; SHAW, 1998;

SILVEIRA et al., 2002; FREITAS, 2010; AKHOUNDI et al, 2016; ESPINOSA et al, 2016).

Tabela 1: Classificação taxonômica do complexo *Leishmania* e seus subgêneros

Subgênero	Espécie	Distribuição	
<i>Leishmania</i>	<i>L. aethiopica</i>	África (Etiopia, Quênia)	
	<i>L. amazonensis</i>	América (Brasil, Venezuela, Bolívia)	
	<i>L. donovani</i>	África central, sul da Ásia, Oriente Médio, Índia e China	
	<i>L. infantum</i> (sinônimo: <i>L. chagasi</i>)	Região do Mediterrâneo (Norte da África e Europa), Sudeste Europeu, Oriente Médio, Ásia central, América (Brasil, México, Bolívia, Venezuela)	
	<i>L. major</i>	Norte e centro da África, Oriente Médio, Centro da Ásia	
	<i>L. mexicana</i> (sin.: <i>L. pifanoi</i>)	Estados Unidos, Equador, Venezuela e Peru	
	<i>L. tropica</i>	Norte e centro da África, Oriente Médio, Centro da Ásia e Índia	
	<i>L. venezuelensis</i>	América (Venezuela)	
	<i>Viannia</i>	<i>L. waltoni</i>	República Dominicana
		<i>L. braziliensis</i>	América (Guatemala, Peru, Brasil, Venezuela, Bolívia)
<i>L. guyanensis</i>		América (Guiana Francesa, Brasil, Suriname, Bolívia)	
<i>L. laisoni</i>		Brasil, Bolívia, Peru	
<i>L. lindibergi</i>		Brasil	
<i>L. naiffi</i>		Brasil Guiana Francesa	
<i>L. panamensis</i>		Panamá, Colômbia, Guiana Francesa	
<i>L. peruviana</i>		Peru, Bolívia	
<i>Mundinia</i>	<i>L. shawi</i>	Brasil	
	<i>L. martiniquensis</i>	Martinica, Tailândia	

Fonte: (AKHOUNDI et al, 2016; ESPINOSA et al, 2016)

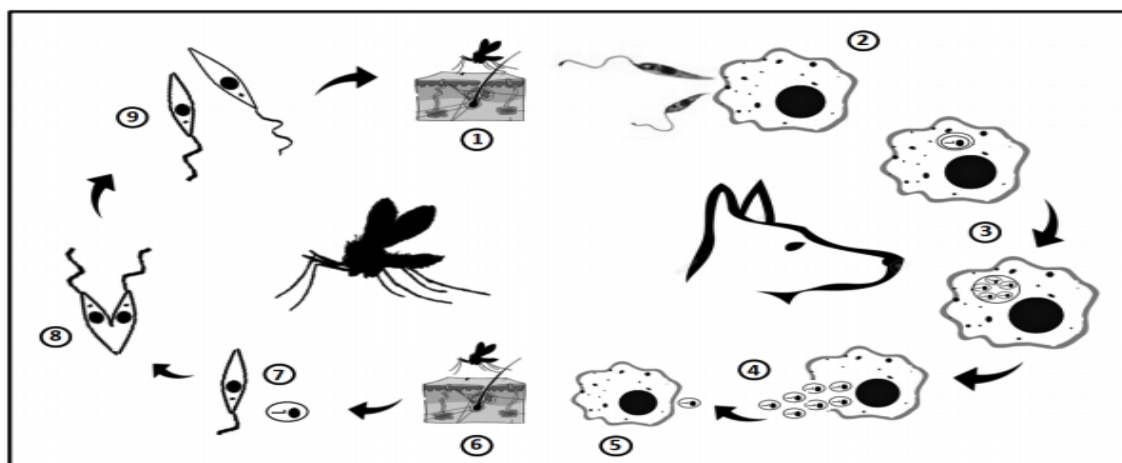
Atualmente, existe um consenso baseado em estudos de biologia molecular e caracterização filogenética, de que *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum* são a mesma espécie. No entanto, para comunicação científica, deve-se adotar a segunda nomenclatura devido ser mais antiga (MAURÍCIO et al.,1999; AZEVEDO, 2004; GONTIJO e MELO, 2004; KUHLS et al., 2005; ALCÂNTARA, 2006).

2.2 CICLO DE TRANSMISSÃO

Os vetores biológicos das Leishmanioses no Brasil e nas Américas são insetos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, ordem Diptera, gênero *Lutzomyia*. Os insetos machos adultos alimentam-se, preferencialmente, de soluções açucaradas, no entanto as fêmeas são hematófagas por necessitarem de sangue para a maturação dos ovos e possuem hábito crepuscular (MENCKE et al., 2003). Essas espécies vetoras de *Leishmania* têm um comportamento antroponozófilo e tendem a realizar o repasto sanguíneo várias espécies de animais silvestres e domésticos, particularmente os canídeos (MATUTE et al., 2007; AFONSO e ALVES-PIRES, 2008).

Quando o parasito na sua forma promastigota é inoculado no cão, através da picada da fêmea do flebotomíneo, os macrófagos realizam fagocitose deste parasito (ECKERT, 2013). Após isso, ocorre diferenciação morfológica de promastigota para amastigota, pois a forma promastigota é sensível à acidez e ação de enzimas líticas presentes no vacúolo do macrófago (AFONSO e ALVES-PIRES, 2008). Em seguida, o parasita se multiplica, por divisão binária, até que haja rompimento celular (ECKERT, 2013) (Figura 1).

Figura 1 – Ciclo de Transmissão de *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Nascimento (2018)

1-Flebótomo inicia o repasto sanguíneo inocula através formas promastigotas; 2- As forma promastigotas são fagocitadas por células do SMF; 3- Ocorre um processo de transformação de promastigota em amastigota no interior do macrófago e sequencial multiplicação por divisão binária; 4- O macrófago repleto de formas amastigotas se rompe e libera os parasitos na circulação; 5- As formas amastigotas invadem novos macrófagos e se dividem por divisão binária; 6- O flebótomo ao refazer o repasto sanguíneo, ingere sangue contendo as formas amastigotas; 7- No interior do flebótomo, ocorre transformação das formas de amastigotas em promastigotas; 8- Formas promastigotas procíclicas se dividem por binarismo, passando para a fase de promastigotas metacíclicas; 9- As promastigotas metacíclicas (ou forma infectante) migram pela válvula faríngea do flebótomo.

Em alguns casos a replicação do parasito nos hospedeiros vertebrados pode sofrer influência da imunocompetência destes, cujo parasitismo pode ser debelado em função da ação dos linfócitos T do sistema imune do hospedeiro, impedindo, assim a infecção (ROITT et al., 1999; CAMPOS, 2007; MURRAY et al., 2005; GAMA et al., 2004).

2.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, sendo causada por *L.(Leishmania) infantum* (LAINSON e SHAW, 1987; BELO, 2013). O Brasil, é um dos países mais endêmicos para LV no mundo (WHO, 2016; PAHO, 2017). A taxa de incidência anual média é de 3,24 casos a cada 100.000 habitantes (BRANDÃO et al, 2017). A LV no passado foi considerada uma doença rural no Brasil e, há algum tempo, vem passando por um processo de urbanização devido a mudanças no comportamento do vetor biológico, à degradação ambiental e à migração de populações humanas e caninas para grandes centros urbanos (WERNECK, 2008; HARHAY et al. 2011) (Figura 2).

Figura 2 – Propagação da Leishmaniose Visceral para áreas urbanas no Brasil (1981-2009)



Fonte: Adaptado de Harhat et al. (2011)

Em áreas endêmicas do país, a maioria dos casos registrados ocorrem em crianças, sendo a maior parte com menos de 10 anos de idade (GONTIJO e MELO, 2004).

Segundo Brandão e colaboradores (2017), de 10379 indivíduos notificados com LV no ano de 2009 a 2013, 6686 são crianças com idade até os 4 anos, 1829 com intervalo de idade entre 5 a 9 anos, 932 com intervalo de idade de 10 a 14 anos, e 932 com idade entre 15 e 19 anos.

Um programa de controle e monitoramento da LV em caninos e humanos (PCLVC) foi criado pelo Ministério da Saúde objetivando reduzir as taxas de transmissão e os índices de mortalidade e morbidade associados à doença. Embora as diretrizes do PCLVC enfatizem a importância das medidas para redução dos riscos, essas estratégias empregadas não têm sido eficazes para a redução da incidência de LV (ROMERO e BOELAERT, 2010). Se levar em consideração os muitos avanços alcançados no controle de outras doenças infecciosas no Brasil, o controle da LV deve ser considerado um significativo insucesso (BARRETO et al., 2011).

Assim como em muitos estados do Brasil, desde a década de 1990 a LV é historicamente endêmica no estado de Pernambuco e vem sendo amplamente distribuída em todas as regiões geográficas (região metropolitana do Recife, região da Mata Atlântica, zona do Agreste e semiárido) (DANTAS-TORRES, 2006; LEITE 2016).

2.3.1. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

No Brasil, cerca de 1.600 municípios apresentam transmissão autóctone de Leishmaniose Visceral em todas as regiões (BRASIL, 2014). A região sul do Brasil era considerada livre de LVC (ROSSETO et al., 2006; HEUSSER-JÚNIOR et al., 2010), mas em 2010, em San Borja (RS) ocorreu um surto de com mais de 1200 cães soropositivos (TARTAROTTI et al., 2011). Em um estudo realizado no município de Garanhuns, em Pernambuco, Santos et al (2010) detectou anticorpos IgG anti-*Leishmania* spp em cães e revelou uma realidade até então desconhecida no município onde Lins et.al. (2018) relataram 2,4% de soropositividade em 242 cães de diferentes bairros.

A relação entre seres humanos e cães no domicílio ou no peridomicílio, além do grande parasitismo cutâneo dos cães infectados, favorecem a manutenção ciclo de transmissão de *L. infantum* no Brasil (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; BRASIL, 2006). A primeira abordagem sobre relação: homem, canídeos (com alto parasitismo cutâneo) e vetor biológico e LV foi descrita por Deane (1956), quando observou que a doença não apresentava um caráter esporádico constante, que

predominava no meio rural, estando em expansão para a zona urbana, relacionando a presença do cão infectado com os focos endêmicos.

Vários estudos têm relatado a ocorrência de LV em cães no Brasil através de inquéritos soroepidemiológicos: Paranhos-Silva et al.(1996), obtiveram 23,5% (395/1.681) de positividade para a doença em Jequié (BA); em Belo Horizonte (MG), Ferreira et al. (2007) observaram 63,24% (148/234); na cidade de Fortaleza, Rondon et al. (2008) tiveram 26,2% (197/750); Frehse et al. (2010), no Paraná, em São José dos Pinhais, 0,027% (1/364); em Araçatuba (SP) Viol et al. (2012), obtiveram 20,1% (82/408); em Caruaru (PE) Souza et.al (2014) registrou um aumento de 1,4% (24/1671) em 2005, para 29,55% (347/1174) em 2010.

Marques (2017), utilizando de métodos de georreferenciamento e soroepidemiologia, realizou um estudo sobre a dispersão geográfica da LVC no oeste do Rio Grande do Sul e constatou que situação atual da LVC nos municípios de Uruguaiana, Itaqui e São Borja são preocupantes, principalmente ao considerar a expansão da enfermidade desde a confirmação do primeiro caso autóctone no estado em 2009.

Por outro lado, utilizando métodos moleculares para a identificação da presença de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de sangue total de cães no Brasil, Silva et al.(2006), em Belo Horizonte (MG), observou 28,57% (28/98) de animais positivos e no estado de São Paulo, Troncarelli et al. (2009), observaram frequências de 38% (76/200) e 36% (72/200) nas cidades de Bauru e Botucatu respectivamente e Viol et al. (2012), município de Araçatuba, constatou 29,66% (121/408). No estado de Pernambuco, Dantas-Torres et al. (2010), em Mundo Novo, usando amostras de medula óssea, constatou 2,43% (1/41) de cães positivos.

A LVC tem sido considerada como doença imunomediada e a progressão da infecção nos cães apresenta acentuada resposta humoral com altos títulos de imunoglobulinas e depressão da resposta imunológica celular (MAIA e CAMPINO, 2008; CARRILLO e MORENO, 2009), determinando o surgimento de animais assintomáticos ou sintomáticos (MOLINA, 1994; FONTES e SILVA, 2011).

Os principais achados clínicos em cães acometidos por LV são: dermatopatias, onicogribose, hiporexia, anorexia, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia, anemia, oftalmopatias, entre outros sinais clínicos (SILVA, 2007). Normalmente, as lesões cutâneas são mais comuns e envolvem descamação e eczema, principalmente no espelho nasal e orelhas; úlceras rasas nas orelhas, cauda, articulações e no focinho (BRASIL, 2006).

2.3.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL

No Brasil, a LT apresenta diversos padrões epidemiológicos, que podem variar de acordo com a espécie de flebotomíneo envolvida na transmissão, população suscetível, o nível de exposição, bem como a diversidade e competência dos reservatórios (BRITO, 2012). A enfermidade pode se apresentar em três apresentações clínicas distintas: Cutânea, mucocutânea e tegumentar difusa (LAISON e SHAW, 1978; LAISON et. al., 1987; BRANDÃO et. al., 2017).

Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos vêm sugerindo mudanças no padrão de transmissão da LT: de zonas rurais habitadas para zonas rurais praticamente desmatadas pela industrialização e urbanização e para regiões periurbanas (BRASIL, 2017).

Os casos humanos notificados estão em áreas socialmente menos favorecidas, relacionados principalmente ao sexo masculino, que exercem práticas agrícolas, atividades de desmatamento e/ou reflorestamento, extração de madeira, caça, pesca, mineração, atividades de pesquisa em florestas tropicais, comunidades ribeirinhas ou adjacentes a florestas, entre outros (PASSOS et. al., 2001; RODRIGUEZ et. al., 2013).

O Ministério da Saúde do Brasil, desde 2002, preconiza como modelo de vigilância a identificação de áreas prioritárias para ação, prevenção e controle da LT. Esse modelo utiliza o cálculo de densidade de casos (número de casos de LT por município de residência, por km²) (BRASIL, 2002). Segundo Brandão et al (2017), durante os anos de 2009 a 2013, o Brasil notificou 31179 casos de LT (uma taxa de 9,73 casos por 100.000 habitantes).

2.3.3. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM CÃES

A LT em cães tem sido relatada desde do início do século passado (PEDROSA, 1913), no entanto era difícil saber quais eram os parasitas que causavam quadros da doença em cães no continente (LAINSON e SHAW, 1979).

Através de melhorias nos métodos de identificação (a exemplo da biologia molecular), hoje é possível afirmar que as seguintes espécies de *Leishmania* causam quadros de Leishmaniose cutânea em cães nas Américas: *L. (Viannia) braziliensis* (MAYRINK et al, 1979), *L. (V.) peruviana* (HERRER, 1951), *L. (V.) panamensis* (HERRER e CHRISTENSEN, 1976) e *L. (V.) colombiensis* (DELGADO et al., 1993).

Dantas-Torres et. al (2010), através de métodos sorológicos e moleculares, identificou 51% cães positivos para *Leishmania brasiliensis* em uma área endêmica para LT no estado de Pernambuco, sendo que 21% destes cães apresentavam sinais sugestivos da doença que, em cães, são semelhantes aos casos da doença em humanos: como lesões ulcerativas e descamativas cutâneas e mucocutâneas na região de pavilhão auricular, plano nasal, região labial e periocular (AL-BAJALAN et. al., 2017).

2.4 DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES NA ESPECIE CANINA

2.4.1. Diagnóstico Parasitológico

Durante muitos anos, o diagnóstico tanto das leishmanioses em inquéritos caninos eram realizados através de exames parasitológicos (ALVES;BEVILACQUA, 2004). Os métodos parasitológicos ainda representas o “Padrão-Ouro” para o diagnóstico definitivo e resume-se na visualização de formas amastigotas de *Leishmania* spp intracelulares ou livres em amostras citológicas, a exemplo de citologia esfoliativa, biopsias de medula óssea, as pirados de linfonodos e também através de histopatologia (GREENE, 2012; MAGNO, 2007). Por ser rápido, de fácil execução, baixo custo, pouco traumático e com 100% de especificidade, o método parasitológico representa tem caráter de eleição na confirmação da LVC. Porém, devido a alguns fatores (coleta, qualidade da amostra e carga parasitária), a sensibilidade do exame pode ser baixa (MAGNO, 2007).

Além dessas formas de diagnóstico direto, o método de imunohistoquímica é considerado muito sensível e específico para detecção de formas amastigotas se comparado a avaliações citológicas e histopatológicas (TAFURI et al., 2004). Através do método de isolamento em meio de cultura também é possível realizar diagnóstico direto de *Leishmania* spp, no entanto há limitações no que se refere ao tempo dos resultados e a baixa sensibilidade, sendo pouco usado na rotina clínica e diagnóstica (RIBEIRO, 2007; MAGNO, 2007).

2.4.2. Diagnóstico Sorológico

Os exames sorológicos, atualmente no Brasil, são os mais utilizados para diagnóstico de Leishmanioses em cães (PARANHOS-SILVA et al. 1996; FERREIRA et al. 2007; RONDON et al. 2008 FREHSE et al. 2010, VIOL et al. 2012, SOUZA et.al 2012; MARQUES, 2017). A partir da década de 1960, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) começou a ser utilizada para diagnóstico, por se tratar de um teste rápido, de fácil de execução e de baixo custo (ALVES; BEVILACQUA 2004; IKEDA-GARCIA;

FEITOSA, 2006). A técnica foi também preconizada pelo Ministério da Saúde do Brasil para realização de inquéritos sorológicos caninos (GONTIJO e MELO, 2004). Em casos de Leishmaniose Tegumentar em cães, o diagnóstico é semelhante ao realizado na doença humana (BRASIL, 2007).

Ainda dentro dos métodos sorológicos para diagnóstico das Leishmanioses, método ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) se difundiu no Brasil, pois trata-se de um exame rápido, relativamente simples (LIMA et al., 2005; SCALONE et al., 2002) e que permite o processamento de significativo número de amostras em pouco tempo (MAIA; CAMPINO, 2008). Porém, estes exames diagnósticos devem ser interpretados com cautela, uma vez não têm total sensibilidade e especificidade, além de que podem haver “falsos-positivos”, principalmente em casos de doenças causadas por outros hematozoários (BARROS et al, 2012; RIBEIRO, 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Além da Imunofluorescência e do Elisa, a Fixação de Complemento (FC) e o Western blotting podem ser realizados como exames sorológicos para o diagnóstico de *Leishmania* spp (GRIMALDI, et al., 2012).

O Ministério da Saúde do Brasil preconiza como protocolo legal de diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina, teste sorológico imunocromatográfico de triagem (DPP®: Dual Path Platform), que possui como antígeno uma proteína recombinante de *L. infantum* rK26/ rK39 (GRIMALDI et al., 2012; MARCONDES et al., 2013). Após a triagem, o ensaio imunoenzimático (ELISA) é procedido como exame confirmatório para a doença (BRASIL, 2014).

2.4.3. Diagnóstico Molecular

Com o desenvolvimento da técnica de Reação em Cadeia Polimerase (PCR), tornou-se possível identificar e amplificar seletivamente o DNA do cinetoplasto de *Leishmania* spp (ALVES; BEVILACQUA, 2004). É uma técnica mais específica e sensível, mas que depende do tipo de amostra utilizada, do método de extração do DNA e da carga parasitária do animal (IKONOMOPOULOS et al., 2003). A PCR é um exame excelente no que diz respeito à especificidade e à sensibilidade que pode ser usado como método qualitativo, especialmente em presença de resultados sorológicos duvidosos (CAMPILLO et al., 1999). Por outro lado, também tem utilidade como método quantitativo através da técnica real-time PCR (RT-PCR) (GOMES et al., 2008).

2.5 GEORREFERENCIAMENTO ASSOCIADO A EPIDEMIOLOGIA E AO DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES.

Os recentes avanços na tecnologia, principalmente no desenvolvimento dos Sistemas de Informações Geográficas (SIG), favoreceu a reincorporação do lugar e do espaço como variáveis de relevância nas análises epidemiológicas (BARATA e WERNECK, 2012).

Os estudos que objetivam avaliar as relações entre saúde e espaço devem priorizar características relacionadas a uma população e ao ambiente onde estas estão inseridas (SOUZA-SANTOS et al., 2008; BRASIL, 2014). De acordo com Barata e Werneck (2012), estudos embasados na correlação geográfica, permitem uma melhor compreensão análises epidemiológicas, pois permitem analisar a relação espacial de eventos voltados à saúde comparando com características ambientais, socioeconômicas e demográficas.

Através da análise espacial torna-se possível identificar diferentes localidades dentro de um mesmo município com taxa de frequência e incidência semelhantes, o que indica que casos de Leishmanioses podem não estar concentrados em uma única região, mas dispersos por todo o município (MARQUES, 2017). Alguns estudos têm sido realizados e constataram que o diagnóstico geográfico da dispersão espacial das Leishmanioses pode auxiliar na implementação de ações diferenciadas para a prevenção e controle destas enfermidades dentro de um mesmo município (TEIXEIRA-NETO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015; MARQUES, 2017)

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASI, M.; LOTFI, P.; BAZMANI, A.; MATINI, M.; HAJILOOI, M. Evaluation of FcgammaRIIIB-NA1/NA2 polymorphism in visceral leishmaniasis. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, ed. 16, p. 12437. 2014

ABID, M.; KALBANTNER, K.; MISCHKE, R. Platelet function in dogs with bacterial infections and leishmaniasis. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift Journal**. v.128, n.7-8, p.289-96, 2015.

AFONSO, M. O.; ALVES-PIRES, C. Bioecologia dos vectores. In G.M. Santos-Gomes e I.M. Pereira da Fonseca (Eds.), Leishmaniose canina. **Lisboa: Chaves Ferreira Publicações**. p. 27-40, 2008

AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and

dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Disease**. ed. 10, p. 0004349. 2016

AL-BAJALAN, M. M. M.; NIRANJI, S. S.; AL-JAF, S. M. A.; & KATO, H. First identification of *L. major* in a dog in an endemic area of human cutaneous leishmaniasis in Iraq: molecular and phylogenetic studies. **Parasitology Research**, ed 117, v. 2, p 585–590, 2017.

ALCÂNTARA, A.C. **ELISA indireto e mkDNA PCR-RFLP para o diagnóstico e avaliação da infecção por *Leishmania* sp. em reservatórios domésticos (cães) e silvestres (marsupiais) em Barrado Pojuca, Camaçari, Bahia**. Dissertação (Mestrado), Programa de pós graduação em Ciência Animal nos Trópicos Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, 126p. 2006.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J. et. al. WHO. Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**. 2012

ALVES, BEVILACQUA. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004

ANDRADE, M.S. et al. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, p.229-233, 2005.

ANDRADE, M.S. et al. Novo surto de Leishmaniose Tegumentar Americana em área de treinamento militar na Zona da Mata norte do Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.5, p.594-596, 2009

ARIAS, J. R.; NAIFF, R. D.; MILES, M. A.; SOUZA, A. A. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, n.4, p.537-541, 1981.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in 35 Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.

AZEVEDO, M.A.A. **Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Canina em Pexoréu MT**, Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 464if., 2004.

BARATA, R. B.; WERNECK, G. Epidemiologia & Saúde: Observação e registro dos fenômenos epidemiológicos (tempo, espaço, indivíduos e populações). **In: Almeida Filho N., Barreto M. L. Epidemiologia & Saúde: fundamentos, métodos, aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.127-149, 2012

BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G.; BASTOS, F.I.; XIMENES, R.A.A.; BARATA, R.B.; RODRIGUES, L.C.. Sucessos e Fracassos no Controle de Doenc ,as Infeciosas no

Brasil: O Contexto Social e Ambiental, Políticas, Intervenções e Necessidades de Pesquisa. **Lancet – Saúde no Brasil**. ed. 3, p. 47–60, 2011

BARROS, et al. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.106, p. 419-423, 2012

BREDOR, C. N. G. **Sequenciamento e caracterização de genes identificados como codificantes para proteínas antigênicas de *Leishmania chagasi***. 75 f. Recife, PE. Dissertação (Mestrado em genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

BELO, V.S.; WERNECK, G.L.; BARBOSA, D.S.; SIMÕES, T.C.; NASCIMENTO, B.W.L.; DA SILVA, E.S. et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in the Americas: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Disease**; ed. 2182, 2013

BEVILACQUA, P.D. et al. Urbanização da Leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.1-8, 2001

BRANDÃO-FILHO, S.P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.93, p. 488-494. 1999

BRANDÃO, E; ROMERO, S.; SILVA, M.A.L.; SANTOS, F.L.N; Neglected tropical diseases in Brazilian children and adolescents: data analysis from 2009 to 2013. **Infectious Diseases of Poverty** ed. 6, p. 154, 2017

BRASIL- Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, 494p. 2002

BRASIL. Ministério da Saúde (MS)/Secretaria de vigilância em Saúde (SVS). Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 120p. 2006

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 182p. 2007

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Introdução à Estatística Espacial para a Saúde Pública. **Série Capacitação e Atualização em Geoprocessamento em Saúde**. Brasília, v. 3, p. 120, 2007.

BRASIL. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação**. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 120 p. 2014

BRASIL. **Guia de orientação para vigilância de leishmaniose visceral canina (LVC)**. Santa Catarina. 2015

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ed. Ministério da Saúde; 2017

BRITO, M.E.; ANDRADE, M.S.; DANTAS-TORRES, F.; RODRIGUES, E.H.; CAVALCANTI, M. P.; DE ALMEIDA, A.M.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. ed 45(4), p. 425-9, 2012.

BRITO, M.E.F.; ANDRADE, M.S.; MENDONÇA, M.G.; SILVA, C. J., ALMEIDA, E.L.; LIMA, B.S.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Tropical Medicine & International Health*. ed. 14(10), p. 1278–1286, 2009

CALDART, E.T, et al. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. Jaboticabal, vol.26 n.1, Jan./Mar. 2017

CAMPBELL-LENDRUM, D.; DUJARDIM, J-P.; MARTINEZ, E.; FELICIANGELI, M. D.; PEREZ, J. E.; SILANS, L. N. M. P. et al. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.96, p. 62-159, 2001

CAMPILLO, M.C. et al. **Parasitologia Veterinaria**. 1.ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, p.651-665, 1999

CAMPOS, R. M. **Caracterização molecular de antígenos de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* potencialmente úteis no controle da leishmaniose visceral**. 114f. Recife, PE. Dissertação (Mestrado), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2007.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 128, p 67-70, 2009.

CORREDOR, A.; GALLEGO, J. F.; TESH, R., B.; PELÁEZ, D.; DIAZ, A.; MONTILLA, M.; PALÁU, M., T. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.83, p.195, 1989

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-

specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, p.12-17, 2004

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

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, 2010.

DANTAS-TORRES; F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**. ed. 40, p. 537-41, 2006

DEANE, L.M. **Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará**. 1956. 162 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

DELGADO, O.; CASTES, M.; WHITE JR, A.C.; KREUTZER, R.D.; Leishmania colombiensis in Venezuela. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene** 48, 145-147,1993.

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**. v. 44(1), p. 200, 2010.

ECKERT, B.S. **Tratamento de leishmaniose visceral canina – Revisão bibliográfica**. Monografia (graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.

ESPINOSA, O.A.; SERRANO, M.G.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.G.; SHAW, J.J. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. *Parasitol*. 2016.(In press). found in Brasília, Federal District, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.2, p.297-299, 2016.

FERREIRA, E.C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A.B.; PAES, D.V.; SILVA, E.S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C.M.F. Comparison of serological assays for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**. v.146, p. 235-241, 2007.

FONTES, S.D.; SILVA, A.S.A. Leishmaniose visceral canina. **Anais III SIMPAC**. v.3, n.1, p.285-290, Viçosa-MG, 2011.

FREHSE, M.S.; GRECA JÚNIOR, H.; ULLMANN, L.S.; CAMOSSO, L.G.; MACHADO, J.G.; LANGONI, H.; BIONDO, A.W.; MOLENTO, M.B. Surveillance of canine visceral leishmaniasis in a disease-free area. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, p.62-64, 2010.

FREITAS, T. P.; D'ANDREA, P. S.; PAULA, D. A.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; BONVICINO, C. R.; ALMEIDA, A. D. O. B.; BOA-SORTE, E. D. A. C.; SOUSA, V. R. Natural infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.12, n.1, p.81-83, 2012.

GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: las leishmaniosis. **Revue Scientifique et Technique Office International Epizootie**, v.23, n.2, p. 661- 676, 2004.

GAMA, M. E.; COSTA, J. M.; PEREIRA, J. C.; GOMES, C. M.; CORBETT, C. E. Serumcytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Brazilian journal of medical and biological research**, v.37, n.1, p.129–136, 2004.

GIL, J. F.; NASSER, J. R.; CAJAL, S. P.; JUAREZ, M.; ACOSTA, N.; CIMINO, R. O. et al. Urban transmission of American cutaneous leishmaniasis in Argentina: spatial analysis study. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v.82, p. 40-433, 2010.

GÓES, M.A.O.; MELO, C.M.; e JERALDO, V.L.S. Série temporal da leishmaniose visceral em Aracaju, estado de Sergipe, Brasil (1999 a 2008): aspectos humanos e caninos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. ed.15(2), p. 298–307, 2012.

GOMES, Y.M. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, v.175, p. 45-52. 2008.

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.

GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; SINCLAIR, D.; FIROOZ, A.; ENK, C.; VÉLEZ, I. D.; ESTERHUIZEN, T. M.; TRISTAN, M.; ALVAR, J. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. 2015.

GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Elsevier/Saunders, 4. ed. 2012.
GRIMALDI Jr., G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Review**, v. 6, p.230-250. 1993.

GRIMALDI, J.R., G.; TEVA, A., FERREIRA, A.L.; DOS SANTOS, C.B.;PINTO, I.S.;AZEVEDO, C.T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromato- -graphic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPPíCVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** . v.106 (1), p.54-59, 2012.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L; COSTA, C.H.N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**. ed.27, p. 403-409, 2011.

HERRER, A. Estudios sobre leishmaniasis tegumentaria en el Perú e Visceral Leishmaniasis natural en perros procedentes de localidades utugenas. **Revista de Medicina Experimental e Salut**. v.8, p. 87-117, 1951

HERRER, A.; CHRISTENSEN, H.A.; Natural cutaneous leishmaniasis among dogs in Panama. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 25, p. 59–63, 1976

HEUSSER-JÚNIOR, A. F.; BELLATO, W.; DE SOUZA, A. P.; DE MOURA, A. B.; SARTOR, A. A.; SANTOS, E. G. O. B.; SILVA, V. L. Leishmaniose tegumentar canina no Município de Balneário Camboriú, Estado de Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 713-716, 2010.

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

IKONOMOPOULOS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of the traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 99–113, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Divisão Territorial do Brasil e Limites Territoriais**. Disponível em <ftp://geoftp.ibge.gov.br/> Acesso em dezembro de 2018.

KARAKUŞ, M.; TÖZ, S.; ERTABAKLAR, H.; PAŞA, S.; ATASOY, A.; ARSERIM, S. K.; ÖLGEN, M. K.; ZIYA ALKAN, M.; DURRANT, C.; ÖZBEL, Y. Evaluation of conjunctival swab sampling in the diagnosis of canine leishmaniasis: A two-year follow up study in Cukurova Plain, Turkey. **Veterinary Parasitology**, 2015.

KASSAHUN, A.; SADLOVA, J.; DVORAK, V.; KOSTALOVA, T.; ROHOUSOVA, I.; FRYNTA, D.; AGHOVA, T.; YASUR-LANDAU, D.; LEMMA, W.; HAILU, A.; BANETH, G.; WARBURG, A.; VOLFF, P.; VOTYPKA, J. Detection of *Leishmania donovani* and *L. tropica* in Ethiopian wild rodents. **Acta Tropica**, v.145, p.39-44, 2015.

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

KUHLS, K. et al. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, v.7, p. 1224-1234, 2005.

LAINSON, R; SHAW, J. J; SILVEIRA, F. T; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. Ed. 81(3) p.517; 1987.

LAINSON, R; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**; ed. 273(5664); p. 595–600; 1978.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and 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.; MILES, M. A.; POVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: Enzymatic characterization of a *Leishmania* from the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (Edentata), from Pará State. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v.76, n.6, p. 810-811, 1982.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In: COX, F. E. G.; KREIER, J. P.; WAKELIN, D. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. **Parasitology**. Arnold: London, p.242-266, 1998.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; READY, P. D.; MILES, M. A.; PÓVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. Braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, n.4, p.530-536, 1981.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. The Role of Animals in the Epidemiology of South American Leishmaniasis. In: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), Biology of the Kinetoplastida, **Academic Press, London, New York & San Francisco**. v. 2, p. 1–116, 1979.

LAINSON, R.; BRAGA, R. R.; SOUZA, A. A. A.; POVOA, M. M.; ISHIKAWA, E. A. Y.; SILVEIRA, F. T. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v.64,n.3, p.200-207, 1989.

LEITE, C. E. A. Leishmaniose visceral humana em Pernambuco: epidemiologia e gastos com internações hospitalares, 59 f.: il. **Dissertação (Mestrado em Gestão e Economia da Saúde)** – Universidade Federal de Pernambuco, CCSA, 2016.

LIMA, V.M.F.; BIAZZON, L.; SILVA, A.C.; COR RÊA, A.R.F.L.; LUVIZOTTO, M.C.R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.4, p.215-218, 2005.

LINS, T.N.B.; SOUZA, I.B; DE BARROS, G.M.M; SANTOS, R.A. C., ALVES, L.C; RAMOS, R.A.N. Seroprevalence and spatial distribution of canine leishmaniasis in an endemic region in Brazil: how has the situation changed after 10 years? **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, ed. 51(5), p. 680–682, 2018.

MAGNO.S.S. **Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) submetidos a um protocolo terapêutico em uma Clínica Veterinária de Belo Horizonte**. [Dissertação]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

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

MARCONDES, M.; LIMA,V.M.F; ARAÚJO, M. F. L.; HIRAMOTO, R. M.; TOLENZANO, J. E.; VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. **Veterinary Parasitology**, v.91, p.649-652, 2013.

MARQUES, G.D. **Análise Espacial dos Casos de Leishmaniose Visceral Canina no Município de Itaqui (2009-2016)**. Dissertação (Mestrado). 57 p. - Universidade Federal do Pampa, Mestrado Em Ciência Animal, 2017.

MATUTE, A.M. et al. Etiología, biología y epidemiología. **Canis et Felis**, v.89, 6-18. 2007.

MAURICIO, I.L. et al. Genetic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v.119, p. 237-246, 1999.

MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COELHO, M. V.; DIAS, M.; MARTINS, A. V.; MAGALHAES, P. A.; DA COSTA, C. A.; FALCAO, A. R.; MELO, M. N.; FALCAO, A. L. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais. Brazil. **Annals of Tropical Medicine Parasitology**. v.73, p. 123–137, 1979.

MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.23, s. 1, 2004.

MENCKE, N. et al. Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sandflies (*Phlebotomus papatasi*) on dogs. **Parasitology Research**. v.90, p.108–111. 2003.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MIRANDA, T. M.; MALAQUIAS, L.C.; ESCALDA, P. M.; RAMALHO, K.C.; COURA-VITAL, W.; SILVA, A.R. et al. Descriptive study of American tegumentary leishmaniasis in the urban area of the municipality of Governador Valadares, Minas Gerais state, Brazil. **Revista Pan-Americana de Saude**. v.2, p. 27-35, 2011

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

MORENO J, AVAR J. Canine leishmaniasis epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 399-405, 2002.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v.366, n.9496, p.1561–1577, 2005.

NASCIMENTO, J.O. Trabalho de conclusão de residência em medicina veterinária preventiva - doenças parasitárias, 75 f.: – Universidade Federal Rural de Pernambuco, DMV, 2018.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

OLIVEIRA, A. C. et al. Canine visceral leishmaniasis case investigation in the Jacaré region of Niteroi, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical.** São Paulo, v. 57, p. 325-332, 2015.

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

OPA. Organização Pan-Americana da Saúde. **Informe Leishmanioses** Nº 5, 2017.

PAHO (2017). Pan-American Health Organization. Informe Epidemiológico das Américas Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34113/informe_leishmanioses_5_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em outubro de 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. **Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas.** Organización Panamericana de la Salud. Ed. Panaftosa, p.152. 2006.

PAIZ, L.M.; FORNAZARI, F.; MENOZZI, B. D.; OLIVEIRA, G. C.; COIRO, C. J.; TEIXEIRA, C. R.; CAMPANUCCI da SILVA, V. M.; DONALISIO, M. R.; LANGONI, H. Serological Evidence of Infection by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Synonym: *Leishmania (Leishmania) chagasi*) in Free-Ranging Wild Mammals in a Nonendemic Region of the State of São Paulo, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.15, n.11, p.667-673, 2015.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L.; SANTOS, W.C.; GRIMALDI JÚNIOR, G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine**, v.55, p.39-44, 1996.

PAŞA, S.; TETİK-VARDARLI, A.; EROL, N.; KARAKUŞ, M.; TÖZ, S.; ATASOY, A.; BALCIOĞLU, I. C.; EMEK-TUNA, G.; ERMIŞ, Ö. V.; ERTABAKLAR, H.; ÖZBEL, Y. Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. **Veterinary Parasitology**, v.212, n.3-4, p.389-392, 2015.

PASSOS, V. M. A; BARRETO, S. M.; ROMANHA, A. J.; KRETTLI, A. U.; VOLPINI A. C.; GONTIJO, C. M. F. et al. Leishmaniose tegumentar na Região Metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos (1989-1995). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 34, p. 5-12, 2001.

PEDROSA, A.M. Leishmaniose local do cão. **Anais Paulistanos de Medicina e Cirurgia.** v. 1, p 33-39, 1913.

PITTNER, E.; VOLTARELLI, E.; PERLES, T. F.; ARRAES, S. M. A. A.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C. Ocorrência de Leishmaniose Tegumentar em cães de

área endêmica do Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 561-565, 2009.

REITHINGER R.; LAMBSON, B. E.; BARKER, D. C.; DAVIES, C. R. Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) sp. in dog blood and bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p. 748-51, 2000

RIBEIRO. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Revista Clínica Veterinária**, v. 71, p.66-76. 2007.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; MARSON, P. M.; HAYASAKA, E. Y.; VICTORIA, C.; SILVA, R. C.; LANGONI, H. Molecular detection of *Leishmania* spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. v.20, p.27, 2014.

RODRÍGUEZ, E. M.; DÍAZ, F.; PÉREZ, M. V. Spatio-temporal clustering of American cutaneous leishmaniasis in a rural municipality of Venezuela. **Epidemics**. v.5, p. 9-11, 2013.

ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America – a systematic review. **Plos Neglected Tropical Disease**. v.4, ed. 584, 2010.

RONDON, F.C.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; FRANKE, C.R.; BARROS, R.S.; OLIVEIRA, F.R.; ALCÂNTARA, A.C.; DINIZ, A.T, Cross-sectional serological study of canine Leishmania infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Veterinaire Parasitaire**, v.155, p.24-31,2008.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Imunologia. **Ed. Manole**. 5ª. Edição, São Paulo, 1999.

ROSSETO, A. L.; EGER-MANGRICH, I.; FAYAD, L.; MACHADO, D. S. B.; SPECH, C. M.; MORAES, M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: estudo clínico e epidemiológico de 50 casos autóctones no Vale do Itajaí, SC. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 39, p. 134, 2006.

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

SANTOS, J.M.T; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M.R.F.; LINO, F.R.L; ANDRADE, L.S.S.; SOUZA, R.C.A; BRITO, F.L.C; BRITO, M.E.F.; BRANDÃO-FILHO, S.P; SIMÕES-MATTOS, L. Prevalência de anticorpos antileishmania spp em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.43, n.1, 2010.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R. R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A. R.; FRANK, G. R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, v.104, p.275- 285, 2002.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Versão eletrônica. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf> Acesso em outubro de 2018.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde Brasil 2011: uma análise da situação de saúde e a vigilância da saúde da mulher.** Editora MS; Brasília. 2012.

SHERLOCK, I. A. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (*Marsupialia Didelphidae*) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 511, 1984.

SHERLOCK, I. Notas sobre a transmissão da Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 16, n. 1, p. 19-26, 1996

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; HONER, M.vR. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral Americana, em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, p. 420–425, 2007.

SILVA, E.S.; VANDER MEIDE, W.F.; SCHOONE, G.J.; GONTUO, C.M.F.; SCHALLIG, H.D.F.H.; BRAZIL, R.P. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. **Veterinary Research Communication**, v.30, p.637-643, 2006.

SILVA, F. T. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v.1, n.1, p.20. 2007.

SILVEIRA, F. T.; ISHIKAWA, E. A. Y.; SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon Region. **Parasite**, v.9, p.43-50, 2002.

SOUZA-SANTOS, R. et al. Spatial heterogeneity of malaria in Indian reserves of Southwestern Amazonia, Brazil. **Internacional Journal of Health Geographics**, v. 7, p. 55, 2008.

SOLANO-GALLEGO, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. ed.165, p. 1-18, 2009.

SOUZA, Z.C.; BRANDESPIM, D.F.; AGRA, M.C.R.; SIMÕES-MATOS, L. Leishmaniose visceral canina e humana em Caruaru, Pernambuco, no período de 2005 a 2010. **Revista de Patologia Tropical**. Vol. 43, ed (1), p. 57-68. jan.-mar. 2014.

TAFURI, W.L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n.1-2, p. 17–23, 2004.

TARTAROTTI, A. L.; DONINI, M. A.; DOS ANJOS, C.; RAMOS, R. R. Vigilância de reservatórios caninos. **Boletim Epidemiológico**, v. 13, n. 1, p. 5-6, 2011.

TEIXEIRA-NETO, R. G. et al. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. **Parasites & Vectors**, v. 7, 2014.

TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniasis. **Parasitaire Resource**, v.164, n.2/4, p.118-123, 2011.

TRAVI, B. L.; FERRO, C.; CADENA, H.; MONTOYA-LERMA, J.; ADLER, G. H. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. **Research in Veterinary Science**, v.72, n.1, p.83-86, 2002.

TRONCARELLI, M.Z.; CAMARGO, J.B.; MACHA DO, J.G.; LUCHEIS, S.B.; LANGONI, H. Leishmania spp. and/or Trypanosoma cruzi diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinaire Parasitaire**, v.164, p.118-123, 2009.

TRUPPEL, J. H. **Avaliação do parasitismo em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e sua atuação como hospedeiro intermediário de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii***. 119f, Curitiba, PR. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

VALE, E.C.S. e FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. ed.80(4), p.421-428, 2005.

VIOL, M. A.; LIMA, V. M. F.; AQUINO, M. C. C.; GALLO, G.; ALVES, I.P.; GENEROSO, D.; PERRI, S. H.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H.; NUNES, C. M.; BRESCIANI, K, D. S. Detection of cross infections by Leishmania spp. and Trypanosoma spp. in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Parasitology Research**. v.111, n.4, p.1607-1613, 2012.

VOLTARELLI, E.M et al. Serological survey for Leishmania sp. infection in wild animals from the municipality of Maringá, Paraná State, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v.15, n.4, p.732-744, 2009.

WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 24, p. 40-2937. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO 2017). Geneva: Leishmaniasis—Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em Outubro de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly Epidemiological Records**. v. 91, 96-287, 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Test Performance. ed. 1, n. 4, p. 45, 2011. Disponível em: < https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&alias=1405-avaliacao-testes-rapidos-para-o-diagnostico-da-leishmaniose-visceral-oms-tdr-5&category_slug=leishmanioses-978&Itemid=965 > Acesso em Dezembro de 2018.

4 .OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar através de métodos sorológico, molecular e de georreferenciamento, a infecção por *Leishmania* spp em cães no município de Exu, Pernambuco, Brasil.

4.2 ESPECÍFICOS

- Pesquisar no Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Educação, a quantidade de casos humanos de Leishmaniose Visceral e Tegumentar notificados no município de Exu nos últimos 5 anos.
- Georreferenciar os casos humanos dentro da localidade.
- Realizar inquérito sorológico em caninos pertencentes às zonas urbana e rural do município de Exu.
- Identificar molecularmente *Leishmania* spp. em amostras biológicas coletadas a partir de caninos domésticos pertencentes às zonas urbana e rural do município de Exu.
- Georreferenciar os cães infectados.

CAPÍTULO I

**CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA, MOLECULAR E ESPACIAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* spp. NO MUNICÍPIO DE
EXU, PERNAMBUCO, BRASIL.**

**CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA, MOLECULAR E ESPACIAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* spp NO MUNICÍPIO DE
EXU, PERNAMBUCO, BRASIL.**

**SEROLOGICAL, MOLECULAR AND SPATIAL CHARACTERIZATION OF
DOGS NATURALLY INFECTED BY *Leishmania* spp. IN THE MUNICIPALITY
OF EXU, PERNAMBUCO, BRAZIL.**

RESUMO

O estado de Pernambuco é historicamente endêmico tanto para Leishmaniose Visceral (LV) quanto para Leishmaniose Tegumentar (LT). O cão doméstico ainda é incriminado como sendo o principal hospedeiro urbano para *Leishmania infantum* e de significativa na transmissão de *Leishmania brasiliensis*, espécies que causam quadros de LV e LT, respectivamente. O município de Exu, estado de Pernambuco, registrou na zona urbana e rural, um total de 27 casos de LV e LT em humanos nos últimos 5 anos (2013-2018). Com o objetivo de identificar espécies de *Leishmania* em caninos urbanos no município de Exu, foram coletadas amostras de sangue total e soro de 260 cães (255 da zona urbana e 5 da zona rural), realizado inquérito sorológico através do teste imunocromatográfico DPP® LVC (BioManguinhos), feita análise molecular de *Leishmania* spp., *L. (L.) infantum* e *L. (V.) brasiliensis* por PCR convencional e procedido georreferenciamento desses cães infectados. Através do georreferenciamento dos cães infectados, foi possível concluir que a Leishmaniose Visceral Canina no município de Exu está intimamente relacionada aos casos de LV em humanos e representam um caráter de vigilância para os locais onde as doenças ainda não são incidentes mesma área.

Palavras chaves: caninos; georreferenciamento; saúde pública, vigilância

ABSTRACT

The state of Pernambuco is historically endemic for both Visceral Leishmaniasis (LV) and Tegumentary Leishmaniasis (LT). The domestic dog is still incriminated as being the main urban host for *Leishmania infantum* and significant in the transmission of *Leishmania brasiliensis*, species that cause LV and LT frames, respectively. The municipality of Exu, state of Pernambuco, recorded in the urban and rural areas, a total of 27 cases of LV and LT in humans in the last 5 years (2013-2018). In order to identify *Leishmania* species in urban canines in the city of Exu, total blood and serum samples were collected from 260 dogs (255 from the urban area and 5 from the rural area). A serological survey was performed using the DPP® LVC immunochromatographic test, made molecular analysis to (*L.*) *infantum* and *L. (V.) brasiliensis* by conventional PCR and proceeded georeferencing of these infected dogs. Through the georeferencing of the infected dogs, it was possible to conclude that Visceral Canine Leishmaniasis in the municipality of Exu is closely related to the cases of LV in humans and represent a surveillance character for the places where the diseases are not yet incident the same area.

Keywords: canines; georeferencing; public health, surveillance

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses ainda são um grande problema de saúde pública nas Américas, sendo consideradas doenças tropicais antropozoonóticas negligenciadas (KASZAK et al. 2015). São doenças de transmissão vetorial de caráter complexo que envolve diferentes espécies de parasitos, reservatórios e vetores (ALVES e FAUSTINO, 2005; PAHO/WHO, 2017).

No Brasil, são reconhecidas pelo menos oito espécies de *Leishmania* capazes de infectar animais domésticos, silvestres e seres humanos causando quadros patogênicos de Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT) (LAISON e SHAW, 1978; LAISON et al. 1987, BREDOR, 2003), tendo como principais espécies envolvidas a *Leishmania (Leishmania) infantum* e *L. (Viannia.) braziliensis*, respectivamente (VALE, 2005).

Nos últimos anos ocorreram alterações no perfil de transmissão, e hoje a LV encontra-se urbanizada em várias cidades brasileiras de médio e grande porte com a interação da interface silvestre, sinantrópica e ambiente domiciliar (GOES et al. 2014), tendo o cão como principal reservatório nos centros urbanos (LAINSON e RANGEL, 2005; BELO et al. 2013). Por outro lado a domiciliação da transmissão da LT tem sido sugerida pela associação observada entre a infecção em humanos e animais domésticos, como cães e outros animais que vivem ambientes peridomésticos (PITTNER et al. 2009; BRITO, 2009; DANTAS-TORRES et al, 2010).

A utilização de técnicas sorológicas e moleculares no diagnóstico da LV e LT em animais que participam da cadeia epidemiológica de transmissão tem sido utilizado com sucesso na detecção de casos novos e inquéritos epidemiológicos, sendo importante no monitoramento da infecção nas diversas regiões do Brasil (DANTAS-TORRES et al, 2010, LINS et al, 2018).

Por outro lado, o georreferenciamento da infecção nas diversas espécies tem sido uma ferramenta importante na compreensão de variantes epidemiológicos, pois permitem avaliar a relação espacial de eventos voltados à saúde comparando com características ambientais, socioeconômicas e demográficas (BARATA e WENECK, 2012; LINS et al, 2018) facilitando deste modo o entendimento da dispersão e o comportamento da doença no tempo e no espaço de uma mesma localidade (SOUZA-SANTOS, 2008; BRASIL, 2014).

O Estado de Pernambuco é historicamente endêmico para LV (LEITE, 2016) e LT é em diversas mesorregiões (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; ANDRADE et al.,

2005; ANDRADE et al., 2009, BRASIL, 2011), com a participação efetiva na cadeia epidemiológica de ambas o cão doméstico (DANTAS-TORRES et al, 2010).

Contudo o estado de Pernambuco ainda carece de mais estudos que relacionem a dispersão geográfica de espécies causadoras de Leishmanioses e casos humanos em áreas endêmicas. Sendo assim esse trabalho teve como objetivo a caracterização sorológica, molecular e espacial de cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. no município de Exu, Pernambuco, Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de Estudo

O Estudo foi realizado no município de Exu (07°30'43"S 39°43'27"O), estando a uma altitude de 523 metros, na região do sertão do Araripe, na divisa entre os estados de Pernambuco e Ceará, nordeste do Brasil (IBGE, 2018). (FIGURA 1)

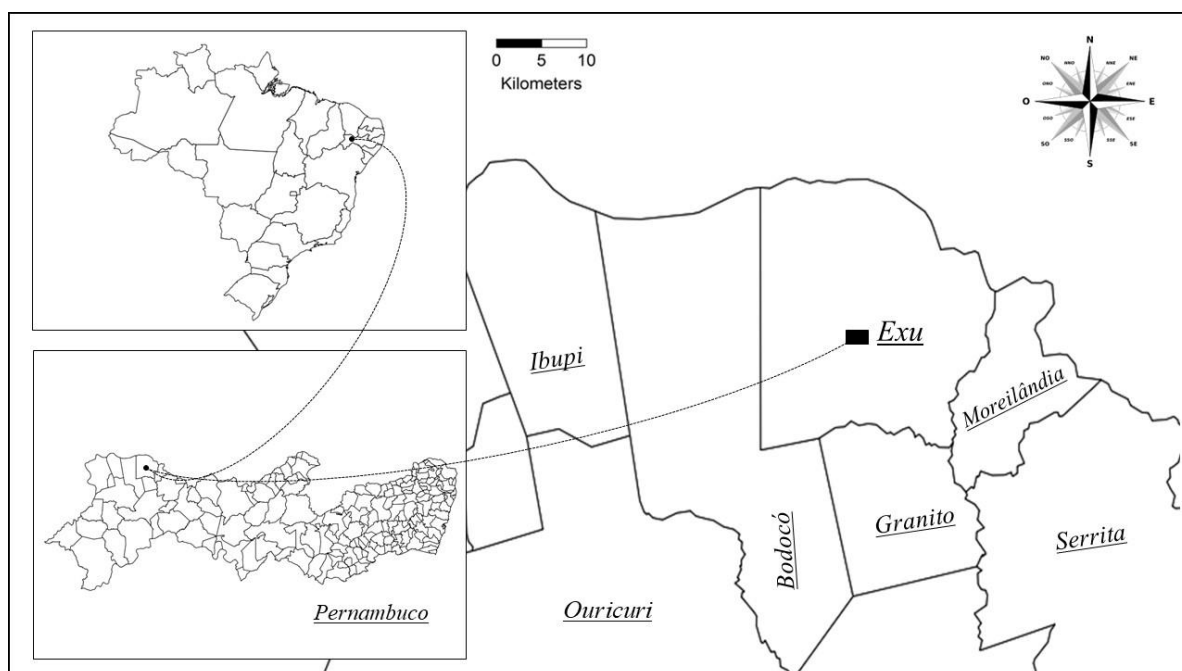


Figura 1 – Localização geográfica do município de Exu.

2.2 Tipo de Estudo

Inicialmente foi realizada através da busca ativa nos dados do Sistema de Informação de Agravos e notificações (SINAN), fornecida pela Secretaria Estadual de

Saúde de Pernambuco, para identificação as áreas de ocorrência de casos de LV E LT em humanos no município de Exu.

2.3 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos aqui realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE.

2.4 Animais Estudados

Após a coleta de dados do SINAN, e a identificação dos locais, foram realizadas as coletas em cães diferentes raças e idades, entre machos e fêmeas em ambientes domiciliares, peridomiciliares em um raio de 1 km da(s)residência(s). Os tutores foram informados sobre os objetivos da pesquisa, assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1).

2.5 Coleta de amostras biológicas e triagem dos cães

Foram coletadas, de maneira asséptica, amostras de sangue por venopunção jugular, cefálica ou safena lateral. As amostras foram distribuídas em 2 tubos de ensaio, sendo 1 tubo sem anticoagulante e outro tubo com solução anticoagulante, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Em seguida foi realizada uma triagem através de testagem sorológica via imunocromatografia utilizando o Teste Rápido DPP® LVC (BioManguinhos).

2.6 Diagnóstico Molecular

2.6.1 Extração de DNA de sangue total

O material coletado foi congelado e mantido a temperatura de -20°C para posterior extração de DNA. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o Kit DNeasy Blood (QiagenR Hilden-Germany), de acordo com as instruções do fabricante.

2.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador da seguinte maneira:

Leishmania spp:

1 ciclo D 94°C – 5 min.; A 65°C – 1 min; E 72 °C – 1 min., 29 ciclos D 94°C – 1 min.; A 65°C – 1 min; E 72°C – 1 min. e E final 72°C – 5 min. Os primers utilizados para a PCR de *Leishmania* spp (L1 e L2) foram os descritos por Michalsky et al. (2002): L1: (5' – GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA – 3') e L2: (5' – GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC – 3').

L. (Leishmania) infantum:

1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 60 °C por 20 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os primers utilizados foram os MC1: (5' – GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG – 3') e MC2: (5' – CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG – 3'), descritos por Cortes et al. (2004), que permitem à amplificação de 447 pares de base do DNA.

L. (Viannia) braziliensis:

1 ciclo D 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos D a 94°C por 60 segundos, anelamento a 60,5° C, extensão a 72°C por 60 segundos e extensão final a 72° C por 10 minutos. Os primers utilizados para a PCR de *Leishmania (Viannia) brasiliensis* foram como descritos por Reithinger et al (2000): B1 (5'- GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG – 3') e B2 (5'- CTA ATT GTG CAC GGG GAG G 3').

Os produtos amplificados foram analisados por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 2% em um tampão TAE 1X, utilizando o corante BlueGreen®, usando marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder - GibcoBRL-Life Technologies, MD, USA). Posteriormente, os géis foram visibilizados e analisados por meio de um transiluminador ultravioleta acoplado a um computador com software de imagens.

2.7. Georreferenciamento

Todos os cães infectados por *Leishmania* spp. na análise molecular foram georreferenciados utilizando o sistema de posicionamento global GARMIM GPSMAP 76 (Olathe, KS, USA) e as coordenadas geográficas ajustadas para a região próxima de onde as mesmas ocorreram com a ajuda do programa Google Earth® (Mountain View, CA, USA). Um banco de dados foi utilizado para armazenar e organizar estas informações. Após o georreferenciamento, estes dados foram utilizados no programa ArcGIS™ versão 10.0, para a confecção de mapa e análise espacial da ocorrência da doença.

3. RESULTADOS

Segundo as fichas do SINAN, o município de EXU, durante os anos de 2013 a 2018 notificou 27 casos de Leishmanioses, sendo sete de Leishmaniose Visceral (LV) e 20 de Leishmaniose Tegumentar (LT), dispersos na zona urbana e rural. (BRASIL, 2018).

Do total de casos humanos notificados das Leishmanioses durante os anos de 2013 a 2018, 66,6% (18/27) se concentram na zona rural, enquanto que 33,3% (9/27), se concentram na zona Urbana. Na apresentação visceral da doença, 42,8% (3/7) dos casos se concentraram na zona urbana do município, enquanto que 57,1% (4/7) foram notificados na zona rural. Já em se tratando de LT, apenas 20% (4/20) dos casos estavam concentrados na área urbana do município, enquanto que 80% (16/20) se concentram na zona rural (TABELA 1).

Do total de casos humanos notificados das Leishmanioses durante os anos de 2013 a 2018, 70,3% (19/27) se concentram na zona rural, enquanto que 29,6% (8/27), se concentram na zona Urbana. Na apresentação visceral (LV) da doença, 42,8% (3/7) dos casos se concentraram na zona urbana do município, enquanto que 57,1% (4/7) foram notificados na zona rural. Já em se tratando de forma tegumentar (LT), apenas 25% (5/20) dos casos estavam concentrados na área urbana do município, enquanto que 75% (15/20) se concentram na zona rural.

Tabela 1: Distribuição geográfica dos casos humanos de LT e LV no município de Exu, Pernambuco.

Bairro/ Sítio	Apresentação clínica		Zona
	LV	LT	
Centro	2	3	Zona Urbana
Wilson. M. Saraiva	1	1	Zona Urbana
Vila N. Senhora		1	Zona Urbana
Cacimbas	1	2	Zona Rural
Ingá	1		Zona Rural
Timorante	2		Zona Rural
Raquel		1	Zona Rural
Canto Alegre		1	Zona Rural
Zé Gomes		2	Zona Rural
Estancinha		1	Zona Rural
Serra do Bucei		1	Zona Rural
Serra da Arara		2	Zona Rural
Matosinho		1	Zona Rural
Barrinha		1	Zona Rural
Serra da Inveja		1	Zona Rural
Gadelhas		1	Zona Rural
Gravatá		1	Zona Rural
TOTAL	7	20	

Adaptado de Brasil (2018)

Dos 260 cães analisados (255 da zona urbana e 5 da zona rural), 27,84% (71/255) e 40% (2/5) foram reagentes ao teste imunocromatográfico. Uma vez realizada a triagem, todas as 71 amostras dos cães reagentes na imunocromatografia tiveram seu DNA extraído e foram submetidas ao diagnóstico molecular.

Das 71 amostras analisadas, 22 tiveram seu DNA amplificado para *Leishmania* spp, sendo 21 amostras da zona urbana e 1 na zona rural. Das 22 amostras amplificadas para *Leishmania* spp., 21 tiveram seu DNA amplificado para *L. (Leishmania) infantum*, sendo 20 amostras pertencentes a 20 cães de 4 bairros da zona urbana e 1 amostra pertencente a 1 cão de 1 sítio da zona rural. Nenhuma amostra teve seu DNA amplificado para *L. (Viannia) brasiliensis* e 1 amostra não amplificou nenhum dos dois primers (TABELA 2).

Tabela 2: Número de cães infectados com *Leishmania infantum* no Município de Exu, Pernambuco, Brasil.

Zona	Bairro/Sítio	Nº de cães infectados com <i>L. infantum</i>
Urbana	Gonzagão	2
	N. Sra. Aparecida	6
	Wilson. M. Saraiva	10
	Centro	2
Rural	Cacimbas	1
TOTAL	5	21

A maior densidade de cães infectados por *Leishmania infantum* no município de Exu se deu na zona urbana, principalmente nos bairros Wilson Moreira Saraiva, seguindo pelos bairros Nossa Senhora Aparecida, Centro e Gonzagão, respectivamente. Na zona rural, apenas 1 cão do sítio Cacimbas foi diagnosticado como sendo portador do mesmo parasito (FIGURA 2).

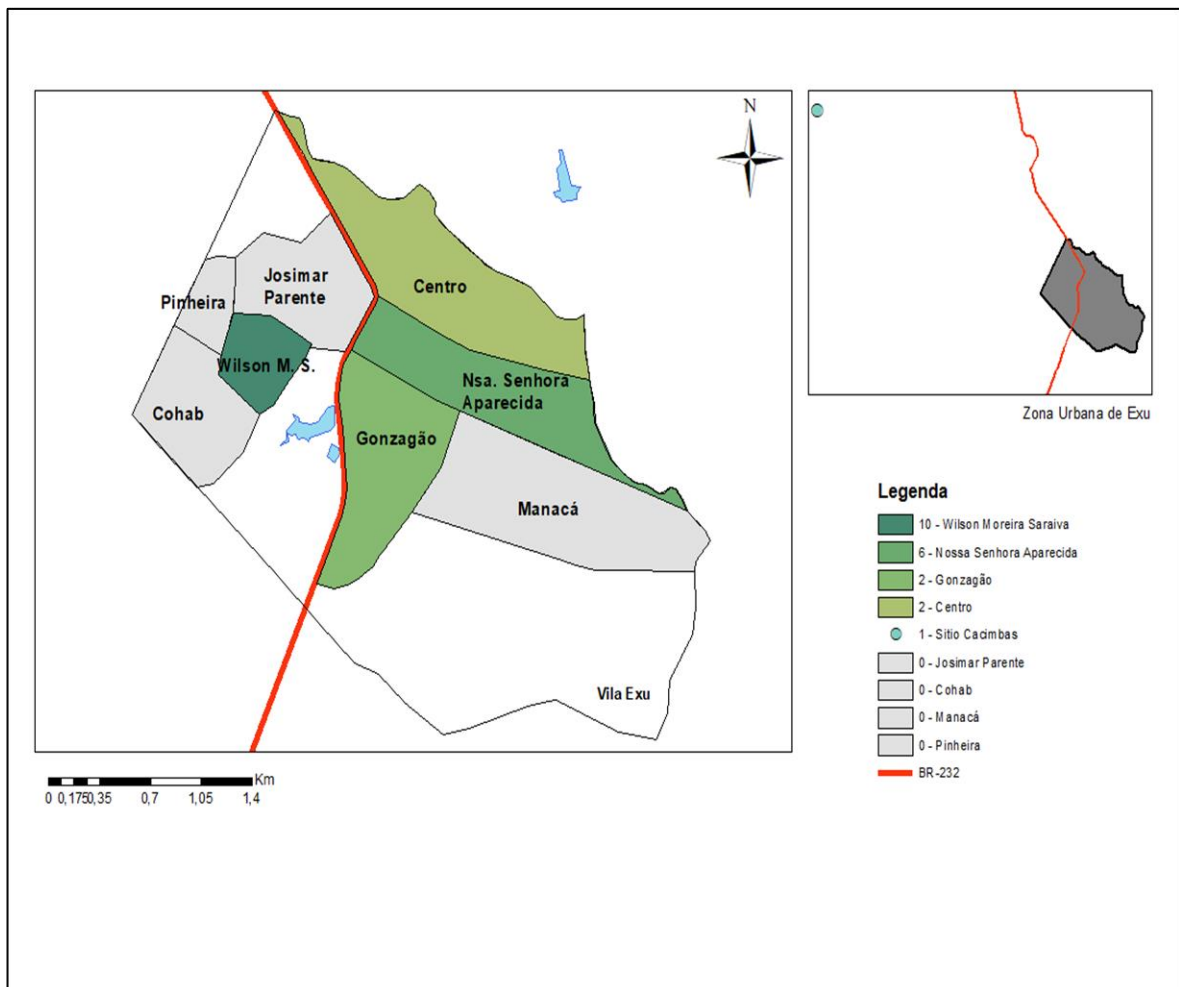


Figura 2 – Densidade espacial dos cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* na zona urbana e rural do Município de Exu.

4. DISCUSSÃO

Apesar de muitas pesquisas estarem apontando um processo de mudança na epidemiologia espacial de LV e LT que, no passado, eram consideradas doenças relacionadas ao meio rural no Brasil (WERNECK, 2008, BRASIL, 2017), o perfil de distribuição temporal de ambas as doenças no município de EXU apresenta-se de caráter

misto, sendo a maioria dos casos humanos tanto de LT quanto de LV ainda concentradas no meio rural.

O número de casos humanos de Leishmaniose Visceral no centro do município de Exu, assim como no bairro Wilson Moreira Saraiva, pode estar intimamente associado à quantidade de cães naturalmente infectados por *L. infantum* nesse mesmo bairro, uma vez que Segundo Oliveira 2001, o cão doméstico é também um dos responsáveis pelo aumento da incidência da doença em humanos, tanto em escala espacial quanto temporal. Além disso, o *Canis familiares* ainda é incriminado como sendo o reservatório de maior relevância epidemiológica devido o alto parasitismo cutâneo que favorece a infecção dos vetores biológicos e a manutenção da endemicidade da doença em humanos em áreas de foco (MORENO e AVAR, 2002; GONTIJO e MELO, 2004; OMS, 2006; BELO et al 2013).

Por sua vez, o número de cães naturalmente infectados por *L. infantum* nos bairros Gonzagão e Nossa Senhora Aparecida e, não tendo havido nestes bairros nenhuma notificação de caso humano de LV, estimula ainda mais o caráter de vigilância. Pois, de acordo com Bevilacqua e colaboradores (2001) e Solano-Gallego (2009), a alta frequência de cães infectados em uma localidade configura que a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) pode anteceder os casos de LV em humanos.

A maioria dos casos humanos de Leishmaniose da zona rural e da zona urbana do município de Exu são na sua apresentação Tegumentar (BRASIL, 2018). Apesar disso, nenhum dos cães da zona urbana nem da zona rural de Exu foram positivos na PCR convencional para *Leishmania braziliensis*. Portanto, faz-se necessário que mais estudos sejam realizados para averiguar a participação destes animais ou de outros mamíferos domésticos e silvestres na cadeia de transmissão da LT em áreas endêmicas, como sugere Brandão-Filho et al 2003 e Brito et al, 2012.

Assim como Marques (2017), que avaliou a dispersão geográfica da LVC no oeste do Rio Grande do Sul e constatou que situação atual da LVC em alguns municípios era de caráter alarmante, o número de cães naturalmente infectados por *L. infantum* no município de Exu, sertão do estado de Pernambuco, também sugere um maior comprometimento dos setores de saúde do município no que diz respeito à vigilância em saúde.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do exposto, conclui-se que o diagnóstico sorológico e molecular somados a ferramentas de análise espacial, contribuem para entender a dispersão de *Leishmania infantum* em uma área endêmica. Ademais, é possível concluir também que os casos de Leishmaniose Visceral Canina no município de Exu podem estar intimamente relacionados aos casos de Leishmaniose Visceral em humanos na mesma localidade no tempo presente e, a fim de evitar casos futuros, a vigilância em saúde deve ser intensificada no município.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Leishmaniose visceral canina. **Manual da Schering- Plough**, São Paulo, 2005. 14p.

BARATA, R. B.; WERNECK, G. Epidemiologia & Saúde: Observação e registro dos fenômenos epidemiológicos (tempo, espaço, indivíduos e populações). **In: Almeida Filho N., Barreto M. L. Epidemiologia & Saúde: fundamentos, métodos, aplicações.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.127-149, 2012

BELO, V.S.; WERNECK, G.L.; BARBOSA, D.S.; SIMÕES, T.C.; NASCIMENTO, B.W.L.; DA SILVA, E.S. et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in the Americas: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Disease**; ed. 2182, 2013

BRANDÃO-FILHO, S.P.; BRITO, M.E.; CARVALHO, F.G.; ISHIKAWA, E.A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. ed.97(3), p. 291-296, 2003

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília, 120 p. 2014

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar.** Brasília: Ed. Ministério da Saúde; 2017

BRASIL. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação.** Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

BREDOR, C. N. G. **Sequenciamento e caracterização de genes identificados como codificantes para proteínas antigênicas de *Leishmania chagasi*.** 75 f. Recife, PE. Dissertação (Mestrado em genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

BRITO, M.E.; ANDRADE, M.S.; DANTAS-TORRES, F.; RODRIGUES, E.H.; CAVALCANTI, M. P.; DE ALMEIDA, A.M.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil:

a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. ed 45(4), p. 425-9, 2012.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, p.12-17, 2004

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 leishmaniasis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.170, p.313-317, 2010.

GÓES, M.A.O.; MELO, C.M.; e JERALDO, V.L.S. Série temporal da leishmaniose visceral em Aracaju, estado de Sergipe, Brasil (1999 a 2008): aspectos humanos e caninos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. ed.15(2), p. 298–307, 2012.

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.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Divisão Territorial do Brasil e Limites Territoriais. Disponível em <ftp://geoftp.ibge.gov.br/> Acesso em dezembro de 2018

KASZAK, I.; PLANELLAS, M.; DWORECKA-KASZAK, B. Canine leishmaniasis - an emerging disease. **Annals of Parasitology**. ed.61, n. 2, p. 69–76, 2015.

LAINSON, R; SHAW, J. J; SILVEIRA, F. T; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. Ed. 81, n. 3, p. 517; 1987.

LAINSON, R; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**; ed. 273(5664); p. 595–600; 1978.

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

LINS, T.N.B.; SOUZA, I.B; DE BARROS, G.M.M; SANTOS, R.A. C., ALVES, L.C; RAMOS, R.A.N. Seroprevalence and spatial distribution of canine leishmaniasis in an endemic region in Brazil: how has the situation changed after 10 years? **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, ed. 51(5), p. 680–682, 2018.

MARQUES, G.D. **Análise Espacial dos Casos de Leishmaniose Visceral Canina no Município de Itaqui (2009-2016)**. Dissertação (Mestrado). 57 p. - Universidade Federal do Pampa, Mestrado Em Ciência Animal, 2017

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002

MORENO J, AVAR J. Canine leishmaniasis epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 399-405, 2002.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. **Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas**. Organización Panamericana de la Salud. Ed. Panaftosa, p.152. 2006.

PAHO (2017). Pan-American Health Organization. Informe Epidemiológico das Américas. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34113/informe_leishmanioses_5_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em outubro de 2018.

PITTNER, E.; VOLTARELLI, E.; PERLES, T. F.; ARRAES, S. M. A. A.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C. Ocorrência de Leishmaniose Tegumentar em cães de área endêmica do Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 561-565, 2009.

REITHINGER R.; LAMBSON, B. E.; BARKER, D. C.; DAVIES, C. R. Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) sp. in dog blood and bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p. 748-51, 2000.

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

VALE, E.C.S. e FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. ed.80(4), p.421-428, 2005.

WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 24, p. 40-2937. 2008.

APÊNDICE 1



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE P[OS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) _____ para participar da Pesquisa intitulada “**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESPACIAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania spp* NO MUNICÍPIO DE EXU, PERNAMBUCO, BRASIL.**”, sob a responsabilidade do pesquisador MÉDICO VETERINÁRIO WAGNER WESLEY ARAÚJO ANDRADE, a qual pretende avaliar a dispersão espacial de *Leishmania spp* em cães naturalmente infectados. Sua participação com seu animal é voluntária e se dará por meio de coleta de 3 ml de sangue do seu animal.

Os riscos decorrentes da participação dos seu (s) animal (is) na pesquisa são mínimos ou inexistentes. Se você aceitar participar, os resultados decorrentes do estudo com seu (s) animal (is) estará contribuindo para compreender a epidemiologia das Leishmanioses no município de Exu.

Se depois de consentir em sua participação o (a) Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem prejuízo a sua pessoa.

O (a) Sr (a) não terá despesas e também não receberá remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade e de seu (s) animal (is) não serão divulgadas, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço Rua Dom Manoel de Medeiros 1000, pelo telefone (81) 33206441.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o projeto “**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESPACIAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania spp* NO MUNICÍPIO DE EXU, PERNAMBUCO, BRASIL.**” que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser.

Este documento foi emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ___/___/____

Assinatura do participante

Impressão do dedo polegar
Caso não saiba assinar

Assinatura do Pesquisador Responsável