UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE CANINA NO DISTRITO DA VILA OPERÁRIA, BUERAREMA, BAHIA, BRASIL.

Autor: Nilo Fernandes Leça Júnior
Orientador: Profª. DSc. Fabiana Lessa Silva

Ilhéus-Bahia
2011

NILO FERNANDES LEÇA JÚNIOR

EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE CANINA NO DISTRITO DA VILA OPERÁRIA, BUERAREMA, BAHIA, BRASIL.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração:
Ciência Animal

Linha de pesquisa:
Clínica e Sanidade Animal

Orientador(a): Profª. DSc. Fabiana Lessa Silva – UESC

Ilhéus-Bahia
2011

L455 Leça Júnior, Nilo Fernandes.

Epidemiologia da leishmaniose canina no distrito da Vila Operária, Buerarema, Bahia, Brasil / Nilo Fernandes Leça Júnior. – Ilhéus, BA: UESC, 2011.

xiii, 62 f.

Orientadora: Fabiana Lessa Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Inclui referências bibliográficas.

1. Leishmaniose. 2. Leishmania brasiliensis. 3. Imu-
nofluorescência. 4. Epidemiologia. 5. Leishmaniose – Diagnóstico. I. Título.

CDD 616.9364

NILO FERNANDES LEÇA JÚNIOR

EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE CANINA NO DISTRITO DA VILA OPERÁRIA, BUERAREMA, BAHIA, BRASIL.

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do título mestre em Ciência Animal na Universidade Estadual de Santa Cruz, no dia 04 de maio de 2011.

_____

Profª. DSc. Fabiana Lessa Silva
DCAA/UESC
(Orientadora)

_____

Prof. DSc. George Rego Albuquerque
DCAA/UESC

_____

Prof. DSc. Wagner Luiz Tafuri
ICB/UFMG

DEDICATÓRIA

A meus pais, Nilo Leça e Ana Leça, fonte inesgotável de amor, carinho e respeito.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tem realizado maravilhas em minha vida e tem possibilitado que as tenha vivido na sua totalidade.

A professora Fabiana Lessa Silva, símbolo maior de competência, conhecimento e profissionalismo. Responsável pela viabilização desse projeto e por propiciar dois anos de muito conhecimento e de excelente convivência.

À Mônica da Motta Leça Tebaldi, irmã querida e grande companheira durante toda minha caminhada.

As minhas saudosas avós Joaquina de Jesus Magalhães (*in memorian*) e Maria da Conceição Santos Motta (*in memorian*), por todos seus sábios ensinamentos, seu amor e carinho incondicional que eram dispensados a todos na família.

Ao professor George Rego Albuquerque, por toda sua solicitude e disponibilidade nos esclarecimentos das técnicas sorológicas utilizadas nesse experimento.

Ao professor Amauri Arias Wenceslau, por todos os esclarecimentos sobre os testes moleculares e pela abertura de seu laboratório para a realização do experimento.

Ao amigo e colega de mestrado Valter Almeida dos Anjos, por toda a ajuda na execução do experimento e companheirismo durante o mestrado.

À Lailla Nascimento de Santana, aluna de iniciação científica desse projeto de pesquisa. Sua amizade, colaboração e companheirismo foram essenciais para a correta execução da pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz, Taiane Nascimento da Hora, Enock Martins e Selma Regiane, pela ajuda durante as coletas de campo.

Ao técnico do Hospital Veterinário da UESC, Givaldo Rodrigues da Silva, pela enorme ajuda dada durante as coletas, principalmente nos casos dos animais mais arredios, utilizando seu amplo conhecimento nas contenções físicas de forma mais ética.

Ao Médico Veterinário e mestre Fábio Santos Carvalho, técnico do Laboratório de Genética Animal do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz, por toda paciência nos ensinamentos e execução dos testes moleculares empregados no projeto de pesquisa.

Aos amigos da turma de pós-graduação em Ciência Animal do ano de 2009, Rodrigo Alves Bezerra, Vanessa Magalhães, Carlos Eduardo D'Alencar e Luciana Afonso Guimarães, pela amizade e companheirismo durante todo o processo de aprendizagem.

Aos meus saudosos cachorros Half e Kate, criaturas divinas que guardavam o meu dia-a-dia com um carinho e amor imensurável. Os dias sem vocês latindo, pedindo carinho, comida e rua perderam toda a graça. Saudades eternas de vocês dois.

Aos animais que participaram dessa pesquisa, pela paciência e confiança no trabalho realizado, o que possibilitou um maior conhecimento da doença estudada no estado da Bahia.

A médica veterinária Daniella Naves Paglioni e a técnica Marta do Laboratório de Zoonoses do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Belo Horizonte - MG, por toda solicitude e esclarecimentos para a correta padronização dos exames sorológicos.

A todos os meus familiares, que me incentivaram de forma incondicional durante todas as fases de minha vida.

A todas as demais pessoas que participaram dessa pesquisa e que seus nomes não foram aqui citados.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz por possibilitar a realização e execução do projeto de pesquisa.

Meu muito obrigado!

“Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE CANINA NO DISTRITO DA VILA OPERÁRIA, BUERAREMA, BAHIA, BRASIL.

Autor: Nilo Fernandes Leça Júnior
Orientador: Profª. DSc. Fabiana Lessa Silva

RESUMO

A leishmaniose canina é uma enfermidade infecciosa de caráter zoonótico, observada, dependendo do agente, tanto no ambiente silvestre quanto urbano. O aumento recente das notificações de cães infectados, no domicilio e peridomicílio, em áreas endêmicas e em áreas onde recentemente passaram pelo processo de desmatamento, levaram a suspeitar que o cão doméstico possa atuar como reservatório da doença no meio ambiente, no caso da leishmaniose tegumentar americana e confirmar sua importância epidemiológica na manutenção do ciclo de transmissão da leishmaniose visceral americana. Este trabalho teve como objetivo a identificação dos fatores de risco associados ao desenvolvimento da doença em cães desta localidade através de aplicação de questionário epidemiológico aos proprietários dos animais estudados. A pesquisa foi desenvolvida no distrito da Vila Operária, município de Buerarema, sul da Bahia, considerada zona endêmica para leishmaniose tegumentar americana humana. Além disso, também foi objetivo dessa pesquisa a realização de inquérito sorológico e molecular para a identificação de animais infectados pelo parasito e a correta identificação do agente causal da enfermidade. Para isso, foram selecionados toda a população canina residente no distrito, totalizando 292 animais, excluindo-se os animais com idade inferior a seis meses. Todos os animais foram inicialmente avaliados clinicamente quanto à presença de lesões cutâneas sugestivas. As lesões observadas foram escarificadas e o material coletado disperso sobre lâmina de vidro para posterior identificação microscópica de formas amastigotas. Posteriormente, foram coletados amostras de sangue para avaliação sorológica pela técnica da RIFI e testes moleculares (PCR). Dos animais avaliados, apenas 13 (4,5%) dos cães, apresentavam lesões sugestivas de leishmaniose,

entretanto, o exame parasitológico foi negativo em todas as amostras obtidas. Das 292 amostras sanguíneas coletadas, 147 (50,3%) foram sorologicamente positivos, sendo que desses, apenas seis apresentavam lesões cutâneas. Do total de 273 cães testados pela técnica da PCR, em apenas 10 (3,7%) foi detectado DNA de *L. braziliensis*, sendo que desses, apenas quatro foram sorologicamente positivos. Em nenhuma amostra foi detectado DNA de *L. infantum*. Foram identificados como fatores de risco nesse estudo a presença de terrenos baldios no peridomicílio e a presença de luz no domicílio. Nossos resultados permitem inferir que, na localidade estudada, há um grande número de cães positivos, sendo na maioria assintomáticos. A presença desses animais pode ser um indicador do risco de transmissão da infecção para o homem nessa localidade. Além disso, a técnica da RIFI utilizada apresentou melhor sensibilidade de detecção dos animais infectados em relação à PCR feita a partir de amostras sanguíneas.

Palavras-chaves: *Leishmania braziliensis*; *Leishmania infantum*; *Canis familiaris*; Imunofluorescência indireta; PCR – *Polymerase chain reaction*; Epidemiologia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Fatores associados à infecção por *Leishmania* sp. em cães procedentes da Vila Operária, Buerarema, Bahia.	54
Tabela 2.	Associação entre cães positivos e os fatores: presença de terrenos baldios no peridomicílio, residir em área urbana e presença de fossas no domicílio no distrito da Vila Operária, Buerarema, Bahia.	55

LISTA DE ABERVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
mM	Milimolar
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática

SUMÁRIO

	Resumo	viii
1.	Introdução	14
2.	Revisão de literatura	16
2.1.	Leishmaniose tegumentar americana	17
2.2.	Agentes etiológicos	18
2.3.	Vetores	19
2.4.	Reservatórios	20
2.5.	Sinais clínicos	21
2.6.	Diagnóstico laboratorial	21
2.6.1.	Parasitológico	22
2.6.2.	Imunológicos	22
2.6.2.1.	Testes sorológicos	22
2.6.2.2.	Teste intradérmico	23
2.6.3.	Molecular	23
2.7.	Leishmaniose visceral americana	24
2.8	Agentes etiológicos	25
2.9.	Vetores	27
2.9.1.	Outras formas de transmissão	27
2.10.	Reservatórios	28
2.11.	Sinais clínicos	28
2.12.	Diagnóstico laboratorial	29
2.12.1.	Parasitológico	29
2.12.2.	Teste imunológico	30
2.12.2.1.	Teste sorológico	30

2.12.3.	Molecular	30
3.	Referências bibliográficas	32
	Epidemiologia da leishmaniose canina no Sul da Bahia, Brasil.	47
1.	Introdução	47
2.	Material e métodos	49
2.1.	Local de pesquisa	49
2.2.	Animais	49
2.3.	Obtenção de dados epidemiológicos	49
2.4	Exame parasitológico direto	50
2.5.	Sorologia	50
2.6.	Biologia molecular	50
2.6.1.	PCR para a detecção de DNA de *Leishmania braziliensis*	51
2.6.2.	PCR para a detecção de DNA de *Leishmania infantum chagasi*	51
2.7.	Análise estatística	52
3.	Resultados	52
4.	Discussão	55
	Referências bibliográficas	59

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças de países de clima tropical à subtropical causada por protozoários do gênero *Leishmania* que vem passando por um novo processo de expansão no continente americano com aumento no número de casos, devido ao constante desmatamento das florestas e do crescimento desorganizado das cidades (BASANO; CAMARGO, 2004).

É uma doença relatada desde o período colonial e, na atualidade, é descrita como endêmica em todo o continente americano (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003). No Brasil, sua ocorrência já foi relatada em todos os estados da federação e, nos últimos 20 anos, 550.250 novos casos foram diagnosticados no país. A região norte é a que concentra o maior número de casos diagnosticados, representando 36,21% do total, seguida pelas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (BRASIL, 2010).

A leishmaniose tegumentar pode apresentar um espectro clínico variado, sendo muitas vezes confundida com outras afecções clínicas dermatológicas. Com o progresso da infecção, lesões únicas ou múltiplas podem acometer o tecido cutâneo ou muco-cutâneo. Muitas dessas lesões ocorrem no tecido cartilaginoso nasal, parte do trato respiratório superior ou o conduto auricular, podendo acarretar em destruição total ou parcial dessas estruturas (PEDROSO, 1913; FALQUETO et al, 1986; BARBOSA et al., 1999; PADILLA et al., 2002; BRASIL, 2010).

A leishmaniose visceral, doença que é um importante problema de saúde pública mundial e principalmente em países em desenvolvimento, que acomete principalmente os órgãos cavitários dos mamíferos, podendo levar à morte quando o tratamento é negligenciado por seus portadores ou pelas instituições públicas de saúde (MELO, 2004; BRASIL, 2014).

Os principais reservatórios da doença são animais da fauna silvestre, principalmente roedores, marsupiais, edentados, canídeos selvagens e animais domésticos (BRASIL, 2010; BRASIL, 2014). Muito se discute sobre o papel do cão doméstico na manutenção do ciclo biológico da leishmaniose tegumentar no ambiente peri-domiciliar e domiciliar no meio urbano e rural nas áreas endêmicas. Entretanto, em casos de leishmaniose visceral, o cão tem papel

importante na manutenção do ciclo do parasita no meio em que habita (MARCONDES; ROSSI, 2013; BRASIL, 2014).

Este trabalho teve como objetivos a realização de inquérito epidemiológico para detecção de infecção por *Leishmania* sp. na população de cães do distrito da Vila Operária do Município de Buerarema, sul da Bahia, considerada zona endêmica para leishmaniose tegumentar humana. Além disso, também foi objetivo dessa pesquisa a realização de exames laboratoriais (exame parasitológico direto, sorológico e PCR – Reação em cadeia da polimerase), a fim de identificar os fatores de risco que estariam associados à enfermidade nos cães desta localidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários digenéticos do gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida, Família Trypanossomatidae) que se manifestam sob formas clínicas distintas. A principal forma de transmissão da infecção para o homem e outros mamíferos é pela picada de fêmeas de dípteros hematófagos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos popularmente como mosquitos palha, asa branca e tatuquira (AZEVEDO et al., 1996; REY, 2001; BRASIL, 2010; BRASIL, 2014).

No continente americano, as leishmanioses podem ser divididas em duas amplas categorias: a leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar e a leishmaniose tegumentar americana (LTA) (REITHINGER; DAVIES, 1999; ALVAR et al., 2004; DESJEUX, 2004; BRASIL, 2010; BRASIL, 2014).

A LVA é uma doença sistêmica, crônica e progressiva que afeta múltiplos órgãos como o baço, fígado, medula óssea, linfonodos e a pele. Quando o tratamento é negligenciado pode levar a óbito do ser humano acometido pela doença (ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004; BRASIL, 2014).

A LTA possui grande variedade de formas, as quais podem ser agrupadas da seguinte maneira: (1) leishmaniose cutânea, caracterizada por lesões localizadas na pele, as quais podem curar espontaneamente ou evoluir para lesões crônicas; (2) leishmaniose mucocutânea, caracterizada por lesões ulcerativas e destrutivas de mucosas ou junções mucocutâneas; (3) leishmaniose cutânea disseminada, caracterizada por múltiplas lesões papulares, geralmente ulceradas, distribuídas por diferentes partes do tegumento; (4) leishmaniose cutânea difusa, forma menos comum de apresentação, caracterizada por lesões papulares ou nodulares, deformantes e graves, com ampla distribuição pela superfície corporal (CARVALHO et al., 1994; REITHINGER; DAVIES, 1999; ASHFORD, 2000; OLIVEIRA-NETO et al., 2000; DESJEUX, 2004; COSTA, 2005; REITHINGER et al., 2007; BRASIL, 2010).

2.1. Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose tegumentar é uma enfermidade infecciosa de evolução crônica que tem ampla distribuição mundial. Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde, 2015), a LTA é um grave problema de saúde pública, estando entre as seis doenças infecto-parasitárias mais importantes nas Américas. No continente americano, a ocorrência dessa enfermidade já foi registrada desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (BRASIL, 2010).

No Brasil, existem relatos da doença em todos os estados da federação, tendo muitas vezes caráter endêmico (PAHO - Pan American Health Organization, 1994; BRASIL, 2010). O Nordeste brasileiro diagnosticou nos últimos 20 anos, segundo dados do BRASIL (2010), 191.424 (34,78%) de todos os novos casos de LTA no Brasil. Os estados do Maranhão, Bahia e Ceará são os mais afetados, com respectivamente 37,40%, 31,71% e 21,25% dos casos diagnosticados na região nesse período. Na Bahia, a doença é reconhecida desde o início do século XIX, período que correspondeu à expansão da cultura cacaueira na região sul do estado (FOLLADOR et al., 1999; BRASIL, 2010).

A LTA é uma enfermidade primariamente de caráter zoonótico observada tradicionalmente em ambientes silvestres. Os hospedeiros vertebrados das espécies dermotrópicas de *Leishmania* vão desde roedores, carnívoros até primatas. Entretanto, tem sido frequente a observação de casos da doença em zonas rurais e urbanas, inclusive em animais domésticos tais como felinos, cães e eqüídeos (OLIVEIRA-NETO et al., 1988; FALQUETO et al., 1991; MADEIRA et al., 2003; CASTRO et al., 2005; SANTOS et al., 2005; TEODORO et al., 2007; TRAINOR et al., 2010).

O perfil epidemiológico das leishmanioses dermotrópicas tem passado por constantes modificações devido as ações antrópicas nos ambientes silvestres, peri-urbanos e urbanos (COSTA, 2005).

O fato da transmissão da LTA no ambiente doméstico ter aumentado nos últimos anos bem como os relatos frequentes da infecção em cães nas zonas endêmicas tem levado alguns autores a suspeitar que os cães domésticos (*Canis familiaris*) possam ser importantes como reservatórios da infecção, com posterior transmissão para o homem (FALQUETO et al., 1986;

REITHINGER; DAVIES, 1999; PADILLA et al., 2002; RYAN et al., 2003; DANTAS-TORRES, 2007; PITTNER et al., 2009).

2.2. Agente etiológico

Leishmania sp. é um parasito heteroxeno que necessita obrigatoriamente de dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida: um vertebrado mamífero e o outro invertebrado, inseto díptero hematófago pertencente à família Phlebotominae e aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (REITHINGER; DAVIES, 1999; ASHFORD, 2000).

As espécies do gênero *Leishmania* possuem formas distintas durante seu ciclo de vida. As principais são as promastigotas, flageladas e móveis, que se desenvolvem no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e amastigotas, imóveis, que vivem e se multiplicam no interior de células do sistema fagocítico-mononuclear (SFM) dos hospedeiros vertebrados (MAÜEL, 1990).

O ciclo de vida dos protozoários do gênero *Leishmania* inicia-se quando as fêmeas dos vetores invertebrados, conhecidos como flebotomíneos, se contaminam durante o repasto sanguíneo nos hospedeiros vertebrados, quando ingerem macrófagos parasitados com as formas amastigotas presentes no tecido cutâneo. Dentro do trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, os macrófagos são lisados e liberam as formas amastigotas que se transformam em promastigotas. Após a reprodução assexuada das promastigotas, elas migram para a proboscide do inseto em aproximadamente 4 a 5 dias. As formas promastigotas serão então inoculadas na pele de um novo hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva do inseto durante o próximo repasto sanguineo (ASHFORD, 2000; KAMHAWI, 2006).

Nas Américas, atualmente são reconhecidas 11 espécies dermotrópicas de *Leishmania* que causam doença no homem e oito espécies descritas somente em animais (ASHFORD, 2000; BRASIL, 2010).

No Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (Vianna) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. Recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni, L. (V.) naiffi, L. (V.) lindenberg* e *L.*

(V.) shawi foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (GRIMALDI et al., 1989; ASHFORD, 2000; GRAMICCIA; GRADONI, 2005; DANTAS – TORRES, 2009; BRASIL, 2010).

No Brasil, a leishmaniose tegumentar apresenta três padrões epidemiológicos distintos: puramente silvestre, silvestre modificado e peri-urbano (BASANO; CAMARGO, 2004; COSTA, 2005; BRASIL, 2010).

Nos casos de LTA puramente silvestre e silvestre modificada, estão implicadas na transmissão as espécies *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. lainsoni*. Os casos de LTA de transmissão peri-urbana, peri-domiciliar e domiciliar são em sua maioria causados pelas espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (COSTA, 2005; TOLEZANO et al., 2007; BRASIL, 2010).

Na Bahia, na localidade de Corte de Pedra, região da costa do dendê, já foram isoladas as espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectivamente, em humanos e roedores (PETERSON et al, 1988; COSTA et al., 1998).

2.3.Vetores

As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão da leishmaniose tegumentar no Brasil são: *Lutzomyia flaviscutellata, Lu. whitmani, Lu. umbratillis, Lu. intermedia, Lu. wellcome* e *Lu. migonei*. Embora ainda não tenha sido comprovado o papel da *Lu. neivai* e *Lu. fisheri* como vetores da LTA, estas espécies têm sido encontradas com frequência em ambientes domiciliares em áreas de transmissão da doença (BRASIL, 2010).

Alterações estruturais presentes no trato digestivo desses invertebrados permitem que os protozoários do gênero *Leishmania* sejam firmemente aderidos à sua mucosa, impossibilitando sua expulsão através das fezes (KAMHAWI, 2006). Esse achado implica na grande especificidade e capacidade de adaptação do parasita ao vetor, o que explicaria o surgimento de novos focos de leishmanioses em áreas livres da doença (KAMHAWI, 2006; VOLF; MYSKOVA, 2007).

Estudos conduzidos em diferentes áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar americana apontam para uma ampla variação na fauna flebotomina implicada na transmissão da doença, o que confere a essa zoonose grande

complexidade (VEXENAT et al., 1986; DESJEUX, 2001; MENESES et al., 2002; CASTRO et al., 2005; GRAMICCIA; GRADONI, 2005; REITHINGER et al., 2007; BRASIL, 2010).

Em Ilhéus, município inserido na Mata Atlântica e endêmica para LTA, já foram capturados na zona rural do município dípteros hematófagos das espécies *Lu. intermedia*, *Lu. whitmani*, *Lu. fischeri*e *Lu. migonei* (AZEVEDO et al., 1996). Na zona urbana e rural da cidade, Carvalho et al. (2010) relataram a captura de 3.375 flebótomos no período de 2007 a 2009 sendo que destes, 86,3% foram capturados na zona rural. A fauna flebotomínea observada na zona rural era composta basicamente pelas espécies *Lu*. *fischeri* (45,2%) e *Lu*. *whitmani* (41,1%). A espécie *Lu*. *fischeri*, no Brasil, ainda não foi vinculada como vetor da doença (BRASIL, 2010).

2.4. Reservatórios

Diversos estudos já foram realizados no Brasil com o intuito de identificar os reservatórios silvestres da leishmaniose tegumentar americana. Os resultados destes estudos são inconsistentes, mas apresentam dois aspectos em comum: o fato de haver uma grande diversidade de espécies envolvidas e uma pequena taxa de infecção nesses animais (FORATTINI et al., 1972; BRANDÃO-FILHO et al., 2003; BRASIL, 2010).

Os reservatórios da doença no meio variam conforme a espécie de *Leishmania* sp. envolvida. Segundo o BRASIL (2010), podem atuar como reservatórios animais silvestres, sinantrópicos e domésticos, tais como pequenos roedores, gambás, canídeos selvagens e domésticos, felinos, cavalos e muares (PEDROSO, 1913; OLIVEIRA-NETO et al., 1988; ASHFORD, 1996; BRANDÃO-FILHO et al., 2003; CASTRO et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2007; SANTIAGO et al., 2007; TRAINOR et al, 2010).

São cada vez mais frequentes os relatos de casos de LTA em animais domésticos, tanto no meio urbano como no rural (PEDROSO, 1913; OLIVEIRA-NETO et al, 1988; FALQUETO et al., 1991; ASHFORD, 1996; RYAN et al., 2003; CUNHA et al., 2006; TRAINOR et al., 2010). Os resultados de alguns estudos conduzidos no intuito de elucidar o papel do cão no ciclo da transmissão da LTA ainda são inconsistentes, devido à complexidade das

interações entre os diversos vetores e seus reservatórios silvestres, sinantrópicos e domésticos (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; DANTAS-TORRES, 2007; DANTAS-TORRES, 2009). Dados obtidos a partir de um estudo conduzido por Reithinger et al. (2003b) no Peru, indicam que o cão, na ausência de reservatórios silvestres, atua como reservatório no meio, tendo importante impacto epidemiológico na transmissão da leishmaniose tegumentar americana em humanos. No Brasil, esses animais já foram incriminados como reservatórios importantes do parasito no estado do Espírito Santo (FALQUETO et al., 1986).

2.5. Sinais clínicos

As lesões observadas nos cães com LTA são geralmente semelhantes às observadas em seres humanos, e incluem alopecia focal com lesões circulares ulceradas e de difícil cicatrização e linfoadenomegalia da região acometida. As lesões são comumente observadas nas orelhas, escroto, focinho e membros anteriores e posteriores (PEDROSO, 1913; FALQUETO et al, 1986; BARBOSA et al., 1999; PADILLA et al., 2002; BRASIL, 2010).

As úlceras observadas decorrem da migração de leucócitos, que isolam a área infectada levando a processos necróticos ulcerativos de rápido desenvolvimento. Essas alterações são frequentemente observadas nas infecções causadas por *L. panamensis* e *L. braziliensis* (ASHFORD, 2000).

Entretanto, devem ser levadas em consideração no momento da anamnese dos animais quaisquer afecções que possam acometer o sistema cutâneo ou muco-cutâneo e que possam mimetizar as lesões observadas (BRASIL, 2010).

2.6. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da leishmaniose tegumentar não difere essencialmente do diagnóstico da leishmaniose visceral e abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais, tais como métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (GONTIJO; CARVALHO, 2003; DESJEUX, 2004; ANDRADE et al., 2005; GOTO et al., 2010).

2.6.1. Parasitológico

O diagnóstico parasitológico é o método mais confiável, pois se baseia na observação do parasito, que pode ser feita por meio de diferentes técnicas de pesquisa direta e indireta. A pesquisa direta consiste na identificação de formas amastigotas em amostras de lesão obtidas por escarificação, aspiração ou biópsia e coradas com Giemsa ou Leishman. Entretanto, em um considerável número de casos verifica-se uma baixa carga parasitária na lesão, o que resultar em uma baixa sensibilidade desse método para as leishmanioses do novo mundo (FABER, et al., 2003; MOREIRA et al., 2007; GOTO et al, 2010).

A cultura de promastigotas in *vitro* permite o diagnóstico da infecção e também a identificação da espécie de *Leishmania* presente na lesão. Este método requer, no entanto, condições laboratoriais adequadas e pessoal especializado. A sensibilidade global deste método é de aproximadamente 50% para *L. braziliensis* (VEGA-LOPEZ, 2003).

Outra forma de diagnóstico parasitológico é a inoculação em animais de laboratório, que apresenta desvantagens como o grande período de tempo requerido para a evolução da lesão no modelo animal além da grande variação na eficácia do isolamento conforme a espécie de *Leishmania* envolvida (ANDRADE et al., 2005; GOTO et al, 2010).

2.6.2. Imunológico

2.6.2.1. Testes sorológicos

Anticorpos anti-*Leishmania* se encontram presentes no soro de indivíduos com leishmaniose tegumentar e podem ser detectados por métodos sorológicos, como o teste imunoenzimático (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (KAR, 1995).

A RIFI é a técnica sorológica mais utilizada por sua elevada sensibilidade e especificidade (ANDRADE et al., 2005). Entretanto, existe a possibilidade de reações cruzadas, especialmente com o *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas e com a *Leishmania chagasi*,

agente etiológico da leishmaniose visceral (CAMARGO; REBONATO, 1969; ALVES; BEVILACQUA, 2004; OLIVEIRA et al., 2008; LUCIANO et al., 2009).

Além disso, a RIFI apresenta resultados variáveis no diagnóstico da leishmaniose tegumentar, quer seja pela antigenicidade do parasito ou pela quantidade de anticorpos circulantes. Na forma cutânea da doença, a sensibilidade na detecção de anticorpos pode variar de 0,38% a 73,5% (UCHÔA et al. 2001; RIBEIRO et al., 2007; MASSURANI et al., 2009)

Embora muitos estudos demonstrem que os valores de sensibilidade e especificidade obtidos pela técnica de RIFI sejam superiores às obtidas pela técnica de ELISA para o diagnóstico de leishmanioses, alguns pesquisadores observaram resultados superiores de detecção de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica de ELISA em cães, sugerindo que essa técnica seja mais apropriada para a detecção de anticorpos nos animais com leishmaniose tegumentar (BARBOSA et al, 1999; UCHÔA et al, 2001; CASTRO et al., 2005; BARROSO-FREITAS et al., 2009).

2.6.2.2. Teste intradérmico

A intradermorreação de Montenegro ou reação de hipersensibilidade tardia consiste na inoculação de proteína oriunda do parasita no tecido subcutâneo dos animais e é um meio de diagnóstico que pode ser utilizado no acompanhamento da infecção canina por protozoários do gênero *Leishmania* (MARZOCHI; BARBOSA-SANTOS; 1988; PARANHOS-SILVA et al., 2001; REIS et al., 2008).

Resultados observados por Reis et al (2008) e Marzochi; Barbosa-Santos (1988) comprovaram a eficácia dessa técnica como método de diagnóstico para estudos epidemiológicos da doença, por ser de rápida execução e sensível na identificação de cães infectados.

2.6.3. Molecular

A utilização de técnicas moleculares como a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) vem se mostrando como ferramenta atraente para o diagnóstico diferencial e genotipagem em infecções causadas pelos protozários do gênero

Leishmania (HARRIS et al, 1998; REITHINGER et al., 2003a; GOMES et al., 2007).

Nos últimos anos, várias pesquisas utilizando a PCR foram realizadas no intuito de detectar diferentes espécies de *Leishmania* em amostras clínicas diversas, a partir da amplificação de genes do RNA ribossomal, de genes de miniexon, do DNA do cinetoplasto e de sequencias de DNA repetitivo. A PCR é particularmente útil para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar uma vez que os métodos convencionais de diagnóstico parasitológico e sorológico apresentam baixa sensibilidade, principalmente nos casos de infecção por *L. braziliensis*, devido à baixa carga parasitária nas lesões (ANDRADE et al., 2005).

Num estudo recente realizado por Oliveira et al. (2003), a PCR mostrou sensibilidade e especificidade de 100% no diagnóstico de infecções por *L. braziliensis* em pacientes humanos a partir de biópsias de pele. Num outro estudo semelhante, Oliveira et al. (2005) verificaram que a PCR foi capaz de detectar o DNA do parasito em 97,1% dos casos da doença, resultado esse superior aos obtidos pelos outros métodos testados como a coloração com hematoxilina e eosina e imuno-histoquímica.

2.7. Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral é uma doença parasitária de evolução crônica e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2014), estima-se que 350 milhões de pessoas estejam sob risco de contrair a infecção e que aproximadamente 10% da população acometida morra devido ao seu caráter debilitante ou sua associação com outras enfermidades. Entretanto, esses valores tendem a ser subestimados, visto que somente alguns países adotam a notificação compulsória da doença (CHAPPUIS et al., 2007; PINHEIRO et al.,2009; MARCONDES; ROSSI, 2013).

A doença já foi relatada em países do continente asiático, europeu e americano. Entretanto, a grande maioria dos casos de leishmaniose visceral humana no mundo é reportada no Bangladesh, Índia, Sudão do Sul, Sudão, Etiópia e Brasil (CHAPPUIS et. al., 2007; SHAW, LANGTON, HILLMAN, 2009; OMS, 2010; MARCONDES; ROSSI, 2013).

Nas Américas, sua descrição em cães ocorre desde o início do século XX, possuindo caráter endêmico. Contudo, dois países latino-americanos, Chile e Uruguai, até então não relataram focos autóctones dessa enfermidade em seus territórios. Nos Estados Unidos, a doença já foi reportada em animais da raça beagle no estado da Califórnia. Na América Latina, já foi descrita em pelo menos em 12 países, sendo que o Brasil concentra 90 % de todos os casos de leishmaniose visceral do continente (CHAPPUIS et al., 2007; TOLEZANO et al.,2007; RONDON et al., 2008; MARCONDES; ROSSI, 2013; BRASIL, 2014).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a doença já foi notificada, de forma autóctone, em 21 estados da Federação e a região nordeste concentra o maior número dos casos de leishmaniose visceral humana. Num período de dezenove anos, foram notificados 48.455 novos casos de leishmaniose visceral humana em todo território nacional, sendo 66% do total nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí (BALEEIRO et al*.,* 2006; BRASIL, 2012; BRASIL, 2014).

Como medida de controle para retardar a expansão da doença, aproximadamente 23 mil cães sorologicamente positivos são eutanasiados no país por ano. No Ceará, durante dois anos, foram eutanasiados 1136 animais, dos 31.622 capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses, resultando em uma taxa de 0,036% do total de cães apreendidos (RONDON et al. 2008; BRASIL, 2014).

Os cães infectados muitas vezes apresentam-se assintomáticos. A manifestação de sintomas graves da doença ocorre em menos de 50% dos casos, representando um importante problema de saúde pública, já que o cão é o reservatório da doença no meio urbano e possui grande habilidade em transmitir o agente ao vetor (RODRIGUES et al., 2007; MARCONDES; ROSSI, 2013; BRASIL, 2014).

2.8. Agente etiológico

A *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* são os agentes responsáveis pelo desenvolvimento da leishmaniose visceral, respectivamente, na Índia e África Central e nas Américas, Ásia central, no mediterrâneo e na China (CARDOSO et al., 1998; GRAMICCIA; GRADONI, 2005; PALATNIK-DE-

SOUSA; DAY, 2011). Contudo, estudos recentes genéticos afirmam que a *L. infantum* e *L. chagasi* são uma única espécie (SHAW, 2007; COUTINHO et al., 2011).

Os parasitas do gênero *Leishmania* são digenéticos e apresentam em seu ciclo de vida duas formas evolutivas: a forma promastigota e a forma amastigota. As promastigotas, que parasitam os flebotomíneos, apresentam corpo alongado, medindo entre 14 e 20 µ e flagelo livre. As amastigotas, infectantes para o homem e o cão, têm corpo ovóide, medindo entre 2,1 e 3,2 µ e flagelo livre (KAMHAWI, 2006; BRASIL, 2014).

Ao se contaminar, ao picar o homem ou o cão infectado, o vetor invertebrado ingere o protozoário na forma amastigota e no tubo digestivo o parasita tem que resistir às enzimas digestivas, atravessar a membrana peritrófica e se aderir às células de revestimento da mucosa, evitando assim ser eliminado durante a defecação (KAMHAWI, 2006; SAVANI et al., 2009).

O ciclo de vida da *Leishmania* inicia-se quando fêmeas do vetor invertebrado se contaminam durante o repasto sanguíneo nos hospedeiros vertebrados, quando ingerem macrófagos parasitados com as formas amastigotas presentes no tecido cutâneo. Dentro do trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, os macrófagos são lisados e liberam as formas amastigotas que se transformam em promastigotas. Após a reprodução das promastigotas no trato intestinal do inseto, ocorre a migração dessas formas para o estômago, onde se transformam em paramastigotas, que colonizam o estômago e faringe do flebotomíneo, diferenciando-se em promastigotas metacíclicas. Em aproximadamente 72 horas, a *Leishmania* conclui seu ciclo de vida no vetor, passando da forma amastigota à promastigota, possibilitando a infecção de um novo cão ou o homem durante novo processo de repasto sanguíneo (KAMHAWI, 2006; SAVANI et. al., 2009; BRASIL, 2014).

Quando o hospedeiro vertebrado é infectado, estas são fagocitadas por macrófagos e se transformam em amastigotas. Dentro dos macrófagos, as amastigotas reproduzem-se, provocam a ruptura dessas células e são liberadas no meio extracelular, e são, então, novamente fagocitadas por outros

macrófagos, dando prosseguimento ao parasitismo do hospedeiro (HANDMAN; BULLEN, 2002).

2.9. Vetores

A leishmaniose visceral é transmitida pelos mosquitos flebotomíneos, sendo o principal vetor, no Brasil, o *Lutzomyia longipalpis* (SAVANI et al.,2009; BRASIL, 2014). Entretanto, pesquisas sugerem que outros vetores podem estar associados à propagação da enfermidade, já que em muitos países endêmicos, baixas taxas de infecção do vetor são inconsistentes com os elevados índices de manifestação da doença (FELICIANGELI et al., 1999; MARCONDES; ROSSI, 2013).

O *Lutzomyia longipalpis* está amplamente distribuído, sendo relatado desde o México à Argentina. É facilmente encontrado em áreas de vegetação rasteira ou arbustiva e de relevo acidentado (LEMOS et al., 2004; BRASIL, 2014).

Os flebotomíneos possuem hábitos crepusculares, abrigando-se em locais escuros e úmidos, que possuam proteção contra ventos e matéria orgânica em decomposição (MARCONDES; ROSSI, 2013). São encontrados nos meio urbano e rural, principalmente no peridomicílio, em galinheiros, canis e currais (ARIAS et al., 1996; LEMOS et al., 2004; BRASIL, 2014).

2.9.1. Outras formas de transmissão

Estudos recentes comprovaram a viabilidade da transmissão por ectoparasitas e por materiais biológicos de animais infectados. Em um estudo realizado por SILVA et. al. (2008), observou-se que o sêmen de animais infectados possibilitou a soroconversão de cadelas livres da infecção após cópulas. COUTINHO et al. (2005) e COUTINHO; LINARDI (2007), em estudos distintos, conseguiram reproduzir a doença *in vitro* a partir de ectoparasitas, no caso carrapatos e pulgas, respectivamente, oriundos de animais positivos. Contudo, mais esclarecimentos são necessários para que se confirmem esses dois vetores como potenciais disseminadores da doença *in vivo*. A transmissão vertical também já foi relatada (SILVA et al., 2009).

2.10. Reservatórios

Os principais animais susceptíveis à doença são, no meio silvestre e urbano, canídeos, felídeos, primatas e marsupiais, entretanto, qualquer mamífero pode ser infectado com o parasita (DANTAS-TORRES, 2007; LUPPI et al., 2008; BRASIL, 2014; LOMBARDI et al., 2014).

No meio urbano, o principal reservatório do agente e de importância epidemiológica, é o cão doméstico. A principal hipótese é que o animal infectado em contato próximo e constante com humanos possibilite um aumento do risco de transmissão, permitindo uma maior exposição do agente ao vetor e ao homem, favorecendo a manutenção do ciclo de transmissão no ambiente domiciliar (LUPPI et al., 2008; BRASIL, 2014; LOMBARDI et al., 2014).

No meio silvestre, já foram relatadas a infecção em raposas, marsupiais, roedores e primatas. Na região amazônica, nordestina e do sudeste, a presença de raposas infectadas pelo agente evidencia sua habilidade em parasitar mamíferos silvestres. Em um estudo conduzido na cidade de Belo Horizonte, encontrou-se também positividade em primatas através da técnica da PCR para DNA de *L. infantum*, contudo, o papel dessas espécies como reservatórios da doença e sua importância epidemiológica ainda continuam inconclusivas (MARCONDES; ROSSI, 2013; BRASIL, 2014; LOMBARDI et al., 2014).

2.11. Sinais clínicos

Clinicamente, na leishmaniose visceral, os cães podem apresentar-se assintomáticos ou polissintomático, que vão desde problemas cutâneos à visceromegalias (LUPPI et al., 2008; ASSIS et al., 2010; MARCONDES; ROSSI, 2013; BRASIL, 2014). Comumente se manifesta por lesões cutâneas crostosas e ulceradas principalmente no nariz e orelhas. Em estágio avançado, é comum a presença de anemia, onicogrifose, caquexia, hepato-

esplenomegalia, linfoadenomegalias, ceratoconjutivite, glomerulonefrite imunomediada, transtornos gastro-intestinais e hiperqueratose (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; GOMES et al., 2007; GRANTHON et al.,2007; ASSIS et al., 2010; COUTINHO et al., 2011; BRASIL, 2014).

Solano-Gallego et al.,(2004) descreve microscopicamente as principais alterações no tecido tegumentar de cães acometidos pela doença. Comumente se observa uma lesão inflamatória granulomatosa difusa, com presença de várias células inflamatórias e aumento da concentração de colágeno tipo I e III. As maiores concentrações inflamatórias e parasitárias são encontradas comumente ao redor do folículo piloso, próximo ao suprimento vascular.

2.12. Diagnóstico laboratorial

Muitas técnicas de diagnóstico são empregadas no diagnóstico da leishmaniose visceral. Os mais utilizados são o teste parasitológico, os testes sorológicos (ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* e IFI – Imunofluorescência indireta) e os diagnósticos moleculares (ALVES; BEVILACQUA, 2004; MELO, 2004; MOREIRA et al.,2007; FARIA; ANDRADE, 2012; BRASIL, 2014).

2.12.1. Parasitológico

O método parasitológico, apesar de ser invasivo, pode apresentar restrições à sua sensibilidade devido ao estado sanitário em que o animal se encontre ou pela não homogeneidade na distribuição da carga parasitária. Animais assintomáticos possuem baixa carga parasitária ou parasitas em quantidade insuficiente na pele ou em linfonodos, o que poderia mascarar o resultado, possibilitando a emissão de laudos de animais positivos como negativos, e estes atuando como reservatórios para novas infecções (MOREIRA et al., 2007; FARIA; ANDRADE, 2012).

Comumente são utilizados órgãos linfoides, como baço, medula óssea e linfonodos para o diagnóstico da doença. As técnicas parasitológicas possuem sensibilidade que variam de 60% a 98%, dependendo do órgão avaliado, e especificidade de 100% (FARIA; ANDRADE, 2012).

2.12.2. Imunológico

2.12.2.1 Testes sorológicos

Os testes sorológicos são muito utilizados e são os recomendados pelo Ministério da Saúde do Brasil por serem de rápida execução e de baixo custo. Eles possuem alta sensibilidade, entretanto possuem baixa especificidade. Um dos questionamentos dessa técnica pela comunidade científica é que a possibilidade de animais falsos positivos e falsos negativos é grande, podendo ser indicado à eutanásia de um animal negativo e a liberação de um animal positivo. Isso ocorre devido às reações cruzadas que ocorrem entre a leishmaniose tegumentar, leishmaniose visceral e doença de Chagas (ALVES; BEVILACQUA, 2004; MELO, 2004; BRASIL, 2014).

Alves e Bevilacqua (2004), analisando os dados referentes ao estudo epidemiológico realizado na cidade de Belo Horizonte entre 1993 e 1997, encontraram dados alarmantes. Dos quase 416 mil animais examinados pelo método sorológico, 406.566 animais forma considerados como negativos e 15.117 como positivos. Desses 15.117 animais positivos, 12.925 seriam falsos positivos e 2.033 positivos liberados após o teste como negativos.

2.12.3. Molecular

Os testes moleculares são os que mais fidedignamente caracterizam as infecções por tripanossomatídeos. Possuem alta sensibilidade e especificidade, podendo caracterizar o gênero e espécie envolvida no parasitismo animal. A sensibilidade observada em amostras realizadas a partir do sangue animal costuma ter uma sensibilidade inferior ao observado em tecido animal. Sugere-se uma menor sensibilidade no tecido sanguíneo devido ao grupo heme, que poderia atuar inibindo a função da *Taq polimerase* (REITHINGER et al., 2000). Tais resultados podem ser justificados pelo tropismo tecidual característico da cepa parasitária ou pela resposta humoral desenvolvida pelo animal. Contudo, devido aos altos custos e maquinário específico necessário para a implementação desse teste, seu uso rotineiro ainda configura-se como um

desafio, principalmente em países endêmicos e que ainda estão em fase de desenvolvimento (FARIA; ANDRADE, 2012).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M. A.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciência, Saúde – Manguinhos**, v.10, n.3, p.853-882, 2003.

ALVAR, J.; CANAVATE. C.; MOLINA, R.; MORENO, J. ; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. 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**. v.20, n. 1, p. 259-265, 2004.

ANDRADE, B. B., BOAVENTURA, V., BARRAL-NETO, M. BARRAL, A. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n.1, p. 75-82, 2005.

ARIAS, J.R., MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 145-146, 1996.

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

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

ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; NORONHA JUNIOR, A. C. F.; NEVES, M. F.; MACHADO, R. Z.; BUZETTI, W. A. S. Estudo comparativo dos métodos de diagnóstico para Leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n, 1, p. 17-25, 2010.

AZEVEDO, A. C. R., VILELA, M. L., SOUZA, N. A., ANDRADE-COELHO, C. A., BARBOSA, A. F., FIRMO, A. L. S., RANGEL, E. F. The sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous leishmaniasis in Ilhéus, state of Bahia, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 75-79, 1996.

BALEEIRO, C.O.; PARANHOS-SILVA, M.; DOS SANTOS, J.C.; OLIVEIRA, G.G.S; NASCIMENTO, E.G.; CARVALHO, L.P.; DOS SANTOS, W.L.C. Montenegro's Skin Reaction and Antibodies Against Different *Leishmania* Species in Dogs From a Visceral Leishmaniosis endemic Areas. **Veterinary Pathology**. v. 139, p.21-28, 2006.

BARBOSA, G. M. S., MARZOCHI, M. C. A., MASSARD, C. L., LIMA, G. P. S., CONFORT, E. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em cães, no Município de Paraty, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.15, n.3, p.641-616, 1999.

BARROSO-FREITAS, A. P. T.; PASSOS, S. R. L.; MOUTA-CONFORT, E.; MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SANTOS, G. P. L.; NASCIMENTO, L. D.; MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the diagnosis of american tegumentar leishmaniasis. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 383 – 389, 2009.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328 – 337, 2004.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E.; CARVALHO, F. G.; ISHIKAW, E. A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, E.; SHAW, J. J. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil.**The Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygene,** v.97, n. 3, p. 291-296, 2003.

BRASIL, Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, Editora MS, 2ª Edição Atualizada, Brasília, DF, 2010.

BRASIL, Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Editora MS, Brasília, DF, 2014.

BRASIL, Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federativas, 1990 a 2011, Editora MS, Brasília, DF, 2012.

CAMARGO, M. E.; REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence test for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 4, p. 500 – 505, 1969.

CARDOSO, L., NETO, F., SOUSA, J.C., RODRIGUES, M., CABRAL, M. Use of a Leishmanin Test in the Detection of Canine *Leishmania*-Specific Cellular Immunity. **Veterinary Parasitology**, v. 79, n.3, p. 213-220, 1998.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M.; BITTERCOURT, A.; MARDSEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica,** v. 56, n. 4, p. 315-325, 1994.

CARVALHO, S. M. S.; SANTOS, P. R. B.; LANZA, H.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Diversidade de flebotomíneos no município de Ilhéus, Bahia. **Epidemiologia e Serviços de Saúde Pública**, v. 19, n. 3, p. 239-244, 2010.

CASTRO, E. A.; LUZ, E.; TELLES, F. Q.; PANDEY, A.; BISETO, A.; DINAISKI, M.; SBALQUEIRO, I.; SOCCOL, V. T. Eco-epidemiologicalsurvey os *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. **ActaTropica**, v. 93, p. 141-149, 2005.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral Leishmaniasis: What are the Needs for Diagnosis, Treatment and Control? **Nature Reviews – Microbiology**, v. 5, November 2007.

COSTA, J. M . L.; BALBY, I. T. A.; ROCHA, E. J. S.; DA SILVA, A. R.; REBÊLO, J. M. M.; FERREIRA, L. A.; GAMA, M. E. A.; BRANCO, M. R. F. C.; BURATTINI, M. N.; SOARES, N. J. S. Estudo comparativo da leishmaniose tegumentar americana em crianças e adolescentes procedentes das áreas endêmicas de Buriticupu (Maranhão) e Corte de Pedra (Bahia), Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 3, p. 279 – 288,1998.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 3 – 17, 2005.

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

COUTINHO, M.T.Z.; LINARDI, P.M. Can Fleas from Dogs Infected with Canine Visceral Leishmaniasis Transfer the Infection to Others Mammals? **Veterinary Parasitology**. v. 147, p. 320-325, 2007.

COUTINHO, C. E. R.; SANTOS, D. O.; BAPTISTA, C.; FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. F. Evaluation of *Leishmania (Leishmania) chagasi* strains isolated from dogs originating from two visceral leishmaniasis-endemic areas in Brazil using multilocus enzyme electrophoresis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 572 – 575, 2011.

CUNHA, J. C. L.; LIMA, J. W. O.; POMPERU, M. M. L. Transmissão domiciliar de leishmaniose tegumentar e associação entre leishmaniose humana e canina, durante uma epidemia na Serra de Baturité, no estado do Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia,** v.9, n.6, p. 425-435, 2006.

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

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

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

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

FABER, W. R.; OSKAM, L.; VAN GOOL, T.; KROON, N. C. M.; KNEGT-JUNK, K. J.; HOFWEGEN, H.; VAN DER WALL, A. C.; KAGER, P. A. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology,** v. 49, n. 1, p. 70 – 74, 2003.

FALQUETO, A.; COURA, J. R.; BARROS, G. C.; GRIMALDI FILHO, G.; SESSA, P. A.; CARIAS, V. R. D.; JESUS, A. C.; ALENCAR, J. T. A. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n.2, p. 155-163, 1986.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A.; VAREJÃO, J. B. M.; BARROS, G. C.; MOMEN, H.; GRIMALDI JÚNIOR, G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, n. 4, p. 499 - 500, 1991.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde,** v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.

FELICIANGELI, M.D.; RODRÍGUEZ, N.; DE GUGLIELMO, Z.; RODRÍGUEZ, A. The re-emergenceof American Visceral Leishmaniasis in na Old Focus in Venezuela. II. Vector and Parasites. **Parasite**, v. 6, p.113-120, 1999.

FOLLADOR, I.; ARAÚJO, C.; CARDOSO, M. A.; TAVARES-NETO, J.; BARRAL, A.; MIRANDA, J. C.; BITTERCOURT, A.; CARVALHO, E. M. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 497 – 503, 1999.

FORATTINI, O. P.; PATTOLI, D. G.; RABELLO, E. X.; FERREIRA, O. A. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.6, p. 255 - 261, 1972.

GOMES, A. H..S.; FERREIRA, I. M. R.; LIMA, M. L. S. R.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F. L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.144, p. 234 - 241, 2007.

GONTIJO, B., CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOTO, H.; ANGELO, J.; LINDOSO, L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniais. **Expert Reviews**, v. 8, n. 4, p. 419 - 433, 2010.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1169 – 1180, 2005.

GRANTHON, A.C.; BRAGA, M.V.; RODRIGUES, J.C.F.; CAMMERER, S.; LORENTE, S.O.; GILBERT, I.H.; URBINA, J.A.; SOUZA, W. Alterations on the Growth and Structure of *Leishmania chagasi* Induced by Squalene Synthase Inhibitors. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 25-35, 2007.

GRIMALDI JR., G; TESH, R. B.; MACMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, p. 687-725, 1989.

HANDMAN, E.; BULLEN, D.V.R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage.**Trends in Parasitology**.v.18, n.8, p.332–334, 2002.

HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AGABIAN, N. Single-step multiplex PCR assay for characterizations of New World *Leishmania* complexes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1989-1995, 1998.

KAMHAWI, S. Phlebotomine Sand Flies and Leishmania Parasites: Friends or Foes? **Trends in Parasitology**. v. 22, n. 9, 2006.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, p. 123 – 152, 1995.

LEMOS, J.C.; LIMA, S.C.; NETO, A.A.P.; CASAGRANDE, B.; VIEIRA, G.S.S.;FERRETE, J.A.; MAGALHÃES, M.J.O.; Encontro de *Lutzomyia longipalpis* na Área de Implantação da Usina Hidrelétrica Capim Branco I, Na Bacia do Rio Araguari, no Município de Uberlândia, Minas Gerais – Brasil. **Caminhos da Geografia**, v.12, n.11, p.186-198, 2004.

LOMBARDI, M. C.; TURCHETTI, A. P.; TINOCO, H. P.; PESSANHA, A. T.; SOAVE, S. A.; MALTA, M. C. C.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Diagnosis of *Lieshmania infantum* infection by Polymerase Chain Reaction in wild mammals. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 1241 – 1244, 2014.

LUCIANO, R. M.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LUCIANO, D. M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n.3, p.181-187, 2009.

LUPPI, M. M.; MALTA, M. C. C.; SILVA, T. M. A.; SILVA, D. L.; MOTTA, R. O. C.; MIRANDA, I.; ECCO, R.; SANTOS, R. L. Visceral Leishmaniasis in Captive Wild Canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 155, p.146-151, 2008.

MADEIRA, M. F.; UCHOA, C. M. A.; LEAL, C. A.; SILVA, R. M. M.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C. M.; SERRA, C. M. B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 551-555, 2003.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MARZOCHI, M. C. A.; BARBOSA-SANTOS, E. G. O. Evaluation of a skin test on the canine mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 3, p. 391 -392, 1988.

MASSURANI, G. K.; VOLTARELLI, E. M.; DOS SANTOS, D. R.; DOS SANTOS, A. R.; POIANI, L. P.; DE OLIVEIRA, O.; VIOLATO, R. J.; MATSUO, R.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V. A serological and molecular investigation of american cutaneous leishmaniasis in dogs, three years after an outbreak in the northwest of Paraná state, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 1, p. 97 -104, 2009.

MAÜEL, J. Macrophage-parasite interactions in *Leishmania* infections.**Journal of Leukocyte Biology**, v. 47, p. 187-193, 1990.

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

MENESES, C. R. V.; AZEVEDO, A. C. R.; COSTA, S. M.; COSTA, W. A.; RANGEL, E. F. Ecology of american cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v.27, p. 207-214, 2002.

MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 245-252, 2007.

OLIVEIRA, C. I.; BAFICA, A.; OLIVEIRA, F.; FAVALI, C. B.; CORREA, T.; FREITAS, L. A.; NASCIMENTO, E.; COSTA, J. M.; BARRAL, A. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 11, p. 149-153, 2003.

OLIVEIRA, J. G.; NOVAIS, F. O.; de OLIVEIRA, C. I.; da CRUZ JUNIOR, A. C.; CAMPOS, J. M.; BARRAL, A. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. **ActaTropica**, v. 94, p. 55-59, 2005.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Erlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.1, p.7-11, 2008.

OLIVEIRA-NETO, M. P.; PIRMEZ, C.; RANGEL, E.; SCHUBACH, A.; GRIMALDI JR, G. Anoutbreakof American Cutaneuos Leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro City, Brazil: clinical and epidemiological studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 427-435, 1988.

OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M. S.; PEREZ, M. A.; DA-CRUZ, A. M.; FERNANDES, O.; MOREIRA, J.; GONÇALVES-COSTA, S. C.; BRAHIN, L. R.; MENEZES, C. R.; PIRMEZ, C. American tegumentar leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. **International Journal of Dermatology**, v. 39, p.506-514, 2000.

OMS - Organização Mundial da Saúde. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_CDS_NTD_IDM_2007.3_eng.pdf. Acessado em 28 de março de 2011.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/. Acessado em 03 de junho de 2015.

PADILLA, A. M.; MARCO, J. D.; DIOSQUE, P.; SEGURA, M. A.; MORA, M. C.; FERNÁNDEZ, M. M.; MALCHIODI, E. L.; BASOMBRÍO, M. A. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniosis in Salta, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 1-10, 2002.

PAHO - Pan American Health Organization. Leishmaniasis in the Americas - Epidemiological Bulletin.v.15, n.3, p.8 - 13, 1994.

PALATNIK-DE-SOUSA; C. B.; DAY, M. J. One health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 4, p. 197-207, 2011.

PARANHOS-SILVA, M.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA, G. G. S.; NASCIMENTO, E. G.; DOS SANTOS, W. L. C. Skin reactions to Thimerosal and *Leishmania* in dogs from a leishmaniasis endemic área: it is better to keep them apart. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 679 – 681, 2001.

PEDROSO, A. M. Leishmaniose local do cão. **Annaes Paulistas de Medicina e Cirurgia**, v. 1, n. 2, p. 33 – 39, 1913.

PETERSON, N. E.; VEXENAT, J. A.; ROSA, A. C. O. C.; LAGO, P. R. L. Isolation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from the rodent *Nectomys squamipes* captured in Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.39, p.83, 1988.

PINHEIRO, P.H.C.; PINHEIRO, A.N.; FERREIRA, J.H.L.; COSTA, F.A.L.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C.L. A Recombinant Cysteine Proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as na Antigen for Delayed-Type Hypersensitivity Assays and Serodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p.32-39, 2009.

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 no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.3, p. 561-565, 2009.

REIS, S. R.; NAIFF, R. F.; ALMEIDA-CAMPOS, F. N.; FRANCO, A. R. Intradermorreação de Montenegro em cães (Mammalia:Canidae) experimentalmente inoculados por *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida:Trypanosomatidae), principais agentes causadores de leishmaniose tegumentar na Amazônia. **Acta Amazonica**, v.38, n. 3, p. 593 -596, 2008.

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

REITHINGER, R.; LAMBSON, B. E.; BARKER, D. C.; DAVIES, C. R. Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 748 – 751, 2000.

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J. C.; COUTERNAY, O.; DAVIES, C. R. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania* (*Vianna*) spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1486 – 1493, 2003a.

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J. C.; DAVIES, C. R. The transmission of canine American cutaneous leishmaniasis in Huánuco, Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Higyene**, v. 69, n. 5, p. 473 – 480, 2003b.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 581 – 596, 2007.

REY, L. Parasitologia. 3ª edição. Rio de Janeiro. **Editora Guanabara Koogan**, 2001. 856 p.

RIBEIRO, F. C.; SCHUBACH, A. O.; MOUTA-CONFORT, E. SCHUBACH, T. M. P.; MADEIRA, M. F.; MARZOCHI, M. C. A. Use of ELISA employing *Leishmania* (*Vianna*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmnia*) *chagasi* antigens for the detection og IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 200 – 206, 2007.

RODRIGUES, C. A. T.; BATISTA, L. F. S.; TEIXEIRA, M. C. T.; PEREIRA, A. M.; SANTOS, P. O. M.; OLIVEIRA, G. G. S.; FREITAS, L. A. R.; VERAS, P. S. T. Peripheral Blood Mononuclear cell supernatants From Asympytomatic Dogs Immunized and Experimentally Challenged With *Leishmania chagasi* Can Stimulate Canine Macrophages to Reduce Infection In Vitro. **Veterinary Parasitology**.v.143, p.197-205, 2007.

RONDON, F.M.C; BEVILAQUA, C.M.L.; FRANKE, C.R.; BARROS, R.S.; OLIVEIRA, F.R; ALCÃNTRA, A.C.; DINIZ, A.T. Cross-sectional Serological Study of Canine *Leishmania* Infection in Fortaleza, Ceará State, Brazil. **Veterinary Parasitology**.v.155, p.24-31, 2008.

RYAN, P. R.; ARANA, B. A.; RYAN, J. R.; WIRTZ, R. A.; WORTMANN, G. W.; RIZZO, N. R. The domestic dog, a potential reservoir for *Leishmania* in the Peten region of Guatemala. **Veterinary Parasitology**, v. 115, p. 1 – 7, 2003.

SANTIAGO, M. E. B.; VASCONCELOS, R. O.; FATTORI, K. R.; MUNARI, D. P.; MICHELIN, A. F.; LIMA, V. M. F. Na investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban áreas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 283 – 290, 2007.

SANTOS, G. P. L.; SANAVRIA, A.; MARZOCHI, M. C. A.; SANTOS, E. G. O. B.; SILVA, V. L.; PACHECO, R. S. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do Município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 38, p. 161-166, 2005.

SAVANI, E.S.M.M.; NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; CASTILHO, T.M.; ZAMPIERI, R.A.; FLOETER-WINTER, L.M. The Findings of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* Naturally Infected by Leishmania spp. in a Cutaneous and Canine Visceral Leishmaniases Focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**.v.160, p. 18-24, 2009.

SHAW, S. E. The leishmaniases – survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 541 – 457, 2007.

SHAW, S. E.; LANGTON, D.A.; HILLMAN, T.J. Canine Leishmaniosis in the United Kingdon: A Zoonotic Disease Waiting for a Vector? **Veterinary Parasitology**, 2009.

SILVA; F. L.; RODRIGUES, A. M; REGO, I. O. P.; SANTOS, R. L. H.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Genital lesions and Distribution of Amastigotes in Bitches Naturally Infected With *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, p.86-90, 2008.

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

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORREL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* – infected dogs. **Journal of Compared Pathology**, v.130, p.7-12, 2004.

TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; DIAS, A. C.; ABBAS, M.; ALBERTON, D.; DOS SANTOS, D. R. Luz e galinhas como fatores de atração de *Nyssomyia whitmani* em ambiente rural, Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 3, p. 383 – 388, 2007.

TOLEZANO, J. E.; ULIANA, S. R. B.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. F. L.; BARBOSA, J. A. R.; BARBOSA, J. E. R.; FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J. J. The first records of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba county, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 280 – 284, 2007.

TRAINOR, K. E.; PORTER, B. F.; LOGAN, K. S.; HOFFMAN, R. J.; SNOWDEN, K. F. Eight cases of feline cutaneous leishmaniasis in Texas. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 6, p. 1076 – 1081, 2010.

UCHÔA, C. M. A.; SERRA, C. M. B.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C. M.; SILVA, R. M.; THEOPHILO, F.; FIGLIUOLO, L. P.; HORTA, F. T.; MADEIRA, M. F. Aspectos sorológicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana canina em Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 563 – 568, 2001.

VEGA-LOPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion In Infection Diseases**, v. 16, p. 97 -101, 2003.

VEXENAT, J. A.; BARRETO, A. C.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia. III. Fauna flebotomínea. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, n.03, p. 293-301, 1986.

VOLF, P.; MYSKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 3, p.91, 2007.

Epidemiologia da leishmaniose canina no Sul da Bahia, Brasil.

Nilo Fernandes Leça Júnior[1]; Paula Elisa Brandão Guedes[2], Lailla Nascimento Santana[3]; Valter dos Anjos Almeida[4]; Fábio Santos Carvalho[5], George Rego Albuquerque[6]; Amauri Arias Wenceslau[6]; Alexandre Dias Munhoz[6], Fabiana Lessa Silva[6].

[1] Mestre em Ciência Animal.
[2]Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC.
[3] Médica Veterinária.
[4]Doutorando em Patologia Humana e Experimental no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BA).
[5]Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC.
[6] Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC.

ABSTRACT

Leishmaniasis are zoonosis caused by protozoa of the genus Leishmania. American cutaneous leishmaniasis (ACL) is mainly caused by the species *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, and american visceral leishmaniasis (AVL) is caused by *L. infantum chagasi*. In addition to the proven role as reservoirs of AVL, researchers also suspect the role of dogs as reservoirs of ACL due to reports of this infection in the domestic environment and infected dogs in endemic areas. The aim of this study was to detect *Leishmania* sp. infection in dogs of Vila Operária, Buerarema, Bahia, through the parasitological test, Indirect Immunofluorescent Assay (IFA) and Polymerase Chain Reaction (PCR). Furthermore, this study also aimed to identify risk factors associated with illness in dogs in this locality, by conducting an epidemiological survey. For this purpose, 292 dogs were clinically evaluated for the presence of skin lesions, and the dogs that showed these changes were submitted to scarification injury to prepare the slides for microscopic study of amastigotes. Subsequently, the animals underwent blood sampling for serological (IFA) and molecular (PCR) tests. Additionally, owners of dogs answered an epidemiological questionnaire, in order to identify risk factors for exposure of animals to pathogens of LTA. Of the 292 animals studied, 13 (4.5 %) had lesions suggestive of ACL with negative parasitological examination, and 147 (50.3 %) were seropositive by IFA methods. Of the 273 animals studied by PCR test, 10 (3.66%) were positive for *L. braziliensis* and all samples were negative for *L. infantum chagasi*. Wastelands in the peri-domicile and presence of light in the household were risk factors associated with ACL. The results show that Vila Operária has asymptomatic dogs with ACL and the detection sensitivity of the infected animals by IFA was higher compared to PCR.

Key-words: Dogs; *Leishmaniasp;* Indirect Immunofluorescence; Polymerase Chain Reaction; Risk factors.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários digenéticos do gênero *Leishmania,* que necessitam obrigatoriamente de um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado para concluírem seu ciclo de vida (DAWIT et al., 2013). Essas enfermidades possuem ampla distribuição mundial, afetando países distribuídos pelo Oriente Médio, África, Continente Asiático, Europeu e Americano. No continente americano, as leishmanioses são divididas em duas categorias: leishmaniose visceral americana (LVA) e leishmaniose tegumentar

americana (LTA) (ASHFORD, 2000; CHAPPUIS et al., 2007; BRASIL, 2010; HEUSSER JÚNIOR et al., 2010).

A forma tegumentar da doença é descrita desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, excetuando-se o Chile e o Uruguai. No Brasil, são reconhecidas sete espécies causadoras, sendo as mais importantes *Leishmania* (*Vianna*) *braziliensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (BRASIL, 2010). Dados publicados pela Secretaria de Vigilância em Saúde (2011) revelaram que as regiões Norte e Nordeste foram responsáveis pela grande maioria dos diagnósticos registrados entre os anos de 2000 e 2010, com destaque para o estado da Bahia, que durante esse período registrou 10,2% dos casos humanos diagnosticados no país. O elevado número de casos humanos de LTA associado ao diagnóstico desta infecção em cães levaram a alguns autores a suspeitar que esses animais possam estar atuando como fonte natural da infecção (FALQUETO et al., 1986; DANTAS-TORRES, 2007; PITTNER et al., 2009,HEUSSER JÚNIOR et al., 2010).

A LVA, por sua vez, é uma doença de evolução crônica e na América Latina já foi relatada em pelo menos 12 países, sendo que o Brasil concentra 90% dos casos da doença no continente, causados pela *L. infantum chagasi* (MELO, 2004; CHAPPUIS et al., 2007; TOLEZANO et al., 2007; MAIA-ELKHOURY et al., 2008; RONDON et al., 2008; BRASIL, 2013).Os cães infectados são considerados reservatórios da doença no meio rural e urbano, possuindo grande habilidade em transmitir o agente ao vetor (RODRIGUES et al., 2007).

Dessa forma, considerando o papel do cão como reservatório da LVA e a possibilidade de também agir como reservatório da LTA, influenciando na transmissão e manutenção da doença, esse estudo teve como objetivo a detecção sorológica e molecular de *Leishmania* sp. em cães, bem como os fatores associados à infecção em uma área endêmica para LTA humana, no Nordeste brasileiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local da pesquisa

O estudo foi realizado entre os meses de março a agosto de 2010, no Distrito da Vila Operária, Município de Buerarema (Latitude: 14º 56' Sul, Longitude: 39º 18' Oeste), região sul da Bahia, que é considerada área endêmica para LTA humana (CASTELLANO et al., 2009). A Vila Operária é um distrito rural, distante aproximadamente 7 km do centro da cidade de Buerarema, composto por uma aglomeração humana com característica predominante rural, popularmente chamada pelos residentes por "Sururu" e as demais áreas são compostas por fazendas. Vila Operária possui clima tropical úmido, temperatura média anual de 26º C e pluviosidade anual que varia entre 1500 mm a 2000 mm. Esta localidade está inserida na Mata Atlântica e o principal meio de subsistência é a lavoura cacaueira.

2.2. Animais

Foi incluída neste estudo toda a população canina residente na localidade, excluindo-se animais com idade inferior a seis meses, perfazendo um total de 292 cães. Após autorização dos proprietários, os cães foram inicialmente avaliados clinicamente quanto à presença de lesões cutâneas e, posteriormente, foram colhidas amostras de sangue (aproximadamente 5ml) por punção venosa das veias cefálicas ou jugulares. As amostras foram separadas em dois tubos: sem anticoagulante, para realização dos testes sorológicos e com anticoagulante (EDTA), para os procedimentos de biologia molecular. A metodologia utilizada nessa pesquisa foi julgada e aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, sob protocolo n°. 002/10.

2.3. Obtenção de dados epidemiológicos

Uma entrevista semi-estruturada foi aplicada aos proprietários dos animais com o objetivo de identificar fatores associados à infecção, e abrangia

questões como resenha do animal, características do ambiente em que o animal vive e contato com outros animais (outros cães, gatos, asininos, roedores) (ALMEIDA et al., 2009).

2.4. Exame parasitológico direto

Os animais que durante o exame clínico apresentavam alterações cutâneas condizentes com LTA foram submetidos à escarificação das lesões, com auxílio de lâminas de bisturi. O material coletado foi distribuído sobre lâminas de vidro, que foram coradas com panótico rápido para pesquisa microscópica de formas amastigotas de *Leishmania* sp (DANTAS-TORRES, 2006a).

2.5. Sorologia

Os tubos sem EDTA foram centrifugados a 1292 *g* durante 15 minutos para obtenção de soro. A técnica sorológica utilizada foi a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando-se o *kit* para diagnóstico de Leishmaniose Canina - Bio - Manguinhos®(RIBEIRO et al., 2007), e seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. A titulação do conjugado foi executada segundo as orientações da FUNED – Fundação Ezequiel Dias. Os títulos sorológicos considerados positivos foram ≥ 1:40.

2.6. Biologia Molecular

As amostras de sangue com anticoagulante foram centrifugadas a 1292 g durante 15 minutos para a separação das capas leucocitárias. O DNA foi extraído utilizando-se o método fenol-clorofórmio, e estocado a -20° C. Após a extração, o DNA de todas as amostras foi mensurado através do espectrofotômetro.

A PCR foi realizada visando detectar o DNA do agente etiológico envolvido na infecção, já que existem relatos na literatura de possíveis reações cruzadas em testes sorológicos entre os agentes causadores das leishmanioses dermotrópicas, da leishmaniose visceral e da doença de Chagas

(CAMARGO; REBONATO, 1969; LUCIANO et al., 2009). Para isso, utilizaram-se *primers* específicos para detecção de DNA de *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi*.

2.6.1. PCR para a detecção de DNA de *Leishmania braziliensis*

As sequências dos *primers* utilizados foram B1 (5' GGGGTTGGTGTAATATAGTGG 3') e B2 (5' CTAATTGTGCACGGGGAGG 3'), que amplificam um fragmento de 750 pb do DNA de *Leishmania* (*Vianna*) *braziliensis* (BRUIJN, BARKER, 1992). As condições para a reação da PCR, como o número total de ciclos, temperatura de desnaturação, anelamento e extensão, concentração de Taq DNA polimerase e MgCl2, foram adaptadas daquelas previamente descritas por Reithinger et al. (2000). A reação foi feita num volume final de 25 µL de solução, composta de 17 µL de Supermix® (Invitrogen), 1U de taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,6 mM de MgCl (Invitrogen), 20 pmol de cada *primer* e 100ng de DNA. A amplificação do DNA foi realizada utilizando-se um termociclador (*Biocycler* MJ96G) programado para desnaturação inicial por 5 minutos a 94º C; seguidos por 35 ciclos distribuídos em 94º C por 1 minuto, 59º C por 1 minuto, 72º C por 1 minuto, e 72ºC por 7 minutos para extensão final. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, revelados em brometo de etídeo e fotodocumentados. Foi utilizada como controle positivo cepa de cultura pura de *L. braziliensis* (MHOM/BR/3456), e como controle negativo foi utilizada água ultra pura.

2.6.2. PCR para a detecção de DNA de *Leishmania infantum chagasi*

As sequencias dos *primers* utilizados foram RV1 (5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3') e RV2 (5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'), que amplificam um fragmento de 145 pb do DNA de *L. infantum chagasi* (RAVEL et al., 1995). As condições para a reação da PCR, como o número total de ciclos, temperatura de desnaturação, anelamento e extensão, concentração de Taq DNA polimerase e MgCl2, foram adaptadas daquelas previamente descritas por Lachaud et al. (2002). A reação

foi desenvolvida em volume final de 25 µL de solução, que era composta de 17 µL de Supermix® (Invitrogen), 20 pmol de cada *primer* e 100ng de DNA. A amplificação do DNA foi realizada segundo programa utilizado por Reithinger et al. (2000) com adaptações, com desnaturação inicial por 5 minutos a 94º C; seguidos por 35 ciclos distribuídos em 94º C por 45 segundos, 59º C por 45 segundos, 72º C por 45 segundos, e 72ºC por 7 minutos para extensão final. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, revelados em brometo de etídeo e fotodocumentados. Foi utilizada como controle positivo cepa de cultura pura de *L. chagasi* (MHOM/BR2000/Merivaldo) e como controle negativo foi utilizada água ultra pura.

2.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Epi Info 7.1.3.0 (CDC, EUA) levando em consideração a variável de exposição como os resultados obtidos pela técnica sorológica. Os dados foram comparados pelo teste exato de Fisher e qui-quadrado (χ^2). A odds ratio (OR) da análise bivariada foi calculada utilizando medidas de associação e intervalo de confiança de 95%. As variáveis com valor de p inferior ou igual a 20%,obtidas através da análise bivariada e que demontraram plausibilidade biológica foram selecionadas e submetidas à análise multivariada com regressão logística não-condicional, com o modelo final criado através das variáveis de saída do sistema.

3. RESULTADOS

Durante a avaliação clínica, somente 13 (4,45%) animais apresentaram alterações cutâneas condizentes com LTA, que eram caracterizadas por lesões circulares, ulceradas e de aspecto úmido, localizadas em conduto auricular interno e externo, espelho nasal, bolsa escrotal e no tecido cutâneo, no entanto não foram observadas formas amastigotas de protozoários do gênero *Leishmania* sp. em nenhuma das amostras obtidas através da escarificação das lesões.

Na avaliação sorológica, 147 cães (50,3%) apresentaram resultados positivos, com títulos ≥40. Dos 13 animais que apresentaram lesões cutâneas condizentes com leishmaniose tegumentar ao exame clínico, seis foram sorologicamente positivos.

Das 292 amostras coletadas, 19 tornaram-se inviáveis para realização da PCR, uma vez que foi excedido o tempo preconizado entre a coleta e o processamento do material para extração do DNA. Dessa forma, apenas 273 amostras foram analisadas pela PCR. Dos 273 animais testados para detecção de DNA de *L. braziliensis,* dez (3,7%) tiveram resultados positivos. Desses dez, apenas quatro cães tiveram resultados positivos pela RIFI. Não houve detecção de DNA de *L. infantum chagasi* em nenhuma das amostras avaliadas pela PCR.

A análise dos dados epidemiológicos revelou que os serviços básicos e estruturais como rede sanitária, fossa sanitária, coleta de lixo, água encanada e luz elétrica residencial estavam presentes, respectivamente, em 7,5%, 25,7%, 50,7%, 72,3% e 93,8% dos domicílios visitados. Além disso, durante o questionário epidemiológico, os proprietários dos cães relataram a presença de animais silvestres no peridomicílio, principalmente roedores, marsupiais (gambás) e raposas. Os fatores de risco associados à leishmaniose canina identificados neste trabalho foram presença de terrenos baldios no peridomicílio e luz elétrica nas residências (tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Fatores associados à infecção por *Leishmania* sp. em cães procedentes da Vila Operária, Buerarema, Bahia.

Variável		Positivos	Negativos	P-valor	OR	IC-95%
Sexo	Macho	95	93	0,97	1,02	0,63-1,64
	Fêmea	52	52			
Idade	≤4 anos	104	85	0,05	1,79	1,02-3,13
	>4 anos	28	41			
Presença de bananeira	Sim	132	135	0,42	0,65	0,28-1,50
	Não	15	10			
Presença de fossa sanitária no domicílio	Sim	46	29	0,03	1,82	1,06-3,11
	Não	101	116			
Presença de luz elétrica no domicílio	Sim	142	132	0,08	2,79	0,97-8,05
	Não	05	13			
Presença de terreno baldio no peridomicílio	Sim	126	112	0,08	1,76	0,96-3,23
	Não	21	33			
Contato com asininos	Sim	69	68	0,91	1,00	0,63-1,58
	Não	78	77			
Presença de galinheiro	Sim	90	88	0,97	1,02	0,63-1,63
	Não	57	57			
Contato com cãeserrantes	Sim	73	75	0,81	0,92	0,58-1,45
	Não	74	70			
Contato com marsupiais	Sim	53	44	0,36	1,29	0,79-2,10
	Não	94	101			
Contato com roedores	Sim	62	58	0,79	1,09	0,68-1,74
	Não	85	87			
Contato com raposas	Sim	3	2	0,98	1,48	0,24-9,04
	Não	144	143			

Tabela 2. Associação entre cães positivos e os fatores: presença de terrenos baldios no peridomicílio, residir em área urbana e presença de fossas no domicílio no distrito da Vila Operária, Buerarema, Bahia.

Variável	*Odds Ratio*	Intervalo de Confiança a 95%	*P*-valor
Presença de terrenos baldios no peridomicílio	1,92	1,04-3,52	0,0354
Presença de luz elétrica no domicílio	3,17	1,09-9,21	0,0333

p= 0,0085
likehood= 0,0138

4. DISCUSSÃO

A ausência de formas amastigotas nas amostras das lesões cutâneas observadas ao microscópio de luz demonstrou a reduzida sensibilidade do exame parasitológico direto para o diagnóstico das leishmanioses. Segundo Andrade et al. (2005), a sensibilidade da pesquisa direta do parasito no esfregaço sanguíneo varia de 50 a 70%, entretanto tende a diminuir com a evolução da doença, chegando a apenas 20% depois de decorrido um ano de infecção. Possivelmente, os animais deste estudo, cujas lesões foram submetidas à pesquisa direta do parasito, se encontravam em estágios avançados da infecção, quando a possibilidade de visualização das formas amastigotas no local da lesão cutânea é reduzida. Além disso, a carga parasitária nas lesões na maioria dos casos é reduzida o que, aliado à contaminação bacteriana que ocorre na maioria dos casos, dificulta a visualização dos protozoários nas amostras (SCHUBACH et al., 2001; ANDRADE et al., 2005). Vale ressaltar, ainda, que as lesões cutâneas observadas nos cães desta pesquisa, embora condizentes com as desenvolvidas na LTA, são inespecíficas e podem ser compatíveis com outras alterações tegumentares. Isso sugere que as lesões encontradas podem não estar relacionadas à LTA, e, assim sendo, não se espera encontrar carga parasitária nestas.

Os dados de prevalência deste estudo corroboram com os resultados publicados por Dantas-Torres et al. (2006b), que relataram elevada prevalência (40,3%) de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em uma população canina residente

em área endêmica para leishmaniose. Levando-se em conta que a RIFI é uma técnica com sensibilidade (90% a 100%) e especificidade (80%) elevadas na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (LUCIANO et al., 2009). Dos cães positivos, apenas seis (4,1%) tinham lesões sugestivas de LTA o que nos leva a inferir que na localidade estudada há um número elevado de cães infectados e assintomáticos (95,9%).

Embora a RIFI possa apresentar reações cruzadas com antígenos de *T. cruzi* e *L. infantum chagasi,* possibilitando resultados falsos positivos (LUCIANO et al., 2009), neste estudo não houve detecção de DNA de *L. infantum chagasi* em nenhuma das amostras avaliadas pela PCR. Adicionalmente, em estudo prévio realizado por Leça Júnior et al. (2013), na mesma área de estudo, foi detectado, através da PCR, DNA de *T. cruzi* em apenas dois dos 273 (0,7%) animais avaliados. Esses resultados minimizam a possibilidade de terem ocorrido reações cruzadas nos exames sorológicos, confirmando a elevada prevalência de leishmaniose tegumentar em cães na localidade estudada. Além disso, estudos desenvolvidos por Azevedo et al, (1996) e Carvalho et al. (2010) não observaram a presença de *Lu*. *longipalpis*, vetor biológico incriminado na transmissão da leishmaniose visceral americana, o que minimizaria o surgimento de focos autóctones da doença na região em estudo. Os resultados publicados em um estudo prévio realizado em humanos no município de Ilhéus, região sul da Bahia, sugerem que *L. braziliensis* seria o agente etiológico envolvido nos casos de leishmaniose tegumentar na região (CARVALHO et al., 2010).

A baixa detecção de DNA de *L. braziliensis* nos cães soropositivos pode ser justificada pelo fato da PCR ter sido feita a partir de amostras de sangue (capa de leucócitos), o que reduz a sensibilidade da PCR para pesquisa de *Leishmania*, segundo Reithingeret al. (2000). Esses autores afirmam, ainda, que os protozoários do gênero *Leishmania* subgênero *Viannia* localizam-se inicialmente no sítio de infecção na derme, e que a disseminação por via hematógena só ocorre após um período de tempo indefinido. No caso da LTA, os parasitos localizam-se predominantemente no sítio de infecção na derme, com reduzida disseminação, a qual só ocorre quando os parasitos são fagocitados. Por outro lado, embora os dados desta pesquisa corroborem com os resultados obtidos por Reithingeret al. (2000), eles confrontam com os

dados obtidos por Velasquez et al. (2006) e Dantas-Torres et al. (2010), os quais concluíram que a origem da amostra, quer seja sangue, quer seja tecido, não influencia na sensibilidade da PCR para detecção do DNA de *L. brasiliensis*.

Em relação aos fatores associados à infecção, a presença de terrenos baldios no peridomicílio revelou-se um fator de risco de exposição do animal à leishmaniose, elevando as chances de infecção em 1,92 vezes. Isso se deve à possibilidade desses terrenos atuarem como depósitos de lixo ou matéria orgânica, principalmente porque a coleta no local é ineficaz, favorecendo a aproximação de animais infectados, como pequenos roedores e animais silvestres, e do vetor da doença, em ambiente peridomiciliar. A presença de pequenos roedores infectados por *L. braziliensis* já foi relatada por Brandão-Filho et al. (2003) em zona endêmica para LTA no estado de Pernambuco, sendo que estes têm papel comprovado como reservatórios silvestres do parasito (BRASIL, 2010). Além disso, Lainson (1985) concluiu que a deposição de matéria orgânica próxima ao domicílio atuaria também como fator de atração de marsupiais, reservatórios silvestres de LTA (BRASIL, 2010), que se alimentam dos detritos domésticos. Isso facilitaria o elo de transmissão entre o ambiente silvestre e o peridomiciliar, já que esses animais agiriam tanto como reservatório da doença quanto como de fonte de alimentação para o vetor no ambiente.

Adicionalmente, a presença de luz elétrica nos domicílios incluídos nesta pesquisa também se revelou fator de risco para leishmaniose, e aumentou em 3,17 vezes a possibilidade de exposição dos cães à infecção. *Lutzomyia* w*hitmani*, uma das espécies de vetor incriminada na transmissão de LTA no Brasil e que já foi identificada na região estudada (AZEVEDO et al., 1990a; AZEVEDO et al., 1990b; CARVALHO et al., 2010), difere de outros flebotomíneos, pois se caracteriza por apresentar atividade diurna (SANTOS et al., 2009). Aliado a isso, os resultados do trabalho realizado por Teodoro et al. (2007) no estado do Paraná comprovaram que essa espécie de flebotomíneo pode ser atraída pela presença de fontes luminosas no ambiente peridomiciliar. Analisados em conjunto, esses dados podem justificar a influência da luz elétrica no estabelecimento da LTA na área estudada.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a região possui elevada prevalência de leishmaniose tegumentar canina e grande número de animais infectados assintomáticos. Apesar do papel dos cães como reservatórios da LTA ainda não ser comprovado, esses resultados indicam que os animais assintomáticos podem ser importantes na manutenção do agente da LTA na região em estudo, visto que a região é considerada área endêmica para LTA humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. B. P. F.; FARIA, R. P.; PIMENTEL, M. F .A.; DAHROUG, M. A. A.; TURBINO, N. C. M. R.; SOUSA, V. R. F. Inquérito soroepidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado do Mato Grosso.**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 156 – 159, 2009.

ANDRADE, B. B., BOAVENTURA, V., BARRAL-NETO, M. BARRAL, A. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n.1, p. 75-82, 2005.

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

AZEVEDO, A. C. R.; RANGEL, E. F.; COSTA, E. M.; DAVID, J.; VASCONCELOS, A. W.; LOPES, U. G. Natural infection of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes&Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturité, Ceará state, northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 2, p. 251, 1990a.

AZEVEDO, A. C. R.; RANGEL, E. F.; QUEIROZ, R. G. *Lutzomyia migonei* (França, 1920) naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniais in Ceará state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 4, p. 479, 1990b.

AZEVEDO, A. C. R., VILELA, M. L., SOUZA, N. A., ANDRADE-COELHO, C. A., BARBOSA, A. F., FIRMO, A. L. S., RANGEL, E. F. The sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous leishmaniasis in Ilhéus, state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 75-79, 1996.

BRANDÃO-FILHO, S.P.; BRITO, M. E.; CARVALHO, F.G.; ISHIKAWA, E.A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L.; SHAW, J.J. 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 the Tropical Medicine and Hygiene,** v.97, p. 291 – 296, 2003.

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª edição, 1ª reimpressão, 2010.

BRASIL. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 1ª edição, 5ª reimpressão, 2013.

BRUIJN, M. H.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania brasiliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **ActaTropica**, v.52, p.45-58, 1992.

CAMARGO, M. E.; REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence test for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 4, p. 500 – 505, 1969.

CARVALHO, S. M. S.; SANTOS, P.R.B.;LANZA, H.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Diversidade de flebotomíneos no município de Ilhéus, Bahia. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19, n.3, p.239 – 244, 2010.

CASTELLANO, L. R.; FILHO, D. C.; ARGIRO, L.; DESSEIN, H.; PRATA, A.; DESSEIN, A.; RODRIGUES, V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with Strong interferon-ϒproduction. **Human Immunology**, v. 70, p. 383 – 390, 2009.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral Leishmaniasis: What are the Needs for Diagnosis, Treatment and Control? **Nature Reviews – Microbiology**, v. 5, n.11, p. 873-882, 2007.

DANTAS-TORRES, F. Presence of *Leishmania* amastigotes in peritoneal fluid of a dog with Leishmaniasis from Alagoas, Northeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.4, p. 219 – 221, 2006a.

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

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

DANTAS-TORRES,F.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, F.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.

DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K.A review on biology, epidemiology and public health significance of Leishmaniasis. **Bacteriology & Parasitology**, v.4, n., 2 p. 1 - 7, 2013.

FALQUETO, A.; COURA, J. R.; BARROS, G. C.; GRIMALDI FILHO, G.; SESSA, P. A.; CARIAS, V. R. D.; JESUS, A. C.; ALENCAR, J. T. A. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n.2, p. 155-163, 1986.

HEUSSER JÚNIOR, A.; BELLATO, V.; SOUZA, A. P.; 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. 713-718, 2010.

LACHAUD, L.; MARGCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DREREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1,p. 210-215, 2002.

LAINSON, R. Our present knowledge of the ecology and control of Leishmaniasis in the Amazon region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.18, n.1, p. 47 – 56, 1985.

LUCIANO, R. M.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LUCIANO, D. M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n.3, p.181-187, 2009.

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

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, supplement1, p. 41 – 45, 2004.

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 no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.3, p. 561-565, 2009.

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

REITHINGER, R.; LAMBSON, B. E.; BARKER, D. C.; DAVIES, C. R. Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 748 – 751, 2000.

RIBEIRO, F. C.; SCHUBACH, A. O.; MOUTA-CONFORT, E. SCHUBACH, T. M. P.; MADEIRA, M. F.; MARZOCHI, M. C. A. Use of ELISA employing *Leishmania* (*Vianna*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* antigens for the detection og IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentar leishmaniasis in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 200 – 206, 2007.

RODRIGUES, C. A. T.; BATISTA, L. F. S.; TEIXEIRA, M. C. T.; PEREIRA, A. M.; SANTOS, P. O. M.; OLIVEIRA, G. G. S.; FREITAS, L. A. R.; VERAS, P. S. T. Peripheral Blood Mononuclear cell supernatants from Asympytomatic Dogs Immunized and Experimentally Challenged With *Leishmania chagasi* Can Stimulate Canine Macrophages to Reduce Infection In Vitro. **Veterinary Parasitology**.v.143, p.197-205, 2007.

RONDON, F.M.C; BEVILAQUA, C.M.L.; FRANKE, C.R.; BARROS, R.S.; OLIVEIRA, F.R; ALCÃNTRA, A.C.; DINIZ, A.T. Cross-sectional Serological Study of Canine *Leishmania* Infection in Fortaleza, Ceará State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.155, p.24-31, 2008.

SANTOS, D. R.; SANTOS, A. R.; SANTOS, E. S.; OLIVEIRA, O.; POLANI, L. P.; DA SILVA, A. M. Observações sobre a atividade diurna de *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) na área urbana de Maringá, Paraná, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 18, n. 3, p. 227 – 236, 2009.

SCHUBACH, A.; CRUZZI-MAIA, T.; OLIVEIRA, A. V.; SARTORI, A.; OLIVERIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M. S.; ARAÚDO, M. L.; SOUZA, W. J. S.; HADDAD, F.; PEREZ, M. A.; PACHECO, R. S.; MOMEM, H.; COUTINHO, S. G.; MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; DA COSTA, S. C. C. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 987 – 996, 2001.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. **Boletim eletrônico epidemiológico**, 2011. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_02_ano10.pdf Acesso em 19 de janeiro de 2012.

TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; DIAS, A. C.; ABBAS, M.; ALBERTON, D.; DOS SANTOS, D. R. Luz e galinhas como fatores de atração de *Nyssomyia whitmani* em ambiente rural, Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 3, p. 383 – 388, 2007.

TOLEZANO, J. E.; ULIANA, S. R. B.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. F. L.; BARBOSA, J. A. R.; BARBOSA, J. E. R.; FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J. J. The first records of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba county, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 280 – 284, 2007.

VELASQUEZ, L. G.; MEMBRIVE, N.; MEMBRIVE, U.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; TESSMANN, I. P. B.; SILVEIRA, T. G. V. PCR in the investigation of canine American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 571 – 578, 2006.