



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO DE LEISHMANIOSE CANINA EM**  
**UM MUNICÍPIO DA REGIÃO DO RECÔNCAVO BAIANO**

**BRUNO MILEN VARJÃO**

**Médico Veterinário**

Salvador - BA  
2020

**BRUNO MILEN VARJÃO**

**INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO DE LEISHMANIOSE CANINA EM  
UM MUNICÍPIO DA REGIÃO DO RECÔNCAVO BAIANO**

Defesa apresentada ao Programa de pós-graduação em  
Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da  
Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre  
em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Stella Maria Barrouin Melo  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Roberta Costa Dias

Salvador  
2020

Varjão, Bruno Milen.

Inquérito epidemiológico de leishmaniose canina em um município da região do Recôncavo Baiano / Bruno Milen Varjão. - 2020.

73 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Stella Maria Barrouin Melo.

Coorientadora: Profa. Dra. Roberta Costa Dias.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2020.

1. Medicina Veterinária. 2. Zoonoses - Recôncavo (BA). 3. Doenças transmissíveis em animais. 4. Leishmaniose - Bahia. 5. Leishmaniose - Muritiba (BA) - Epidemiologia. 5. Cães - Doenças. I. Melo, Stella Maria Barrouin. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

CDD - 616.9364

CDU - 616.993.161

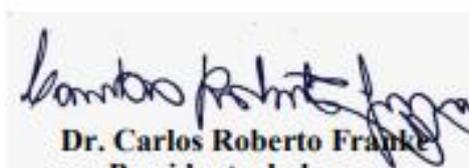
**INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO DE LEISHMANIOSE CANINA EM UM  
MUNICÍPIO DA REGIÃO DO RECÔNCAVO BAIANO**

**BRUNO MILEN VARJÃO**

**Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de Mestre em Ciência  
Animal nos Trópicos**

**Salvador, 09 de abril de 2020**

**Comissão examinadora:**



**Dr. Carlos Roberto Franke**  
Presidente da banca  
EMVZ / UFBA

**Dr. Adriano Figueiredo Monte Alegre**  
UFBA

**Dr. Aristeu Vieira da Silva**  
(UEFS)

**Dra. Rosângela Soares Uzêda**  
(UFBA/EMVZ)



**Dr. Luis Fernando Pita Gondim**  
Coordenador PPGCAT  
EMEVZ / UFBA

Dedico este trabalho a todos os animais e pessoas que adoeceram de leishmaniose, seja ela visceral ou tegumentar. Pois sei das dificuldades que existem em suas vidas ao conviver e tratar a doença.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus (Pai criador de todo o universo), por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente nas horas de angústia.

Ao meu pai Edvaldo Gonçalves Varjão, a minha mãe Sara Helena Oliveira Milen Varjão e as minhas irmãs Natasha Milen Varjão (também veterinária e parceira de trabalho) e Luana Milen Varjão.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado: Georlando Silva, Ana Luísa do Rosário, Alana do Rosário, André Dantas, Emanuelle Oliveira Yagi, Nara Santos, Cosme Nogueira, Jair Mormay, e todos aqueles que não me recordo no momento, mas que contribuíram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser realizado.

Agradeço também aos responsáveis pelos cães que me permitiram avaliá-los e utilizá-los em minha pesquisa científica.

E claro agradeço aos elementos principais dessa pesquisa, os cães, pois sem eles nada disso seria possível.

Quero agradecer também a Universidade Federal da Bahia (UFBA), a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa. Gostaria de agradecer também as professoras que sempre me orientaram especialmente a Flaviane Alves de Pinho, Roberta Costa Dias e Stella Maria Barrouin Melo, e aos outros professores que me ajudaram nesse trabalho.

Gostaria de agradecer a Prof<sup>a</sup> Hiro Goto e sua equipe do Instituto de Medicina Tropical em São Paulo na Universidade Federal de São Paulo (IMT-USP) que me ajudaram e me receberam de braços abertos para realização de alguns experimentos.

“A felicidade não se resume na ausência de problemas, mas sim na sua capacidade de lidar com eles.” Albert Einstein

## RESUMO

VARJÃO, B. M. **Inquérito epidemiológico de leishmaniose canina em um município da região do Recôncavo Baiano**. 2020. 73 f. Dissertação (Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2020.

O estado da Bahia apresenta casos de leishmaniose visceral humana (LVH) causada por *Leishmania infantum*, assim como relatos de infecção em animais. O Recôncavo Baiano, onde a doença é conhecidamente endêmica em humanos, até o presente momento não apresenta quantidade de estudos suficientes quanto a real situação da leishmaniose canina causada por *L. infantum* (LCan). Objetivou-se investigar a situação epidemiológica da doença canina no município de Muritiba, localizado no recôncavo, onde a LVH é considerada de ocorrência esporádica. Foram examinados 351 cães clinicamente e por meio de diagnóstico sorológico e molecular (PCR) a partir de amostras de aspirado de medula óssea; aspectos ambientais foram levantados e as localidades que tinham cães soropositivos registradas por georreferenciamento. Com base nos critérios do Ministério da Saúde foi considerado infectado o cão com resultados positivos no teste de triagem (TR-DPP) e no teste confirmatório (ELISA), encontrando-se uma soroprevalência de 15,7% (55/351). Nenhuma associação foi encontrada entre a soropositividade para LCan e o sexo, raça, idade e se os cães eram domiciliados. Quanto à caracterização clínica dos cães soropositivos, 72,7% (40/55) apresentavam algum sinal clínico sugestivo de LCan, como alopecia ( $p < 0,0001$ ), úlceras na pele ( $p < 0,0001$ ), onicogribose ( $p < 0,0001$ ), despigmentação do focinho ( $p < 0,0001$ ), crostas na pele ( $p = 0,0051$ ) e hiperqueratose ( $p < 0,0001$ ), alterações oculares ( $p = 0,0117$ ), apatia ( $p = 0,0007$ ), emagrecimento ( $p < 0,0001$ ), mucosas hipocoradas ( $p = 0,0015$ ), linfonodos aumentados ( $p = 0,0139$ ) e esplenomegalia ( $p < 0,0001$ ). O método de PCR em amostras de medula óssea, realizado em 36 cães soropositivos, confirmou a presença de DNA de *L. infantum* em 88,8% (32/36) desses cães. Verificou-se ainda que os animais positivos não estão distribuídos uniformemente no município e que os aspectos ambientais como criação de aves e falta de saneamento básico adequado podem facilitar a manutenção do vetor na região, o que com a presença do agente oferece um risco de transmissão para os seres humanos e manutenção da infecção entre os animais gerando um potencial para endemicidade na área estudada. Os dados confirmam a ocorrência de infecção e doença canina causada por *L. infantum* no município de Muritiba.

**Palavras-Chave:** Georreferenciamento. *Leishmania infantum*. Saúde Única. Zoonose.

## ABSTRACT

VARJÃO, B. M. **Canine leishmaniasis epidemiological survey in a city from Recôncavo Baiano region**. 2020. 73 f. Dissertation (Master in Animal Science in the Tropics) - School of Veterinary Medicine and Animal Science - Federal University of Bahia, 2020.

Bahia state presents cases of human visceral leishmaniasis (LVH) caused by *Leishmania infantum*, as well as reports of infection in animals. Recôncavo Baiano, where the disease is known to be endemic in humans, has not yet been studied for canine leishmaniasis caused by *L. infantum* (LCan). The objective was to investigate an epidemiological situation of the disease in the municipality of Muritiba, located in the recôncavo, where an LVH is considered a sporadic occurrence. 351 dogs were examined clinically and by serological and molecular diagnosis (PCR) from samples of bone marrow aspirate; environmental aspects were raised and as places that had seropositive dogs registered by georeferencing. Based on the requirements of Ministry of Health, the dog with positive results in serology a screening test (TR-DPP) and a confirmatory test (ELISA) was considered positive, found a seroprevalence of 15.7% (55/351). No association was found between seropositivity for LCan and sex, race, age and whether the dogs were domiciled. Regarding the clinical characterization of seropositive dogs, 72.7% (40/55) presented some clinical sign suggestive of LCan, such as alopecia ( $p < 0.0001$ ), skin ulcers ( $p < 0.0001$ ), onychoglyphosis ( $p < 0.0001$ ), depigmentation of the dog's snout ( $p < 0.0001$ ), crusts on the skin ( $p = 0.0051$ ) and hyperkeratosis ( $p < 0.0001$ ), eye changes ( $p = 0.0117$ ), apathy ( $p = 0.0007$ ), weight loss ( $p < 0.0001$ ), pale mucous membranes ( $p = 0.0015$ ), enlarged lymph nodes ( $p = 0.0139$ ) and splenomegaly ( $p < 0.0001$ ). Bone marrow PCR method performed in 36 seropositive dogs confirmed the presence of *L. infantum* DNA in 88.8% (32/36) of these dogs. It was also found that positive animals are not evenly distributed in the municipality and that environmental aspects such as poultry farming and the lack of basic sanitation are adequate to allow the maintenance of vectors in the region, or the presence of agents that offer a risk of transmission to humans and maintenance of infection among animals that generate an endemic potential in the studied area. The data confirm an occurrence of infection and canine disease caused by *L. infantum* in the municipality of Muritiba.

**Keywords:** Georeferencing. *Leishmania infantum*. Single Health. Zoonosis.

**LISTA DE SIGLAS**

<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>CVBD</b>	Companion vector-borne diseases
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked ImunoSorbent Assay
<b>FA</b>	Fosfatase alcalina
<b>GPS</b>	Sistema de Posicionamento Global
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>IFI</b>	Imunofluorescencia Indireta
<b>LCan</b>	Leishmaniose canina
<b>LIVE</b>	Laboratório de Infectologia Veterinária
<b>LVH</b>	Leishmaniose visceral humana
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>SFM</b>	Sistema fagocitário mononuclear
<b>SIG</b>	Sistemas de Informações Geográficas
<b>TR-DPP</b>	Teste Rápido - Dual Path Plataform
<b>UFBA</b>	Universidade Federal da Bahia
<b>µL</b>	Microlitros
<b>UTM</b>	Projeção Universal Transversa de Mercator
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b>	Status da endemicidade da leishmaniose visceral no mundo .....	22
<b>Figura 2</b>	Localização geográfica do município de Muritiba-BA .....	32
<b>Figura 3</b>	Presença (A) e ausência (B) de sinais clínicos em cães com LCan .....	42
<b>Figura 4</b>	Sinais clínicos dos cães com LCan diagnosticados sorologicamente na região de Muritiba, seguindo os critérios do Ministério da Saúde .....	44
<b>Figura 5</b>	Distribuição espacial dos cães soronegativos e soropositivos para LCan na zona rural (São José do Itaporã) e urbana (Centro) de Muritiba, com base nos critérios de diagnóstico estabelecidos pelo Ministério da Saúde .....	48
<b>Figura 6</b>	Casas com quintal com vegetação .....	50
<b>Figura 7</b>	Distanciamento do aterro sanitário (círculo amarelo) dos casos de LCan .....	50

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Manifestações clínicas e alterações laboratoriais encontradas na LCan por <i>L. infantum</i> .....	17
<b>Quadro 2</b>	Soroprevalência de leishmaniose canina nos municípios da Bahia, Brasil ...	25
<b>Tabela 1</b>	Análise sorológica das 351 amostras de cães domiciliados ou semi-domiciliados no município de Muriba-BA, empregando os critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde para diagnóstico da leishmaniose canina .....	38
<b>Tabela 2</b>	Características gerais dos cães soropositivos para leishmaniose canina oriundos do município de Muritiba-BA, empregando os critérios de diagnóstico estabelecidos pelo Ministério da Saúde .....	41
<b>Tabela 3</b>	Associação entre os sinais clínicos e soropositividade para leishmaniose canina dos cães do município de Muritiba, empregando os critérios de diagnóstico estabelecidos pelo Ministério da Saúde .....	45
<b>Tabela 4</b>	Número de domicílios por localidade avaliados, soropositividade para LCan e características ambientais observadas intra- e peridomicílio durante a busca ativa .....	47

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1	A LEISHMANIOSE CANINA POR <i>Leishmania infantum</i> .....	14
<b>2.1.1</b>	<b>Etiologia e transmissão</b> .....	14
<b>2.1.2</b>	<b>Fisiopatologia</b> .....	15
<b>2.1.3</b>	<b>Diagnóstico da Leishmaniose Canina por <i>L. infantum</i></b> .....	16
2.1.3.1	<i>Diagnóstico clínico e patologia clínica</i> .....	16
2.1.3.2	<i>Diagnóstico laboratorial</i> .....	18
2.1.3.2.1	Sorologia .....	19
2.1.3.2.2	Exames parasitológicos .....	20
2.1.3.2.3	Exames moleculares .....	21
2.2	EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR <i>L. infantum</i> .....	22
<b>2.2.1</b>	<b>A Distribuição Geográfica da Leishmaniose Visceral Humana</b> .....	22
<b>2.2.2</b>	<b>A Distribuição Geográfica da Leishmaniose Canina (LCan)</b> .....	24
<b>2.2.3</b>	<b>Reservatórios e Medidas de Controle da Leishmaniose por <i>L. infantum</i></b> .....	25
2.3	ANÁLISES ESPACIAIS DA LEISHMANIOSE HUMANA E CANINA A PARTIR DE GEORREFERENCIAMENTO .....	28
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	30
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
4.1	OBJETIVO GERAL .....	30
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
5.1	ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS .....	31
5.2	ÁREA DE ESTUDO E DESENHO EXPERIMENTAL .....	31
5.3	EXAME FÍSICO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	34
5.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INFECÇÃO POR <i>L. infantum</i> .....	35
<b>5.4.1</b>	<b>Exame parasitológico</b> .....	35
<b>5.4.2</b>	<b>Exame sorológico</b> .....	35
<b>5.4.3</b>	<b>Diagnóstico molecular</b> .....	36
5.5	GEORREFERENCIAMENTO .....	37
5.6	ANÁLISE DOS DADOS .....	37
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
6.1	PREVALÊNCIA SOROLÓGICA DA LCan CAUSADA POR <i>Leishmania infantum</i> NO MUNICÍPIO DE MURITIBA-BA .....	38
6.2	CARACTERIZAÇÃO GERAL E CLÍNICA DOS CÃES E A ASSOCIAÇÃO COM A SOROPOSITIVIDADE .....	40
6.3	CARACTERIZAÇÃO ESPACIAL DOS CÃES SOROPOSITIVOS DO MUNICÍPIO DE MURITIBA E FATORES AMBIENTAIS .....	46
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	51
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
	<b>APÊNDICE A</b> – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Tutor .....	69
	<b>APÊNDICE B</b> – Questionário Observacional do Ambiente das Colheitas .....	70
	<b>ANEXO A</b> – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais .....	71
	<b>ANEXO B</b> – Ficha de Campo de Exame Clínico de Leishmaniose Canina do Ambulatório de Leishmanioses Zoonóticas do HOSPMEV-UFBA .....	72
	<b>ANEXO C</b> – Email de submissão do artigo a Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que desencadeiam processos fisiopatológicos diversos. Em seres humanos, a classificação da doença se baseia no tipo de apresentação clinicopatológica, dividindo-se em leishmaniose visceral humana (LVH) e leishmaniose tegumentar (LAINSON; SHAW, 1987; TORRES-GUERRERO et al., 2017). As principais espécies causadoras da LVH são *L. donovani*, agente etiológico na África, Europa e Ásia, e *L. infantum* na região do Mediterrâneo (Europa) e nas Américas (ALVAR et al., 2012; AKHOUND et al., 2016). *L. infantum* infecta cães e outros mamíferos domésticos e silvestres (QUINNELL; COURTENAY, 2009), e embora o cão também seja infectado por *L. donovani*, é questionada a possibilidade de participação do cão na transmissão para humanos em regiões endêmicas para essa espécie (AKTER et al., 2016).

O aspecto comum aos casos de LVH produzida por *L. infantum* na América ou por *L. donovani* na África e Ásia, é o fato de aproximadamente 94% desses casos ocorrerem em países em desenvolvimento como Etiópia, Quênia, Somália, Sudão, Sudão do Sul, Índia e Brasil (WERNECK, 2014; WHO, 2019). Nesses países, a morbidade e a mortalidade são altas, por ser a LVH uma doença negligenciada pelas autoridades governamentais, em aspectos como: (1) falta de planejamento estratégico de controle da doença; (2) ausência de medidas voltadas para controle dos vetores; (3) falta de diagnóstico e de tratamento adequado das pessoas doentes; (4) falta de medidas públicas básicas como saneamento, água potável, coleta de lixo e atenção à educação, que fazem com que a população não tenha adequada qualidade de vida ou meios de se proteger contra a doença (OKWOR; UZONNA, 2016; WERNECK, 2014).

No Brasil, a espécie *L. infantum* é transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* e é responsável por ocasionar a LVH e a leishmaniose canina (LCan), doenças caracterizadas por serem sistêmicas e crônicas que, quando não tratadas, podem evoluir para o óbito do hospedeiro, respectivamente o homem e o cão (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; RIBEIRO et al., 2018). No ambiente peri-urbano e urbano, o cão doméstico é considerado o principal reservatório do agente infeccioso e um elemento importante da cadeia epidemiológica da infecção (DEANE; DEANE, 1955; CAMPOS et al., 2017; GRAMICCIA, 2011). O governo brasileiro estabeleceu o Decreto Nº 51.838 em 14 de março de 1963, que trata das normas técnicas especiais de combate às leishmanioses no Brasil, em que uma das medidas implementadas seria a identificação e eliminação de cães soropositivos

em testes laboratoriais como forma de controlar a doença humana (BRASIL, 1963). Apesar disso, a LVH se expandiu em todo o território nacional com registros de casos nas 26 unidades federativas brasileiras e no Distrito Federal com uma incidência de 3.455 casos/ano, com letalidade de 8,9% no ano de 2018 (BRASIL, 2020). Além disso, estudos recentes demonstraram que a eliminação de cães não é eficaz para conter a expansão da leishmaniose causada por *L. infantum* (DANTAS-TORRES et al., 2019b; TRAVI et al., 2018).

Os dados das infecções humana e canina mostram que os estados do Nordeste do Brasil apresentam os maiores índices de incidência e prevalência em comparação às outras regiões (BRASIL, 2020). Entretanto, ainda existem municípios do Nordeste com subnotificação dos casos humanos e sem dados sobre a prevalência da infecção canina, portanto, com mais deficiência nas medidas de controle e prevenção (FREITAS-ROCHA et al., 2018; MAIA-ELKHOURY et al., 2007).

No ano de 2018, a Bahia ocupou o terceiro lugar no Nordeste com o maior número de casos humanos de LVH (BRASIL, 2020). O Recôncavo Baiano é uma região com notificações de casos humanos, mas ainda existem muitos municípios sem registros epidemiológicos sobre infecção canina, a exemplo do município de Muritiba. Nesse sentido, o presente trabalho objetivou investigar a situação epidemiológica da LCan causada por *L. infantum* no município de Muritiba-BA, localizado em uma região de transmissão da leishmaniose humana (BRASIL, 2019a), bem como caracterizar por georreferenciamento a distribuição da infecção canina.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A LEISHMANIOSE CANINA POR *Leishmania infantum*

#### 2.1.1 Etiologia e Transmissão

A leishmaniose canina (LCan) é causada por protozoários da espécie *Leishmania infantum* que pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, com ciclo biológico heteroxênico, necessitando assim de dois hospedeiros, um vertebrado, representado principalmente por canídeos (silvestres e domésticos), roedores e humanos, e de um invertebrado, representado pelos insetos vetores (GUIMARAES-E-SILVA et al., 2017; LAINSON; SHAW, 1987; SCHLEIN, 1993). *L. infantum* é transmitida entre seus hospedeiros a partir da picada de insetos pertencentes à ordem Diptera, da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, na linguagem comum flebotomíneos. Apenas as fêmeas de flebotomíneos realizam a hematofagia, devido à necessidade do repasto sanguíneo para amadurecimento dos ovos, portanto, sendo capazes de transmitir *L. infantum* para os hospedeiros mamíferos (KILLICK-KENDRICK, 1990; MORAES et al., 2018). Nas Américas, incluindo o Brasil, a espécie *Lutzomyia longipalpis* é a principal transmissora desse parasito, conhecida popularmente por mosquito-palha, inseto muito pequeno cujas larvas não aquáticas costumam se desenvolver em locais com matéria orgânica em decomposição (GUIMARAES-E-SILVA et al., 2017; LAINSON; SHAW, 1987;). Na África e Eurásia os transmissores de *L. infantum* pertencem ao gênero *Phlebotomus* (*P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. neglectus* e *P. perfiliewi*) (ALTEN et al., 2016; PETRELLA et al., 2015).

As formas biológicas de *L. infantum* são caracterizadas pela sua apresentação pleomórfica em duas formas distintas: as formas paramastigotas e promastigotas (forma flagelar) encontradas no vetor *L. longipalpis*, e as formas amastigotas (forma aflagelar) encontradas, principalmente, no interior de células do sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros mamíferos (MICHALICK; GENARO, 2005; MORAES et al., 2018). Quando o vetor faz seu repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero infectado, ingere as formas amastigotas, que no trato digestório do vetor se transformam em promastigotas metacíclicas (forma flagelada). No momento em que o vetor faz um novo repasto sanguíneo em outro hospedeiro mamífero, libera as formas promastigotas presentes em sua saliva, as quais são fagocitadas por macrófagos teciduais infectando um novo hospedeiro (KILLICK-KENDRICK, 1990).

### 2.1.2 Fisiopatologia

As leishmanias ao serem inoculadas na pele do hospedeiro pelos vetores, invadem células do sistema fagocítico mononuclear. Dentro dos macrófagos, o parasito sofre a transformação da forma promastigota para a forma amastigota - intracelular obrigatória (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010; SEGUIN; DESCOTEAUX, 2016). As formas amastigotas se multiplicam por divisão binária iniciada pela duplicação do cinetoplasto no interior do vacúolo fagocitário dos macrófagos. Após sucessivas multiplicações, na ausência do controle parasitário pela célula hospedeira, esta rompe-se e as amastigotas libertadas são fagocitadas por outros macrófagos (SEGUIN; DESCOTEAUX, 2016). *Leishmania* spp. pode se disseminar nos macrófagos para outros órgãos do corpo (visceralização das amastigotas), principalmente nos órgãos linfoides, tais como medula óssea, baço, fígado e linfonodos, embora macrófagos infectados ocasionalmente possam ser encontrados em todos os tecidos, incluindo sangue, pele, pulmões, rins, testículos, coração, meninges e outros, causando uma infecção crônica (TAFURI et al., 2001; ALVES et al., 2010; SILVA et al., 2002).

O desenvolvimento da doença vai depender da resposta imune do hospedeiro à *L. infantum*. Geralmente a LCan é caracterizada por linfadenopatia, hipergamaglobulinemia e perda de peso, evoluindo cronicamente até a morte ou mantendo-se subclínica por períodos variados (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Estudos com cães têm mostrado que a resposta mediada por células Th1 é responsável pela resolução da infecção e que a proliferação de células Th2 exacerba o processo infeccioso, caracterizando-se como uma infecção com resposta polarizada (PINELLI et al., 1994; 2000; ALMEIDA-LEAL et al., 2014). Dessa forma, cães infectados por *L. infantum*, tanto de forma natural quanto experimental, podem apresentar uma resposta imune incapaz de conter a infecção e portanto são susceptíveis ao desenvolvimento de infecção ativa caracterizada por sinais clínicos, doença progressiva e fatal; no outro polo, podem apresentar uma resposta imune capaz de controlar a infecção, que permanece subclínica e com baixas cargas parasitárias, mantendo esses cães clinicamente saudáveis, sendo, portanto considerados resistentes à infecção (PINELLI et al., 1994; 2000; ALMEIDA-LEAL et al., 2014; HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGO, 2017).

Os cães susceptíveis com infecção ativa desenvolvem a visceralização das amastigotas e uma produção descontrolada e intensa de anticorpos, detectada em exames de patologia clínica como hiperglobulinemia (PROVERBIO et al., 2014). O excesso circulante de gamaglobulinas é associado à deposição de imunocomplexos em diferentes tecidos, levando às consequências inflamatórias que culminam com doença e disfunção em diversos sistemas orgânicos (RIBEIRO et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; KOUTINAS;

KOUTINAS, 2014). A pele é um importante órgão no progresso da infecção, sendo comuns a presença de úlceras crostosas em pontas de orelha, cauda e focinho, a descamação furfurácea e/ou alopecia (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2013; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

Nos órgãos linfóides, há reação inflamatória e difusa com macrófagos repletos de parasitos, o que resulta em hipertrofia dos linfonodos e esplenomegalia (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2013). Nos rins, ocorre glomerulonefrite ou nefrite intersticial devido à doença por deposição de imunocomplexos nos glomérulos levando ao comprometimento da função renal (WILSON et al., 2017). As lesões oculares tais como ceratoconjuntivite, blefarite e uveíte são também relacionadas com deposição de imunocomplexos (FREITAS et al., 2017). Entretanto, qualquer tecido do corpo do cão susceptível pode ser acometido pela invasão parasitária e inflamação subsequente, gerando o que se considera quadros atípicos de LCan, como por exemplo pneumonite, discoespondilite ou enterite (ALVES et al., 2010; CIARAMELLA et al., 1997; RUIZ; LALOY; BENCHEKROUN, 2015; NERY et al., 2015).

### **2.1.3 Diagnóstico da Leishmaniose Canina por *L. infantum***

Para o diagnóstico da LCan por *L. infantum* é importante que o cão passe por avaliação médico-veterinária, para exame clínico e diagnóstico laboratorial, que é imprescindível para uma definição diagnóstica correta (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

O diagnóstico laboratorial das alterações patológicas produzidas pela infecção e caracterização clínica em diferentes estádios é feito por meio de testes de patologia clínica (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

#### *2.1.3.1 Diagnóstico Clínico e Patologia Clínica*

O diagnóstico clínico da LCan pode ser um problema para médicos veterinários e autoridades de saúde pública devido a ampla variedade de sinais clínicos que podem ser observados no cão com LCan, podendo ser confundida com outras enfermidades. No geral, os cães podem se apresentar clinicamente sadios (portadores de infecção subclínica) ou com poucos sinais clínicos, enquanto outros apresentam doença grave polissistêmica (SOLANO-GALLEGO et al., 2011) (Quadro 1). Além disso, por se tratar de uma doença crônica, a infecção pode estar clinicamente inaparente por anos, pois o aparecimento de sinais clínicos depende do estado imunológico do cão e da virulência da cepa de *Leishmania* (PINELLI et al., 1994; 2000; ALMEIDA-LEAL et al., 2014).

**Quadro 1** – Manifestações clínicas e alterações laboratoriais encontradas na LCan por *L. infantum*

<b>MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS</b>	
<b>Geral</b>	
○ Linfadenomegalia generalizada	○ Esplenomegalia
○ Perda de peso corporal	○ Poliúria e polidipsia
○ Diminuição ou aumento do apetite	○ Febre
○ Letargia	○ vômito
○ Palidez das membranas mucosas	○ Diarreia (incluindo colite crônica)
<b>Cutâneo</b>	
○ Dermatite esfoliativa não pruriginosa, com ou sem alopecia	○ Dermatite papular
○ Dermatite erosivo-ulcerativa	○ Dermatite pustular
○ Dermatite nodular	○ Onicogribose
<b>Ocular</b>	
○ Blefarite (esfoliativa, ulcerativa ou nodular) e conjuntivite (nodular)	○ Ceratoconjuntivite, comum ou seca
	○ Uveíte anterior / Endoftalmite
<b>Outros</b>	
○ Lesões ulcerativas ou nodulares mucocutâneas e mucosas (orais, genitais e nasal)	○ Claudicação (poliartrite erosiva ou não erosiva, osteomielite, polimiosite)
	○ Distúrbios neurológicos
○ Distúrbios vasculares (vasculite sistêmica, tromboembolismo arterial)	○ Miosite mastigatória atrófica
	○ Epistaxe
<b>ALTERAÇÕES LABORATORIAIS</b>	
<b>Hemograma</b>	
○ Anemia não regenerativa leve a moderada	○ Trombocitopenia
○ Leucocitose ou leucopenia	○ Hemostasia secundária prejudicada e fibrinólise
○ Trombocitopenia	
<b>Proteínas séricas e eletroforetograma</b>	
○ Hiperglobulinemia, beta policlonal e / ou gammaglobulinemia	○ Hipoalbuminemia
	○ Diminuição da relação albumina / globulina
<b>Perfil bioquímico / de urina</b>	
○ Proteinúria leve a grave	○ Atividades enzimáticas hepáticas elevadas
○ Azotemia renal	

Fonte: Adaptado de Ribeiro et al. (2013) e Solano-Gallego et al. (2011).

A LCan é caracterizada desde sinais clínicos tegumentares a sistêmicos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). As alterações dermatológicas mais relatadas são alopecia, dermatite furfurácea e úlceras cutâneas com distribuição local ou generalizada (MOREIRA et al., 2016; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; SILVA et al., 2017). O cão pode também apresentar apatia, emagrecimento progressivo com atrofia muscular, linfadenomegalia focal ou generalizada, hepatoesplenomegalia, uveíte, distúrbios gastrointestinais (enterite, melena,

diarréia), pneumonite, convulsões, mioclonia, ptose facial, disfagia, estrabismo, andar em círculos decorrentes das lesões no sistema nervoso (CIARAMELLA et al., 1997; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2013; SILVA et al., 2017; BLAVIER et al., 2001). As alterações laboratoriais mais comuns são anemia geralmente normocítica normocrômica, trombocitopenia, aumento dos níveis séricos de proteínas totais e globulinas, hipoalbuminemia e leucopenia, além disso, pode-se observar azotemia e alterações nas enzimas de função hepática alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2013).

A imunossupressão da resposta imune produzida e intensificada pela presença de *Leishmania* sp., favorece o aparecimento de patologias e/ou infecções oportunistas e/ou concomitantes, associadas a outros patógenos endêmicos nas mesmas áreas, como *Ehrlichia* sp., *Babesia* sp. ou helmintos, dificultando o diagnóstico da LCan (FREITAS et al., 2012; GAMA-MELO et al., 2019).

#### 2.1.3.2 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial para determinação da infecção pode ser feito de forma indireta por meio da avaliação da resposta imune humoral, utilizando testes que detectam a presença de anticorpos específicos contra antígenos de *Leishmania* sp., principalmente no soro. Existem vários testes sorológicos que detectam principalmente IgG em resposta à infecção, dentre eles os métodos baseados em imunocromatografia, imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático por adsorção à placa (ELISA) ou aglutinação (MOREIRA et al., 2007; LEANDRO-JUNIOR, 2014; RIBEIRO et al., 2019). Além da confirmação de uma suspeita clínica, os ensaios sorológicos são também utilizados em estudos epidemiológicos e, de acordo com suas características de aplicação, sensibilidade e especificidade, são definidos como ensaios de triagem populacional, a exemplo do DPP® (*Dual Path Platform*, Biomanguinhos, Fiocruz, BR), ou ensaios confirmatórios, a exemplo do Ensaio Imunoenzimático (EIE-LVC, Biomanguinhos, Fiocruz, BR) (FIGUEIREDO et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2019).

O diagnóstico laboratorial direto da infecção é feito por meio de exames capazes de detectar a presença do parasito ou de seu DNA nas amostras colhidas dos cães, e são os únicos verdadeiramente confirmatórios da infecção por *Leishmania* spp. (SUNDAR; RAI, 2002; FARIA; ANDRADE, 2012). Os exames parasitológicos podem empregar técnicas como o exame citológico, cultura, histologia ou imuno-histoquímica (MOREIRA et al., 2007). As técnicas moleculares são basicamente as variantes da *Polymerase Chain Reaction*

(PCR), sendo elas qualitativas e quantitativas. Das qualitativas existem: a) PCR convencional onde ocorre a desnaturação – separação da dupla fita de DNA, anelamento ou hibridização – os iniciadores ou primers se ligam a fita de DNA que se pretende amplificar; extensão ou polimerização – com o ponto de partida já identificado, a Taq polimerase liga-se a fita sinalizada pelo primer, repetindo-se durante vários ciclos complementando-a; b) a Nested PCR que foi projetada para melhorar a sensibilidade e a especificidade, envolvendo o uso de dois conjuntos de iniciadores e duas reações sucessivas à PCR. E quantitativas como a qPCR ou PCR em tempo real cujas metodologias permitem realizar a quantificação do alvo durante o processo de amplificação do DNA (MOREIRA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2017; SUNDAR; SINGH, 2018). Nenhum teste para o diagnóstico da LCan apresenta 100% de sensibilidade e de especificidade (RIBEIRO et al., 2019; DUTHIE; LISON; COURTENAY, 2018), portanto, o diagnóstico de infecção e doença requerem a associação de testes.

#### 2.1.3.2.1 Sorologia

Os exames sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde são o teste de triagem (teste rápido) determinado pelo teste imunocromatográfico *Dual Path Platform TR-DPP®* (Biomanguinhos, Fiocruz, BR) que emprega como antígeno a proteína recombinante k29 de *L. infantum* e pelo ensaio imunoenzimático ELISA (EIE-LVC, Biomanguinhos, Fiocruz, BR), teste confirmatório pelo Ministério da Saúde, que usa antígenos solúveis de *L. major-like* para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* nas amostras caninas (BRASIL, 2014).

O teste imunocromatográfico TR-DPP® apresenta sensibilidade entre 93% a 100% em cães em condição subclínica, porém, em cães doentes, apresenta elevada sensibilidade e especificidade, de 99% a 100%, respectivamente (GRIMALDI et al., 2012; PESSOA-E-SILVA et al., 2019). No método ELISA, a sensibilidade pode variar entre 71 e 100%, e a especificidade entre 85% e 100% (MARCONDES et al., 2013).

Além dos testes padronizados pelo Ministério da Saúde, a literatura descreve diversos ensaios ELISA com diferentes níveis de acurácia. Dentre os fatores que resultam na maior ou menor acurácia de um teste ELISA incluem-se as enzimas de detecção, sendo as mais utilizadas as peroxidases e fosfatases, ou os equipamentos de detecção disponíveis (espectrofotômetro, luminímetro, fluorímetro) (KHATKHATAY; DESAI, 1999). Outro teste sorológico conhecido é a reação de imunofluorescência indireta (RIFI ou IFI) que apresenta uma sensibilidade de 68,0% e especificidade 87,5% (LIRA et al., 2006), conhecida como uma técnica de dupla camada, baseando-se na detecção de anticorpos no soro do paciente por meio de antígenos de *L. major* fixados em uma lâmina (LIRA et al., 2006).

Tanto no ELISA, quanto em outros métodos sorológicos, um fator crucial na capacidade diagnóstica é a qualidade do tipo de antígeno (CONTRERAS, 2018; TRAVI et al., 2018). A principal consequência da diversidade de testes com diferentes acurácias é que os levantamentos epidemiológicos podem resultar em proporções de positivos/negativos maiores ou menores em uma mesma área conforme o teste escolhido, não refletindo o grau real de infecção.

Dessa forma, a literatura tem trabalhos como o de Laurenti et al. (2014), que contesta o atual protocolo do Ministério da Saúde e sugere a utilização do TR-DPP® como teste confirmatório, ao invés do ELISA. Outros autores enfatizam aspectos como a facilidade de manuseio e a rapidez na realização do TR-DPP®, o que favorece a sua utilização fora do ambiente laboratorial (GRIMALDI et al., 2012; WOYAMES-PINTO; RIBEIRO; TAFURI, 2016). Há estudos que descrevem a ocorrência relevante de resultados falso-positivos com cães comprovadamente negativos (ALVES et al., 2012), ou falso-negativos em cães positivos em testes confirmatórios (LOPES et al., 2017). Peixoto, Oliveira e Romero (2015) realizaram uma metanálise para avaliar a acurácia dos testes diagnósticos de LCan com protocolos do Ministério da Saúde e estimaram uma sensibilidade de 83,5% (IC95% 78,3 a 87,9) e uma especificidade de 72,9% (IC95% 70,5 a 75,2) para TR-DPP e sensibilidade de 89% (IC95% 86,9 a 90,9) e especificidade de 87% (IC95% 85,6 a 88,3) para o ELISA com antígenos brutos. Nesta revisão sistemática, observou-se uma heterogeneidade nos resultados dos testes sorológicos nas diferentes regiões brasileiras.

Por essas razões, indica-se que estudos epidemiológicos sobre a LCan por *Leishmania infantum* em cães devam aplicar mais de um teste diagnóstico, para evitar resultados falsos e vieses (TRAVI et al., 2018).

#### 2.1.3.2.2 Exames parasitológicos

Os exames parasitológicos são realizados a partir de amostras biológicas como medula óssea, baço e/ou linfonodo (SUNDAR; RAI, 2002). É possível a identificação do parasito em outras amostras, como sangue periférico e raspado cutâneo, quando o cão está com altas cargas parasitárias (GIUDICE; PASSANTINO, 2011; VERÇOSA et al., 2012). O exame parasitológico por microscopia direta de aspirados de tecidos permite um diagnóstico rápido, porém é menos sensível que os exames baseados em inoculação em meio de cultura ou aqueles que envolvem técnicas histológicas ou imuno-histológicas, cujo processamento é mais oneroso e demanda mais tempo (MOREIRA et al., 2007).

A sensibilidade do exame parasitológico também é influenciada pelo tipo de amostra biológica avaliada. Por exemplo, em amostras de medula óssea a sensibilidade é em torno de 60 a 85%, em linfonodos de 30 a 40% (SUNDAR; RAI, 2002). De acordo com Barrouin-Melo et al. (2004), a sensibilidade das culturas de baço para detecção de *Leishmania* foi de 97,9%; nas culturas de linfonodos foi de 25%, sendo aspirado esplênico a amostra biológica mais indicada em exame de cultura parasitária. As limitações dos métodos parasitológicos são o fato de não poderem determinar a espécie de *Leishmania*, mas somente o gênero, a carga parasitária da amostra avaliada que pode acabar não sendo detectada e também a habilidade do técnico que irá avaliar a amostra (SUNDAR; RAI, 2002).

#### 2.1.3.2.3 Exames moleculares

O exame molecular pela reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) se baseia na detecção do DNA da *L. infantum* em amostras biológicas. A PCR é considerada o exame confirmatório da infecção na LCan (SOLANO-GALLEGO et al., 2017).

A PCR para *L. infantum* necessita que a amostra seja de tecidos em que a presença do parasito seja mais abundante e provável, e de boa qualidade e estado de conservação, para minimizar falsos negativos (BARROUIN-MELO et al., 2004). São preferíveis amostras de punção de baço, pois é onde os parasitos se concentram e podem ser encontrados mais facilmente no organismo (BARROUIN-MELO et al., 2004; SOLCÀ et al., 2014). Amostras de medula óssea e linfonodo também possibilitam PCR com boa sensibilidade (QUARESMA et al., 2009; SOLCÀ et al., 2014). Diferentemente, a sensibilidade do teste cai quando são utilizadas amostras de sangue total, uma vez que o parasito é mais provavelmente encontrado no sangue somente quando o cão tem alta carga parasitária (QUARESMA et al., 2009; PEREIRA et al., 2016).

As variações mais utilizadas do método baseado em PCR são a qualitativa e a quantitativa. A PCR qualitativa detecta a presença ou não do DNA de *L. infantum*, enquanto a PCR quantitativa, mais elaborada porém mais onerosa, além da presença do DNA parasitário, determina também a quantidade proporcional de parasitos presentes na amostra, portanto, permite avaliar a carga parasitária do cão (ASCENCIO et al., 2019; DUTHIE; LISON; COURTENAY, 2018). Em geral, a PCR é uma ferramenta útil no diagnóstico da LCan, pois aumenta a sensibilidade para 90-100% em casos clinicamente suspeitos (ALVAR et al., 2004), e para 80% na detecção de casos subclínicos (BERRAHAL et al., 1996).

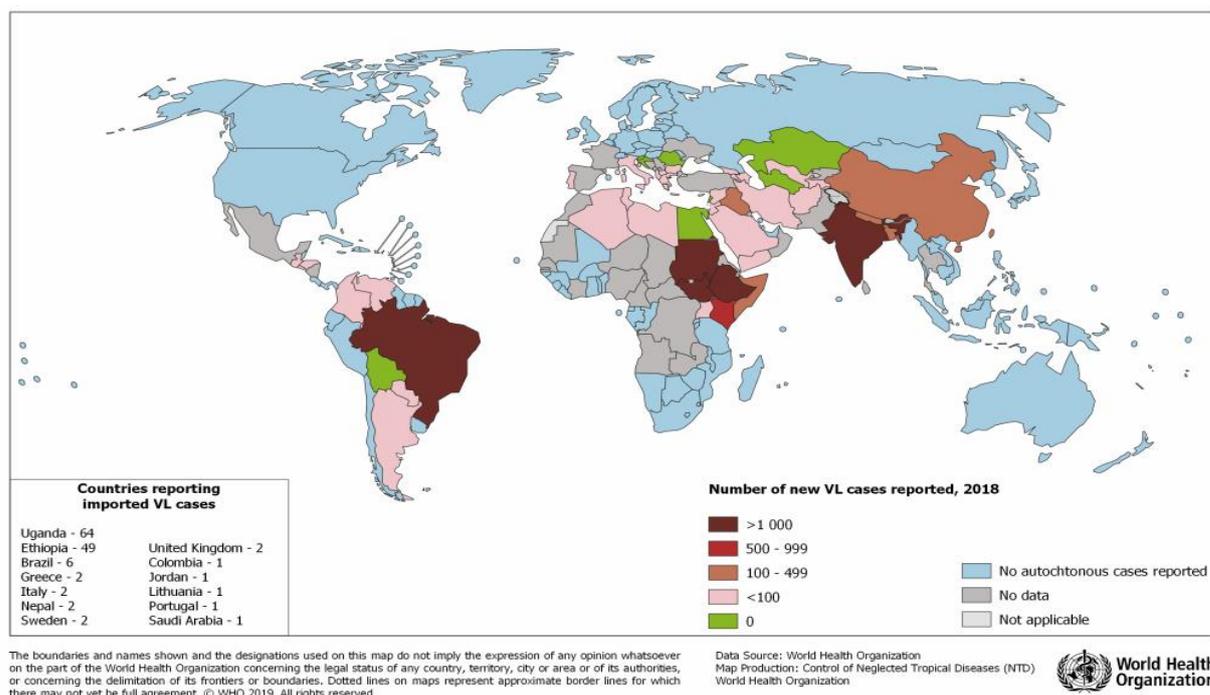
## 2.2 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR *L. infantum*

### 2.2.1 A Distribuição Geográfica da Leishmaniose Visceral Humana

Nos últimos anos, as leishmanioses se distribuíram ao redor do mundo aumentando globalmente o número de casos da forma visceral em humanos e da LCan (WHO, 2019). Diversos são os fatores que contribuíram para esse aumento, como por exemplo: problemas associados a saúde pública, condições precárias de vida, infraestrutura precária, coinfeções com doenças epidêmicas, aumento da presença dos vetores transmissores de *Leishmania*, dificuldades no controle dos vetores, acúmulo de matéria orgânica proveniente de lixos, da atividade humana e mudanças climáticas (BOUSSAA et al., 2016; PETERSON et al., 2017; CUNZE et al., 2019), ou seja, devido a fatores ambientais e socioeconômicos (FOLLADOR et al., 1999; SOUZA et al., 2006; SILVEIRA et al., 2016).

A LVH é uma doença presente em vários países do mundo (Figura 1) como no continente Asiático (Índia, China), países do leste da África (Etiópia, Kenya, Sudão), países da Europa ao redor do Mar Mediterrâneo, e nas Américas, especialmente no Peru, Bolívia e Brasil (ALVAR et al., 2012). A doença apresenta uma alta morbidade e mortalidade principalmente nos países em desenvolvimento onde existem alta densidade populacional associada à falta de cuidados básicos com saúde, infraestrutura e saneamento precário (WHO, 2019).

**Figura 1** - Status da endemicidade da leishmaniose visceral no mundo



Fonte: WHO, 2019.

A LVH apresenta uma mortalidade global em torno de 26.000 a 65.000 óbitos por ano, sendo considerada uma das seis principais endemias no mundo estando presente em mais de 88 países. Dos casos registrados na América Latina, 90% ocorrem no Brasil (WHO, 2019).

O primeiro caso de LVH no Brasil foi descrito em 1913 em necropsia de um paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso (MIGONE, 1913). Em 1934, 41 casos foram identificados em lâminas de viscerotomias praticadas *post mortem*, em indivíduos oriundos das Regiões Norte e Nordeste, com suspeita de febre amarela (PENNA, 1934). O Dr. Evandro Chagas, fundador do Instituto de Patologia Experimental do Norte (hoje Instituto Evandro Chagas), fez os primeiros relatos da doença na região amazônica, em 1936 (SILVEIRA et al., 2016). O casal Deane e Deane (1962), fez os primeiros estudos de distribuição geográfica e transmissão da *L. infantum* em humanos e animais no país. A doença, desde então, vem sendo descrita em vários municípios brasileiros, apresentando mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominando em ambientes silvestres e rurais e mais recentemente em centros urbanos. Em média, cerca de 3.500 casos são registrados anualmente e o coeficiente de incidência é de 2,0 casos/100.000 habitantes. Nos últimos anos, a letalidade aumentou gradativamente, passando de 3,2% em 2000 para 7,6% em 2012, e 8,9% em 2018 (BRASIL, 2020).

Em 2018, foram registrados 11 casos confirmados de LVH com 7,7% de letalidade na região Sul, 122 casos com 9,5% de letalidade na região Centro-Oeste, 428 casos com 10,9% de letalidade na região Sudeste, 737 casos com 8,2% de letalidade na região Norte e no Nordeste do país foram registrados 1735 casos confirmados da doença com 8,6% de letalidade (BRASIL, 2020).

Na Bahia, a LVH é endêmica em 52% de seus municípios, sendo registrados 15.341 casos no período de 1990 a 2018, com uma média de 529 casos/ano (BRASIL, 2020). A região central do estado apresenta o maior número de notificações de LVH em relação ao resto do estado, porém houve uma dispersão geográfica para o litoral e o sul do estado, tradicionalmente indenes, indicando mudanças no perfil ecoepidemiológico da doença (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2003). O vetor, *L. longipalpis*, transmissor da infecção, é facilmente encontrado no estado da Bahia, incluindo o Recôncavo Baiano (CAMARGO, 2011).

O município de Muritiba localizado na região do Recôncavo Baiano é classificado como um município de transmissão esporádica de leishmanioses, tendo sido notificado um caso de leishmaniose tegumentar americana (LTA) nos anos de 2009, 2011 e 2013; e três

casos (dois em 2008 e um em 2016) de LVH (BAHIA, 2018), diferentemente de outros municípios como Camaçari e Feira de Santana que são classificados como área de transmissão intensa para LV (BRASIL, 2020). Entre 2016 a 2018, foi notificado um caso de LV na área de Camaçari, já em Feira de Santana no ano de 2018 foram notificados 42 casos de LV humana (BRASIL, 2019a).

### **2.2.2 A Distribuição Geográfica da Leishmaniose Canina (LCan)**

Diversos são os fatores associados à instalação de endemicidade da LCan para infecção por *L. infantum* no Brasil, dentre eles a multiplicação descontrolada dos cães devido à precariedade de utilização de métodos contraceptivos (castração); aos baixos índices educacionais da população humana, o que compromete o senso de guarda responsável, gerando abandono de animais e aumento da proporção de cães errantes; às condições precárias de infraestrutura e saneamento urbano, favorecendo a proliferação de vetores aliada às dificuldades no controle desses vetores; e ainda à presença de outras doenças infecciosas na mesma área endêmica favorecendo que cães tenham coinfeções e portanto mais debilidade do sistema imunológico fazendo com que desenvolvam altas cargas parasitárias de *L. infantum* (DANTAS-TORRES et al., 2019a).

No Brasil, a LCan é investigada nas diferentes regiões brasileiras, especialmente em áreas endêmicas para LVH (JUDIELE et al., 2019). A soropositividade canina para anticorpos anti-*L. infantum* é variável (1,9% a 35%) nos estados brasileiros (PIMENTEL et al., 2015; LINS et al., 2018). A região Nordeste apresenta a maior quantidade de estudos sobre soroprevalência de LCan (ROCHA, et al., 2018a; ROCHA, et al., 2018b; DEIRÓ et al., 2018), seguido da região Sudeste (RAMOS-AUGUSTO, 2018), Norte (SCHWANKE et al., 2014), Centro-Oeste (TEIXEIRA et al., 2019) e Sul do país (SOCCOL et al., 2017).

Nos municípios da Bahia, de acordo com dados das Secretarias Municipais de Saúde, existem notificações de casos de LCan. O Quadro 2 sumariza os estudos encontrados, até o momento, sobre ocorrência de cães soropositivos nos municípios baianos, onde se observa uma variação de 0,06 a 50,3%.

**Quadro 2 – Soroprevalência de leishmaniose canina nos municípios da Bahia, Brasil**

<b>Município</b>	<b>Soroprevalência LCan (Cães positivos / Amostragem)</b>	<b>Técnica diagnóstica</b>	<b>Autor/Ano de publicação</b>
Jacobina	36% (84/235)	ELISA	ASHFORD et al., 1998
Salinas da Margarida	10% (55/558)	ELISA	SOUZA et al., 2006
Camaçari	21,7% (56/258)	ELISA	JULIÃO et al., 2007
Salvador	0,06% (6/881)	ELISA	BARBOZA et al., 2009
Monte-Gordo/Camaçari	14,8% (53/358)	ELISA	SILVA et al., 2010
Dias D'Ávila	6,7% (21/312)	IFI; ELISA	OLIVEIRA et al., 2010
Lauro de Freitas e Camaçari	10,7% (23/226)	ELISA	SEIXAS et al., 2012
Barreiras	17% (773/4.614)	IFI; ELISA	LEITE, 2014
Camaçari	21,8% (175/800)	ELISA	GONÇALVES, 2014
Buerarema	50,3% (147/292)	IFI	LEÇA-JÚNIOR et al., 2015
Dias D'ávila, Itabuna, Ilhéus, Salvador, Feira de Santana, Jequié, Eunápolis, Una, e Brumado	26,1% (92/353)	IFI	DEIRÓ et al., 2018

Nos municípios da região do Recôncavo Baiano, de acordo com dados das Secretarias Municipais de Saúde, existem notificações de casos de LCan e em seres humanos. Em Salinas da Margarida, foram identificados 96 casos de LVH de 2004 a 2008, comprovados por exame parasitológico direto (citologia) (CAMARGO, 2011). Observou-se que a ocupação urbana feita sem um planejamento estratégico foi a responsável pelo avanço da doença na região, além de atividades como a carcinicultura, que produz intenso acúmulo de matéria orgânica favorecendo a proliferação das larvas do vetor flebotomíneo (SOUZA et al., 2006; CAMARGO, 2011). Além disso, a atividade turística desgovernada, aliados a saneamento básico precário intensifica o problema sanitário devido ao acúmulo de lixo e esgoto não tratado (CAMARGO, 2011). Um estudo anterior no mesmo município demonstrou que 10% dos cães analisados foram diagnosticados positivos para LCan (SOUZA et al., 2006).

### **2.2.3 Reservatórios e Medidas de Controle da Leishmaniose por *L. infantum***

O reservatório é o local (humano, animal, artrópode, planta ou matéria inanimada) em que o agente infeccioso se mantém e se multiplica de maneira a ser transmitido a um hospedeiro suscetível (AVILA-PIRES, 1989; DANTAS-TORRES, 2007). No ambiente peri-urbano e urbano, o cão doméstico é considerado o principal reservatório de *L. infantum* e um

elemento importante da cadeia epidemiológica da LCan e da LVH (GRAMICCIA, 2011). A raposa é o principal reservatório silvestre do parasito. O cão doméstico e a raposa apresentam condições que os caracterizam como bons reservatórios, pois têm população numerosa, são espécies gregárias, vivem por muito tempo, e apresentam grande atratividade ao flebotomíneo e intenso parasitismo visceral e cutâneo (SHERLOCK, 1996; CAMARGO, 2011; GHARBI et al., 2015). Outros animais silvestres e sinantrópicos como marsupiais (sariguês – *Didelphis didelphis*), roedores como o rato de telhado - *Rattus rattus*, morcegos – *Phyllostomidae*, e porcos do mato (*Tayassu tajacu*) têm sido encontrados albergando o parasito (RICHINI-PEREIRA et al., 2014).

*L. infantum* já foi encontrada em outras espécies animais como os gatos domésticos (SILVEIRA-NETO et al., 2015) e em animais de produção como bovinos (LOBSIGER et al., 2010), equinos (KOEHLER et al., 2002), suínos, caprinos e ovinos. Entretanto, a participação desses animais não está muito bem definida no ciclo de transmissão da doença (ROHOUSOVA et al., 2015).

Os seres humanos têm sido considerados hospedeiros acidentais de *L. infantum*, mantendo temporariamente pequena população de parasitos, não sendo, portanto, um reservatório adequado (ASHFORD, 1996). Entretanto, alguns autores demonstram ser o homem doente e com altas cargas parasitárias também capaz de transmitir a infecção ao vetor no Brasil (COSTA et al., 2000).

O cão suscetível pode constituir fonte de infecção para os insetos vetores, mesmo aparentemente sadio, quando alberga altas cargas parasitárias no processo inicial de uma infecção ativa (MAIA; DANTAS-TORRES; CAMPINO, 2018). O achado de formas amastigotas de *Leishmania* na pele de cães sem sinais clínicos evidentes é considerado um indicador da importância desses animais na epidemiologia da doença (SILVA, 2007; TRAVI et al., 2018).

O governo brasileiro criou o Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral (PNCLV) que classifica municípios com transmissão de LV com base na média de casos dos últimos cinco anos, em: áreas sem transmissão (não apresentam casos humanos); áreas com transmissão esporádica (média de casos inferior a 2,4); áreas com transmissão moderada (média de casos entre 2,4 e menor que 4,4) e áreas com transmissão intensa (média de casos acima de 4,4 de acordo com os valores calculados para a média de casos humanos) (BRASIL, 2009; BRASIL, 2014). Dentre as medidas de controle estabelecidas no PNCLV incluem-se realizar investigação epidemiológica; controlar a doença humana e identificar e eliminar os cães soropositivos em testes laboratoriais. Mesmo assim, a LVH se expandiu por

26 unidades federativas brasileiras e no Distrito Federal com uma incidência de 3.455 casos/ano, com letalidade de 7,4% no ano de 2016 (BRASIL, 2020).

A eliminação de cães, segundo vários autores, não é a medida de controle mais adequada para conter a expansão da leishmaniose causada por *L. infantum* (COSTA, 2011; FARIA; ANDRADE, 2012; GONTIJO; MELO, 2004). A estratégia de eutanásia de cães vem sendo questionada com base em diversos motivos. Não há nenhuma evidência científica confiável apoiando a eficácia da eutanásia de cães como forma de reduzir a incidência de LVH (GONZÁLEZ et al., 2015). Autores argumentam que reservatórios alternativos podem desempenhar um papel na manutenção do ciclo de vida de *L. infantum* e devem ser levados em consideração quando uma estratégia de controle integrada é formulada (MAIA; DANTAS-TORRES; CAMPINO, 2018). Além disso, cães eliminados são rapidamente substituídos por cães jovens, geralmente mais suscetíveis à infecção primária (NUNES et al., 2010). Outro aspecto é que as ferramentas de diagnóstico sorológico frequentemente usadas para a triagem de cães como parte de um programa de eutanásia têm limitações em termos de sensibilidade e especificidade (SILVA et al., 2011; TRAVI et al., 2018). A eliminação de cães implica altos gastos e não é uma alternativa válida do ponto de vista socioeconômico, às instituições governamentais (COSTA, 2011).

Outras formas de controle da doença estão sendo estudadas, como tratamentos e o desenvolvimento de vacinas multiprotéicas mais específicas para LCan (PALATNIK-DE-SOUZA, 2012; SOLANO-GALLEGU et al., 2017), controle do vetor e o uso de coleiras repelentes com deltametrina (BETHONY et al., 2011; CAMARGO-NEVES, 2011; LEAL, 2017; RANGEL; VILELA, 2008).

A ideia mais defendida é que o controle efetivo da transmissão de *L. infantum* requer abordagens integradas, focando não apenas o cão como fonte indireta, mas também o parasito e, principalmente, o vetor flebotomíneo (GÁLVEZ et al., 2018).

A eutanásia de cães em áreas onde a LV é endêmica deve ser substituído por medidas alternativas não terminais, que possam prevenir infecções nos animais. Os membros do Fórum Mundial da *Companion Vector-Borne Diseases* (CVBD) recomendam as seguintes medidas para reduzir o risco de infecção por *L. infantum* em cães e em seres humanos: 1- Promover a prevenção da picada de flebotomíneo para reduzir o risco de infecção em cães não infectados e sua propagação em cães já infectados; 2- Melhorar a saúde geral e o estado nutricional dos cães; 3- Implementar os conceitos mais recentes sobre o manejo clínico da LCan, incluindo abordagens para diagnóstico e tratamento; 4- Melhorar as condições

ambientais e de habitação para reduzir a exposição dos seres humanos aos vetores (OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013).

### 2.3 ANÁLISES ESPACIAIS DA LEISHMANIOSE HUMANA E CANINA A PARTIR DE GEORREFERENCIAMENTO

As análises espaciais são ferramentas adicionais à metodologia utilizada pelos órgãos de saúde para a determinação de áreas prioritárias e para a racionalização financeira de recursos para a vigilância e controle de endemias em um município (BARBOSA, 2011). Exemplo de uma dessas ferramentas, é geoprocessamento que consiste em um conjunto de técnicas computacionais de coleta, análise e apresentação de dados espaciais. Dentre as técnicas de geoprocessamento mais utilizadas têm-se o sensoriamento remoto via sistema de posicionamento global (GPS), a cartografia digital, a estatística espacial e os sistemas de informações geográficas (SIG) (BERNARDI; LANDIM, 2013; LONGLEY et al., 2013).

Os SIG têm se tornado uma importante ferramenta no entendimento da epidemiologia das leishmanioses facilitando a tomada de decisões e garantindo um planejamento estratégico para a alocação de recursos e implantação de medidas de controle da doença. Estas ferramentas permitem gerar mapas, delinear a distribuição de surtos e eventos, vetores, reservatórios da doença em humanos e da infecção em caninos, permitindo assim comparar e associar estes achados a mudanças ambientais, sociais e econômicas além de possibilitar a definição de áreas prioritárias para vigilância da LV, a fim de se obter resultados efetivos que auxiliarão no controle da endemia (BARBOSA, 2011).

Estudos recentes em diferentes regiões brasileiras fizeram análise espacial da incidência da LVH e LCan com o objetivo de identificar áreas de risco e adequar as medidas de controle com base na ecoepidemiologia da leishmaniose (ARRUDA et al., 2019; BRUHN et al., 2018; LANA et al., 2018). Uma pesquisa em Belo Horizonte mostrou a relação temporal e distribuição espacial da LVH com os casos em cães e em outros hospedeiros (BRUHN et al., 2018). Arruda et al. (2019) utilizaram essa mesma abordagem para identificar áreas de risco para leishmaniose e de prioridade para ações de controle e prevenção também em Belo Horizonte, conseguindo categorizar 27 áreas como prioridade máxima e 13 como alta.

Um estudo recente de Cavalcante et al. (2020) caracterizaram a distribuição e frequência da LVH no Ceará entre 2003 e 2017. Os resultados indicaram um aumento da incidência e letalidade, como também a expansão da doença no estado. Buckingham-Jeffery et al. (2019) desenvolveram um modelo espacial-temporal para compreender a dinâmica de

transmissão da leishmaniasis entre cães na ilha de Marajó, no Pará. O estudo determinou que a prevalência de infecção em cães é fortemente afetada pelos parâmetros associados aos flebotomíneos e a proporção de cães recém-introduzidos já infectados. No sudeste do Brasil, os resultados soropidemiológicos e espaciais, de 597 guardiães e seus 729 cães, coletivamente mostraram falta de associação dos fatores de infecção entre os cães e seus tutores, e que os cães estão mais expostos à infecção que seus donos (BENITEZ et al., 2018).

Na Bahia, no município de Feira de Santana, Carneiro et al. (2004) aplicaram as geotecnologias no estudo da distribuição espaço-temporal da LV (casos humanos e caninos e presença de *L. longipalpis*), sob influência de fatores ambientais como temperatura, umidade e precipitação. O estudo conseguiu delimitar as principais áreas de risco para a doença no município, auxiliando na racionalização de recursos e tomada de decisões no planejamento das atividades de controle.

Gurgel et al. (2005), testaram a contribuição do índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI) em estudos epidemiológicos da LV em 33 municípios da região oeste da Bahia, em 1997. A partir da compilação de dados de cobertura vegetal da área de estudo, e de variáveis climáticas do período foi possível verificar que a maior distribuição espacial dos casos de LV e de captura do vetor *L. longipalpis*, foi registrada em áreas de vegetação típica de caatinga, transição cerrado/caatinga. Bavia et al. (2005) classificaram, entre os anos de 1990 a 1998, os municípios baianos em três áreas: áreas de alto risco; áreas endêmicas e áreas de alerta para a doença, aplicando uma mesma base cartográfica utilizada por Gurgel et al. (2005) enriquecida com os dados notificados da leishmaniose em humanos e da infecção em cães e do vetor.

### **3 HIPÓTESE**

O protozoário *Leishmania infantum* está presente no município de Muritiba como agente causal de leishmaniose canina (LCan).

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Efetuar inquérito epidemiológico da LCan no município de Muritiba - BA.

#### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Caracterizar cães segundo a soropositividade, infecção e doença causada por *L. infantum* em cães no município de Muritiba;
- ✓ Caracterizar por georreferenciamento a distribuição dos casos de LCan no município de Muritiba.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

A população canina estudada foi composta por cães domiciliados e semi-domiciliados do município de Muritiba. O acesso aos cães foi feito por meio de busca ativa, que consistiu em visitas aos diversos ambientes onde os cães poderiam ser encontrados (domicílios principalmente) com o objetivo de localizar, examinar e colher amostras biológicas dos animais. Os critérios de inclusão dos cães no estudo foram ambos os sexos, todas as idades, saudáveis ou doentes. Os guardiões foram informados sobre os objetivos do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

Além da avaliação dos seus cães, os guardiões foram orientados sobre os métodos de prevenção da LCan seguindo as medidas listadas no manual Guia de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2019b). Os resultados dos exames para LCan foram informados aos guardiões, incluindo instruções sobre a necessidade de se buscar o serviço médico veterinário, no caso dos resultados positivos.

O estudo foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e devidamente aprovado e registrado sob o protocolo N° 013/2017 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (EMEVZ-UFBA) (ANEXO A).

### 5.2 ÁREA DE ESTUDO E DESENHO EXPERIMENTAL

A área estudada foi o município de Muritiba, localizado na região do Recôncavo Baiano (12°37'35'' latitude sul, 38°59'24'' longitude oeste) (Figura 2). O município é caracterizado por abranger uma área territorial de 86,311 km<sup>2</sup> e conter uma população estimada em 29.387 habitantes (IBGE, 2017). Segundo o IBGE (2017), Muritiba apresenta 0,660 de Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM, faixa de 0 – 1), os trabalhadores formais (8,4% da população) têm salário médio mensal de 1,6 salários mínimos, e 46,4% da população tem rendimento nominal mensal per capita de até meio salário mínimo; o Índice de Desenvolvimento da Educação Básica (IDEB, faixa de 0 – 10) na rede pública é de 3,8 tendo 96,7% de taxa de escolarização de 6 a 14 anos. A cidade conta com uma Secretaria da Saúde, nove Centros de Saúde/Unidade Básica, um hospital geral, uma unidade móvel de nível pré-hospitalar na área de urgência, e um Núcleo de Apoio à Saúde da Família (NASF).

**Figura 2** - Localização geográfica do município de Muritiba-BA



Fonte: IBGE, 2017

A vegetação de Muritiba teve suas unidades alteradas por atividades humanas como a agropecuária e expansão residencial, apresentando-se como área antropizada em diferentes estágios, segundo dados do INEMA (2014). Por seu clima tropical atlântico variar do úmido ao sub-úmido Muritiba é caracterizado por possuir originariamente uma vegetação de floresta decidual e semi-decidual. Dentro da cidade existem pequenas ilhotas de vegetação arbórea. Ao longo do ano, em geral a temperatura varia de 19°C a 33°C e raramente é inferior a 16°C ou superior a 36°C (INEMA, 2014; INPE, 2020; WEATHERSPARK, 2020).

A região de Muritiba tem dois distritos: São José do Itaporã localizado na zona rural, e a sede do município (centro), que se localiza na zona urbana. Neste estudo foram avaliados cães domiciliados e semi-domiciliados residentes em 163 domicílios na sede da cidade (Centro) e em 65 domicílios no distrito São José do Itaporã na zona rural. Muritiba também apresenta alguns povoados (Gravatá de Cima, Gravatá de Baixo, Cachoeirinha, Pau Ferro), infelizmente por dificuldades de transporte, desconhecimento de representantes locais e falta de acesso a esses povoados, não foram possíveis investigações para LCan nos povoados do município.

Muritiba é classificada como área de transmissão esporádica para a leishmaniose humana (BRASIL, 2019b), com a última notificação de LVH registrada em 2016. Não foram encontrados registros oficiais (no período de 2007-2018) e nem na literatura sobre a situação epidemiológica da LCan no município.

O estudo desenvolvido no presente projeto de dissertação ocorreu no período de março de 2018 a julho de 2019, e é caracterizado como estudo de corte transversal em uma amostra por conveniência da população canina no município de Muritiba-BA. Essa área foi selecionada devido à sua classificação como área de transmissão esporádica para LVH (BRASIL, 2019b).

Foram eliminados da pesquisa os domicílios visitados em que os tutores não colaboraram ou responderam o questionário referente ao cão e dados ambientais, também aqueles que não permitiram avaliar o cão ou fazer colheitas de amostras biológicas para exames de diagnóstico da LCan. Desta forma, foram visitados os domicílios ao lado ou próximos ao domicílio eliminado e computados aqueles em que os guardiões permitiram essas análises. De todo modo, todos os tutores de cães participantes ou não da pesquisa receberam informações referentes a doença, transmissão, e cuidados básicos de prevenção.

O cálculo amostral foi realizado seguindo os critérios do Ministério da Saúde e do Instituto Pasteur (2013), constantes na Nota Técnica 02 - IP/CCD/SES-SP – 07/10/2013, que estabelece que a população de cães representa 10 a 20% da população humana nos estados brasileiros (REICHMANN; PINTO; NUNES, 1999; BRASIL, 2009), e na Bahia segundo a SESAB (2019) essa proporção representa 11% da população humana. No último censo demográfico de Muritiba, a população humana foi estimada em 28.899 habitantes (IBGE, 2017). A partir desse dado determinou-se que a população canina seria de 11% em relação a população humana, ou seja, de 3.179 cães. A determinação do tamanho da amostra foi obtida no programa Epiinfo versão 7, considerando os critérios: (1) 50% como prevalência esperada para LCan, por não existir estudos prévios que estimem a prevalência da infecção no município; (2) uma margem de erro aceitável de 5% e nível de confiança de 95%. Dessa forma, o tamanho amostral aproximado foi de 351 cães.

Todos os cães foram avaliados por meio de um exame físico com o objetivo de caracterizar o quadro clínico. Após o exame físico, foram colhidas amostras de sangue periférico de todos os cães da amostragem e medula óssea da região do manúbrio do osso esterno de cães soropositivos para diagnóstico e confirmação da circulação de *L. infantum* no município do estudo.

Após o exame dos cães, foram registradas as observações sobre as características do ambiente que cada animal vivia tais como: presença de outros animais, área com lixo orgânico, vegetação, saneamento básico, presença de crianças ou idosos, infra-estrutura da rua e tipo de moradia (APÊNDICE B).

### 5.3 EXAME FÍSICO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O exame físico de cada um dos 351 cães foi feito de acordo com os critérios determinados na literatura especializada para classificação clínica da LCan (BARROUIN-MELO et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; 2011). Para tanto, foi utilizada uma ficha clínica que contém detalhamento suficiente para caracterizar a LCan (ANEXO B) com registro dos dados sobre a anamnese e exame físico dos cães. A ficha clínica é a mesma utilizada pela equipe de pesquisa do Ambulatório de Leishmanioses Zoonóticas (ALZ) do Hospital de Medicina Veterinária Prof. Renato Rodenburg de Medeiros Netto (HOSPMEV-UFBA).

A anamnese consistiu de informações de cada cão, incluindo idade, sexo, raça, pelagem, procedência, histórico de vacinação, acesso ao ambiente externo ao domicílio (domiciliado e semi-domiciliado), doenças e tratamentos prévios e medicações em uso. Com base no exame físico, para avaliar a gravidade da doença dos cães infectados do estudo utilizou-se os critérios estabelecidos por Silva et al. (2017) com adaptações. Cada sinal clínico recebeu um escore de 0 a 1 para ausência ou presença da alteração, respectivamente. Os parâmetros clínicos avaliados foram: atitude ativa ou apática; perda de peso; gastroenterite; neuropatia; hematoquesia, melena, diarreia; vômitos; score corporal; mucosas hipocorada; desidratação; oftalmopatia; linfonodos aumentados; baço palpável; edema em membros; ascite; febre; epistaxe; alopecia; descamação furfurácea; úlceras na pele; crostas; hiperqueratose; vasculite; onicogribose; despigmentação do focinho; nódulos; dermatite; neuropatia.

Após o exame físico, foi realizada a colheita de amostras de sangue periférico e aspirado de medula óssea. A colheita de sangue foi realizada sob contenção manual e o aspirado de medula óssea sob sedação com acepromazina (0,05 mg/kg) e anestesia local com lidocaína (2-5 mg/kg) (PAPARCONI et al., 2013), todos os métodos baseados nos preceitos de bem-estar animal. Dez mililitros de sangue foram obtidos por meio da punção da veia jugular ou cefálica, e distribuídos em tubos sem aditivos para separação do soro por centrifugação a 1.200 x g por 10 minutos. O soro foi acondicionado em caixas de transporte isotérmicas com gelo seco para garantia de refrigeração adequada (4°C) e enviado por via

aérea para o Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para o diagnóstico sorológico da LCan.

Aproximadamente 500 µL do aspirado da medula óssea da região do manúbrio do osso esterno foram colhidos com o auxílio de agulha 40 x 12mm e seringa de 20mL (PAPARCONE et al., 2013). Uma parte do aspirado da medula óssea foi destinado ao preparo de esfregaços em lâminas para investigar formas amastigotas de *Leishmania* sp. por análise citológica. Outra parte da amostra da medula óssea foi armazenada a -20°C para o diagnóstico molecular da infecção por *L. infantum*. O exame citológico e o diagnóstico molecular foram realizados no Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE) do HOSPMEV-UFBA.

#### 5.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INFECÇÃO POR *L. infantum*

##### 5.4.1 Exame parasitológico

Após a confecção das lâminas com o aspirado de medula óssea, o esfregaço foi corado com corante hematológico panótico rápido (Panótico Rápido<sup>®</sup>, Laborclin, São Paulo) e foi analisado em microscópio óptico convencional (Olimpus, China, modelo CX22ledrfs1) no aumento de 1000x, para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp.

##### 5.4.2 Exame sorológico

A detecção de anticorpos anti-*Leishmania* foi determinada pelo teste imunocromatográfico *Dual Path Platform* TR-DPP<sup>®</sup> (Biomanguinhos, Fiocruz, BR) e pelo teste imunoenzimático ELISA (Biomanguinhos, Fiocruz, BR), recomendados pelo Ministério da Saúde.

O teste TR-DPP<sup>®</sup> emprega como antígeno a proteína recombinante k29 de *L. infantum*. Para realização do teste, foram utilizados 5 µL de soro conforme as instruções do fabricante (Biomanguinhos, Fiocruz, BR).

Para o método ELISA, foi utilizado o kit Ensaio imunoenzimático para diagnóstico da Lcan (EIE-LVC, Biomanguinhos, Fiocruz, BR), que usa antígenos solúveis de *L. major*-like para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* nas amostras caninas. O ensaio foi realizado seguindo as orientações do fabricante (EIE-LVC, Biomanguinhos, Fiocruz, BR).

O critério utilizado para conclusão diagnóstica sobre a soropositividade para Lcan baseou-se nas instruções do Ministério da Saúde para diagnóstico da Lcan (BRASIL, 2019b), que estabelece o cão soropositivo como aquele que apresenta resultado positivo em ambos os testes TR-DPP<sup>®</sup> e ELISA.

### 5.4.3 Diagnóstico molecular

Amostras de medula óssea dos cães soropositivos nos dois testes sorológicos (TR-DPP® e ELISA) foram destinadas ao exame molecular *Polymerase Chain Reaction* (PCR) multiplex para confirmar a infecção.

A PCR multiplex foi realizada para detecção simultânea da região alvo do DNA do controle endógeno e da *L. infantum*, conforme o protocolo previamente padronizado para amostras caninas e empregado na rotina do LIVE. As amostras destinadas ao exame molecular foram conservadas a -20°C. O DNA total de amostras de aspirado de medula óssea foi extraído por meio do kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade e qualidade do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro L-quant 1.0 (Loccus®, Brasil). As amostras de DNA com uma relação 260/280 com valores entre 1.8-2.0 foram submetidas a PCR multiplex.

O controle endógeno foi empregado para confirmar a ausência de inibidores da PCR nas amostras estudadas. Os iniciadores utilizados para a amplificação da região específica do controle endógeno *glyceraldehyde-3-phosphate* (GAPDH) foram: 5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3'(F) e 5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3'® (BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2003). Para detecção do DNA de *L. infantum* foram utilizados os iniciadores 5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3'(RV1) e 5'CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'(RV2) (LACHAUD et al., 2002).

As condições da PCR foram: 13,3 µL água ultrapura livre de RNase e DNase; 2,5 µL de tampão 10x (Invitrogen®, EUA); 1 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de dNTP (Invitrogen®, EUA); 10 pmol dos iniciadores; 1.2 U de Taq Platinum Polimerase (Invitrogen®, EUA); e 1 µL (80 a 100 ng) de DNA, em volume final de reação de 20 µL. O termociclador (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler®) foi ajustado nas seguintes configurações: 94°C por 2 min; 94°C por 30 seg; 61°C por 30 seg; 72°C por 30 seg; 72°C por 5 min em um total de 35 ciclos. Os produtos obtidos da amplificação foram corados com Syber Gold (Invitrogen®, EUA) e visualizados em gel de agarose a 1,5%, com auxílio do fotodocumentador Biometra® (BioDocAnalyze, Alemanha). Foram considerados positivos aqueles produtos com aproximadamente 450 e 145 pares de base (pb) para o controle endógeno (GAPDH) e *L. infantum*, respectivamente. Também foram utilizados controles positivos e negativos para confirmação do teste.

## 5.5 GEORREFERENCIAMENTO

Durante a avaliação dos cães nos domicílios, foi realizado o georreferenciamento do endereço dos mesmos utilizando o equipamento GPS Garmin Etrex 10 (Garmin, EUA), em coordenadas UTM (projeção Universal Transversa de Mercator). As coordenadas geográficas foram analisadas no programa Quantum GIS (versão 3.4, QGIS Development Team) para as análises espaciais dos dados e caracterização da distribuição da doença no município de Muritiba.

Com relação a setorização do município, este foi dividido em dois setores: sede (centro de Muritiba localizado na zona urbana); e distrito (São José do Itaporã localizado na zona rural). Foram avaliados ambas as localidades buscando ao máximo obter amostras com representatividade homogênea de distribuição de cães por estas localidades do município.

## 5.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados estão apresentados de forma descritiva para a prevalência sorológica da LCan, como também a caracterização dos cães soropositivos e a gravidade da doença pelo escore clínico. A concordância nos diagnósticos sorológicos foi calculada utilizando kappa e classificação de Landis e Koch (1977), considerando os níveis de comparação: 0,81 a 0,99 - concordância quase perfeita; 0,61 a 0,8 - concordância substancial; 0,41 a 0,6 - concordância moderada; 0,21 a 0,4 - concordância razoável; 0,1 a 0,2 - concordância fraca; <0 - concordância pobre. Foi realizada análise estatística para verificar associações entre as variáveis de interesse (sexo, idade, raça, domiciliação do cão, sinais clínicos como: emagrecimento, alopecia, úlceras na pele, onicogribose, despigmentação do focinho, linfonodos alterados, apatia, mucosas hipocoradas, oftalmopatia, esplenomegalia, edemas, crostas, nódulos, descamação furfurácea e hiperqueratose) e a ocorrência da soropositividade combinada entre o teste TR-DPP® e o teste ELISA, aplicando-se Qui-Quadrado, com nível de significância de 0,05. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad software, Inc., San Diego, CA, USA).

As características ambientais da área de estudo estão apresentadas de forma descritiva como presença de outros animais na residência, área com lixo orgânico, vegetação, saneamento básico, presença de crianças ou idosos, infra-estrutura da rua e tipo de moradia.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 PREVALÊNCIA SOROLÓGICA DA LCan CAUSADA POR *Leishmania infantum* NO MUNICÍPIO DE MURITIBA-BA

Para investigar a soroprevalência da LCan no município de Muritiba-BA, foram avaliadas 351 amostras colhidas dos cães domiciliados e semi-domiciliados nesta região. Separadamente, o teste imunocromatográfico TR-DPP<sup>®</sup> detectou 27,9% (98/351) de positividade, enquanto o teste ELISA detectou 22,0% (77/351) de cães soropositivos (Tabela 1). Com base nos resultados da soropositividade dupla, nos testes TR-DPP<sup>®</sup> e ELISA seguindo os critérios do Ministério da Saúde para diagnóstico da LCan (BRASIL, 2019b), 55 cães cujas amostras foram positivas em ambos os testes, foram considerados soropositivos para LCan, representando uma soroprevalência de 15,7% (55/351). O teste Kappa dos resultados entre TR-DPP<sup>®</sup> e ELISA mostrou uma concordância moderada de 0,508% (IC 95%: 0,40 a 0,61), similar ao encontrado em outros estudos (PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015).

**Tabela 1** – Análise sorológica das 351 amostras de cães domiciliados e semi-domiciliados no município de Muritiba-BA, empregando os critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde para diagnóstico da leishmaniose canina

		ELISA		Total
		Positivo	Negativo	
DPP	Reagente	55 (15,7%)	43 (12,2%)	98 (27,9%)
	Não Reagente	22 (6,3%)	231 (65,8%)	253 (72,1%)
Total		77 (22,0%)	274 (78,0%)	351

A soroprevalência da LCan encontrada no presente estudo (15,7%) está dentro da faixa de achados de soroprevalência descritos na literatura sobre áreas endêmicas para leishmaniose nas diferentes regiões brasileiras, com soropositividade para DPP e ELISA variando entre 1,9% e 35% (PIMENTEL et al., 2015; LINS et al., 2018). No estado da Bahia, também na região do Recôncavo Baiano, têm-se registros da ocorrência da LCan: em Salinas da Margarida foi observada uma soroprevalência de 10% (SOUZA et al., 2006), em Monte-Gordo distrito do município de Camaçari foi encontrado 14,8% de 358 cães avaliados (SILVA et al., 2010), em Dias D'Ávila de 6,7% dos 312 cães avaliados (OLIVEIRA et al., 2010).

O número de cães sororreagentes poderia ser maior do que o revelado neste experimento na cidade de Muritiba, tendo como possíveis contribuições para essa afirmação fatores como a existência de muitos cães de rua no município, os quais não foram avaliados durante a pesquisa; a variação da sensibilidade e da especificidade dos testes sorológicos, como a imunocromatografia (TR-DPP) e o imunoenzimático (ELISA) adotados pela pesquisa, o mesmo protocolo atual do Ministério da Saúde (BRASIL, 2014), que pode acarretar falhas na detecção de cães infectados na fase pré-patente da parasitose (FREITAS et al., 2012; GAMA-MELO et al., 2019; SOUSA-PAULA et al., 2019).

Acredita-se que alguns cães poderiam estar co-infectados com outras hemoparasitoses, o que agravaria o estado de saúde do cão, entretanto neste estudo não foram avaliados outras comorbidades, especialmente aquelas causadas por tripanossomatídeos, como o agente etiológico da doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e/ou por outras espécies de *Leishmania* spp. (FREITAS et al., 2012; GAMA-MELO et al., 2019; SOUSA-PAULA et al., 2019).

Na cidade de Muritiba não existe notificação de cães positivos para LCan, sendo necessária uma busca ativa de casos em áreas com menos casos de LCan; a interrupção das ações da Vigilância Epidemiológica do Município para o Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral (PNCLV) em função de mudanças de gestores municipais e rotatividade de recursos humanos; limitações logísticas e operacionais; a rápida reposição de cães pela população muritibana, que acabam muitas vezes sendo infectados no mesmo domicílio onde outros cães morreram com a doença, além do abandono de cães doentes.

No presente estudo, dos cães soropositivos no teste TR-DPP, 43 (12,2%) foram considerados falso-positivos, por resultarem negativos no teste ELISA, considerado confirmatório pelo Ministério da Saúde. Estudos sobre o desempenho do TR-DPP mostra variação na especificidade entre 73% a 96% (FIGUEIREDO et al., 2018; PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015; RIBOLDI et al., 2018).

Para confirmar a circulação da espécie *L. infantum* na região de Muritiba, dos 55 cães duplamente soropositivos nos testes TR-DPP e ELISA (BioManguinhos, Fiocruz, Brasil), foi realizada PCR em amostras de medula óssea de 36 cães. Como a colheita de amostras de medula óssea foi realizada num segundo momento após confirmação dos resultados na dupla sorologia (DPP® e ELISA), os outros cães (soropositivos) que não foram realizadas as PCRs deveu-se ao fato de alguns terem morrido, talvez por conta da doença ou por outras causas, outros não foram encontrados, e outros os tutores não autorizaram a colheita de medula óssea. Foi confirmada a presença de DNA de *L. infantum* em 88,8% (32/36) desses cães, apenas em

quatro cães (11,2%) não foi confirmada a presença de DNA de *L. infantum*. Os dados confirmam a ocorrência de infecção e doença canina causada por *L. infantum* no município de Muritiba, sugerindo a possibilidade da região ser endêmica para a doença, entretanto, faz-se necessários mais estudos para determinação de endemicidade de LCan no município, inclusive com avaliação de vigilância entomológica, importante para determinar a presença da espécie vetora.

No presente estudo, hipotetizou-se que os quatro cães soropositivos pelo DPP® e ELISA e negativos na PCR podem ter tido contato com o parasito e até mesmo terem sido infectados, porém seu sistema imune pode ter debelado a infecção, e os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* permaneceram detectáveis por um período pós-infecção, que incluiu o momento em que as amostras de sangue foram colhidas. Fenômenos semelhantes foram descritos na literatura (BASSO et al., 2016). No entanto, ainda pode-se considerar a possibilidade de reação cruzada por outros agentes infecciosos, como alguns hemoparasitos que acometem cães, como já foi reportado em cães com outros tripanossomatídeos (BASANO; CAMARGO, 2004; RODRIGUES et al., 2013; ANDRADE et al., 2007).

## 6.2 CARACTERIZAÇÃO GERAL E CLÍNICA DOS CÃES E A ASSOCIAÇÃO COM A SOROPOSITIVIDADE

Como pode ser observado na Tabela 2, dos 55 cães soropositivos do estudo, 49,1% (27/55) eram machos e 50,9% (28/55) eram fêmeas. Em relação à faixa etária, 28,5% tinham até um ano de idade, 41,9% tinha entre 2 a 4 anos, e 29,6% tinha mais de 5 anos. A maioria era sem raça definida (69%; 38/55) e em menor proporção (31%; 17/55) de raça pura. Quanto à apresentação clínica, 72,7% (40/55) dos cães soropositivos exibiam algum sinal clínico sugestivo de LCan. A maior parte dos cães soropositivos eram domiciliados (52,7%; 29/55), os semi-domiciliados representaram (47,3%; 26/55). A variável idade foi significativa,  $p=0,0017$  /  $OR=0,26$  (IC 0,1-0,6), com possível efeito de proteção em animais mais velhos maior ou igual a 2 anos de idade. Nenhuma outra associação foi encontrada com as características acima e a prevalência da soropositividade para LCan.

**Tabela 2** – Características gerais dos cães soropositivos para leishmaniose canina oriundos do município de Muritiba-BA, empregando os critérios de diagnóstico estabelecidos pelo Ministério da Saúde

Variáveis	Número de cães	Cães positivos no TR-DPP e ELISA N(%)	Valor de p	OR (IC 95%)
<b>Sexo</b>				
Macho	176	27 (15,3%)	0,87	0,9 (0,5-1,7)
Fêmea	175	28 (16,0%)		
<b>Raça</b>				
SRD	217	38 (17,5%)	0,22	1,5 (0,8-2,7)
De raça	134	17 (12,7%)		
<b>Idade</b>				
<2 ano (Jovem)	100	6 (6,0%)	<b>0,0017</b>	<b>0,26 (0,1-0,6)</b>
≥2 anos (Adulto/Idoso)	251	49 (19,5%)		
<b>Domiciliação do cão</b>				
Domiciliado	204	29 (14,2%)	0,37	0,7 (0,4-1,4)
Semi-domiciliado	147	26 (17,7%)		
<b>Estado clínico do cão</b>				
Doente	232	40 (17,2%)	0,2814	1,44 (0,8-2,7)
Subclínico	119	15(12,6%)		
<b>Gravidade da doença</b>				
Leve	186	19 (10,2%)		1,0
Moderada	33	10 (30,3%)	0,0017	3,8 (1,6-9,2)
Grave	13	11 (84,6%)	<0,0001	48,3 (9,8-222,7)

Alguns estudos sobre as características fenotípicas dos cães com leishmaniose e associação com a infecção são controversos. Similar aos encontrados neste estudo, alguns relatos não encontraram associação da positividade para *Leishmania* spp. e as variáveis como sexo e raça (ALMEIDA et al., 2009). Alguns relatos também apontam que o tamanho do cão, independente do fato de ter ou não raça definida, podem estar correlacionados positivamente com a infecção por *L. infantum*, devido ao fato de permanecerem no exterior das residências o que poderia levar a uma maior exposição ao vetor (DANTAS-TORRES, 2009; FEITOSA et al., 2000; SOCCOL et al., 2017).

Em contrapartida, foi observado que os cães adultos/idosos ( $p=0,0017$ ) estavam menos susceptíveis a soropositividade para LCan, da mesma forma como relatado por outras investigações (AZEVEDO et al., 2008). Estudos sobre a ocorrência da LCan clinicamente aparente observaram que cães muito jovens (<1 ano de idade) e cães idosos (>8 anos) são mais predispostos à infecção por *Leishmania* spp. e desenvolvimento de doença, provavelmente, por se enquadrarem em uma faixa etária de risco devido ao perfil imunológico imaturo ou menos funcional, respectivamente (SOLANO-GALLEGU et al., 2011).

A associação entre o acesso livre à rua e a infecção por *Leishmania* spp. não foi encontrada no presente estudo. A ausência desse tipo de associação foi também verificada

por outros autores (FEITOSA et al., 2000). Entretanto, existem estimativas de que cães semi-domiciliados apresentam risco três vezes maior de serem infectados e desenvolverem LCan do que os cães domiciliados (GÁLVEZ et al., 2010), por estarem mais expostos aos flebotomíneos que comumente se concentram nas áreas externas ao domicílio em locais com lixo e/ou com vegetação densa (BELO et al., 2013).

Os dados controversos sobre os fatores de risco associados a LCan devem-se provavelmente a diversos aspectos tais como: suscetibilidade do cão ao agente infeccioso, estado nutricional, condição ambiental, estrutura populacional, grau de domiciliação do cão e metodologia empregada na avaliação (FIGUEREDO et al., 2012; BELO et al., 2013).

No presente estudo, 72,7% (40/55) dos cães soropositivos apresentavam alguma alteração clínica, enquanto 27,3% (15/55) eram clinicamente saudáveis (Figura 3). A maior frequência de cães soropositivos doentes em relação a soropositivos não-doentes encontrada neste estudo difere dos dados publicados em outras áreas endêmicas para LCan variando entre 23,5% e 30,5% (FIGUEREDO et al., 2012; SOCCOL et al., 2017), provavelmente devido às condições socioeconômicas desfavoráveis dos habitantes do município de Muritiba, que segundo o IBGE (2017), o município apresentou 0,660 de Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM, faixa de 0 – 1) estando a baixo do parâmetro de IDH nacional 0,758 no mesmo ano, que poderia explicar uma deficiência nutricional com consequências imunológicas dos animais para o combate de infecções devido a uma alimentação inadequada.

**Figura 3** – Presença (A) e ausência (B) de sinais clínicos em cães com LCan

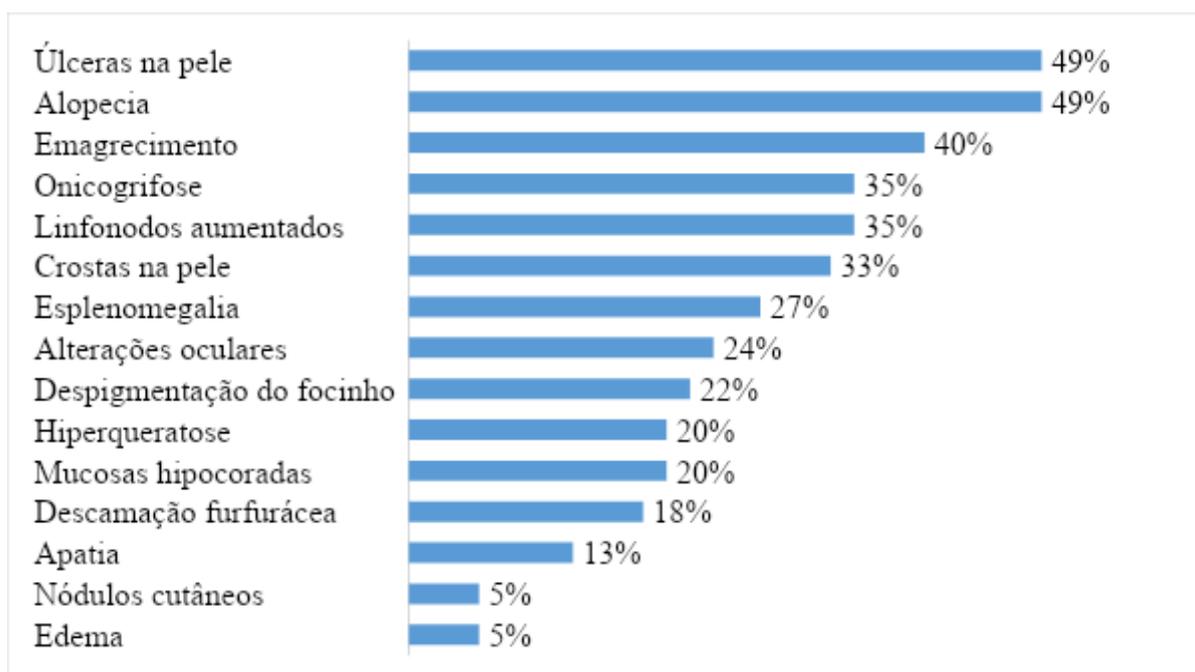


Também é importante considerar que a alta frequência de ocorrência de manifestações clínicas em cães oficialmente soropositivos para LCan não necessariamente

está associada apenas a infecção por *L. infantum*. Outras doenças como erliquiose, anaplasmose e babesiose são caracterizadas clinicamente similares à LCan. Os agentes infecciosos que causam essas doenças podem coexistir no mesmo cão infectado por *L. infantum*, aumentando o risco do desenvolvimento de alterações patológicas (KRAWCZAK et al., 2015). Vale acrescentar que, dos cães com algum sinal clínico, 82,7% (192/232) foram soronegativos, o que sugere a ocorrência de outras infecções/patologias.

O perfil clínico dos 55 cães oficialmente soropositivos para LCan do presente estudo (Figura 4) foi similar ao descrito pela literatura especializada para classificação clínica de cães com infecção por *L. infantum* (BARROUIN-MELO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; 2011) com destaque para alopecia e úlceras na pele (49,1%; 27/55), emagrecimento em 40% (22/55) e linfonodos aumentados e onicogrifose em 34,5% (19/55). As lesões cutâneas e seus anexos são observadas em torno de 67 a 89% dos cães com LCan (SARIDOMICHELAKIS; KOUTINAS, 2014; SOLANO-GALEGO et al., 2017), na ausência ou na presença de outros sinais clínicos não tegumentares, caracterizadas por dermatite esfoliativa, alopecia não pruriginosa, úlceras geralmente localizadas na cabeça ou membros, onicogrifose, despigmentação nasal, hiperqueratose nasal ou de coxim e dermatite nodular mucocutânea (FREITAS et al., 2012; LOMBARDO et al., 2012).

**Figura 4** – Sinais clínicos dos cães com LCan diagnosticados sorologicamente na região de Muritiba, seguindo os critérios do Ministério da Saúde



No presente estudo, 60% (33/55) dos cães soropositivos apresentavam algum tipo de lesão tegumentar como alopecia ( $p < 0,0001$ ), úlceras na pele ( $p < 0,0001$ ), onicogribose ( $p < 0,0001$ ), despigmentação do focinho ( $p < 0,0001$ ), crostas na pele ( $p = 0,0051$ ) e hiperqueratose ( $p < 0,0001$ ). Todas essas alterações estavam associadas com a soropositividade para *L. infantum* (Tabela 3). Encontrou-se que o emagrecimento foi o segundo sinal clínico mais frequente, diferente do informado por Peruhype-Magalhães, Machado-De-Assis e Rabello (2012) que encontraram a linfadenomegalia segue como a segunda alteração clínica mais frequente em cães com LCan, acometendo cerca de 60 a 90% desses animais. No entanto, no presente estudo verificou-se ainda que as alterações oculares ( $p = 0,0117$ ), apatia ( $p = 0,0007$ ), emagrecimento ( $p < 0,0001$ ), mucosas hipocoradas ( $p = 0,0015$ ), linfonodos aumentados ( $p = 0,0139$ ) e esplenomegalia ( $p < 0,0001$ ) também estavam associados com a soropositividade para *L. infantum* (Tabela 3).

Apesar do presente estudo ter encontrado lesões tegumentares e sistêmicas associadas com a soropositividade para *L. infantum*, não é possível inferir sobre o valor prognóstico dos parâmetros descritos, uma vez que deve-se excluir as coinfeções promotoras de lesões teciduais semelhantes às lesões encontradas nos órgãos infectados por *Leishmania* (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; 2011).

Silva et al. (2017) criaram um modelo para validação de escore clínico para LCan com sensibilidade e especificidade de 60,71% e 73,64%, respectivamente, em que onicogribose, despigmentação no focinho e conjuntivite foram os sinais clínicos associados a infecção por *L. infantum*, similar aos achados desse estudo. Dessa forma, para caracterização da gravidade da doença com base nos sinais clínicos foi utilizado o sistema de classificação de Silva et al. (2017) com modificações.

Foi observado que dos cães soropositivos que apresentavam pelo menos um sinal clínico (72,7%; 40/55), destes: 47,5% (19/40) dos cães foram classificados com doença leve, 25% (10/40) com doença moderada e 27,5% (11/40) com doença grave. A gravidade da LCan reflete na dinâmica de transmissão do parasito para o inseto vetor. Por exemplo, Courtenay et al. (2002) observaram que a probabilidade de um cão ser infeccioso estava correlacionada com a manifestação de sinais clínicos, ou seja, dos cães infectados subclínicos apenas 21,3% (16/75) foram infecciosos para os flebotomíneos, em comparação, 62,5% (15/24) dos cães doentes transmitiram o parasito para o vetor, independente do escore clínico.

**Tabela 3** – Associação entre os sinais clínicos e soropositividade para leishmaniose canina dos cães do município de Muritiba, empregando os critérios de diagnóstico estabelecidos pelo Ministério da Saúde

Variáveis	Número de cães	Cães positivos no TR-DPP e ELISA N(%)	Valor de p	OR (IC 95%)
<b>Alterações cutâneas</b>				
Áreas de alopecia				
Sim	80	27 (33,7%)	<0,0001	4,4 (2,3-7,9)
Não	271	28 (10,3%)		
Úlceras na pele				
Sim	72	27 (37,5%)	<0,0001	5,3 (2,9-9,8)
Não	279	28 (10,0%)		
Onicogribose				
Sim	34	19 (55,9%)	<0,0001	9,8 (4,6-20,2)
Não	317	36 (11,3%)		
Despigmentação do focinho				
Sim	19	12 (63,2%)	<0,0001	11,5 (4,3-29,2)
Não	332	43 (12,9%)		
Croscas na pele				
Sim	67	18 (26,9%)	0,0051	2,4 (1,3-4,5)
Não	284	37 (13,0%)		
Nódulos				
Sim	27	3 (11,1%)	0,4976	0,6 (0,2-2)
Não	324	52 (16,0%)		
Descamação furfurácea				
Sim	46	10 (21,7%)	0,2244	1,6 (0,7-3,4)
Não	305	45 (14,7%)		
Hiperqueratose				
Sim	25	11 (44,0%)	<0,0001	5 (2,2-11,8)
Não	326	44 (13,5%)		
<b>Alterações oculares</b>				
Sim	46	13 (28,3%)	0,0117	2,5 (1,2-4,9)
Não	305	42 (13,8%)		
<b>Alterações sistêmicas</b>				
Apatia				
Sim	15	7 (46,7%)	0,0007	5,2 (1,9-15,4)
Não	336	48 (14,3%)		
Emagrecimento				
Sim	73	22 (30,1%)	<0,0001	3,2 (1,7-5,9)
Não	278	33 (11,9%)		
Mucosas hipocoradas				
Sim	31	11 (35,5%)	0,0015	3,4 (1,6-7,6)
Não	320	44 (13,7%)		
Linfonodos aumentados				
Sim	77	19 (24,7%)	0,0139	2,1 (1,2-4,1)
Não	274	36 (13,1%)		
Esplenomegalia				
Sim	30	15 (50%)	<0,0001	7 (3,3-14,8)
Não	321	40 (12,5%)		
Edema				
Sim	7	3 (42,8%)	0,0456	4,2 (1-16)
Não	344	52 (15,1%)		

### 6.3 CARACTERIZAÇÃO ESPACIAL DOS CÃES SOROPOSITIVOS DO MUNICÍPIO DE MURITIBA E FATORES AMBIENTAIS

O município de Muritiba apresenta uma área urbana com ampla cobertura vegetal segundo o IBGE (2017), com arborização de 30,1% das vias públicas, mas com focos de desmatamento de áreas periféricas devido a expansão da cidade e sem condições sanitárias adequadas para a população (14,6% de esgotamento sanitário adequado), o que contribui para a manutenção do vetor *L. longipalpis* (ALMEIDA et al., 2010; MISSAWA; LIMA, 2006; RANGEL; VILELA, 2008). É considerado um município de transmissão esporádica para LVH, com dois casos em 2008 e um caso em 2016 (BRASIL, 2019a). Nesse contexto, Muritiba estaria caminhando para deixar de ser considerado um município de transmissão da LVH, devido ao fato do Ministério da Saúde utilizar como intervalo de tempo o período de 5 anos. Entretanto, com esse estudo foi possível observar que há de fato circulação da *L. infantum* entre cães no município e que a qualquer momento pode haver transmissão para humanos, caso medidas de controle do vetor e prevenção da doença canina não sejam tomadas. Essas condições somadas a prevalência de 15,7% (55/351) da LCan, encontrada neste estudo, indicam que o município de Muritiba é uma área de transmissibilidade para LVH e LCan com risco de endemicidade, pois também apresenta estrutura ambiental para manutenção do vetor.

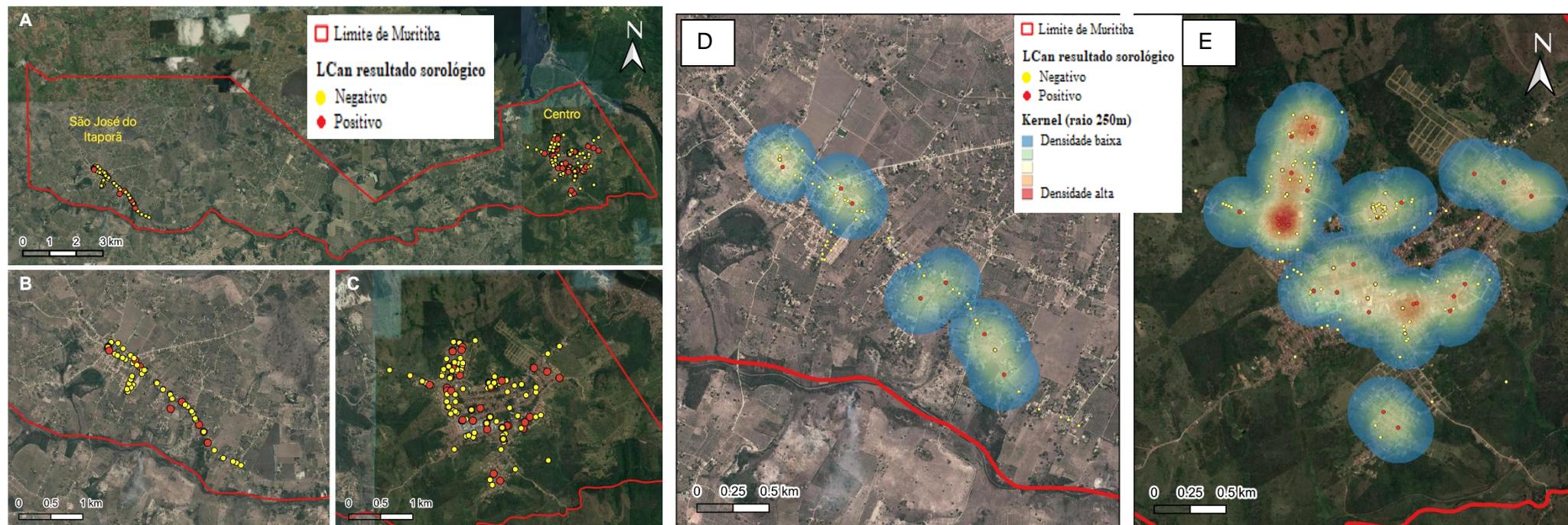
Neste estudo foram avaliados cães domiciliados e semi-domiciliados residentes em 163 domicílios na sede da cidade (Centro) e em 65 domicílios no distrito São José do Itaporã na zona rural. Na região do Centro foi encontrada uma soropositividade para LCan de 27,6% (45/163) dos cães avaliados e em São José do Itaporã de 15,4% (10/65) (Tabela 4). Os dois locais tinham colheita de lixo regular, mas o sistema de esgotamento sanitário existia apenas na região do Centro, e em São José do Itaporã os moradores utilizam fossa séptica.

Os cães soropositivos estavam distribuídos praticamente em toda extensão das duas localidades, mas de forma heterogênea, como mostra o estimador de intensidade de Kernel (Figura 5). Os focos de maior intensidade de LCan, por localidade, correspondem às áreas com maior número de cães avaliados no mesmo domicílio ou domicílios próximos. Com essa ferramenta pode-se determinar os locais que facilitariam a transmissão para humanos, pois concentrações muito altas de focos sinalizam para necessidade de aplicação de ações de prevenção e controle da doença.

**Tabela 4** – Número de domicílios por localidade avaliados, soropositividade para LCan e características ambientais observadas intra- e peridomicílio durante a busca ativa

	Total	Localidades							
		São José do Itaporã			Centro				
	Domicílios positivos	Total	Valor de p	OR (IC 95%)	Domicílios positivos	Total	Valor de p	OR (IC 95%)	
<b>Características dos domicílios</b>									
Total de Domicílios	228	13,8% (9/65)	28,5% (65/228)	-	-	22,1% (36/163)	71,5% (163/228)	-	-
Soropositividade LCan	55		15,4% (10/65)	-	-		27,6% (45/163)	-	-
<b>Presença de cães no domicílio</b>									
1 cão	96	44,4% (4/9)	40% (26/65)			36,1% (13/36)	42,9% (70/163)		
>2 cães	132	55,6% (5/9)	60% (39/65)	0,7710	0,8 (0,2-3,3)	63,9% (23/36)	57,1% (93/163)	0,3495	1,4 (0,6-3,1)
<b>Presença de cães errantes na rua do domicílio</b>									
Sim	112	88,8% (8/9)	87,7% (57/65)	0,9063	1,1 (0,1-14,3)	52,8% (19/36)	33,7% (55/163)	0,0062	2,8 (1,3-6,1)
Não	116	11,2% (1/9)	12,3% (8/65)			47,2% (17/36)	66,3% (108/163)		
<b>Presença de outros animais no domicílio</b>									
Sim	132	55,6% (5/9)	60% (39/65)	0,7694	0,8 (0,2-2,9)	63,9% (23/36)	57% (93/163)	0,3480	1,4 (0,7-3,0)
Não	96	44,4% (4/9)	40% (26/65)			36,1% (13/36)	43% (70/163)		
<b>Casas com quintal</b>									
Com vegetação	198	100% (9/9)	100% (65/65)	-	-	88,9% (32/36)	81,5% (133/163)	0,2008	2,0 (0,6-5,8)
Sem vegetação	30	0% (0/9)	0% (0/65)			11,1% (4/36)	18,4% (30/163)		

**Figura 5** - Distribuição espacial dos cães soronegativos e soropositivos para LCan na zona rural (São José do Itaporã) e urbana (Centro) de Muritiba, com base nos critérios de diagnóstico estabelecidos pelo Ministério da Saúde



Com relação a caracterização da distribuição espacial dos cães avaliados para LCan (figura 5-A), pode-se observar que os cães soropositivos estavam bem distribuídos pelo município. No mapa de Kernel (mapa que mostra as áreas quentes onde existe maior risco de transmissão da doença), foi possível observar que a sede do município apresenta um maior risco de transmissão ao se comparar com o distrito (figura 5-D) e que na mesma sede existe uma área que se destaca, representada pela área da feira livre do município (figura 5-E). Uma possível explicação seria uma presença maior de cães nessa área em busca de alimentos, além de ser uma área com acúmulo de matéria orgânica devido ao descarte inadequado dos produtos da feira. No distrito de São José do Itaporã (figura 5-B e 5-D) foi possível observar quatro áreas de colorações mais intensa áreas de risco sendo uma delas de alto risco.

No presente estudo foi observado que a LCan está presente tanto na área rural como na área urbana. As condições ambientais desempenham um papel importante no ciclo de transmissão da LVH e LCan. Embora, as condições sanitárias não sejam tão precárias nas localidades do município estudado, elas se situam em áreas que foram desmatadas para a ocupação da população, contribuindo para o desequilíbrio da fauna e flora, subsequentemente, contribuindo para o deslocamento e adaptação do inseto vetor para os domicílios, o que torna o homem e os cães domésticos alvos para alimentação do flebotomíneo e, assim, aumenta o risco de infecção por *Leishmania* (GÓES; MELO; JERALDO, 2012; GRAMICCIA, 2011).

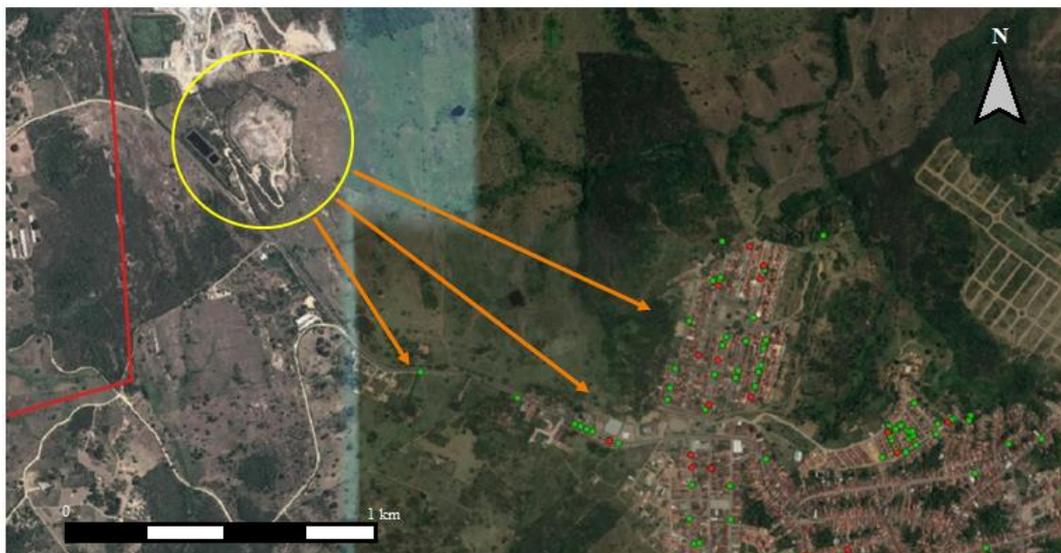
Boa parte das casas na sede com cães positivos (88,9%) e 100% das casas com cães positivos no distrito de São José do Itaporã apresentaram áreas de quintais com vegetação (figura 6), podendo ser locais fáceis de acumular matéria orgânica se não forem bem cuidados, consequentemente promovendo a proliferação do vetor aumentando o risco de transmissão para humanos e outros animais. Alguns com vegetação bastante densa e outros com presença de bananeiras que tem a capacidade de acumular umidade e matéria orgânica.

Além disso, Muritiba está localizada em um polo avícola e alguns estudos demonstraram que a galinha doméstica é uma fonte de alimentação importante para o flebotomíneo e as suas fezes favorecem a sua reprodução (GUIMARAES-E-SILVA et al., 2017; LAINSON; SHAW, 1987). Outro aspecto é que no município de Muritiba tem uma área de aterro sanitário (figura 7) e o acúmulo de matéria orgânica (lixo) é uma fonte de multiplicação do vetor.

**Figura 6** – Casas com quintal com vegetação



**Figura 7** – Distanciamento do aterro sanitário (círculo amarelo) dos casos de LCan



Poucos são os trabalhos científicos publicados sobre áreas endêmicas para LCan na região do Recôncavo da Bahia. Existe um desconhecimento da população em geral sobre esta doença e quais as consequências para os seres humanos e seus animais. Além disso, as ações de saúde pública são aplicadas precariamente, sendo necessária uma investigação epidemiológica por meio de busca ativa para detecção de cães positivos para LCan nas cidades pertencentes ao Recôncavo Baiano, além de vigilância entomológica para identificação do vetor.

## 7 CONCLUSÕES

Foi encontrada soropositividade para LCan no município de Muritiba-BA, por meio da aplicação diagnóstica dos testes oficiais preconizados pelo Ministério da Saúde do Brasil, e presença de DNA de *Leishmania infantum* em cães com presença da infecção. É o primeiro registro epidemiológico da LCan nesta região, caracterizada como uma área de transmissão esporádica de leishmaniose humana.

Os sinais clínicos, demonstrados nos cães soropositivos para LCan, indicam que estes cães, além da elevada taxa de confirmação de infecção por meio de detecção do DNA do parasito e das evidências de resposta humoral, detectada via reatividade de anticorpos nos dois testes sorológicos, DPP<sup>®</sup> e ELISA, também apresentavam doença clínica caracterizada por sinais tipicamente associados à infecção por *L. infantum*, especialmente sinais de alterações cutâneas.

A região possui condições ambientais para manutenção do vetor e transmissibilidade da *Leishmania infantum*. Pode-se determinar os locais de risco de maior transmissão para humanos a partir do número de cães infectados (Georreferenciamento – Mapa de Kernel), sugerindo a possibilidade de aumento de transmissão para humanos.

O conhecimento da ocorrência e da localização dos casos auxilia na tomada de medidas governamentais para controle da circulação da leishmaniose na região, que devem incluir educação da população para se responsabilizar pela própria saúde e ambiente e evitar favorecimento à presença de vetores, adequação da infraestrutura sanitária para evitar lixo e esgoto expostos, ações preventivas e terapêuticas à população humana e manejo ecologicamente correto das áreas verdes.

## REFERÊNCIAS

- AKHOUND, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p. e0004349, 2016.
- AKTER, S., ALAM, M.Z., NAKAO, R., YASIN, M.G., KATO, H. AND KATAKURA, K. Molecular and serological evidence of *Leishmania* infection in stray dogs from visceral leishmaniasis–endemic areas of Bangladesh. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 95, n. 4, p. 795-799, 2016.
- ALBUQUERQUE, A.; CAMPINO, L.; CARDOSO, L.; CORTES, S. Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. **Parasites Vectors**, v. 10, n.57, p. 1-5, 2017.
- ALEXANDRE-PIRES, G.; BRITO, M.T.V.; ALGUERÓ, C.; MARTINS, C.; RODRIGUES, O.R.; FONSECA, I.P.; SANTOS-GOMES, G. Canine leishmaniosis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 137, n. 3-4, p. 275-283, 2010.
- 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 soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 156-159, 2009.
- ALMEIDA-LEAL, G.G.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; CARNEIRO, C.M.; GIUNCHETTI, R.C. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 472–82, 2014.
- ALMEIDA, P. S. D.; NASCIMENTO, J.C.D.; FERREIRA, A.D.; MINZÃO, L.D.; PORTES, F.; MIRANDA, A.M.D.; FACCENDA, O.; ANDRADE FILHO, J.D. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, 2010.
- ALTEN, B.; MAIA, C.; AFONSO, M.O.; CAMPINO, L.; JIMÉNEZ, M.; GONZÁLEZ, E.; MOLINA, R.; BAÑULS, A.L.; PRUDHOMME, J.; VERGNES, B.; TOTY, C. Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, e. 0004458, 2016.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, n. 3, p. 1-88, 2004.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ALVES, A.S.; MOUTA-CONFORT, E.; FIGUEIREDO, F.B.; OLIVEIRA, R.V.C.; SCHUBACH, A.O.; MADEIRA, M.D.F. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Research in veterinary science**, v. 93, n. 3, p.1329-1333, 2012.

ALVES, G.B.B.; PINHO, F.A.; SILVA, S.M.M.S.; CRUZ, M.S.P.; COSTA, F.A.L. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 3, p.310-315, 2010.

ANDRADE, R. A.; REIS, A. B.; GONTIJO, C. M. F.; BRAGA, L. B.; ROCHA, R. D. R.; ARAÚJO, M. S. S.; VIANNA, L. R.; MARTINS-FILHO, O. A. Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 116, n. 1-2, p. 85-97, 2007.

ARRUDA, R.M.F.; CARDOSO, D.T.; TEIXEIRA-NETO, R.G.; BARBOSA, D.S.; FERRAZ, R.K.; MORAIS, M.H.F.; BELO, V.S.; SILVA, E.S. Space-time analysis of the incidence of human visceral leishmaniasis (VL) and prevalence of canine VL in a municipality of southeastern Brazil: Identification of priority areas for surveillance and control. **Acta Tropica**, v. 197, p.105052, 2019.

ASCENCIO, M.E; SARMIENTO, N.F; SCHNITTGER, L.; FLORIN-CHRISTENSEN, M; RODRIGUEZ, A.E. Molecular diagnosis of *Leishmania* spp. in dogs of a subtropical locality of Argentina. **Transbound Emerging Diseases**, v. 00, p. 1–5, 2019.

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

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Dermatology Clinical Journal Articles**, n. 14, p. 523-532, 1996.

AVILA-PIRES, F. D. Zoonoses: hospedeiros e reservatórios. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 1, p. 82-97, 1989.

AZEVEDO, M. A. A.; DIAS, A. K. K.; PAULA, H. B.; PERRI, S. H. V.; NUNES, C. M. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréu, Estado do Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 3, p. 123-127, 2008.

BAHIA. Diretoria de Vigilância Epidemiológica do Estado da Bahia. **Informe Epidemiológico de Leishmaniose Visceral (LV) – Bahia**. 2018. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/2018-Boletim-de-Leishmaniose-Vivisceral-n.-01.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2019.

BARBOSA, D.S. **Distribuição espacial e definição de áreas prioritárias para vigilância da leishmaniose visceral no município de São Luís, Maranhão, Brasil**. (Dissertação de Mestrado) Rio de Janeiro – RJ, 2011. Programa de Pós-graduação em Epidemiologia em

Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz.

BARBOZA, D.C.P.M.; LEAL, D.C.; SOUZA, B.M.P.D.S.; CARNEIRO, A.J.B.; GOMES-NETO, C.D.M.B.; ALCÂNATARA, A.C.D.; JULIÃO, F.D.S.; MOURA, S.A.B.D.; PERALVA, L.M.P.; FERREIRA, F.; FRANKE, C.R. Inquérito epidemiológico da leishmaniose visceral canina em três distritos sanitários do Município de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n.2, 2009.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; DE-ANDRADE-FILHO, F. A.; TRIGO, J.; JULIÃO, F. S.; FRANKE, C. R.; AGUIAR, P. H. P.; DOS-SANTOS, W. L. C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 331-339, 2006.

BARROUIN-MELO, S.M.; LARANGEIRA, D.F.; TRIGO, J.; AGUIAR, P.H.P.; DOS-SANTOS, W.L.C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p.195-197, 2004.

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. 328-377, 2004.

BASSO, A.; PRADO, G.; PELEGRINI, P.; GROSSI-DE-SA, M. Biopharmaceuticals and Biosimilars. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications**, v. 15, n. 17, p. 23, 2016.

BAVIA, M.E.; CARNEIRO, D.D.M.T.; GURGEL, H.C.; MADUREIRA-FILHO, C.; BARBOSA, M.G.R. Remote sensing and geographic information systems and risk of american visceral leishmaniasis in Bahia, Brazil. **Parasitologia**, v.1, n. 47, p. 165-169, 2005.

BELO, V.S.; STRUCHINERA, C.J.; WERNECKA, G.L.; BARBOSA, D.S.; OLIVEIRA, R.B.; TEIXEIRA-NETO, R.G.T.; SILVA, E.S. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n.1, p. 1-13, 2013.

BENITEZ, A.N.; MARTINS, F.D.C.; MAREZE, M.; NINO, B.D.S.L.; CALDART, E.T.; FERREIRA, F.P.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; FREIRE, R.L.; GALHARDO, J.A.; MARTINS, C.M.; BIONDO, A.W. Spatial and simultaneous seroepidemiology of anti-*Leishmania* spp. antibodies in dog owners and their dogs from randomly selected households in a major city of southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 154, p.47-53, 2018.

BERNARDI, J.V. E.; LANDIM, P. M. B. O uso do “Sistema de Posicionamento Global/GPS” para elaboração de banco de dados geo-referenciados. **Revista Geociências-UnG**, v. 7, n. 6, p. 74-79, 2013.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUREUX, D. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n.3, p. 273-7, 1996.

BETHONY, J. M.; COLE, R. N.; GUO, X.; KAMHAWI, S.; LIGHTOWLERS, M. W.; LOUKAS, A.; PETRI, W.; REED, S.; VALENZUELA, J.G.; HOTEZ, P. J. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. **Immunological Reviews**, v. 239, n. 1, p.237-270, 2011.

BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.H.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORE, J.L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 162, n. 2, p.108-120, 2001.

BOUSSAA, S.; KAHIME, K.; SAMY, A. M.; SALEM, A.B.; BOUMEZZOUGH, A. Species composition of sand flies and bionomics of *Phlebotomus papatasi* and *P. sergenti* (Diptera: Psychodidae) in cutaneous leishmaniasis endemic foci, Morocco. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p.60, 2016.

BRASIL. **Decreto Nº 51.838, de 14 de março de 1963** - Normas técnicas especiais de combate as leishmanioses no Brasil. 1963. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/1950-1969/D51838.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1950-1969/D51838.htm)>. Acesso em: 14 set. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7ª edição, Brasília: ed. Ministério da Saúde, 2009, 816p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ed. 1, reimpr. 5, Brasília. Ministério da Saúde, 2014, 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **DataSUS**: Tabnet. 2019a. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltaba.def>>. Acesso em: 03 fev. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde: volume único**. 3ª. Edição, Brasília: ed. Ministério da Saúde, 2019b. 740 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. SUVISA. **Sinanweb**. 2020. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 03 fev. 2020.

BRUHN, F.R.P.; MORAIS, M.H.F.; CARDOSO, D.L.; BRUHN, N.C.P.; FERREIRA, F.; ROCHA, C.M.B.M. Spatial and temporal relationships between human and canine visceral

leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006–2013. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p.372, 2018.

BUCKINGHAM-JEFFERY, E.; HILL, E.M.; DATTA, S.; DILGER, E.; COURTENAY, O. Spatio-temporal modelling of *Leishmania infantum* infection among domestic dogs: a simulation study and sensitivity analysis applied to rural Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 215, 2019.

BURZA, S.; CROFT, S.L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet Infectious Disease**, v. 392, n. 6736, p.1-20, 2018.

CAMARGO, J. C. D. **Leishmaniose visceral em salinas da Margarida, área do Recôncavo baiano, Brasil**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental). Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2011.

CAMARGO-NEVES, L. F. Avaliação do emprego das coleiras impregnadas com deltametrina 4% associada às medidas tradicionais de controle da leishmaniose visceral no estado de São Paulo, Brasil. **Conectfarma Publicações Científicas**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2011.

CAMPOS, R.; SANTOS, M.; TUNON, G.; CUNHA, L.; MAGALHÃES, L.; MORAES, J.; RAMALHO, D.; LIMA, S.; PACHECO, J.A.; LIPSCOMB, M.; DE-JESUS, A.R. Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. **Geospatial Health**, v. 12, p. 503, 2017.

CARNEIRO, D.D.M.T.; BAVIA, M.E.; ROCHA, W.; LOBÃO, J.; MADUREIRA-FILHO, C.; OLIVEIRA, J.B.; SILVA, C.E.; BARBOSA, M.G.; RIOS, R.B. Identificação de áreas de risco para a leishmaniose visceral americana, através de estudos epidemiológicos e sensoriamento remoto orbital, em Feira de Santana, Bahia, Brasil (2000-2002). **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 28, n. 1, p. 19-32, 2004.

CAVALCANTE, F.R.A.; CAVALCANTE, K.K.D.S.; FLORENCIO, C.M.G.D.; MORENO, J.D.O.; CORREIA, F.G.S.; ALENCAR, C.H. Human visceral leishmaniasis: epidemiological, temporal and spacial aspects in Northeast Brazil, 2003-2017. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, 2020.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; PERSECHINO, A.; GRADONI, L.; SCALONI, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.

CONTRERAS, M.E.M. Serological Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. **American Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials.**, v. 1, n. 3, p. 1015, 2018.

COSTA, C.H.; GOMES, R.B.; SILVA, M.R.; GARCEZ, L.M.; RAMOS, P.K.; SANTOS, R.S.; SHAW, J.J.; DAVID, J.R.; MAGUIRE, J.H. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n.3, p.997-1000, 2000.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, 2011.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M.; SHAW, J.J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, n.9, p.1314-1320, 2002.

CUNZE, S.; KOCHMANN, J.; KOCH, L.K.; HASSELMANN, K.J.; KLIMPEL, S. Leishmaniasis in Eurasia and Africa: geographical distribution of vector species and pathogens. **Royal Society Open Science**, v. 6, n. 5, p.190-334. 2019.

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

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. S1, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G.; BANETH, G.; BOURDEAU, P.; BREITSCHWERDT, E.; CAPELLI, G.; CARDOSO, L.; DAY, M.J.; DOBLER, G.; FERRER, L.; IRWIN, P.; JONGEJAN, F.; KEMPF, V.A.J.; KOHN, B.; LAPPIN, M.; LITTLE, S.; MADDER, M.; MAGGI, R.; MAIA, C.; MARCONDES, M.; NAUCKE, T.; OLIVA, G.; PENNISI, M.G.; PENZHORN, B.L.; PEREGRINE, A.; PFEFFER, M.; ROURA, X.; SAINZ, A.; SHIN, S.; SOLANO-GALLEGU, L.; STRAUBINGER, R.K.; TASKER, S.; TRAUB, R.; WRIGHT, I.; BOWMAN, D.D.; GRADONI, L.; OTRANTO, D. Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. **Emerging Infection Diseases**, v. 25, n. 12, p. 1-4, 2019a.

DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G.; BOWMAN, D.D.; GRADONI, L.; OTRANTO, D. Culling dogs for zoonotic visceral leishmaniasis control: the wind of change. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 97-101, 2019b.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hosp.**, v. 47, p. 75-87, 1955.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, n. 3, p.198-212, 1962.

DEIRÓ, A.G.J.; MONTARGIL, S.M.A.; CARVALHO, F.S.; MUNHOZ, A.D.; ALBUQUERQUE, G.R. Antibody occurrence of Anti-*Toxoplasma gondii*, *Leishmania* sp. and *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia State. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 1, p. 199-210, 2018.

DUTHIE, M.S.; LISON, A.; COURTENAY, O. Advances toward diagnostic tools for managing zoonotic visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 881-890, 2018.

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.

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

FIGUEIREDO, F.B.; VASCONCELOS, T.C.B.; MADEIRA, M.F.; MENEZES, R.C.; MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; MARCELINO, A.P. Validation of Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP(r) CVL rapid test) for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 11, p. e180260, 2018.

FIGUEREDO, L.A.; PAIVA-CAVALCANTI, M.D.; ALMEIDA, E.L.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; DANTAS-TORRES, F. Clinical and hematological findings in *Leishmania braziliensis*-infected dogs from Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 418-420, 2012.

FOLLADOR, I.; ARAUJO, C.; CARDOSO, M.A.; TAVARES-NETO, J.; BARRAL, A.; MIRANDA, J.C.; BITTENCOURT, A.; CARVALHO, E.M. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis in Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p.497-503, 1999.

FREITAS, J. C. C.; PINHEIRO, D. C. S. N.; LOPES-NETO, B. E.; SANTOS, G. J.; ABREU, C. R.; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. M.; OLIVEIRA, L. F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 24-29, 2012.

FREITAS, M.V.D.M.; BRUN, C.F.D.L.; RODRIGUES, M.C.; ALVES, G.B.B.; LEAL, A.F.; GROLLI, L.; QUESSADA, A.M. Ocular diseases in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí, Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 10, 2017.

FREITAS-ROCHA, A.T.; ESPINDOLA, G.M.; SOARES, M.R.A.; ROCHA, J.R.S.; COSTA, C.H.N. Visceral leishmaniasis and vulnerability conditions in an endemic urban area of Northeastern Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 112, n. 7, p. 317-325, 2018.

GÁLVEZ, R.; MIRÓ, G.; DESCALZO, M. A.; NIETO, J.; DADO, D.; MARTÍN, O.; CUBERO, E.; MOLINA, R. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 169, n. 3-4, p. 327-334, 2010.

GÁLVEZ, R.; MONTOYA, A.; FONTAL, F.; MURGUÍA, L.M.; MIRÓ, G. Controlling phlebotomine sand flies to prevent canine *Leishmania infantum* infection: a case of knowing your enemy. **Research in Veterinary Science**, v. 121, p. 94–103, 2018.

GAMA-MELO, M.O.; SILVESTRE, B.T.; SILVEIRA, J.A.G.; VAZ, T.P.; BARBOSA, J.R.; RIBEIRO, M.F.B.; FONTES, G. Avaliação da leishmaniose canina e co-infecção com

*Babesia canis* e rickettsias em área não endêmica no Centro Oeste de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 41, p.e101819-e101819, 2019.

GHARBI, M., MHADHBI, M., REJEB, A., JAOUADI, K., ROUATBI, M., DARGHOUTH, M.A. Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 34, n. 2, p. 613-626, 2015.

GIUDICE, E.; PASSANTINO, A. Detection of *Leishmania* amastigotes in peripheral blood from four dogs. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 59, n.2, p.205-213, 2011.

GÓES, M.A.D.O.; MELO, C.M.D.; JERALDO, V.D.L.S. Time series of visceral leishmaniasis in Aracaju, state of Sergipe, Brazil (1999 to 2008): human and canine aspects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 15, n. 2, p. 298-307, 2012.

GONÇALVES, M. B. **Prevalência, distribuição e identificação de prováveis fatores de risco para Leishmaniose Visceral canina em Camaçari - BA**. 2014. 113 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

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

GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; SINCLAIR, D.; FIROOZ, A.; ENK, C.; VÉLEZ, I.D.; ESTERHUIZEN, T.M.; TRISTAN, M.; ALVAR, J. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 5, n. 8, cd. 008736, 2015.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1, p. 23-30, 2011.

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

GUIMARAES-E-SILVA, A.S.; SILVA, S.O.; SILVA, R.C.R.; PINHEIRO, V.C.S.; REBÊLO, J.M.M.; MELO, M.N. *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. **PLoS One**, v. 12, n. 8, e0179052, 2017.

GURGEL, H. D. C.; BAVIA, M. E.; CARNEIRO, D. D. M. T.; SILVA, C. E. P. D.; MADUREIRA-FILHO, C.; RIOS, R. B.; BARBOSA, M. D. G. A contribuição do NDVI para o estudo epidemiológico da Leishmaniose Visceral Americana, no interior da Bahia. **Anais do XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Goiânia-GO, 2005.

HOSEIN, S.; BLAKE, D.P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v. 144, n. 1, p.95-115, 2017.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades e Estados do Brasil**. 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ba/muritiba/panorama>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

INEMA. Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Secretaria do Meio Ambiente do Governo do Estado da Bahia. **Vegetação: Estado da Bahia**. 2014. Disponível em: <Fonte DDF-1998 e Banco de Dados do INEMA (2014)>. Acesso em: 11 nov. 2019.

INPE. Instituto Nacional de Pesquisa Espaciais. **Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos: Muritiba-BA, Previsão de Tempo por Período**. 2020. Disponível em: <<https://www.cptec.inpe.br/previsao-tempo/ba/muritiba>>. Acesso em: 07 fev. 2020.

INSTITUTO PASTEUR. **Nota Técnica 02 - IP/CCD/SES-SP – 07/10/2013**. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/resources/instituto-pasteur/pdf/nota-tecnica/notatecnicaipn2-2013.pdf>>. Acesso em: 04 fev. 2018.

JUDIELE, S.; MARIANA, C. T.; ANDRÉ, P.; CLAIRTON, M. P. Canine Leishmaniasis in Brazil. **Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences**, v. 6, n. 3, 2019.

JULIÃO, F.S.; SOUZA, B.M.; FREITAS, D.S.; OLIVEIRA, L.S.; LARANGEIRA, D.F.; DIAS-LIMA, A.G.; SOUZA, V.M.; BARROUIN-MELO, S.M.; MOREIRA JR, E.D.; PAULE, B.J.; FRANKE, C.R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 8, p.319-324, 2007.

KHATKHATAY, M.I.; DESAI, M. A comparison of performances of four enzymes used in ELISA with special reference to  $\beta$ -lactamase. **Journal of Immunoassay**, v. 20, n. 3, p. 151-183, 1999.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sand fly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Ann Parasitol Hum Comp.**, v. 65, 1990.

KOEHLER, K.; STECHELE, M.; HETZEL, U.; DOMINGO, M.; SCHÖNIAN, G.; ZAHNER, H.; BURKHARDT, E. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 1-2, p. 9-17, 2002.

KOUTINAS, A.F.; KOUTINAS, C.K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.

KRAWCZAK, F.D.S.; REIS, I.A.; SILVEIRA, J.A.D.; AVELAR, D.M.; MARCELINO, A.P.; WERNECK, G.L.; LABRUNA, M.B.; PAZ, G.F. *Leishmania*, *Babesia* and *Ehrlichia* in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 64-68, 2015.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; DEREURE, J.; LAMOTHE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine

visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, v. 125, n. 3, p. 197-207, 2002.

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

LANA, R.S.; MICHALSKY, É.M.; LOPES, L.O.; LARA-SILVA, F.O.; NASCIMENTO, J.L.; PINHEIRO, L.C.; FRANCA-SILVA, J.C.; MENDES, T.S.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Ecoepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in an endemic area in the Steel Valley in Brazil: An ecological approach with spatial analysis. **Plos One**, v. 13, n. 10, 2018.

LAURENTI, M.D.; SANTANA, L.J.R.; M.V.; TOMOKANE, T.Y.; LUCCA, H.R.L.; ASCHAR, M.; SOUZA, C.S.F.; SILVA, R.M.; MARCONDES, M.; MATTA, V.L.R. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n.3-4, p.444-450, 2014.

LEAL, G. G. D. A. **Efetividade da coleira impregnada com deltametrina na redução da incidência da leishmaniose visceral canina**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto. 2017.

LEANDRO-JUNIOR, M. V. F. **Análise comparativa do teste imunocromatográficos DPP–Biomanguinhos com ELISA e RIFI no diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2014. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental). São Paulo - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2014.

LEÇA-JÚNIOR, N.F.L.; GUEDES, P.E.B.; SANTANA, L.N.; ANJOS-ALMEIDA, V.; CARVALHO, F.S.; ALBUQUERQUE, G.R.; WENCESLAU, A.A.; MUNHOZ, A.D.; SILVA, F.L. Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil. **Acta Tropica**, v.148, p.115-119, 2015.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159, 1977.

LEITE, M.D.X. **Leishmaniose visceral canina–distribuição geográfica e delimitação de áreas de risco em Barreiras, Bahia**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos). Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2014.

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

LIRA, R.A.; CAVALCANTI, M.P.; NAKAZAWA, M.; FERREIRA, A.G.P.; SILVA, E.D.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C.; SOUZA, W.D.; GOMES, Y.M. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 11-16, 2006.

LOBSIGER, L.; MÜLLER, N.; SCHWEIZER, T.; FREY, C.F.; WIEDERKEHR, D.; ZUMKEHR, B.; GOTTSTEIN, B. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 3-4, p.408-414, 2010.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRÌ, A.; SOLANO-GALLEGO, L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 1, p. 10-17, 2012.

LONGLEY, P.A.; GOODCHILD, M.F.; MAGUIRE, D.J.; RHIND, D.W. **Sistemas e Ciência da Informação Geográfica**. 3ª ed. Porto Alegre, p. 37-45. Bookman. 2013.

LOPES, E.G.; SEVÁ, A.D.P.; FERREIRA, F.; NUNES, C.M.; KEID, L.B.; HIRAMOTO, R.M.; FERREIRA, H.L.; OLIVEIRA, T.M.F.D.S.; BIGOTTO, M.F.D.; GALVIS-OVALLOS, F.; GALATI, E.A.B. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiology & Infection**, v. 145, n. 12, p.2436-2444, 2017.

MAIA, C.; DANTAS-TORRES, F.; CAMPINO, L. Parasite biology: the reservoir hosts. In: BRUSCHI, F.; GRADONI, L. editors. **The leishmaniasis: old neglected tropical diseases**. Cham (Switzerland): Springer International Publishing AG. p 79–106. 2018.

MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; LUCENA, F.; SOUSA-GOMES, M.L.; ALVES, W.A.; PAZ, L. Coinfecção da leishmaniose visceral e AIDS no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 124, 2007.

MARCONDES, M.; LIMA, V. M. F.; DE ARAÚJO, M. DE F. L.; HIRAMOTO, R.M.; TOLEZANO, J.E.; VIEIRA, R.F.; BIONDO, A.W. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 649– 652, 2013.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. **Parasitologia Humana**, v. 11, p.67-83, 2005.

MIGONE, L.E. Un caso de kala-zar a Asunción (Paraguay). **Bull Soc Path Exot**, v. 6, p. 118-20, 1913.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 337-340, 2006.

MORAES, C.S.; AGUIAR-MARTINS, K.; COSTA, S.G.; BATES, P.A.; DILLON, R.J.; GENTA, F.A. Second blood meal by female *Lutzomyia longipalpis*: enhancement by oviposition and its effects on digestion, longevity, and *Leishmania* infection. **BioMed Research International**, v. 2018, ID. 2472508, p. 10, 2018.

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 the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p.245-252, 2007.

MOREIRA, N.B.; ALMEIDA, A.B.P.F.; PINTO, A.Z.L.; MUTZEMBERG, E.R.; GODOY, I.; SILVEIRA, M.M.; DUTRA, V.; SOUSA, R.F. Leishmaniose visceral canina: aspectos dermatológicos e dermatoses associadas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-4, 2016.

NERY, G.; MENESES, I.D.S.; TRUEB, I.; LARANGEIRA, D.F.; BARROUIN-MELO, S.M. Ocorrência de *Leishmania infantum* em fezes de cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 5, p.1249-1253, 2015.

NUNES, C.M.; PIRES, M.M.; SILVA, K.M.; ASSIS, F.D.; GONÇALVES-FILHO, J.; PERRI, S.H. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 131–133, 2010.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and economic burden of human leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 489-493, 2016.

OLIVEIRA, L.C.P.D.; ARAÚJO, R.R.D.; ALVES, C.R.; MOUTA-CONFORT, E.; LÓPEZ, J.A.; MENDONÇA-LIMA, F.W.D. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Avila, State of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p.400-404, 2010.

OLIVEIRA, S. S.; ARAÚJO, T. M. Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em uma área endêmica do Estado da Bahia, Brasil (1995-2000). **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n. 6, 2003.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, p. 339-345, 2013.

PALATNIK-DE-SOUZA, C.B. Vaccines for canine leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v.3, p. 69, 2012.

PAPARCONI, R.; FIORENTINO, E.; CAPPIELLO, S.; GIZZARELLI, M.; GRADONI, L.; OLIVA, G.; FOGLIA-MANZILLO, V. Sternal aspiration of bone marrow in dogs: a practical approach for canine leishmaniasis diagnosis and monitoring. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2013, 2013.

PEIXOTO, H.M.; OLIVEIRA, M.R.F.; ROMERO, G.A.S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 3, p.334-352, 2015.

PENNA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasileira de Medicina**, v. 18, p.940-950, 1934.

PEREIRA, V.F.; BENASSI, J.C.; STARKE-BUZETTI, W.A.; SILVA, D.T.; FERREIRA, H.L.; KEID, L.B.; SOARES, R.M.; RUIZ, V.L.D.A.; OLIVEIRA, T.M.F.D.S. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p.104-106, 2016.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MACHADO-DE-ASSIS, T. S.; RABELLO, A. Use of the Kala-Azar Detect® and IT-LEISH® rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p.951-952, 2012.

PESSOA-E-SILVA, R.; VAITKEVICIUS-ANTÃO, V.; ANDRADE, T.A.S.; SILVA, A.C.O.; OLIVEIRA, G.A.; TRAJANO-SILVA, L.A.M.; NAKASONE, E.K.N.; PAIVA-CAVALCANTI, M. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental Parasitology**, v. 199, p. 9-16, 2019.

PETERSON, A.T.; CAMPBELL, L.P.; MOO-LLANES, D.A.; TRAVI, B.; GONZÁLEZ, C.; FERRO, M.C.; FERREIRA, G.E.M.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; CUPOLILLO, E.; RAMSEY, J.; LEFFER, A.M.C. Influences of climate change on the potential distribution of *Lutzomyia longipalpis* sensu lato (Psychodidae: Phlebotominae). **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 10-11, p. 667-674, 2017.

PETRELLA, V.; ACETO, S.; MUSACCHIA, F.; COLONNA, V.; ROBINSON, M.; BENES, V.; CICOTTI, G.; BONGIORNO, G.; GRADONI, L.; VOLF, P.; SALVEMINI, M. De novo assembly and sex-specific transcriptome profiling in the sand fly *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Phlebotominae), a major Old World vector of *Leishmania infantum*. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 847, 2015.

PIMENTEL, D.D.S.; RAMOS, R.A.N.; SANTANA, M.D.A.; MAIA, C.S.; CARVALHO, G.A.D.; SILVA, H.P.D.; ALVES, L.C. Prevalence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs in an endemic area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 4, p.491-493, 2015.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A.M.; VAN HOEIJ, M.; LANGERMANS, J.A.; RUITENBERG, E.J.; RUTTEN, V.P. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 3, p. 181-189, 2000.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PROVERBIO, D.; SPADA, E.; GIORGI, G.B.; PEREGO, R.; VALENA, E. Relationship between *Leishmania* IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. **BioMed Research International**, v. 2014, Article ID 412808, 5 pages, 2014.

QUARESMA, P.F.; MURTA, S.M.F.; CASTRO-FERREIRA, E.; ROCHA, A.C.V.M.; XAVIER, A.A.P.; GONTIJO, C.M.F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v. 111, n.3, p.289-294, 2009.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, p. 1915–1934, 2009.

RAMOS-AUGUSTO, L.C. **Estudo de *Leishmania* spp. em amostras provenientes de cães e humanos e suas implicações em saúde pública na região de Bauru, São Paulo.** 2018. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais). Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu-SP, 2018.

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

REICHMANN, M. L. A. B.; PINTO, H. B. F.; NUNES, V. F. P. Vacinação contra a raiva de cães e gatos. **Instituto Pasteur**, v. 3, p. 32, 1999.

RIBEIRO, V.M.; MIRANDA, J.B.; MARCELINO, A.P.; ANDRADE, H.M., REIS, I.A.; CARDOSO, M.S.; GONTIJO, C.M.F.; PAZ, G.F. Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 274, p.108920, 2019.

RIBEIRO, R.R.; SILVA, S.M.; FULGÊNCIO, G.D.E.O.; MICHALICK, M.S.; FRÉZARD, F.J. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 373– 378, 2013.

RIBEIRO, R.R.; SUZAN, M.; MICHALICK, M.; SILVA, M.E.; PEIXOTO, C.C.; SANTOS, D. Canine leishmaniasis: An overview of the current status and strategies for control. **Biomed Res Int**, 2018.

RIBOLDI, E.; CARVALHO, F.; ROMÃO, P.R.T.; BARCELLOS, R.B.; BELLO, G.L.; RAMOS, R.R.; OLIVEIRA, R.T.; JÚNIOR, J.P.A.; ROSSETTI, M.L.; DALLEGRAVE, E. Molecular method confirms canine *Leishmania* infection detected by serological methods in non-endemic area of Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**, v.56, n.1, p.11, 2018.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; MARSON, P. M.; HAYASAKA, E. Y.; VICTORIA, C.; DA SILVA, R. C.; LANGONI, H. Molecular detection of *Leishmania* spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 27 2014.

ROCHA, A.T.F.; ESPINDOLA, G.M.; SOARES, M.R.A.; ROCHA, J.R.S.; COSTA, C.H.N. Visceral leishmaniasis and vulnerability conditions in an endemic urban area of Northeastern Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 112, n. 7, p. 317–325, 2018.

ROCHA, M.A.N.; MATOS-ROCHA, T.J.; RIBEIRO, C.M.B.; ABREU, S.R.O. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p.609-614, 2018.

ROHOUSOVA, I.; TALMI-FRANK, D.; KOSTALOVA, T.; POLANSKA, N.; LESTINOVA, T.; KASSAHUN, A.; LANDAU, D. Y.; MAIA, C.; KING, R.; VOTYPKA, J.; JAFFE, C. L.; WARBURG, A.; HAILU, A.; VOLF, P.; BANETH, G. Exposure to *Leishmania* spp. and sand flies in domestic animals in northwestern Ethiopia. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 360, 2015.

RUIZ, G.; LALOY, E.; BENCHEKROUN, G. Chronic gastritis and enterocolitis associated with *Leishmania* infection in an 18-month-old, intact female dog. **Veterinary Quarterly**, v. 35, n. 4, p. 236-239, 2015.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 61, 2014.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, v. 9, n. 7, p. 255-258, 1993.

SCHWANKE, K.; SILVA, A. M.; PACHECO, A.; BAHIA, M.; SILVEIRA, F. T.; SCOFIELD, A.; GÓES-CAVALCANTE, G. Molecular diagnosis and frequency of anti-*Leishmania infantum chagasi* antibodies in dogs in Belém/Pará, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 255-260, 2014.

SEGUIN, O.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. **Cell Immunol.**, v. 309, p. 1-6, 2016.

SEIXAS, M.M.; MAGALHÃES-JÚNIOR, J.T.; FRANKE, C.R.; BARROUIN-MELO, S.M. Positividade para leishmaniose visceral canina: existem fatores caninos que contribuem. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 36, n.2, p.358-367, 2012.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.

SILVA, D.A.; MADEIRA, M.F.; TEIXEIRA, A.C.; SOUZA, C.M.; FIGUEIREDO, F.B. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 257–261, 2011.

SILVA, F.L.; TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, M.R.; TAFURI, W.L. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, p.340-344, 2002.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.

SILVA, F. T. D. S.; SANTO, J. T. D.; MARTINS NETTO, E.; BAVIA, M. E.; NAKATANI, M.; SOUZA, F. D. P. D. LOBATO, L.; CARNEIRO, D. D. M. T. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina no distrito de Monte Gordo, Camaçari (BA). **Revista Baiana de Saúde Pública**, v.34, n.4, p.783-795, 2010.

SILVA, K.R.D.; MENDONÇA, V.R.R.D.; SILVA, K.M.; NASCIMENTO, L.F.M.D.; MENDES-SOUSA, A.F.; PINHO, F.A.D.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.M.P. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 1, p. 53-63, 2017.

SILVEIRA, F. T.; LIMA, L. V. D. R.; SANTOS, T. V. D.; RAMOS, P. K. S.; CAMPOS, M. B. Reviewing the trajectory of American visceral leishmaniasis in Brazilian Amazon:

from Evandro Chagas to the current days. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7 (ESP), p. 15-22, 2016.

SILVEIRA-NETO, L.; MARCONDES, M.; BILSLAND, E.; MATOS, L.V.S.D.; VIOL, M.A.; BRESCIANI, K.D.S. Clinical and epidemiological aspects of feline leishmaniasis in Brazil. **Semina-Ciencias Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 1467-1480, 2015.

SOCCOL, V. T.; PASQUALI, A. K. S.; POZZOLO, E. M.; LEANDRO, A. S.; CHIYO, L.; BAGGIO, R. A.; MICHALISZYN, M. S.; SILVA, C.; CUBAS, P. H.; PETERLLE, R.; PAZ, O. L. S.; BELMONTE, I. L. More than the eyes can see: The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, e. 0189182, 2017.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 65, n. 1-2, p. 1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; PETERSEN, C.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; MIRÓ, G.; FERRER, L.; BANETH, G. Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 706-717, 2017.

SOLCÀ, M. S.; BASTOS, L. A.; GUEDES, C. E. S.; BORDONI, M.; BORJA, L. S.; LARANGEIRA, D. F.; ESTRELA-TUY, P. G.S.; AMORIM, L. D. A. F.; NASCIMENTO, E. G.; OLIVEIRA, G. G. D. S.; DOS-SANTOS, W. L. C.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

SOUZA, V.M.M.D.; JULIÃO, F.D.S.; NEVES, R.C.S.; OLIVEIRA, L.D.C.; MAGALHÃES, P.B.; LEAL, D.C.; BISINOTTO, T.V.; ROSA, C.G.; LIMA, A.D.S.; MOREIRA JÚNIOR, E.D. Estudo epidemiológico de um surto de leishmaniose visceral numa área de manguezal. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 76, n. 1, p.14-24, 2006.

SOUSA-PAULA, L.C.; SILVA, L.G.; SILVA-SALES, K.G.; DANTAS-TORRES, F. Failure of the dog culling strategy in controlling human visceral leishmaniasis in Brazil: A screening coverage issue?. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 6, p.e0007553, 2019.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 951-8, 2002.

SUNDAR, S.; SINGH, O.P. Molecular diagnosis of visceral leishmaniasis. **Mol. Diag Ther.**, v. 22, n. 4, p. 443–457, 2018.

TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 203-212, 2001.

TEIXEIRA, A.I.P.; SILVA, D.M.; VITAL, T.; NITZ, N.; CARVALHO, B.C.; HECHT, M.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, E.; RABELLO, A.; ROMERO, G.A.S. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, e. 180452, 2019.

TRAVI, B.L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRO, G. Canine visceral leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2018.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M.R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000 Research**, v. 6, n. 750, 2017.

VERÇOSA, B.L.A.; MELO, M.N.; DEL-PUERTO, H.L.; MENDONÇA, I.L.; VASCONCELOS, A.C. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2-4, p.162-170, 2012.

WEATHERSPARK. **Condições meteorológicas médias de Muritiba-BA/Brasil**. 2020. Disponível em: <<https://pt.weatherspark.com/y/30995/Clima-caracter%C3%ADstico-em-Muritiba-Brasil-durante-o-ano>>. Acesso em: 07 fev. 2020.

WERNECK, G.L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Rev Saude Publica**, v. 48, p. 851-6, 2014.

WHO. **Leishmaniasis**: Epidemiological situation. 2019. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 31 jan 2019.

WILSON, T.M.; MAGALHÃES, L.F.; SOUZA, R.R.; MEDEIROS-RONCHI, A.A.; LIMONGI, J.E. Renal lesions in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 4, 2017.

WOYAMES-PINTO, A.J.; RIBEIRO, V.M.; TAFURI, W.L. The immunochromatography use in canine visceral leishmaniasis in Brazil: a “quick solution” of a complex diagnostic? Rapid test in dogs with leishmaniasis. **Ann. Clin. Cytol. Pathol.**, v. 2, 2016.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Tutor

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
HOSPITAL-ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O presente termo tem o objetivo de informar ao (a) guardião (ã) do animal quanto aos principais aspectos relacionados ao atendimento clínico no projeto “Inquérito epidemiológico de leishmaniose canina na região do Recôncavo Baiano do Estado da Bahia”, sob cujas regras o cão será avaliado e tratado, complementando as informações prestadas pelo (a) seu (sua) médico (a) veterinário (a) e pela equipe de pesquisadores e médicos veterinários pertencentes ao projeto, no Hospital-Escola de Medicina Veterinária da UFBA (Ambulatório de leishmanioses zoonóticas do HOSPMEV-UFBA).

Eu, \_\_\_\_\_, nascido em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_, portador do RG/CPF \_\_\_\_\_, declaro que fui devidamente informado (a) sobre o protocolo aplicado pela Equipe Atendimento LVC – HOSPMEV - UFBA, sendo o meu cão de nome \_\_\_\_\_, sexo \_\_\_\_\_, raça \_\_\_\_\_, idade \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, submetido a triagem a partir da avaliação por meio de coleta de amostras de sangue, urina, aspirado esplênico, medula óssea e linfonodos pertencente ao projeto intitulado “Inquérito epidemiológico de leishmaniose canina na região do Recôncavo Baiano do Estado da Bahia”. Parte das coletas dessas amostras serão mediante sedação, com o objetivo de tranquilizar o animal para a execução dos procedimentos.

Declaro estar ciente de que tanto os procedimentos de colheita de amostras quanto os medicamentos podem implicar riscos à saúde do meu animal, sob a forma de reações adversas ou reações idiossincrásicas (reações adversas ainda não descritas no cão) aos fármacos utilizados em qualquer etapa do diagnóstico ou tratamento, ou ainda de possibilidades de acidentes devido ao uso de instrumentos perfurantes, associados ou não ao próprio estado de saúde do cão portador de infecção por *Leishmania*. Estou ciente de que embora todos os riscos sejam possíveis, os métodos previstos no protocolo são de extrema importância para o tratamento adequado do animal e para impedir a transmissão da infecção. Todos os procedimentos serão realizados por médicos veterinários treinados, o que minimiza a possibilidade de ocorrências adversas.

Para participação deste cão no estudo, estou ciente de que é necessário seguir todas as prescrições realizadas pelos médicos veterinários e comunicar qualquer alteração manifestada pelo animal durante todo o período de tratamento. Caso na triagem seja confirmada a positividade de leishmaniose, o primeiro retorno será marcado em um período de 7 a 30 dias, no qual será iniciada a terapêutica anti-*Leishmania*.

Confirmo que recebi explicações, li, compreendo e concordo com tudo que me foi esclarecido e que me foi concedida a oportunidade de anular, questionar, alterar qualquer espaço, parágrafo ou palavras com as quais não concordasse. Tive a oportunidade de fazer perguntas que me foram respondidas satisfatoriamente. Assim, tendo conhecimento, autorizo a realização do procedimento proposto em meu animal.

Muritiba-BA, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura guardião (a) do cão

\_\_\_\_\_  
Bruno Milen Varjão  
Médico Veterinário  
CRMV-BA 5214

Responsável da Equipe Atendimento LVC – RECÔNCAVO BAIANO – UFBA

**APÊNDICE B – Questionário Observacional do Ambiente das Colheitas**

<b>Questionário de Observação dos locais de colheita</b>					
<b>Município: Muritiba</b>	1 - Zona Urbana	2 - Zona Rural			
<b>Animal / Local de Colheita</b>					
<b>RG(s)</b>					
<b>GPS</b>					
<b>Característica da rua</b>	1 - Asfaltada	2 - Barro	3 - Paralelepípedo		
<b>Fonte de água</b>	1 - Rio	2 - Córrego	3 - Lago	4 - Água exposta	
<b>Container de lixo / lixeiras de rua</b>	1 - Sim	2 - Não			
<b>Vegetação nas proximidades</b>	1 - 50m	2 - 100m	3 - Não existe	4 - Agricultura	5 - Matas / Florestas / etc
<b>Condições sociais da casa ou bairro</b>	1 - Baixa	2 - Média	3 - Alta		
<b>Animais de rua (cães e gatos)</b>	1 - Sim	2 - Não			
<b>Animais silvestres e sinantrópicos</b>	1 - Sim	2 - Não			
<b>Residência</b>	1 - Casa	2 - Apartamento	3 - Fazenda / Sítio	4 - Outros?	
<b>Grau de relacionamento (Tutor/guardião-animal)</b>	1 - Canil	2 - Acorrentado	3 - Dentro do domicílio	4 - Quintal	
<b>Saneamento básico</b>	1 - Esgoto a céu aberto	2 - Esgoto fechado	3 - Fossa		
<b>Abrigo de animais nas proximidades</b>	1 - 50m	2 - 100m			
<b>Pontos de referência nas proximidades</b>	1 - Escola	2 - Posto de Saúde	3 - Hospital	4 - CRAS / CAPES	5 - Delegacia / Prisão
<b>Coleta de lixo</b>	1 - Sim, diariamente	2 - Sim, de vez em quando	3 - Não existe		
<b>Água encanada</b>	1 - Sim	2 - Não			
<b>Presença de vulneráveis</b>	1 - Crianças	2 - Idosos	3 - Outros?		

## ANEXO A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



**Universidade Federal da Bahia**  
**Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**

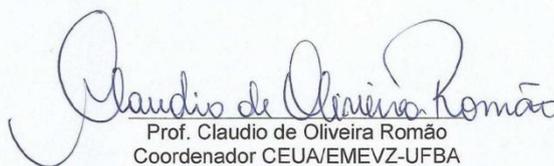
Av. Ademar de Barros, 500 – Ondina-40170-110 Salvador-BA  
 Fone: (071) 3283-6701/6702/6718  
 E-mail: [escmev@ufba.br](mailto:escmev@ufba.br)

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Metabolismo, Diagnóstico e intervenção terapêutica na Leishmaniose zoonótica naturalmente adquirida: Estudos clínicos, parasitológicos, imunológicos, de estresse oxidativo, farmacocinéticos e farmacodinâmicos de drogas anti-Leishmania e utilizadas em doenças concomitantes**”, registrada com o nº **13/2017**, sob a responsabilidade da **Prof. Drª Stella Maria Barrouin Melo**, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, **em reunião de 22.05.2017.**

Finalidade	( ) Ensino/Treinamento ( X ) Pesquisa científica
Vigência da autorização	23/05/2017 à 13/05/2027
Espécie/linhagem/raça	<i>Canis familiaris</i> (Cão), <i>Feli catus</i> (gato)
Nº de animais	>6/grupo
Peso/Idade	Cães >10 Kg / Não informada Gatos >2 Kg / Não informada
Sexo	Ambos
Origem	Animais de companhia e domiciliados com seus responsáveis, em área endêmica para LV.

Salvador, 22/05/2017.

  
 Prof. Claudio de Oliveira Romão  
 Coordenador CEUA/EMEVZ-UFBA

## ANEXO B – Ficha de Campo de Exame Clínico de Leishmaniose Canina do Ambulatório de Leishmanioses Zoonóticas do HOSPMEV-UFBA

AMBULATÓRIO DE LEISHMANIOSES ZONÓTICAS (HOSPMEV - UFBA)		Ficha para Exame Clínico - Leishmanioses Zoonóticas				
						
Guardião:	EXAMES					
GPS / Localização:	DPP:					
Endereço:	ELISA:					
Tel / Cel:	PARASITOLÓGICO:					
Email:	PCR:					
Animal:	RG:	Idade:	Peso:	Data do atendimento: ____ / ____ / ____		
Sexo: ( ) Macho ( ) Fêmea	Cor:	Espécie/Raça:				
Procedência:	( ) Domiciado	( ) Semi-dom.	( ) De rua	Cidade:		
Amostras coletadas:	( ) Baço	( ) Medula Óssea	( ) Sangue	( ) Linfonodo	( ) Urina	
Anamnese					Vacinas	Último Ano
Temperamento	( ) Alerta / Sério	( ) Ativo / Brincalhão	( ) Calmo	( ) Agressivo	( ) Antirrábica	
Apetite	( ) Hiperezia	( ) Nomorexia	( ) Hiporexia	( ) Anorexia	( ) Múltipla	
Peso	( ) Perdeu peso	( ) Ganhou peso	( ) Manteve	( ) Não sabe	( ) Giárdia	
Doença nos últimos 6 meses	( ) Sim	( ) Não	( ) Tratou	( ) Não Tratou	( ) Gripe	
<i>Ehrlichia / Babesia / Hemoparasita</i>	( ) Sim	( ) Não	( ) Tratou	( ) Não Tratou	( ) Leptospirose	
Dermatite	( ) Sim	( ) Não	( ) Tratou	( ) Não Tratou	( ) Leishtec	
Gastroenterite	( ) Sim	( ) Não	( ) Tratou	( ) Não Tratou	( ) Leishimune	
Neuropatia	( ) Sim	( ) Não	( ) Tratou	( ) Não Tratou		
-> Qual:	( ) Convulsões	( ) Desmaios	( ) Mov. Repetido	( ) Cambaleante	Parasiticidas	Mês/Ano
Envenenamento	( ) Sim	( ) Não	( ) Tratou	( ) Não Tratou	( ) Vermífugo	
Urina	( ) Normal	( ) Amarelo intenso	( ) Vermelho	( ) Não sabe	( ) Ectoparasiticida	
Fezes	( ) Normal	( ) Não sabe	( ) Alterada		( ) Coleira	
-> Alterada:	( ) Dura/ressecada	( ) Diarreia	( ) Verme	( ) Sangue		
Vômitos	( ) Sim	( ) Não	Última vez?			
Medicação em uso:						
Exame Físico Geral						
Consciência:	( ) Apático	( ) Ativo	( ) Alerta	( ) Prostrado	( ) Comatoso	
Escore corporal:	( ) Caquético	( ) Magro	( ) Normal	( ) Sobrepeso	( ) Obeso	
Mucosas:	( ) Hipo	( ) Normo	( ) Hiperêmica	( ) Ictérica	( ) Cianótica	
Hidratação:	( ) Normohidratado	( ) Desidratado	TPC	( ) < 2s	( ) > 2s	
Oftalmopatia:	( ) Sim	( ) Não	Quais?			
Linfonodos superficiais aumentados:	( ) Sim	( ) Não	Quais?			
Baço palpável:	( ) Sim	( ) Não				
Edema em membros	( ) Sim	( ) Não				
Ascite (edema abdominal)	( ) Sim	( ) Não				
Freq. Cardíaca =	( ) Bradicardia	( ) Normocardia	( ) Taquicardia	( ) Arritmia	( ) Sopro	
Freq. Respiratória =	( ) Bradipneia	( ) Normopneia	( ) Taquipneia	( ) Ruído patológico		
Temperatura =	( ) Hipotermia	( ) Normotermia	( ) Hipertermia			
Hemorragia	( ) Epistaxe	( ) Hematoquezia/Melena	( ) Petéquias	( ) Não		
Neuropatia:	( ) Sim	( ) Não	Qual? ( ) Convulsão ( ) Falta propriocepção ( ) Desmaio ( ) Mov. Repet.			
Exame Físico da Pele						
Alterações de Pele	( ) Sim	( ) Não				
Alopecia:	( ) Focal	( ) Generalizada	( ) Não			
Alopecia periocular:	( ) Sim	( ) Não				
Descamação furfurácea:	( ) Focal	( ) Generalizada	( ) Não			
Úlceras na pele:	( ) Focal	( ) Generalizada	( ) Não			
-> Localização:	( ) Focinho	( ) Orelha	( ) Rabo	( ) Pênis	Outros?	
Crostas:	( ) Focal	( ) Generalizada	( ) Não	Onde?		
Hiperqueratose:	( ) Focal	( ) Generalizada	( ) Não	Onde?		
Vasculite:	( ) Sim	( ) Não				
Onicogribose:	( ) Sim	( ) Não				
Depigmentação no focinho:	( ) Sim	( ) Não				
Nódulos/Massa Subcutâneos:	( ) Sim	( ) Não	Onde?			

## ANEXO C – Email de submissão do artigo a Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

10/03/2021

Gmail - Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária - Manuscript ID RBPV-2020-0226



Bruno Varjão &lt;bmvarjao@gmail.com&gt;

---

### Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária | - Manuscript ID RBPV-2020-0226

---

Rosângela Machado &lt;onbehalf@manuscriptcentral.com&gt;

7 de outubro de 2020 15:50

Responder a: cbpv\_rbpv.fcav@unesp.br

Para: barrouin@ufba.br

Cc: bmvarjao@gmail.com, flaviane.alves@ufba.br, manuela.solca@ufba.br, ricardosilvestre@med.uminho.pt, mahyumifujimori@yahoo.com.br, hgoto@usp.br, natashavarjao@yahoo.com.br, roberta.dias@ufba.br, barrouin@ufba.br

07-Oct-2020

Dear Dr. Barrouin-Melo:

Your manuscript entitled "Spatial distribution of canine leishmaniasis by *Leishmania infantum* in a municipality with endemic human leishmaniasis in Eastern Bahia, Brazil" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

Your manuscript ID is RBPV-2020-0226.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

Sincerely,  
Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária Editorial Office