

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - UFES
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS - CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

WANDERSON LOPES ANDRADE

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* spp. PELA TÉCNICA DE
ELISA INDIRETA EM POPULAÇÃO CANINA DO MUNICÍPIO DE JOÃO NEIVA –
ES**

ALEGRE - ES

2022

WANDERSON LOPES ANDRADE

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* spp. PELA TÉCNICA DE
ELISA INDIRETA EM POPULAÇÃO CANINA DO MUNICÍPIO DE JOÃO NEIVA –
ES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em diagnóstico, controle e terapêutica das enfermidades em animais.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Santos Zanini

ALEGRE - ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

A553d Andrade, Wanderson Lopes, 1993-
Detecção de anticorpos contra *Leishmania* spp. pela técnica de ELISA indireta em população canina do município de João Neiva - ES / Wanderson Lopes Andrade. - 2022.
67 f. : il.

Orientador: Marcos Santos Zanini.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Leishmaniose. 2. Teste imunoenzimático. 3. Reações antígeno-anticorpo. 4. Sorologia veterinária. I. Zanini, Marcos Santos. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. III. Título.

CDU: 619

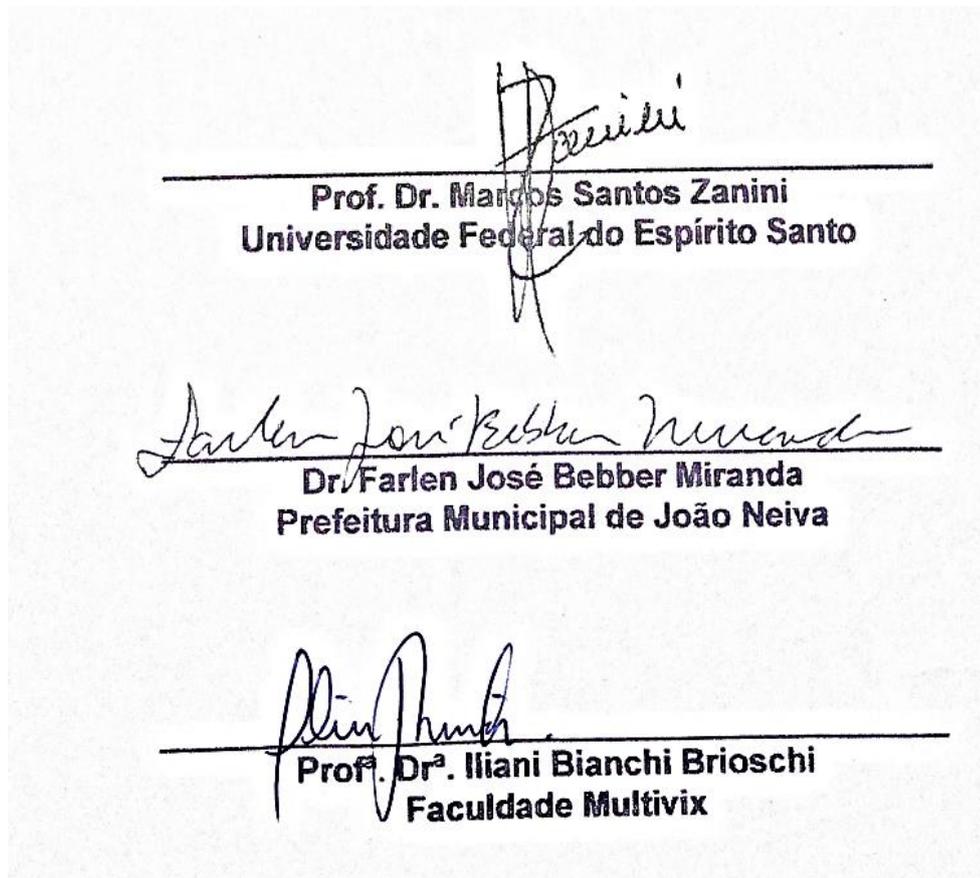
WANDERSON LOPES ANDRADE

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania* spp. PELA TÉCNICA DE
ELISA INDIRETA EM POPULAÇÃO CANINA DO MUNICÍPIO DE JOÃO NEIVA –
ES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em diagnóstico, controle e terapêutica das enfermidades em animais.

Aprovado em: 10 de agosto de 2022

COMISSÃO EXAMINADORA



**Prof. Dr. Marcos Santos Zanini
Universidade Federal do Espírito Santo**

**Dr. Farlen José Bebber Miranda
Prefeitura Municipal de João Neiva**

**Prof. Dr.ª Iliani Bianchi Brioschi
Faculdade Multivix**

A família

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares e namorado, por todo amor, suporte e paciência.

Aos amigos, pelo apoio, comprometimento, amizade, compartilhamentos de experiências e sabedoria.

Aos funcionários da Prefeitura Municipal de João Neiva, pelo auxílio nas coletas, conversas e troca de experiências.

Ao meu orientador, pelo apoio, ensinamentos oferecidos e paciência.

A Universidade Federal do Espírito Santo, pelo oferecimento do curso de mestrado.

Por fim, a todos que me ajudaram de maneira direta ou indireta nessa jornada.

“Você não pode mudar o vento, mas
pode ajustar as velas do barco para
chegar onde quer.”

Cora L. V. Hatch, 1859.

RESUMO

ANDRADE, W. A. **Detecção de anticorpos contra *Leishmania* spp. pela técnica de ELISA indireta em população canina do município de João Neiva - ES.** 2022. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2022.

A leishmaniose é causada por protozoários intracelulares obrigatórios, necessitando de vetores para completar seu ciclo biológico e é dividido em duas formas clínicas, leishmaniose visceral e tegumentar. As leishmanioses são problemas de saúde pública, zoonose e com complexidade clínica, biológica e epidemiológica. A interação entre os hospedeiros, protozoário e vetor é complexa, multifatorial e dinâmica, podendo sofrer constantes alterações. Sua prevalência varia dependendo de fatores geoclimáticos locais e método diagnóstico empregado. Os cães são amplamente infectados e descritos em vários casos em municípios do Brasil e Espírito Santo. Os cães são reservatórios da doença para os humanos no caso de leishmaniose visceral e para leishmaniose tegumentar ainda há divergência entre autores. Para diagnóstico, o Ministério da Saúde, recomenda a realização de testes sorológicos. Diante o exposto, o trabalho teve o objetivo de realizar levantamento sorológico canino no município de João Neiva, Estado do Espírito Santo, no sudeste do Brasil. Para isso, foi realizada coleta sanguínea de 344 cães de zona rural, distritos e zona urbana do referido município com levantamento de variáveis como: sexo, idade, contactantes, localidade de origem e sintomatologia. Após coleta, as amostras foram dessoradas e os soros analisados pela técnica imunoenzimática indireta. Os soros foram aplicados em placa contendo antígeno de *Leishmania* spp.. No teste, 67 caninos (19,76%) foram sororreagentes. As características deste grupo positivo foram compostas por 55,22% fêmeas e 44,77% machos, caninos predominantemente com idade entre 1 a 4 anos, assintomáticos e residentes no meio rural do município. Os resultados indicam que há circulação de *Leishmania* spp. no município estudado.

Palavras chave: leishmaniose. prevalência. sorologia

ABSTRACT

ANDRADE, W. A. **Antibody detection against *Leishmania* spp. by indirect ELISA technique in canine population in João Neiva - ES.** 2022. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2022.

Leishmaniasis is caused by obligate intracellular protozoa, requiring vectors to complete its biological cycle and is divided into two clinical forms, visceral and cutaneous leishmaniasis. Leishmaniasis are public health problems, zoonosis and with clinical, biological and epidemiological complexity. The interaction between hosts, protozoa and vector is complex, multifactorial and dynamic, and may undergo constant changes. Its prevalence varies depending on local geoclimatic factors and the diagnostic method used. Dogs are widely infected and described in several cases in municipalities in Brazil and Espírito Santo. Dogs are reservoirs of the disease for humans in the case of visceral leishmaniasis and for cutaneous leishmaniasis there is still disagreement between authors. For diagnosis, the Ministry of Health recommends performing serological tests. In view of the above, the objective of this study was to carry out a canine serological survey in the municipality of João Neiva, State of Espírito Santo, in southeastern Brazil. For this, blood collection was carried out from 344 dogs from rural areas, districts and urban areas of the aforementioned municipality with a survey of variables such as: sex, age, contacts, place of origin and symptoms. After collection, the samples were drained and the serum analyzed by the indirect enzyme immunological technique. The serum were applied to a plate containing *Leishmania* spp. antigen. In the test, 67 canines (19.76%) were seroreactive. The characteristics of this positive group were composed of 55.22% females and 44.77% males, predominantly canines aged between 1 and 4 years, asymptomatic and living in the rural area of the municipality. The results indicate that there is circulation of *Leishmania* spp. in the studied municipality.

Keywords: leishmaniasis. prevalence. serology

LISTA DE FIGURAS

| FIGURA | | Página |
|---------------|---|---------------|
| Figura 1 - | Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i> em circulação nas Américas | 14 |
| Figura 2 - | Demonstração das formas do protozoário | 15 |
| Figura 3 - | Exemplar de flebotomíneo fêmea realizando pouso | 16 |
| Figura 4 - | Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp. | 19 |
| Figura 5 - | Casos de leishmaniose visceral nos países com maior número de casos. Apanhado dos anos de 2001 a 2018 | 21 |
| Figura 6 - | Apresentação da sintomatologia do cão cursando com LV | 25 |
| Figura 7 - | Número de casos de leishmaniose tegumentar, segundo a estratificação de risco | 28 |
| Figura 8 - | Demonstração de sintomatologia de cão com LT | 31 |
| Figura 9 - | Mapa demonstrando a localização do município de João Neiva – ES | 52 |

LISTA DE TABELAS

| FIGURA | | Página |
|---------------|--|---------------|
| Tabela 1 - | Casos confirmados de leishmaniose visceral por ano de notificação segundo Regional de Saúde por município de notificação nos anos de 2014 a 2020 | 22 |
| Tabela 2 - | Casos confirmados de leishmaniose tegumentar por ano de notificação segundo Regional de Saúde por município de notificação nos anos de 2014 a 2020 | 29 |
| Tabela 3 - | Análise descritiva das variáveis analisadas dos cães no momento da coleta sanguínea do município de João Neiva ... | 55 |
| Tabela 4 - | Análise dos cães sororreagentes ao teste de ELISA indireto divididos por localidade | 56 |
| Tabela 5 - | Análise de associação descritiva dos cães avaliados do município de João Neiva | 59 |

SUMÁRIO

| | Página |
|---|---------------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 14 |
| 2.1 Agente etiológico | 14 |
| 2.2 Hospedeiro invertebrado (vetor) | 16 |
| 2.3 Hospedeiros vertebrados | 18 |
| 2.4 Ciclo biológico da leishmaniose | 18 |
| 2.5 Leishmaniose Visceral (LV) | 19 |
| 2.5.1 Epidemiologia da LV no homem | 20 |
| 2.5.2 Epidemiologia da LV nos canídeos | 24 |
| 2.5.3 Sinais clínicos e patogenia canina | 24 |
| 2.6 Leishmaniose Tegumentar (LT) | 27 |
| 2.6.1 Epidemiologia da LT no homem | 27 |
| 2.6.2 Epidemiologia da LT nos canídeos | 29 |
| 2.6.3 Sinais clínicos nos cães | 30 |
| 2.7 Diagnóstico | 31 |
| 2.7.1 Testes sorológicos | 32 |
| 2.7.2 Diagnóstico parasitológico direto | 35 |
| 2.7.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) | 36 |
| 2.8 Prevenção e Controle | 37 |
| 2.8.1 Medidas para o hospedeiro | 37 |
| 2.8.2 Medidas para o vetor | 38 |
| 2.9 Tratamento Canino | 39 |
| 3. Objetivo | 40 |
| 3.1 Objetivo geral | 40 |
| 3.2 Objetivos específicos | 40 |
| 4. REFERÊNCIAS | 41 |
| CAPÍTULO 1 Detecção de anticorpos para <i>Leishmania</i> spp. pela técnica de ELISA indireta em população canina do município de João Neiva – ES | 48 |
| RESUMO | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 5. INTRODUÇÃO | 49 |
| 6. MATERIAL E MÉTODOS | 51 |
| 6.1 Área de estudo | 51 |
| 6.2 População de estudo | 52 |
| 6.3 Antígenos para a realização dos testes sorológicos | 53 |
| 6.4 Técnica de ELISA indireta | 53 |
| 6.5 Análise estatística | 54 |
| 7. RESULTADOS | 55 |
| 8. DISCUSSÃO | 59 |
| 9. REFERÊNCIAS | 63 |

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas com transmissão vetorial de caráter zoonótico causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania sp.* pertencente à família *Trypanosomatidae* (AGUIAR; MEDEIROS, 2003). As manifestações da enfermidade variam em função de sua forma clínica com apresentação tegumentar e visceral, desde lesões auto resolutivas até lesões ulcerativas desfigurantes e comprometimento sistêmico de órgãos como fígado e baço, podendo ocasionalmente levar ao óbito (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 2019c; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Sua distribuição é global, sendo o maior número de casos reportados nos continentes Africano, Asiático e Americano. Nas Américas, 18 países relatam casos das leishmanioses, sendo o Brasil, um deles. (OPAS, 2019c; WHO, 2010).

No continente americano, as leishmanioses continuam como um problema de saúde pública por se tratar de uma zoonose com grandeza e complexidade clínica, biológica e epidemiológica. Afeta, em sua maioria, a parcela mais pobre da população, sobretudo países em desenvolvimento (OPAS, 2017). Em último manual elaborado pelo Ministério da Saúde do Brasil, encontrava-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (BRASIL, 2014).

Para perpetuar seu ciclo biológico, tradicionalmente necessitam da picada do vetor da família *Psychodidae* em hospedeiro suscetível. (AGUIAR; MEDEIROS, 2003). A sobrevivência do protozoário está estritamente ligada à distribuição de seu vetor que, por sua vez, sofre influência de fatores geográficos e climáticos. (BRASIL, 2019; OPAS, 2019a; OPAS, 2019b).

A enfermidade já foi descrita em diversos animais domésticos e silvestres. Entre os animais domésticos possíveis de serem infectados pelo protozoário, estão os cães sendo os mais afetados. Para a leishmaniose visceral o cão apresenta formas clínicas sistêmicas e comporta-se como reservatório do parasito para infecção de vetores e posterior transmissão ao homem. Em contrapartida, para a leishmaniose tegumentar não é sabido o real papel do cão em seu ciclo de transmissão. O diagnóstico tradicionalmente é laboratorial, podendo ser realizado exames parasitológico, sorológico e molecular (BARROSO-FREITAS et al., 2009; BRASIL, 2019).

Os cães são os animais domésticos mais infectados pela leishmaniose visceral e o ciclo de transmissão sofre variações de acordo com condições geográficas locais, não sendo possível extrapolação de resultados para todas as localidades. No município de João Neiva - ES, temos uma população canina estimada em 2550 animais a partir de dados obtidos da campanha de vacinação antirrábica, entretanto não há registro da enfermidade em cães mesmo a leishmaniose (visceral e tegumentar) estando presente rotineiramente nos municípios limítrofes (Colatina, Linhares, Santa Teresa, Aracruz, São Roque de Canaã) ocasionando casos de leishmaniose em humanos, conforme dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS, 2022).

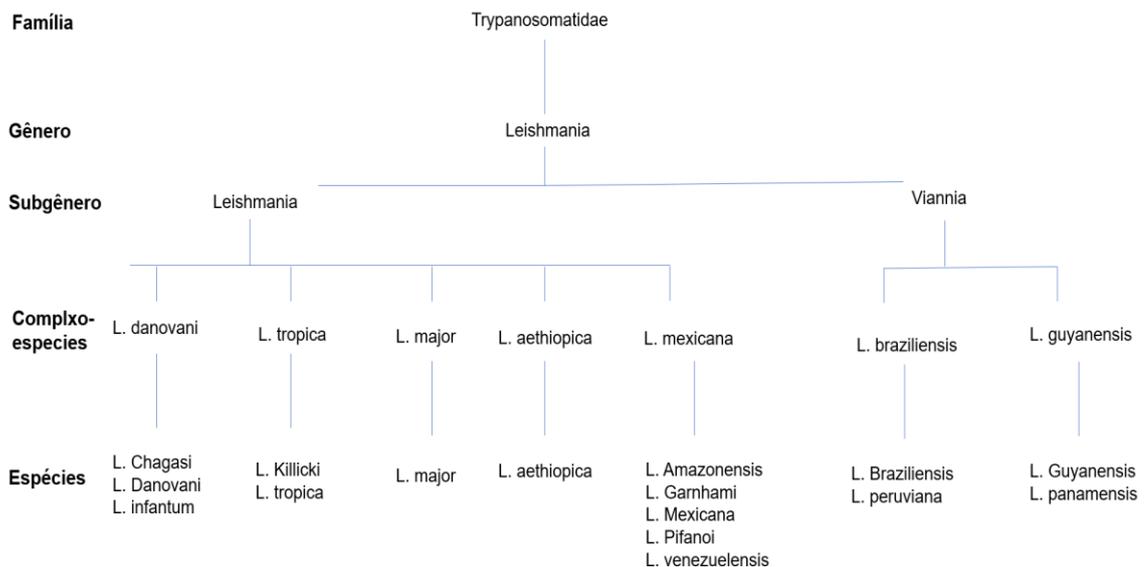
Considerando assim a relevância da doença, sua distribuição e falta de dados epidemiológicos no município de João Neiva, o presente estudo tem por objetivo fazer prospecção da leishmaniose nos cães em zonas rurais, distritos e zonas urbanas do município de João Neiva, Espírito Santo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente etiológico

O agente causador da leishmaniose é um protozoário da família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania* sp., no qual compreendem 22 espécies patogênicas ao homem e são agrupadas em subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Figura 1). Trata-se de enfermidade infecciosa, não contagiosa de caráter zoonótico. Esses protozoários são intracelulares obrigatórios de células do sistema mononuclear fagocitário, necessitando de vetores para completar seu ciclo biológico (OPAS, 2019a; OPAS, 2019b). As diferentes espécies de *Leishmania* spp. não podem ser diferenciadas através de observação em microscópios, necessitando lançar mão de técnicas laboratoriais específicas para sua identificação (BRASIL, 2014; OPAS, 2019a).

Figura 1 – Taxonomia do gênero *Leishmania* em circulação nas Américas.

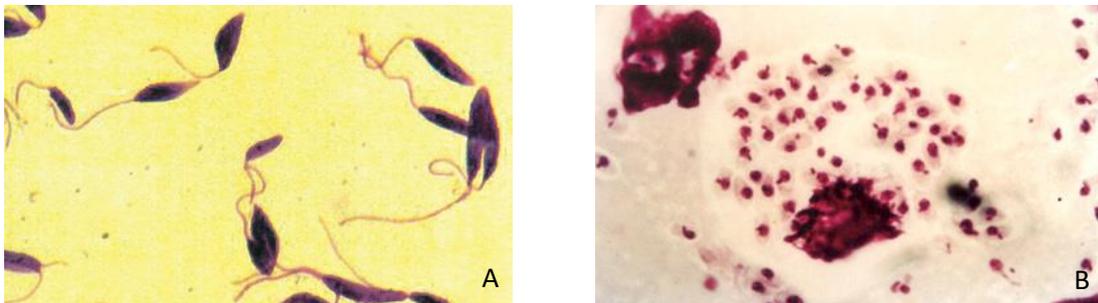


Fonte: OPAS, 2019b. Adaptado.

Os protozoários do gênero *Leishmania* sp. apresentam duas formas distintas. No inseto vetor encontra-se a forma promastigota (Figura 2). Esta forma mede entre 20 a 30 μm , é extracelular, fusiforme e possui, na sua região anterior, flagelo que

permite sua locomoção. Nas células do sistema retículo-endotelial, como medula óssea, células do baço, fígado e, especialmente, macrófagos, encontra-se a forma amastigota (Figura 2). Esta forma mede de 2 a 5 μm , é intracelular, ovoide e o flagelo é rudimentar. Acredita-se que o tropismo aos órgãos se deva a temperatura, onde os protozoários com preferências por temperatura de 35° C, causam manifestações tegumentar, enquanto os com preferências por 37° C, cursam com sinais viscerais (OPAS, 2019a; OPAS, 2019b).

Figura 2: Formas do protozoário observadas em lâmina. A: promastigota de *Leishmania* sp.. B: amastigota de *Leishmania* sp..



Fonte: BRASIL, 2014.

Apresentam duas formas clínicas distintas, a leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar. O agente causador da leishmaniose visceral nas Américas é *Leishmania infantum*, sendo o cão o principal hospedeiro urbano e quando infectados, são altamente infecciosos para os flebotomíneos (BARROSO-FREITAS et al., 2009; OPAS, 2019b). Já a leishmaniose tegumentar é encontrada nas Américas um total de 12 espécies causadoras da doença no homem e 8 descritas apenas em animais (BRASIL, 2017; OPAS, 2019b). No Brasil, já foram relatados casos de leishmaniose tegumentar causadas por sete espécies, sendo 6 do subgênero *Viannia* e 1 *Leishmania*. As principais espécies causadoras no Brasil são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; *Leishmania (Viannia) guyanensis*; *Leishmania (Viannia) braziliensis* (BRASIL, 2017). O agente etiológico mais associado com infecções de leishmaniose tegumentar em cães é *L. braziliensis* (SERRA et al., 2003).

2.2 Hospedeiro invertebrado (Vetor)

Os flebotomíneos são insetos que pertencem à ordem *Diptera*, família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros. Dois gêneros apresentam importância: o gênero *Phlebotomus*, no velho mundo, e o gênero *Lutzomyia*, no novo mundo. Das 700 espécies conhecidas de flebotomíneos, 50 são espécies vetores de *Leishmania spp.* no novo mundo. (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; OPAS, 2019b).

A distribuição desses insetos em todo globo ocorre de maneira ampla, embora apresentem limitações de acordo com condições geoclimáticas locais. Em países tropicais, seu ciclo reprodutivo ocorre em todo o ano, já em países subtropicais, o ciclo acontece nas estações mais quentes. Seu habitat é variado, podendo residir em selvas mais úmidas até regiões mais secas e áridas (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; OPAS, 2019b; RANGEL; LAISON, 2003).

Seu ciclo biológico ocorre no ambiente terrestre e corresponde a quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. As fêmeas depositam os ovos em material úmido e com alta quantidade de matéria orgânica. O desenvolvimento do ovo até inseto adulto ocorre entre 30 a 40 dias, dependendo de condições ambientais, como temperatura. A fêmea adulta apresenta uma estimativa de vida de 20 dias (BRASIL, 2014).

Em fase larval, esses insetos são dependentes de ambientes com baixa luminosidade, terreno úmido e com matéria orgânica em abundância para seu desenvolvimento (BRASIL, 2014). Quando adultos, os flebotomíneos apresentam as seguintes características: são pequenos, atingindo menos de 5 milímetros de comprimento, asas e tórax recobertos por pelos finos de coloração clara e, quando pousam, as asas apresentam-se eretas (Figura 3), voam pequenas distâncias em pequenos saltos; voos são silenciosos (MARCONDES, 2016).

Figura 3 – Exemplar de flebotomíneo fêmea realizando repasto sanguíneo.



Fonte: BRASIL, 2006.

As principais espécies de flebotomíneos apresentam atividade crepuscular e noturna, embora possam ser ativos também durante o dia. Além do aspecto de alimentação, outras características mudam de acordo com a espécie de flebotomíneo, como a reprodução, comportamento e dispersão (OPAS, 2019b). Apenas a fêmea apresenta hábito hematófago e é responsável pela transmissão de parasitos. Os flebotomíneos são encontrados em região peridomiciliar, domiciliar e em diversas temperaturas, possuindo atividade crepuscular noturna e uma facilidade de adaptação aos diversos ambientes (BRASIL, 2014).

Os agentes envolvidos na transmissão da Leishmaniose visceral são flebotomíneos, onde no Brasil são duas as principais espécies: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. Ainda foi descrita a transmissão por uma terceira espécie, a *Lutzomyia migonei* (BRASIL, 2014).

A *L. longipalpis* pode ser encontrada em quase todo o território brasileiro, com exceção da região Sul do país, embora sua distribuição encontra-se em expansão. A partir da década de 80, foi possível encontrar o flebótomo adaptado para ambientes urbanos, principalmente na região Sudeste (BRASIL, 2014).

A transmissão da leishmaniose tegumentar, no Brasil, ocorre principalmente pelos vetores das espécies: *Lu. intermedia*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. Wellcomei*, *Lu. flaviscutellata* e *Lu. migonei* (BRASIL, 2017).

2.3 Hospedeiros vertebrados

Os parasitas do gênero *Leishmania* sp. já foram descritos em vários mamíferos silvestres e domésticos, em diversas ordens, como: *Rodentia*, *Carnivora* (canídeos, felídeos, mustelídeos), *Xenarthra* (preguiças), *Didelphimorphia* (gambás), *Perissodactyla* (equídeos) e *Primates* (homem) (GONTIJO, B; CARVALHO, M. L. R. de, 2003; GONTIJO, C. M.; MELO, M. N, 2004).

Todos os animais infectados podem cursar com sinais clínicos da doença, dependendo da resposta imunológica do indivíduo para demonstrá-los (OPAS, 2019b). Hospedeiros que apresentem resposta celular efetiva, há baixa multiplicação dos protozoários. Caso não desenvolva esse tipo de resposta, ocorre a disseminação para pele e/ou órgãos (GONTIJO, C. M.; MELO, M. N, 2004).

A interação presente entre os hospedeiros e o protozoário é complexa, multifatorial e dinâmica, podendo sofrer constantes alterações e decorrer de intercorrências do meio ambiente (BRASIL, 2017; OPAS, 2019b).

A Leishmaniose visceral apresenta como hospedeiros animais de região urbana e silvestre. Em zona urbana a manutenção de LV ocorre, principalmente pelos canídeos. Outros animais como, roedores, felídeos e equídeos podem fazer parte do ciclo urbano da doença. Já em área silvestre, ocorre em raposas e marsupiais (BRASIL, 2014; GONTIJO, C. M.; MELO, M. N., 2004; OPAS, 2019a; OPAS, 2019b).

A leishmaniose tegumentar dentre os hospedeiros silvestres, é possível que parasite roedores, marsupiais, edentados, quirópteros e canídeos selvagens. Já os domésticos são os canídeos, felídeos e equídeos. Embora encontrado relatos nesses animais, não se conhece seu real papel no ciclo da doença (BRASIL, 2017), mas alguns trabalhos evidenciam associação entre cães infectados ao surgimento de novos casos em humanos (COUTINHO et al., 1985; DIAS, M. et al., 1997; FALQUETO, A. et al., 1986).

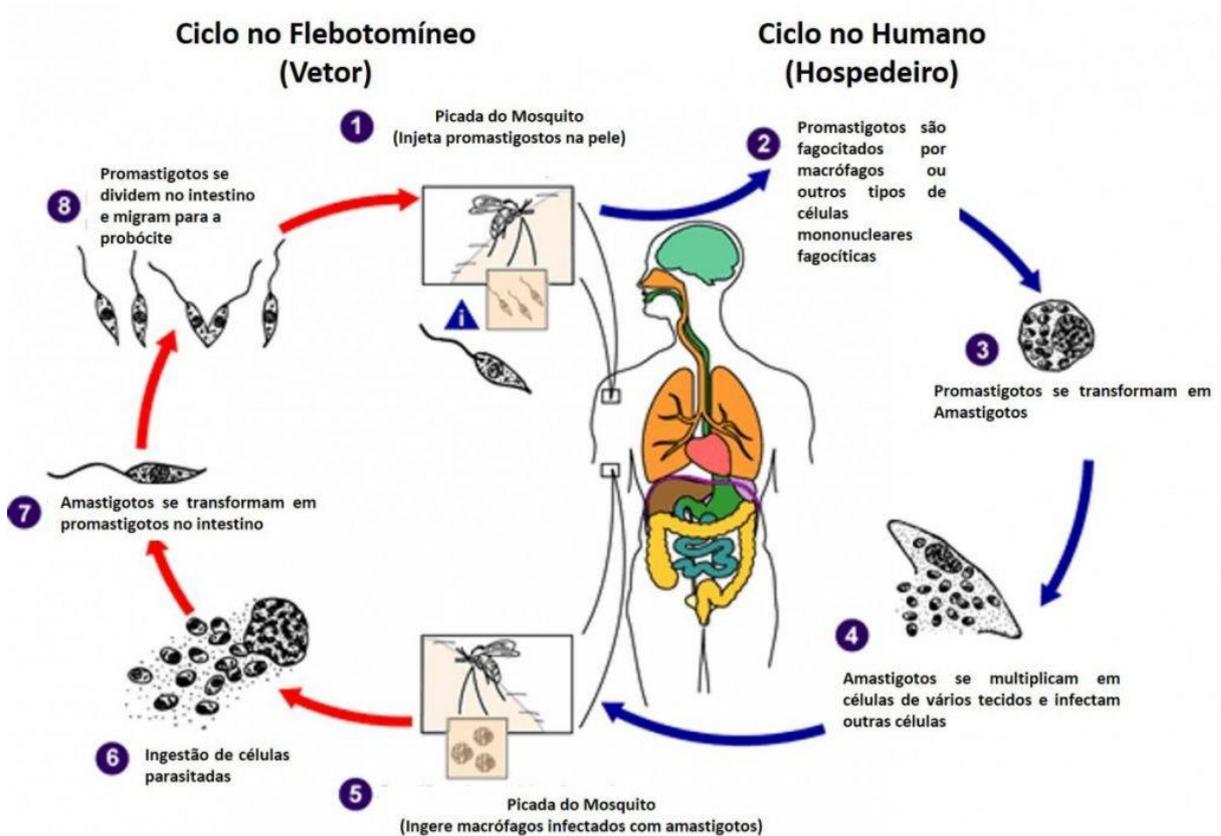
2.4 Ciclo biológico da leishmaniose

Ao realizar o repasto sanguíneo, o vetor infectado irá inocular através de sua saliva a forma promastigota metacíclica do parasito (Figura 4). Na epiderme e corrente sanguínea do hospedeiro, são fagocitados por macrófagos e neutrófilos, mas outras

células também entram em contato com o protozoário, como células *natural killer* e células dendríticas. Após fagocitose, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas e sofrem multiplicações sucessivas através de divisão binária. Posteriormente, rompem as células e infectam outras. Ainda podem atingir diversos órgãos, como fígado, baço e medula óssea (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; GONTIJO, C. M.; MELO, M. N, 2004).

Quando o vetor pica o hospedeiro, ocorre a ingestão de amastigotas de *Leishmania* presentes nos tecidos, nos macrófagos ou outras células fagocíticas. Após ingestão, as células sofrem lise e liberam o protozoário no intestino do flebótomo. Posteriormente vão para a probóscide, se diferenciam em promastigotas para serem inoculados no próximo repasto sanguíneo. (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; GONTIJO, C. M.; MELO, M. N, 2004).

Figura 4: Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: SANAR, 2020

2.5 Leishmaniose Visceral (LV)

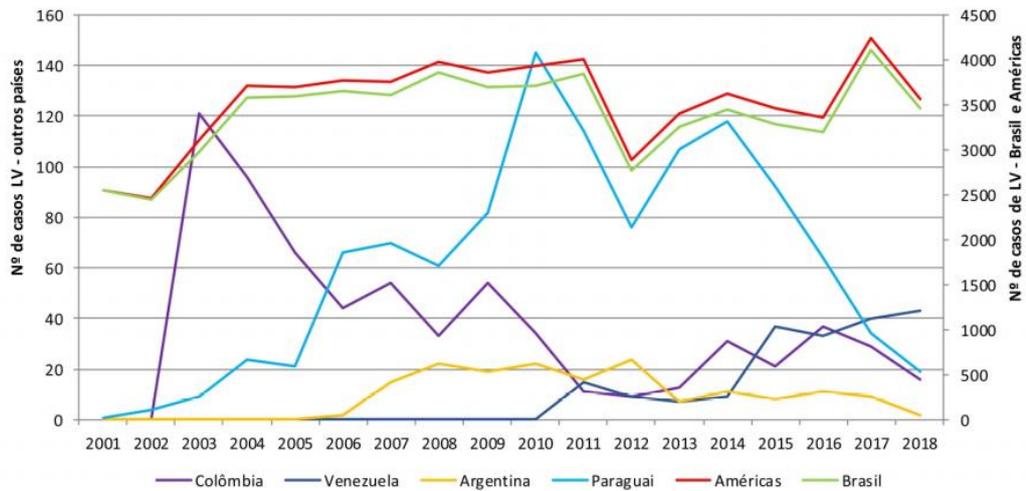
2.5.1 Epidemiologia da LV no homem

A forma mais grave de leishmaniose é a Leishmaniose Visceral (LV) sendo uma doença sistêmica e quando não diagnosticada e tratada de maneira correta, pode levar o indivíduo ao óbito, apresentando alta letalidade. Devido à sua alta letalidade, ser emergente em portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), é uma das doenças mais importantes da atualidade (BRASIL, 2014; OPAS, 2019c; OPAS, 2019d).

É amplamente distribuída ao redor do mundo, atingindo quase todos os continentes, com exceção da Oceania. Pode ser conhecida popularmente, no Brasil, por calazar ou barriga d'água (BRASIL, 2014).

A enfermidade é reportada endemicamente em 12 países da América Latina, entretanto, 96% do total de casos, é reportado pelo Brasil (OPAS, 2017). Nas Américas, entre os anos de 2001 a 2018 (Figura 5) foram registrados um total de 63.331 casos novos em humanos, apresentando média anual de 3.518 casos. No ano de 2017, houve aumento reportado no número de casos de LV pelo Brasil, quando comparado ao ano anterior, havendo um aumento de 28%. No ano seguinte, o país teve queda nos números reportados, sendo de 3.466 (97%) (OPAS, 2019d). (OPAS, 2019c; OPAS 2019d). A taxa de letalidade no ano de 2018 foi de 8%, maior taxa desde 2012. Quando não tratada de maneira adequada, os óbitos podem chegar a 90% (OPAS, 2019d).

Figura 5: Casos de leishmaniose visceral nos países com maior número de casos. Apanhado dos anos de 2001 a 2018.



Fonte: OPAS, 2019d.

De forma regional, a LV é caracterizada epidemiologicamente em três cenários: países cuja transmissão encontra-se em expansão (Brasil, Argentina e Paraguai), transmissão controlada ou estável (Colômbia e Venezuela) e transmissão esporádica (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México) (OPAS, 2017).

A estratificação de risco é elaborada através da média do número de casos a cada 3 anos. Essa estratificação é importante para que os gestores e profissionais de saúde elaborem planos de ação visando a prevenção e controle da doença. Especialistas sugerem a inclusão de mais pontos a serem avaliados para a elaboração da estratificação de risco, como indicadores sociais, ambientais, caninos, vetores e humanos, uma vez que apenas um indicador se mostra ineficiente perante a complexidade da enfermidade (OPAS, 2019c).

No período de 2016 a 2018, o total de municípios na América Latina que reportaram a enfermidade foi de 1.604. Esses municípios, quanto a estratificação de risco para LV, foram divididos em níveis de transmissão, onde a classificação foi: 7 unidades com transmissão muito intensa, 29 intensa, 112 em alta, 307 em moderada e 1.139 em baixa. Entre as 158 unidades cuja transmissão ocorre de maneira muito intensa, intensa e alta, 157 municípios pertencem ao Brasil (OPAS, 2019d).

Levantamentos epidemiológicos realizados de 2004 a 2014 no Brasil, demonstram o deslocamento da doença para regiões periurbanas e urbanas, ocorrendo surtos em diversos estados da federação, como: Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Pará, Mato Grosso do Sul, Piauí, Rio Grande do Norte, Maranhão, Ceará, Bahia e Tocantins. Os dados também demonstram a expansão da doença no

território brasileiro (BRASIL, 2014). Há uma ampla distribuição de casos de LV nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste no país, mas mais recente, há relatos de casos também na região sul e norte (BRASIL, 2014; OPAS, 2017).

Anterior à expansão territorial, normalmente a LV era própria de locais com índices pluviométricos anuais inferiores a 800 mm e em relevos de vales e montanhas. Mas com a urbanização e deslocamento populacional, esse cenário mudou, sendo encontrado até em faixas litorâneas (BRASIL, 2014).

A expansão territorial da leishmaniose pode ser atribuída a fatores como: a dificuldade de eliminar o reservatório, diversificação epidemiológica territorial, custos elevados com as medidas de controle e prevenção, capacidade de adaptação e medidas insuficientes para o controle do vetor (SILVA, D.A. et al., 2015).

No Brasil, a leishmaniose visceral teve seus primeiros relatos no Nordeste, tendo posterior expansão para outras regiões. A chegada da doença no Estado do Espírito Santo se relata por municípios que fazem parte da região do vale do Rio Doce e são cortados pela estrada de ferro Vitória x Minas, nos municípios de Baixo Guandu e Colatina. Esses relatos ocorreram posteriormente a expansão da doença em Minas Gerais, também em municípios da região do vale do Rio Doce (MARTINS et al., 1968). Posteriormente, vários relatos foram feitos em humanos e em caninos. Entre a década de 80 e os anos 2000, foram relatados casos no noroeste do estado, em municípios de Águia Branca, Água Doce do Norte, São Gabriel da Palha, Baixo Guandu, Governador Lindenberg, Itaguaçu, Itarana, Nova Venécia, Pancas e São Roque do Canaã (FALQUETO et al., 2009).

Em levantamento mais recente, o município de Colatina, adjacente ao município estudado, apresentou casos confirmados de LV em humanos entre 2015 a 2019 (Tabela 1), segundo dados fornecidos pelo Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS, 2022) – Espírito Santo. Outro município vizinho a João Neiva, Aracruz, notificou ao sistema 1 caso positivo no ano de 2017. Vale ressaltar que, segundo a mesma fonte, o município de Baixo Guandu, situado próximo ao município estudado, também apresenta casos positivos. O DATASUS não apresentou dados a respeito desses dos municípios para LV no ano de 2020.

Tabela 1: Casos confirmados de leishmaniose visceral por ano de notificação segundo Regional de Saúde por município de notificação nos anos de 2014 a 2020, no E.S.

| Município - Ano | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 | 2020 |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|-----------|
| Aracruz | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | Sem dados |
| Baixo Guandu | | 5 | 7 | 10 | 4 | 1 | Sem dados |
| Colatina | | | 1 | 1 | 1 | 1 | Sem dados |

Fonte: DATASUS, 2022.

2.5.2 Epidemiologia da LV nos canídeos

A leishmaniose canina é endêmica em 50 países. Estudos realizados apontam a expansão da área de distribuição da LV canina, tendo prevalência não mais apenas em países da América do Sul e região do Mediterrâneo, mas também em locais considerados não endêmicos, distribuindo os casos do norte da Argentina ao norte dos Estados Unidos e algumas províncias do Canadá (DANTAS-TORRES et al., 2012).

A soroprevalência de cães com LV varia com fatores ecológicos da região estudada, avaliação empregada, estado clínico do animal, fatores de risco e local onde o animal vive (DANTAS-TORRES, 2009; OPAS, 2019a). Em estudos realizados na Venezuela, foi descrita prevalência em 13,2% dos cães estudados (ZERPA et al., 2003). No Brasil, em estudo realizado no município de Jacobina (BA) em 2015, 36% dos cães estudados foram positivos para LV (PIMENTEL et al., 2015).

Em levantamentos sorológicos em regiões como China e Grécia, foram obtidos prevalência dos cães em aproximadamente 20%. (ATHANASIOU et al., 2012; PASTOR-SANTIAGO et al., 2012). Embora a prevalência de cães soropositivos possa variar, ela é geralmente superior a 25% (DANTAS-TORRES, 2009).

A prevalência global de cães com leishmaniose é de difícil mensuração, tal fato se deve a poucos dados publicados, métodos diagnósticos empregados e a metodologia aplicada nos estudos. Contudo, os maiores dados de prevalência canina de *Leishmania* spp., são decorrentes de estudos realizados no Brasil (DANTAS-TORRES, 2009).

Os fatores de risco de os cães cursarem com LV podem ser diversos, como por exemplo: genética do animal, coinfeções com outros parasitos, imunossupressão e déficit nutricional (ARESU et al., 2007; CORTESE et al., 2011).

Outros fatores de risco a serem considerados são: tamanho de pelo e local onde o animal passa a maior parte de seu tempo. Animais de pelo curto, bem como os que são mantidos no lado externo da casa, são mais infectados. Com isso, cães de porte médio a grande, por normalmente permanecerem mais no exterior das casas e pela maior área corporal, podem ser um facilitador para os flebótomos (MORENO; ALVAR, 2002; PENAFORTE et al., 2013).

Nos cães, as infecções são diagnosticadas mais comumente na faixa etária de até três anos e entre oito e dez anos de idade. Até o momento, não há correlação entre o sexo e a prevalência da doença (MORENO; ALVAR, 2002).

O cão cursa com forma clínica sistêmica e, em regiões endêmicas, são acometidos em maior número e ainda precedem a infecção em humanos, podendo atuar como reservatório do parasito tendo a presença do vetor (BARROSO-FREITAS et al., 2009; BEVILACQUA, P. D. et al., 2001; BRASIL, 2014).

O período de incubação da doença nos cães pode variar de dois a doze meses e o tempo médio de vida do animal ao cursar com a doença é de dois a três anos (SILVA, F. L., 2007). Cães assintomáticos representam aproximadamente 50% dos casos positivos de *Leishmania spp.*, desempenhando assim um papel muito importante na sua manutenção no ambiente (OPAS, 2019a).

2.5.3 Sinais clínicos e patogenia canina

Por se tratar de uma doença sistêmica e crônica, os sinais clínicos variam bastante e dependem da resposta imunológica do animal infectado, onde o estado clínico pode variar do animal aparentemente sadio, até o estado mais severo da doença (BRASIL, 2014, RIBEIRO et al., 2018).

Ainda não se conhece todos os fatores imunológicos ligados ao mecanismo de combate da infecção, mas é relatado que respostas mediadas por células *T Helper 1* (th1) e citocinas pró-inflamatórias associadas a ela, como interleucina-2 (IL2), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF), são associadas a indivíduos resistentes. Tal mecanismo ocorre devido a essas células aumentarem a eficiência

fagocítica e de linfócitos citotóxicos, desencadeando boa resposta imune. Em contrapartida, indivíduos que apresentam resposta imunológica mediada pela proliferação de células *T Helper 2* (th2) e citocinas anti-inflamatórias, como interleucina (IL) 4,5,6,10 e 13, são associadas a indivíduos não resistentes. Tal mecanismo desencadeia proliferação de células B e exacerbada produção de imunoglobulinas, os quais são inespecíficos e não conferem boa resposta imune (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2014; MORENO; ALVAR, 2002; SAHA; MUKHOPADHYAY; CHATTERJEE, 2011).

Inicialmente, os parasitos estão presentes no local da picada. Posteriormente, ocorre a infecção de vísceras e eventualmente tornam-se distribuídos através da derme. Os principais sinais clínicos nos cães são: caquexia, hipergamaglobulinemia, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia e linfadenopatia. (BRASIL, 2014; SILVA, F. S., 2007).

Em uma fase mais adiantada da doença, são recorrentes a onicogribose, alopecia, dermatites, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas, vômito e hiperqueratose (Figura 6). Na fase final, ocorre paresia de membros posteriores, caquexia, inanição, nefrites e morte (BRASIL, 2014; SILVA, F. S., 2007).

Figura 6: Apresentação da sintomatologia do cão cursando com LV. A: Cão com alopecia e lesões no corpo. B Evidenciação de onicogribose. C: Sinais oculares, alopecia e emagrecimento. D: alopecia proeminente em região de face e emagrecimento.



Fonte: BRASIL, 2014.

A linfonodomegalia ocorre principalmente em linfonodos poplíteos e pré-escapulares. Ao realizar a palpação nota-se: aumento de volume, endurecimento e ausência de dor. Nessa etapa, se realizado punção, é possível evidenciar a *Leishmania* sp. no tecido (OPAS, 2019a).

Os sinais cutâneos são decorrentes da ação do parasito na pele, ocorrendo: Hiperqueratose, deixando a pele com aspecto seco; dermatite furfurácea, com seu início pequeno e à medida que a doença progride, há aumento de tamanho. Podem ser localizadas, normalmente em pavilhão auricular, periorbital e focinho; lesões ocorrem em decorrência da hiperplasia de células basais da epiderme em decorrência da presença do protozoário; ulcerações com bordas elevadas, regulares com fundo liso e granulomatoso, frequentemente eritematoso. Essa lesão com frequência localiza-se em região de articulação dos membros, tanto anterior quanto posterior; presença de nódulos na derme. É possível encontrar o parasito nessa lesão; ausência de prurido (BRASIL, 2014; OPAS, 2019a).

Os pelos dos cães perdem o brilho, tornam-se frágeis, quebradiços e caem em demasia, resultando em alopecia localizada em região periorbital, focinha, orelha, pescoço, tórax, tuberosidades ósseas e cauda (BRASIL, 2014; OPAS, 2019a).

Comumente os cães cursam com onicogribose, inflamação da matriz ungueal e hipersensibilidade nas unhas. Ainda ocorre a hiperqueratose dos coxins plantares (BRASIL, 2014; OPAS, 2019a).

Embora relatados todos os sintomas da doença, há estimativas que apontam que 60% dos cães infectados pelo protozoário são assintomáticos (DANTAS-TORRES et al., 2012).

2.6 Leishmaniose Tegumentar (LT)

2.6.1 Epidemiologia da LT no homem

Inicialmente, a leishmaniose tegumentar era associada apenas à doença enzoótica de animais silvestres e, acidentalmente, em humanos que adentravam as florestas. No decorrer dos anos, passou a ser uma doença encontrada em zonas rurais e periurbanas (RANGEL; LAINSON, 2003).

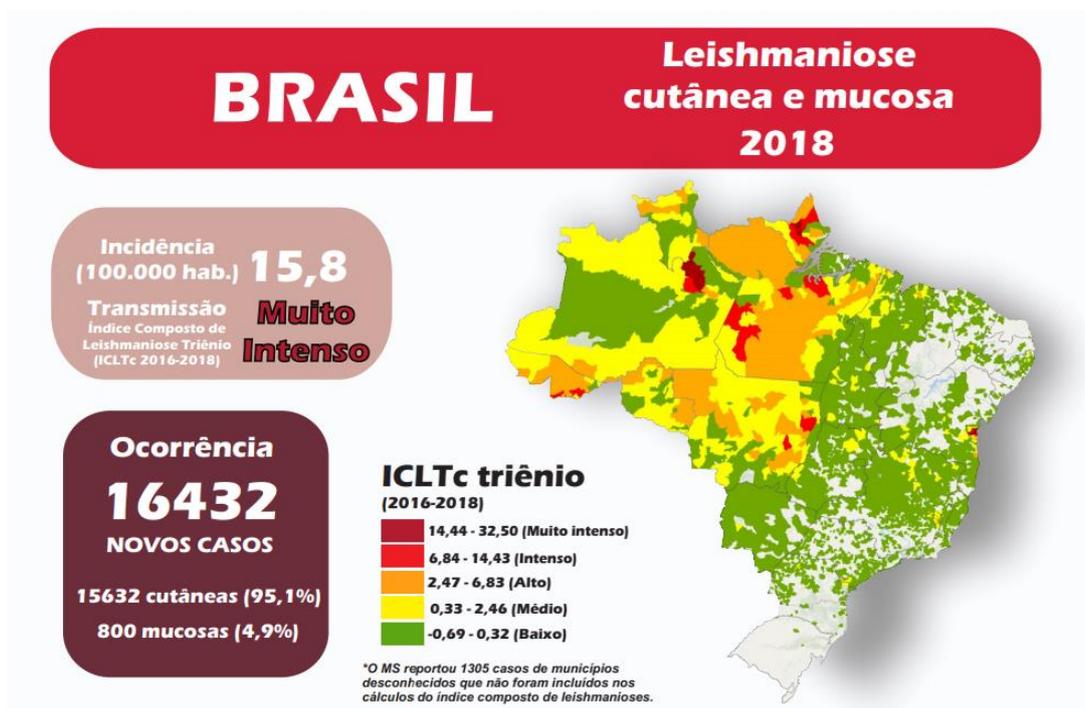
Em 85 países distribuídos em quatro continentes do mundo, exceto a Oceania, a leishmaniose tegumentar é considerada um problema de saúde pública. Sendo também considerada uma das seis doenças infecciosas mais importantes do mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), devido à alta taxa de incidência e capacidade de causar deformidade ao homem (BRASIL, 2017).

Nas Américas, são notificados casos de leishmaniose tegumentar e mucosa em 20 países, sendo que 18 deles são endêmicos para a doença (OPAS, 2017), e desses, 17 reportam os casos para a Organização Pan-Americana de Saúde e 1, a Guiana Francesa, reporta seus casos para a França (OPAS, 2019d).

No ano de 2018 na América Latina, quando comparado ao ano antecessor, houve um aumento do número de casos notificados de 10,5% em unidades de primeiro nível político administrativo nacional (estados, regiões, departamentos ou províncias, a depender da divisão do país) e de 5% em unidades de segundo nível político administrativo (municípios, cantões províncias ou distritos). Este aumento indica expansão territorial da doença dentro do país. Já nas regiões fronteiriças, não ocorreu aumento significativo (OPAS, 2019d).

Ainda no ano de 2018, foram reportados um total de 46.041 novos casos nas Américas, onde o Brasil foi responsável por 84% (16.432) deste total (Figura 7) (OPAS, 2019d), tendo uma diminuição de casos, quando comparado ao ano de 2017, onde reportou 17.526 novos casos (OPAS, 2019c).

Figura 7: Número de casos de leishmaniose tegumentar, segundo a estratificação de risco.



Fonte: OPAS, 2019d.

No Brasil, a LT é uma doença dermatológica de maior importância, pois além das deformidades que pode resultar, leva ainda a prejuízos econômicos, sociais e psicológicos (BRASIL, 2017). Nos anos 80, apenas 19 unidades da federação reportavam casos de LT. A partir de 2003, são encontrados casos confirmados da doença em todas as unidades da federação, sendo considerada uma doença emergente, com seu aumento associado ao desmatamento, exploração dos recursos naturais, expansão agrícola e migração de populações (BRASIL, 2017; RANGEL; LAINSON, 2003).

Além de afetar todos os estados da federação, a leishmaniose tegumentar é amplamente distribuída no estado do Espírito Santo, principalmente em zonas rurais (FALQUETO, A et al., 1991; FALQUETO, A et al., 2003).

No Espírito Santo a LT apresenta um grande problema de saúde pública, onde novos casos surgem continuamente. Apanhados do período de 1987 até 2005, revelaram que o estado da região Sudeste foi o que mais reportou casos, apresentando um coeficiente de detecção de 16,7, onde o coeficiente do Brasil foi de 18,5 (BRASIL, 2007).

A distribuição dos casos no Espírito Santo vem sendo restrita em localidades com altitudes variando de 50 a 750 metros acima do nível do mar, atingindo moradores em casas com vales e encostas no entorno e vegetação nativa em degradação (FALQUETO, et al., 1993).

Os municípios limítrofes ao município de João Neiva - ES, apresentam casos confirmados em humanos nos anos de 2014 até 2020 (Tabela 2) (DATASUS, 2022).

Tabela 2: Casos confirmados de leishmaniose tegumentar por ano de notificação segundo Regional de Saúde por município de notificação nos anos de 2014 a 2020, E.S.

| Município - Ano | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 | 2020 |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Aracruz | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Colatina | Sem dados |
| Ibiraçu | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| João Neiva | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Linhares | 3 | 0 | 16 | 24 | 4 | 1 | 1 |
| São Roque do Canaã | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Fonte: DATASUS, 2022.

Nas leishmanioses, as análises epidemiológicas realizadas são de suma importância para as ações realizadas visando o controle da doença, pois através delas é possível conhecer, monitorar, planejar e direcionar essas ações (OPAS, 2017).

2.6.2 Epidemiologia da LT nos canídeos

No Brasil, a prevalência de cães com *Leishmania* spp. associados a leishmaniose tegumentar varia de 3,2% a 50,3%, dependendo da região estudada e do método diagnóstico empregado (CASTRO et al., 2007; DANTAS-TORRES et al., 2010; FALQUETO et al., 1986; LEÇA JUNIO et al., 2015; SOCCOL et al., 2009). Pela técnica de ELISA demonstraram prevalência de 29% (SOCCOL et al., 2009), 36,1 % (SERRA et al., 2003) e 13,9%, apresentando sensibilidade de 92,3% (CASTRO et al., 2007).

Os resultados acerca de prevalência de leishmaniose tegumentar precisam ser interpretados com cautela, uma vez que há variações entre os protocolos utilizados nos estudos e o tamanho da amostra, sendo ainda baseado em inquérito sorológico e em áreas onde ocorre endemicamente leishmaniose visceral e tegumentar (NUNES et al., 1991).

Em locais onde há casos humanos de leishmaniose tegumentar, alguns autores levantaram a hipótese que cães positivos podem servir de fonte natural de infecção (CASTRO et al., 2007; FALQUETO et al., 1986; FALQUETO et al., 1991; HEUSSER JUNIOR et al., 2010). Em contrapartida, outros autores demonstram poucas evidências para tal fato, sendo o cão um hospedeiro acidental (CASTRO et al., 2007; SOCCOL et al., 2009). No entanto, com o avanço da transmissão da doença em áreas urbanas, sua transmissão se mantém com reservatórios sinantrópico ou domésticos, devendo agora ser determinado quais mamíferos desempenham tal papel no ciclo (QUARESMA et al., 2011).

2.6.3 Sinais clínicos nos cães

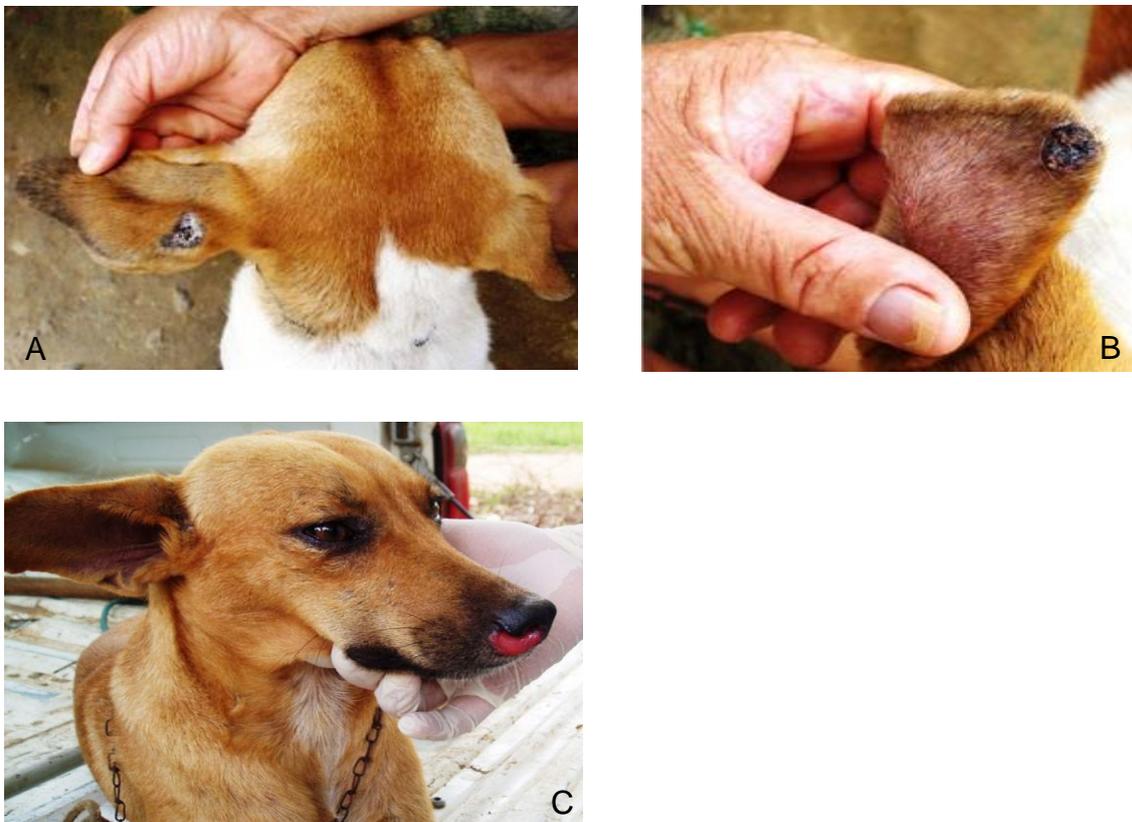
A LT nos cães apresenta-se como uma doença de caráter crônico com manifestações semelhantes dos casos em humanos, ou seja, o parasitismo ocorre preferencialmente em mucosas das vias aerodigestivas superiores, podendo variar conforme resposta imunológica do animal e espécie infectante ao hospedeiro (LEÇA JUNIOR et al., 2015; PIRMEZ et al., 1988).

As lesões cutâneas são ulcerativas, únicas ou múltiplas (mais raramente) e estão localizadas em orelha, focinho, face, bolsa escrotal ou outras áreas da pele (Figura 8). Pode haver lesões mucocutâneas erosivas em focinho e despigmentação e inflamação de narinas (DANTAS-TORRES, 2009; LEÇA JUNIOR et al., 2015;

PIRMEZ et al., 1988). Alguns cães podem ser assintomáticos, com isso não demonstrando nenhuma sintomatologia (LEÇA JUNIOR et al., 2015).

A depender da espécie de *leishmania* envolvida na contaminação do cão, o mesmo pode apresentar completa recuperação clínica e sorológica da doença. Embora, quando as lesões são acompanhadas de soroconversão, mesmo com a remissão dos sintomas, o animal pode voltar a apresentar a doença (MARCO et al., 2001; REITHINGER et al., 2003).

Figura 8: Demonstração de sintomatologia de cão com LT. A e B: lesão em orelha. C: cão com lesão em focinho.



Fonte: DANTAS-TORRES, 2009.

2.7 Diagnóstico

O Ministério da Saúde (MS) recomenda, para cães, teste imunocromatográfico para triagem e o teste imunoenzimático (ELISA) como confirmatório (BRASIL, 2019).

Mesmo nos dias atuais, o diagnóstico de *Leishmaniose* spp. continua sendo um problema para o serviço público, devido a sua forma clínica variável e a inexistência de um teste com especificidade 100% (OPAS, 2019b).

O diagnóstico das leishmanioses abrange perspectivas epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. Para realizar o diagnóstico clínico, faz-se necessária associação dos aspectos epidemiológicos e, muitas vezes, estes com exames laboratoriais eficazes, para assim se obter a confirmação da enfermidade. Vale lembrar ainda que a sintomatologia clínica é variável, tendo outras doenças como diagnóstico diferencial (GONTIJO, B; CARVALHO, M. L. R. de, 2003).

Diante o exposto se faz necessário lançar mão de diagnósticos laboratoriais. Quanto mais inicial é o diagnóstico, mais evita-se complicações provindas da cronicidade que o animal pode vir a apresentar. (GONTIJO, B; CARVALHO, M. L. R. de, 2003).

2.7.1 Testes Sorológicos

Os testes sorológicos são amplamente utilizados devido a facilidade de execução, boa precisão diagnóstica e ser realizado amplamente em uma população. Sua principal limitação ocorre por possíveis reações cruzadas, principalmente com outras espécies de *Leishmania* spp. e/ou espécies de *Trypanosoma* spp. (OPAS, 2019b).

Testes sorológicos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA são usados para detecção da presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro do paciente (ALMEIDA, M. A. et al., 2005; MAIA; CAMPINO, 2008).

O método de imunofluorescência Indireta (RIFI), utiliza o parasito íntegro como antígeno. Atualmente, não é uma técnica de primeira escolha para o diagnóstico de cães sendo utilizada somente para triagens. Consiste em técnica semiquantitativa e sua sensibilidade oscila de 83% a 100% e especificidade em 80% (ALMEIDA, M. A. et al., 2005; DUXBURY; SADUN, 1964; HARITH et al., 1987)

Animais soros reagentes são considerados os que apresentam título igual ou superior ao ponto de corte e os resultados são expressos em diluição, considerando-se como positivas as amostras reagentes a partir da diluição de 1:80. Nos títulos iguais a 1:40, com clínica sugestiva de LV, recomenda-se a solicitação de nova amostra em

30 dias ou teste complementar (ALMEIDA, M. A. et al., 2005; DUXBURY; SADUN, 1964; HARITH et al., 1987).

Este teste tem especificidade discutível pois pode apresentar reações cruzadas com anticorpos contra *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* nas diluições menores, podendo induzir ao erro de diagnóstico de *Leishmania chagasi* que pode condenar o cão à eutanásia (ALMEIDA, M. A. et al., 2005; DUXBURY; SADUN, 1964; HARITH et al., 1987).

O teste imunoenzimático indireto (ELISAI), surgiu em 1970, fazendo com que outros métodos caíssem em desuso, como a reação de fixação de complemento, devido sua facilidade de execução, utilização em uma grande população e a possibilidade de utilização com diferentes antígenos (brutos, sintéticos ou recombinantes) (GRIMALDI; TESH, 1993; MAIA; CAMPINO, 2008).

Esta técnica possui diferentes modalidades de execução (ELISA sandwich, ELISA competitivo, ELISA direto) mas possuem em comum o método de revelação da formação do complexo antígeno+anticorpo pelo uso de enzima ligada ao anticorpo secundário (anti anticorpo) que reage ao cromógeno adicionado ao final da reação.

A seguir é descrito o protocolo utilizado na técnica de segundo Almeida e colaboradores (2019). Antígenos solúveis de protozoários lisados (*L. chagasi*, *L. braziliensis*) são fixados em poços de placa de poliestireno por 12 horas a 4°C. Após a etapa de fixação é feito o bloqueio dos espaços livres do fundo dos poços com soro fetal bovino (SFB). Em seguida são adicionados os soros caninos diluídos aos poços contendo o antígeno solúvel de *Leishmania* sp.

Após a adição do antígeno, segue com adição de uma anti-IgG de cão conjugada à peroxidase. Após incubação e lavagem para retirar excesso de reagentes, é feita a revelação com solução de peróxido de hidrogênio e orto-*p*-fenilenodiamina que identifica colorimetricamente a reação enzimática entre a peroxidase e o substrato (peróxido de hidrogênio). A reação é então interrompida com solução de ácido sulfúrico adicionada a cada poço sendo a placa lida imediatamente em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490nm.

A determinação da reatividade baseia-se em leituras superiores ao ponto de corte (*cut off*) calculado como a média da densidade ótica dos soros de 3 cães negativos (controles negativos) mais duas vezes o desvio-padrão da densidade ótica desses soros (ALMEIDA, et al., 2019).

O ELISA tem sido utilizado pelo MS como teste confirmatório para os testes rápidos de triagem imunocromatográficos. Apesar de largamente utilizado o teste ELISA é passível de apresentar reações cruzadas principalmente com anticorpos das várias espécies de *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi* (BRASIL, 2014). Em estudo realizado com 57 cães visando detecção de reações cruzadas entre *Leishmania sp.* com *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Babesia Canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, apenas *T. cruzi* (64,3%) e *E. canis* (7,7%), apresentaram reações cruzadas no teste de ELISA (ZANETTE et al. 2014).

O teste de ELISA tem sua sensibilidade e especificidade variada, dependendo principalmente do antígeno utilizado no teste, variando de 80% a 99,5% a sensibilidade e 81% a 100% a especificidade (MANCIANTI et al., 1995; MANCIANTI; PEDONESE; POLI, 1996). Em levantamento da literatura sobre desempenhos dos testes sorológicos para diagnóstico de LV, o teste de ELISA demonstrou sensibilidade de 89% e especificidade de 87%. No levantamento, foram avaliados trabalhos publicados entre novembro de 2012 e fevereiro de 2013, totalizando 25 estudos, que preencheram os critérios utilizados pelos autores, dos 284 trabalhos encontrados (PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015).

A sensibilidade e especificidade do teste está atrelada ao tipo utilizado de antígeno e ao estado clínico do animal testado. Estudos utilizando o antígeno recombinante A2 com soros de animais sintomáticos, apresentam bons resultados e o acontecimento de reação cruzada é insignificante. Já o antígeno rK39 apresenta divergência entre cães assintomáticos e sintomáticos sendo de 58% e 96,7%, respectivamente. (CARVALHO et al., 2002; METTLER et al., 2005). Ao empregar antígenos recombinantes ou purificados no teste, a sensibilidade e especificidade melhoram (SCALONE et al., 2002).

Os testes rápidos existem variadas apresentações comerciais tanto para diagnóstico da LV humana (DiaMed IT-LEISH®, Kalazar Detect®, OnSite®) como para LV canina (TR DPP®, SNAP 4Dx Plus Test/Alere®, Leishmaniose Ac Test Kit®) (GRIMALDI, et al., 2012).

Os mecanismos de testes rápidos basicamente são quatro: imunocromatografia de fluxo lateral; imunocromatografia de dupla migração (duplo percurso-DPP); dispositivos de imunoconcentração; fase sólida. Os testes rápidos podem ser realizados com amostras de sangue, soro, plasma ou fluido supra gengival

e são aplicados para pesquisar antígenos ou anticorpos contra os agentes infecciosos (BRASIL, 2019; GRIMALDI, et al., 2012).

Para pesquisa de anticorpos, haverá antígenos (usualmente proteínas sintéticas) imobilizados na membrana de nitrocelulose, para a captura dos anticorpos presentes na amostra. Enquanto que para a pesquisa de antígenos, haverá anticorpos imobilizados na membrana de celulose, para a captura dos antígenos presentes na amostra (BRASIL, 2019).

Em sua grande maioria, os kits rápidos de diagnóstico imunocromatográfico avaliam a presença de anticorpos e não a presença do parasito. Como exemplo de amplo uso desta técnica pode-se citar o diagnóstico rápido imunocromatográfico tipo Dual-Path Platform baseado em proteínas recombinantes (K26/K39) utilizado pelo MS e laboratórios comerciais para diagnóstico de *L. chagasi*. Estes testes possuem alta especificidade, mas relativa sensibilidade, devendo ser confirmado pela técnica de ELISA indireta (GRIMALDI et al., 2012).

2.7.2 Diagnóstico Parasitológico Direto

Em testes parasitológicos, é possível a visualização do parasito em lâmina através da realização da punção de órgãos nos quais as leishmanioses têm tropismo, como medula óssea, baço, pele, fígado e linfonodos. É considerada técnica ouro de diagnóstico, pois uma vez positiva é indiscutível. É possível visualizar a forma amastigota do parasito neste exame após efetuar coloração do tecido com os corantes Leishman, Giemsa ou Panótico (GONTIJO, C. M.; MELO, M. N., 2004).

A especificidade do teste pode alcançar os 100%, mas sua sensibilidade varia muito, por volta de até 80%, a depender da distribuição do protozoário no tecido, do material coletado e o tempo de observação da lâmina. Testes realizados com punção de baço, por exemplo, apresentam uma sensibilidade elevada, chegando aos 98%, contudo a técnica nesse tecido apresenta um elevado risco para o animal. Já em biópsias de medula óssea, a sensibilidade varia entre 60 e 85% (GONTIJO, C. M.; MELO, M. N., 2004; SUNDAR; RAI, 2002).

Os métodos parasitológicos são pouco utilizados em programas de saúde pública, uma vez que são invasivos. Sendo apenas indicado, para esses casos, para confirmação de caso e identificação da espécie de *Leishmania* spp. (OPAS, 2019b).

2.7.3 Reação em cadeia da polimerase – PCR

A técnica consiste na ampliação de uma sequência conhecida de oligonucleotídeos do protozoário e é conhecido com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O teste pode ser realizado em amostras de medula óssea, linfonodos, sangue, urina e biópsia de pele, tornando assim um método menos invasivo (BOZZA et al., 1995; DEGRAVE et al., 1994; GONTIJO; MELO, 2004; JACKSON et al. 1986).

Particularmente útil no caso de leishmaniose em decorrência da necessidade da confirmação da espécie parasitológica diante da possibilidade de tratamento. A PCR busca a amplificação do DNA do parasito (HEUSSER JUNIOR et al., 2010).

Apresentando 100% de especificidade e capaz de detectar quantidades tão pequenas quanto 1 fentograma (1 fentograma = 10⁻¹⁵g) do DNA de *Leishmania* spp., o equivalente a 1/10 do parasita, sendo para isso necessário a utilização de primers e marcadores específicos para cada espécie do protozoário. Apesar da grande eficácia na detecção do protozoário suas exigências técnicas e custo relativamente alto dificultam sua realização em rotinas laboratoriais (HEUSSER JUNIOR et al., 2010).

A coleta de material onde contenha o parasito é crucial pois em alguns animais, o sangue periférico não apresenta o protozoário, necessitando coleta na medula óssea ou baço. Vale ressaltar que o fato de serem detectados e/ou amplificados fragmentos de ácidos nucleicos do parasito, não significa que este está viável, multiplicando e causando enfermidade. Exemplo clássico disso são as biópsias de lesões cicatrizadas de leishmaniose tegumentar, onde técnicas moleculares facilmente identificam e amplificam fragmentos do ácido nucléico de parasitos mortos (FISA et al., 2001; MAIA; CAMPINO 2008; SANTOS et al., 2010).

A sensibilidade nos tecidos pode sofrer variação devido a não distribuição homogênea do parasito, seja devido ao tropismo ou pela resposta imune local. O tecido cutâneo, dentro os tecidos observados, apresenta uma distribuição mais homogênea e é de fácil obtenção de amostras, diante isso, ele vem sendo

amplamente utilizado para este método de diagnóstico (FISA et al., 2001; MAIA; CAMPINO 2008; SANTOS et al., 2010).

2.8 Prevenção e Controle

2.8.1 Medidas para o hospedeiro

Para a vigilância dos cães, é necessário o conhecimento do cenário epidemiológico local e a importância desse animal no ciclo de transmissão nas áreas onde há casos de leishmaniose humana (OPAS, 2019b).

Devido à complexidade e importância da doença, é recomendado para os cães que cursem com *Leishmania infantum*, visando com o compromisso com a saúde pública e assim obter um controle da doença (BRASIL, 2014; WHO, 2010). O procedimento de eutanásia dos cães pode se adaptar à realidade local, podendo o país optar por seguir ou não a medida (WHO, 2010). Considerando esse sentido, cabe salientar que em um cenário ideal, seria necessário a eutanásia de todos os cães soropositivos que compusesse a região (OPAS, 2019b).

O Brasil é um país que recomenda a medida de realizar eutanásia em cães soropositivos para leishmaniose visceral. Embora o programa seja adotado com o preceito de romper com o ciclo biológico e, com isso, diminuir os casos de leishmaniose em humanos, o programa não demonstra a eficácia esperada (COSTA, 2011; MOREIRA, JUNIOR. E. D., 2004; SILVA, D. A., 2015). Tal ineficiência deve à complexidade no diagnóstico, não aceitação da população quanto a eutanásia, a reposição rápida do cão no cenário epidemiológico e a necessidade de manutenção contínua de vigilância na área (BRASIL, 2014; OPAS, 2019b).

Em estudos realizados pelo Brasil com apoio da Organização Pan-Americana de Saúde, cujo objetivo era avaliar evidências científicas sobre os resultados do controle canino e vetorial para a epidemiologia da leishmaniose visceral, foi demonstrado que são insuficientes os dados para comprovar tal eficácia, embora alguns estudos teóricos e observacionais demonstraram que o controle canino e do vetor são eficazes. Nos estudos que comprovam a eficiência, faltam padronização dos trabalhos que evidenciem a eficácia e o impacto da adoção dessas medidas. A

conclusão proposta pela pesquisa foi que as medidas realizadas devem continuar até o surgimento de novas evidências (OPAS, 2019b).

Para que ocorra a prevenção do cão, é necessário evitar seu contato com o vetor, que por sua vez, é necessário levantar informações sobre características epidemiológicas da região desejada (MOREIRA, de 2013).

Coleiras impregnadas com deltametrina a 4% mostram-se eficientes e demonstraram eficácia como medida de proteção individual para os cães contra picadas de flebotomíneos. O período de proteção é variável e depende do produto escolhido, com duração que variam de 1 a 8 meses (OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013). Entretanto, a adoção em programas de saúde pública, a fim de interromper o ciclo de transmissão doméstico, é necessária a implementação de estudos longitudinais que demonstrem sua efetividade como medida de controle (BRASIL, 2014). O uso de repelentes na forma de pour-on, mostrou-se eficiente também, embora este só confira proteção em todo o corpo do animal após 24 horas de aplicação. Ainda é recomendado o uso desse método antes de inserir o animal na área que tenha a presença do vetor (COURTENAY, et al., 2009; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013).

No mercado global, existem duas vacinas para a leishmaniose visceral canina, uma na Europa e outra no Brasil. A vacina do Brasil é registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), porém sem comprovação da eficácia de seu uso para o controle do reservatório em programas de saúde pública, limitando-se assim, ao uso individual (BRASIL 2014; OPAS, 2019b).

Para a leishmaniose tegumentar, apesar da doença já ter sido descrita em animais silvestres e domésticos, não há nenhuma medida de prevenção e controle emitida exclusivamente pelos órgãos de saúde. O recomendado é apenas realizar as medidas visando evitar o contato com o vetor (OPAS, 2019b).

2.8.2 Medidas para o vetor

Um ponto importante para o controle é o combate ao vetor, devendo ser realizado por meio de borrifação do domicílio e peridomicílio com inseticida de ação residual para a proteção coletiva, sendo empregado apenas para o flebótomo adulto.

As medidas de controle devem ser, imprescindivelmente, realizadas de forma integral para que sejam efetivas (BRASIL, 2014; MARCONDES, 2016).

Medidas para adoção de combate ao vetor é a limpeza de quintais e terrenos, a fim de não permitir o ciclo do vetor, poda de árvores, para diminuir sombras no solo e evitar condições favoráveis para o vetor consolidar seu ciclo, destinar adequadamente o lixo orgânico, impedindo aproximação de animais sinantrópicos (marsupiais e roedores) que prováveis são fontes de infecção para os flebotomíneos (BRASIL, 2014).

Outras medidas que podem ser utilizadas são: uso de repelente, quando adentrar áreas onde encontra o vetor, evitar entrar nesses locais nos horários de atividade do vetor e o uso de mosquiteiros e tela nas janelas (BRASIL, 2014).

2.9 Tratamento Canino

Segundo a portaria interministerial Nº 1.426, de 11 de julho de 2008, o tratamento animal poderá ser realizado após realização de teste com resultado positivo para LV, com medicamentos exclusivos para uso veterinário e que possua autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

O tratamento animal não garante a cura da doença, ocorrendo apenas a melhora dos sinais clínicos e diminuição da carga parasitológica, podendo assim, a doença ter recidivas (BANETH, 2002; NOGEIRA, 2015). Diante disso, as medidas de proteção nunca devem ser abandonadas, como por exemplo, o uso de coleiras e o controle do vetor (OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013).

O protocolo adotado para possível tratamento em países onde se é permitido é realizado com algum Leishmanioestático, como o Alopurinol, um imunomodulador, como a Marbofloxacina e um Leishmanicida, como a Miltefosina (NOGUEIRA, 2015). Outros protocolos podem ser adotados, mas com drogas que não são usualmente empregadas para o uso humano. Cães portadores de LV, geralmente apresentam uma baixa resposta inflamatória, o que auxilia ao aparecimento de infecções secundárias (ARTACHO, 2009).

Vale ressaltar que o Ministério da Saúde do Brasil não autoriza o tratamento de cães que cursem com leishmaniose visceral ou com leishmaniose tegumentar com medicamento de uso humano (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar levantamento sorológico canino acerca de *Leishmania* spp. através da técnica de ELISA indireto no município de João Neiva.

3.2 Objetivos específicos

Verificar prevalência de anticorpos anti-*leishmania* nos cães;

Realizar comprovação de significância dos casos positivos para a população;

Avaliar fatores associados à sorologia positiva dos cães.

4. REFERÊNCIAS

AGUIAR G. M.; Medeiros W.M. Distribuição regional e habitats das espécies flebotomíneos do Brasil, p.207-255. In: **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

ALMEIDA, M. A. O. de et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary parasitology**, v. 127, n. 3-4, p. 227-232, 2005.

ALMEIDA, Y. V. et al. Avaliação sorológica de cães vacinados com vacinas comerciais contra leishmaniose visceral no município de Úna – ES após um ano de vacinação. **PUBVET**, v. 13, n. 6, a352, p. 1-5, 2019.

ARESU, L et al. Membranoproliferative glomerulonephritis type III in a simultaneous infection of *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 5, p. 569-572, 2007.

ARTACHO, N.S. **A leishmaniose no Brasil e o conflito ideológico**: eutanásia ou tratamento? São Paulo, 2009. 57 f. Monografia (graduação em medicina veterinária) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – UniFMU.

ATHANASIOU, L. V. et al. A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. **Acta tropica**, v. 122, n. 3, p. 291-295, 2012.

BANETH, G.; SHAW, S. E., Chemotherapy of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. [S.l.]. 2002. 106: p.315-324.

BARROSO-FREITAS, A. P. T. et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 383-389, 2009.

BEVILACQUA, P. D. et al. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, p. 1-8, 2001.

BOZZA, M et al. Characterization of 'Old World' *Leishmania* species using amplified minicircle variable regions as molecular probes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n.3, p. 333-4, 1995.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p., il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde: volume único** [recurso eletrônico] – 3. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

CARVALHO, F. A. A. et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 43, n. 4, p. 289-295, 2002.

CASTRO, E. A. et al. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). **Experimental parasitology**, v. 117, n. 1, p. 13-21, 2007.

CORTESE, L et al. Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 1, p. 118-121, 2011.

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, p. 232-242, 2011.

COURTENAY, O. et al. A long-lasting topical deltamethrin treatment to protect dogs against visceral leishmaniasis. **Medical and veterinary entomology**, v. 23, n. 3, p. 245-256, 2009.

COUTINHO, S.G. et al. A survey for american cutaneous and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from áreas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 80:17-22. 1985. 69

DANTAS-TORRES, F. et al. Cutaneous and visceral leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 313-317, 2010.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2009.

DANTAS-TORRES, F. et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DEGRAVE, W. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*: a mini review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463-469, 1994.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (DATASUS). Doenças e Agravos de Notificação - 2007 em diante (SINAN). Disponível em: <<https://datasus.saude.gov.br/aceso-a-informacao/doencas-e-agravos-de-notificacao-de-2007-em-diante-sinan/>>. Acesso em: 10/05/2022.

DIAS, M. et al. Epidemiology of mucocutaneous leishmaniasis Americana. I. Study of reservoirs in an endemic region of the State of Minas Gerais. **Ver. Inst. Med. Trop.** São. Paulo. 19:403-10. P. 1977. 68

DINIZ, S. A. et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 5, p. 650-658, 2005.

DUXBURY, R. E.; SADUN, E. H. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 13, n. 4, p. 525-529, 1964.

FALQUETO, A. et al. Participation of the dog in the cycle of transmission of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Viana, State of Espírito Santo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 81:155-63. 1986.

FALQUETO, A. et al. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, V. 86, P. 499 – 500, 1991.

FALQUETO, A. et al. Mapeamento da área endêmica da leishmaniose visceral no estado do Espírito Santo. In: **CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL**. 1993.

FALQUETO, A. et al. Epidemiological and Clinical Features of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. American Cutaneous and Mucocutaneous. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1003 – 1010, 2003.

FALQUETO, A. et al. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 4, p. 559-565, 2009.

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

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

GONTIJO, C.M; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v.7, n.3, p.338-49, 2004.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

GRIMALDI, G. et al. 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**, v.106, n. 1, p. 54-59, 2012.

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. **Advances in applied microbiology**, v. 82, p. 1–23, 2014.

HARITH, A. E. et al. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 4, p. 603-606, 1987.

HEUSSER JÚNIOR, A. et al. Leishmaniose tegumentar canina no município de Balneário Camboriú, Estado de Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 713-718, 2010.

JACKSON, P. R. et al. Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. **Veterinary parasitology**, v. 20, n. 1-3, p. 195-215, 1986.

LEÇA JÚNIOR, N. F. et al. Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil Nilo. 2015.

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

MANCIANTI, F. et al. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 59, n. 1, p. 13-21, 1995.

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Veterinary parasitology**, v. 65, n. 1-2, p. 1-9, 1996.

MARCO, J. D. et al. Force of infection and evolution of lesions of canine tegumentary leishmaniasis in northwestern Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 649-652, 2001.

MARCONDES, M. Leishmaniose. In: LARSON, C. E.; LUCAS, R. (Eds.). **Tratado de Medicina Externa Dermatologia Veterinária**. São Caetano do Sul: Interbook, 2016, p. 313–344.

MARTINS, J. et al. First cases of autochthonous kala azar in the State of Espírito Santo, Brazil. **Hospital (Rio de Janeiro, Brazil)**, v. 73, n. 3, p. 745-74, 1968.

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

MOREIRA Junior, E. D. et al. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Veterinary parasitology**, v. 122, n. 4, p. 245-252, 2004.

MOREIRA, M. L. et al. **Duração da imunidade vacinal na Leishmaniose visceral canina: Perfil fenotípico e funcional da atividade fagocítica anti-*Leishmania chagasi***. 2013. Tese de Doutorado.

MORENO, J.; ALVAR, J.. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

NOGUEIRA, F. S. **Tratamento da leishmaniose visceral canina: Resultados preliminares, Manifestação Clínica**. Simpósio paulista de leishmaniose visceral, São Paulo, SP. Ago, 2015.

NUNES, M. P. et al. Serological survey for canine cutaneous and visceral leishmaniasis in areas at risk for transmission in Rio de Janeiro where prophylactic measures had been adopted. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 4, p. 411-417, 1991.

OPAS Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas**. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, 2017.

OPAS Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas**. Washington, D.C.: OPAS; 2019d

OPAS Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas**. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, 2019c.

OPAS. Organización Panamericana de la Salud. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington, D.C.: OPS; 2019b. 200 p.

OPAS. Programa De Control de Leishmaniasis. Organización Panamericana de la Salud. **Normas, pautas y procedimientos para el diagnóstico y control**. Caracas, 2019a. 196 p.

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.

PASTOR-SANTIAGO, J. A. et al. American visceral leishmaniasis in Chiapas, Mexico. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 1, p. 108, 2012.

PEIXOTO, H. M.; DE 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.

PENAFORTE, K. M. et al. Leishmania infection in a population of dogs: an epidemiological investigation relating to visceral leishmaniasis control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 592-596, 2013.

PIMENTEL, D. S. *et al.* Prevalence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs in an endemic area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, MG, v. 48, 26 jun. 2015.

PIRMEZ, C. et al. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 38, n. 1, p. 52-58, 1988.

QUARESMA, P. F. et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 10, p. 579-585, 2011.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Transmissores de Leishmaniose tegumentar americana. In: **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, cap. 6, P. 291-309, 2003

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J. C.; DAVIES, C. R. The transmission dynamics of canine American cutaneous leishmaniasis in Huánuco, Peru. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 69, n. 5, p. 473-480, 2003.

RIBEIRO, R. R., et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018, p 1-12, 2018.

SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 11, p. 1668–1679, 2011.

SANTOS, J. M. L. dos, et. al. Prevalence of anti-*Leishmania* spp antibodies in dogs from Garanhuns, in the middle scrub zone (Agreste) of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 41-45, 2010.

SCALONE, A. et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary parasitology**, v. 104, n. 4, p. 275-285, 2002.

SERRA, C. et al. Leishmaniose tegumentar canina em Morada das Águias (Serra da Tiririca), Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 1877-1880, 2003.

SILVA V. T. da et al. *Leishmania braziliensis*: Strain-specific modulation of phagosome maturation." **Frontiers in cellular and infection microbiology** v. 9, p. 319-326, 2019.

SILVA, D. A. et al. Geographical expansion of canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.57, n.5, p.435-438, 2015.

SILVA, F. L. Lesões genitais em cadelas naturalmente infectadas com *Leishmania chagasi* e soroconversão de cadelas acasaladas com cães portadores. **Escola de Veterinária: UFMG**, Belo Horizonte, 2007.

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

SOCCOL, V. T. et al. A new focus of cutaneous leishmaniasis in the central area of Paraná State, southern Brazil. **Acta tropica**, v. 111, n. 3, p. 308-315, 2009.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

WHO World Health Organization. **Control of the Leishmaniases**. Geneva, mar. 2010.

ZANETTE, M. F. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 105-107, 2014.

ZERPA, O. et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 13, p. 239-245, 2003.

CAPÍTULO 1

Detecção de anticorpos contra *Leishmania* spp. pela técnica de ELISA indireta em população canina do município de João Neiva - ES

Antibody detection to *Leishmania* spp. by the indirect ELISA technique in a canine population of the municipality of João Neiva - ES

ANDRADE, W. A¹; SELVA, A, F, F;¹ ZANINI, M, S¹.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Centro de Ciências Agrárias e de Engenharias (CCA), Av. Alto Universitário, sem número, Guararema, 29.500-000 Alegre, ES, Brasil.

Artigo científico a ser apresentado a revista **Cadernos de Saúde Pública**, ISSN 1678-4464, <http://cadernos.enp.fiocruz.br/csp/>.

Resumo: A leishmaniose é uma zoonose vetorial de alta complexidade clínica, biológica e epidemiológica, multifatorial, dinâmica e imprevisível, constituindo um grave problema de saúde pública. Os cães em áreas endêmicas são amplamente infectados e descritos em vários relatos como possíveis reservatórios. Sua prevalência varia dependendo de características geoclimáticas, método diagnóstico empregado e sintomatologia do animal. Para diagnóstico de rotina da leishmaniose, são utilizados testes sorológicos. Diante ao risco de transmissão da zoonose e a importância do cão para a enfermidade, o presente trabalho, realizou uma amostragem sorológica canina no município de João Neiva, estado do Espírito Santo, quando foi realizada punção sanguínea de 344 cães, abrangendo região rural, urbana e distritos considerando diferentes variáveis epidemiológicas. A avaliação sorológica foi realizada pela técnica de ELISA indireta, detectando 67 animais (19,76%) reagentes. As características deste grupo positivo foram compostas por 55,22% fêmeas e 44,77% machos, caninos predominantemente com idade entre 1 a 4 anos, assintomáticos e residentes no meio rural do município. Os resultados indicam que há circulação de *Leishmania* spp. no município estudado.

Palavras-chaves: Leishmaniose. Prevalência. Sorologia.

5. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é causada por protozoário da família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania* e são agrupadas em subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. São intracelulares obrigatórios com ciclo de vida heteroxênico, necessitando de vetores para completar seu ciclo biológico^{1,2}. São divididos em duas formas clínicas, visceral e tegumentar^{3,4}.

A forma mais patogênica, a Leishmaniose Visceral (LV), é uma doença sistêmica e com alta letalidade. Na América Latina, há maior prevalência da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*³. Em relação a Leishmaniose Tegumentar (LT), são encontrados nas Américas, um total de 8 espécies, com tropismo cutâneo causadora de doença em humanos e animais^{4,2}. No Brasil as principais espécies causadoras são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*⁴.

As leishmanioses apresentam distribuição mundial, exceto na Oceania, e casos são reportados nos continentes Africano, Asiático e Americano. Nas Américas, 18 países relatam casos das leishmanioses, entre eles o Brasil ^{4,5}.

As leishmanioses são um problema de saúde pública por se tratarem de uma zoonose com grandeza e complexidade clínica, biológica e epidemiológica. Afeta, em sua maioria, a parcela mais pobre da população, sobretudo países em desenvolvimento, sendo assim uma doença negligenciada ⁶. A interação presente entre os hospedeiros e o protozoário é complexa, multifatorial e dinâmica, podendo sofrer constantes alterações e decorrer de intercorrências do meio ambiente ^{4,2}. Para perpetuar seu ciclo biológico, o parasito tradicionalmente necessita do repasto sanguíneo do vetor flebotomíneo, de gênero *Lutzomya* em hospedeiro suscetível ^{7,8}. A sobrevivência do protozoário está estritamente ligada à distribuição de seu vetor que, por sua vez, sofre influência de fatores geoclimáticos ^{7,9,10}. Os flebotomíneos possuem biotipos diversificados, com hábitos domiciliares e peridomiciliares e distribuição em quase todo o território brasileiro ³.

Os parasitas do gênero *Leishmania* são descritos em vários mamíferos silvestres e domésticos, entre eles, o cão ^{11,8}. Os animais infectados podem cursar de forma clínica ou assintomática, dependendo da resposta imune do indivíduo ².

A LV é endêmica em 12 países da América Latina, entretanto, 96% do total de casos, são reportados pelo Brasil ⁶, onde é registrada alta letalidade. Segundo pesquisas realizadas, houve expansão territorial da doença, tendo ampla distribuição de casos nas regiões do nordeste, sudeste e centro-oeste no país ³. A LV em humanos é classicamente associada a presença de cães como reservatórios do parasito. Entretanto, em relação a LT, os autores questionam o cão como reservatório natural ou acidental ^{12,13,14,15}. A LT em humanos está distribuída em 85 países, constituindo-se também, um problema de saúde pública. A LT está entre as seis doenças infecciosas de maior destaque no planeta, devido à alta taxa de incidência e capacidade de causar deformidade ao homem. A alta prevalência da LT é associada ao desmatamento, exploração dos recursos naturais, expansão agrícola e migração de populações ^{4,10}.

O Ministério da Saúde (MS) recomenda, para o diagnóstico de leishmaniose em cães, testes sorológicos, sugerindo o exame imunocromatográfico para triagem, e ensaio imunoenzimático (ELISA) como confirmatório ⁹. A técnica de ELISA possui diferentes modalidades de execução, mas possuem em comum o método de

revelação da formação do complexo antígeno+anticorpo com uso de enzima ligada ao anticorpo secundário (anti anticorpo) que reage ao cromógeno adicionado ao final da reação ^{16,17}. Os testes sorológicos são amplamente utilizados devido a facilidade de execução, boa precisão diagnóstica e podem ser realizados para estudos epidemiológicos. Sua principal limitação ocorre por possíveis reações cruzadas, principalmente entre as espécies de *Leishmania* e/ou espécies de *Trypanosoma* spp ².

No estado do Espírito Santo, casos de leishmaniose em humanos são registrados através do Sistema de informação de agravos de notificação (SINAN)¹⁸, onde para LV, verificou-se que os municípios de Colatina, Aracruz e Baixo Guandu, apresentaram ao menos um ou mais casos positivos desde 2015. Esses municípios são limítrofes ou fazem parte da região do município de João Neiva, onde não ocorreu, qualquer registo para LV nesse mesmo período. Além de afetar todos os estados da Federação, a LT é amplamente distribuída no estado do Espírito Santo, principalmente em zonas rurais ^{13,19}. No município de João Neiva, assim como os municípios limítrofes (Aracruz, Ibirapu, Linhares e São Roque do Canaã), apresentam casos confirmados em humanos entre os anos de 2014 até 2020 ¹⁸.

Assim, considerando a relevância das leishmanioses para a saúde pública, sua distribuição variada e influência direta de fatores geográficos locais, somados ao limitado senso epidemiológico canino local, o presente estudo teve por objetivo fazer prospecção de leishmaniose nos cães em áreas rurais e urbanas no município de João Neiva, visando melhor compreensão epidemiológica da doença na região e respaldar os poderes públicos para medidas sanitárias.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Área de estudo

A região do estudo foi o município de João Neiva (Figura 1), localizado na região central do Estado do Espírito Santo. Com altitude variada entre 60 até 1090 metros, João Neiva possui área de 281km², abriga uma população estimada de 16.946 habitantes, de clima tropical com temperaturas entre 18°C e 31°C e Mata Atlântica

como vegetação característica. Seu território faz divisa com os municípios de Ibirapu, ao sul, Colatina, ao norte, Aracruz e Linhares, ao leste, e Santa Teresa e São Roque do Canaã, ao oeste. Pertence a região da bacia do Rio Doce, tendo uma hidrografia abundante, destacando-se os rios Piraqueaçu, Pau Gigante, Ubás e Triunfo. O estudo foi realizado em localidades pertencentes à zona rural, distritos e zona urbana do município de João Neiva.

Figura 9: Mapa demonstrando a localização do município de João Neiva – ES.



Fonte: IBGE

6.2 População de estudo

Os protocolos e procedimentos foram realizados de acordo com a conduta preconizada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a execução dos mesmos foi condicionada à aquisição prévia do parecer favorável da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo sob o número de protocolo 20/2018.

A população de cães vacinados no município contra raiva (2021), indicou uma população aproximadamente de 1894 animais. A coleta de sangue foi realizada em 344 cães (175 fêmeas/169 machos) com apoio da vigilância sanitária do município, durante os anos de 2020 a 2022. Os tutores dos animais foram informados a respeito do estudo e permitiram a punção sanguínea dos animais pelo Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os cães foram contidos fisicamente e coletado, no mínimo, 2 ml de sangue em veia cefálica. No momento da coleta de sangue, foi realizada inspeção visual nos cães e anotado dados como: escore corporal, separados numericamente de 1 a 5, onde 1 é o indivíduo caquético e 5 obeso. Nessa escala, sendo o escore 3, o padrão ideal ²⁰. Foi observado a presença de onicogribose e dermatopatias como alopecia, lesões superficiais, pelos opacos, e outros achados. Quando deste exame, foi perguntado ao tutor se o cão era autóctone e se haviam outros animais domésticos contactantes com o mesmo. Posteriormente a coleta, foi realizada a separação do soro, através de centrifugação por 5 minutos em alta rotação, e acondicionados em microtubos estéreis. Esses foram identificados e congelados a – 20 °C. Amostras de soro lipêmicas e hemolisadas foram descartadas

Após procedimento de coleta de todas as amostras, as mesmas foram para laboratório de microbiologia na Universidade Federal do Espírito Santo, em Alegre - ES para serem analisadas.

6.3 Antígenos para a realização dos testes sorológicos

A obtenção da fração solúvel de antígenos utilizados no teste sorológico foi segundo Ribeiro et al. (2007) utilizando a fase estacionária das culturas *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) fornecidas como amostras referência pelo Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose – FIOCRUZ.

6.4 Técnica de ELISA indireta

Foi padronizada a técnica de ELISA indireta de acordo com Ribeiro et al. (2007) a fim de detectar anticorpos na presença de antígeno de *Leishmania* spp. fixados em

placas de poliestireno com 96 poços, na concentração de 1,1 mg/mL diluído em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6. A técnica tem início com a fixação de antígeno solúvel de *Leishmania* spp. nos poços da placa por 12 horas até 15 horas por 4 °C, seguido de lavagem (4x) com solução salina (NaCl) adicionada de tensoativo hidrofílico polisorbato 20 (Tween 20) a 0,05% (solução de lavagem). Após a etapa de fixação, foi realizado o bloqueio para evitar reações inespecíficas com 100µL/poço de solução de bloqueio contendo 616 µL soro fetal bovino (SFB) e 10 mL de PBS-1X e incubação por 45 minutos à 37 °C. Seguiu-se com a lavagem da placa duas vezes com solução de lavagem. Em seguida, foi adicionado os soros caninos a serem avaliados no volume de 100µL/poço diluídos em 1:40 em PBS-T.

Após 45 minutos de incubação à 37 °C, as placas foram lavadas cinco vezes e em seguida foram adicionados 100µL/poço de anti-IgG de cão conjugada à peroxidase (Sheep anti-dog IgG2 HRP conjugated) (A40-121P, Bethyl Laboratory Inc., Montgomery, TX) diluída a 1:4000 em PBS-T, sendo novamente incubada. Após a incubação por 45 minutos à 37 °C, foram realizadas novamente, cinco lavagens. A revelação foi feita com 100µL/poço de solução contendo 9 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30% e 0,01 mg de orto-fenilenodiamina (OPD/SIGMA) em 15 mL de tampão citrato-fosfato (ácido cítrico – C₆H₈O₇; fosfato de sódio dibásico – Na₂HPO₄) pH 5,0 com incubação à 37 °C por 10 minutos. A reação foi interrompida após 10 minutos com 32µL por poço de solução de H₂SO₄, sendo a placa lida imediatamente em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490nm.

A determinação da reatividade baseou-se em leituras superiores ao ponto de corte (cut off) calculado como a média da densidade óptica dos soros de 3 cães negativos (controles negativos) mais três vezes o desvio-padrão da densidade óptica desses soros.

6.5 Análise estatística

Testes diversos foram aplicados, com intuito de avaliar se a amostragem da população foi representativa e a ocorrência de associação entre os animais soropositivos e as diferentes variáveis epidemiológicas. Afim de identificar se existe uma associação entre o resultado sorológico positivo para leishmaniose e as variáveis do banco de dados, foram utilizados para as variáveis categóricas o teste Qui-

Quadrado de Pearson e o Teste exato de Fisher quando necessário e o teste T. Para avaliar o efeito da associação foi calculado o *Odds Ratio* ou Razão de Chances para variáveis categóricas binárias (2 respostas possíveis).

As variáveis analisadas foram: idade, sexo, sintomatologia, escore corporal, local de residência e contactantes. Todas as variáveis foram analisadas entre os caninos sororreagentes e não reagentes ao teste de ELISA para a pergunta a ser respondida. Para a avaliação estatística, para as variáveis sintomatologia e local de residência foram criadas a variável hígido ou não hígido e autóctones ou não, respetivamente. Para a variável idade, foi utilizado a média de cães negativos e positivos para a estatística. Assim, as informações foram avaliadas com os seguintes testes; Teste T de Student para idade, teste exato de Fisher para estado nutricional e para as demais, o Teste Qui-quadrado de Pearson. Todos os testes foram avaliados ao nível de significância de 5%.

7. RESULTADOS

Foram avaliados 344 cães, sendo apresentados na Tabela 1, as observações epidemiológicas destes animais. Nesta população de estudo, foram registrados 67 soropositivos para leishmaniose pela técnica de ELISA indireta descrita acima.

Tabela 3: Análise descritiva das variáveis analisadas dos cães no momento da coleta sanguínea do município de João Neiva.

| Variável | Número | Porcentagem (%) |
|--------------|------------|-----------------|
| Total | 344 | 100 |
| • Localidade | | |
| Zona rural | 189 | 54,94 |
| Distritos | 108 | 31,40 |
| Zona urbana | 47 | 13,66 |
| • Sexo | | |
| Fêmea | 175 | 50,87 |
| Macho | 169 | 49,13 |
| • Idade | | |
| < 1 | 29 | 8,43 |
| 1 – 4 | 197 | 57,26 |

| | | |
|-----------------------|-----|-------|
| 5 – 9 | 87 | 25,29 |
| > 10 | 21 | 6,10 |
| Não informado | 10 | 2,90 |
| • ECC | | |
| Escore 1 | 0 | 0 |
| Escore 2 | 66 | 19,19 |
| Escore 3 | 259 | 75,29 |
| Escore 4 | 19 | 5,52 |
| Escore 5 | 0 | 0 |
| • Sintomatologia | | |
| Alopecia | 19 | 5,52 |
| Dermatites | 23 | 6,69 |
| Pelos opacos | 6 | 1,74 |
| Onicogrífose | 2 | 0,58 |
| Outros achados | 5 | 1,45 |
| • Local de residência | | |
| Autóctones | 288 | 83,72 |
| Alóctones | 56 | 16,28 |
| • Contactantes | | |
| Presente | 263 | 76,45 |
| Ausente | 81 | 23,55 |

Fonte: Autor.

Quanto a confiabilidade da amostragem realizada, foi utilizado como parâmetro da população de cães, animais vacinados contra raiva canina, registrando 1894 cães vacinados em 2021. Assim, uma amostra significativa para a população com uma margem de erro de 5% e intervalo de confiança de 95% seria minimamente de 322 cães, sendo que a amostragem realizada de 344 superou este número.

Para o local de residência dos cães avaliados (Tabela 2), foram verificados 189 (54,94%) de zona rural, 108 (31,4%) distritos e 47 (13,66%) de zona urbana. Entretanto, entre o somatório de cães de domicílio urbano mais distritos, foram registrados 42/67 (63,33%) cães soropositivos, enquanto o domicílio rural implicou em 25/67 (37,31%) soropositivos, indicando que nesta região, a residência em meio rural não é fator predisponente para sorologia positiva para leishmaniose.

Tabela 4: Análise dos cães sororreagentes ao teste de ELISA indireto divididos por localidade.

| Variável | Número de cães coletados | Número de cães sororreagentes |
|----------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Total | 344 | 67 |
| Localidade | | |
| • Zona rural | | 25 |
| Córrego Santa Helena | 9 | 1 |
| Rio Triunfo | 11 | 1 |
| Rio Ubás I | 7 | 3 |
| Valada da Manhã | 5 | 1 |
| Córrego São Pedro | 5 | 1 |
| Valada de Cavalinho | 8 | 4 |
| Morro do Feijão | 9 | 4 |
| Margem estrada | 17 | 2 |
| Juá | 13 | 1 |
| Rio Clotário | 11 | 2 |
| Rio Sauna | 4 | 1 |
| Rio Ubás II | 9 | 2 |
| • Distritos | | 33 |
| Acioli | 18 | 8 |
| Barra do Triunfo | 7 | 1 |
| Cavalinho | 16 | 6 |
| Santo Afonso | 21 | 5 |
| Cristal | 29 | 13 |
| Piraqueaçu | 13 | 2 |
| • Zona urbana | | 9 |
| Floresta | 15 | 6 |
| Crubixá | 10 | 1 |
| Caboclo Bernardo | 6 | 1 |
| Vila Nova de Cima | 7 | 1 |

Fonte: Autor.

O número de animais coletados quanto ao sexo (Tabela 1), foram 175 (50,87%) fêmeas e 169 (49,13%) machos, bem como, os resultados para gênero, entre animais soropositivos (67 animais) foi 30/67 (17,3%) machos e 37/67 (22,1%) fêmeas. Estes resultados, demonstram que, a chance de um cão ser testado positivo para leishmaniose dentro do sexo feminino foi 1,36 vezes maior do que a chance de ser sexo masculino.

A maioria dos animais do estudo, 197 (57,26%), pertenciam a faixa etária entre 1 a 4 anos, seguido de 87 (25,29%) cães entre 5 a 9 anos. Menores de 1 ano, com 29 animais (8,43%), mais de 10 anos, com 21 animais (6,1%) e 10 animais não foi informada a idade (2,9%). Entre os sororreagentes, 41 caninos (21,81%) tinham entre 1 a 4 anos de idade, 17 (19,54%) entre 5 a 9 anos de idade, 6 (28,57%) mais que 10

anos de idade, 2 (6,89%) menos de 1 anos de idade e 1 cão (10%) não teve a idade informada. Entretanto, utilizando o Teste T, e verificando o p-valor maior que 0.05 conclui-se que, idade e positivo para leishmaniose não possuem associação. (ajustar para melhor entender, deixar claro que são analisados dentro do mesmo grupo de idade).

Ao realizar-se a avaliação do Escore de Condição Corporal (ECC), percebe-se que a maioria dos animais, 259 (75,29%), apresentava classificação ideal (ECC-3), seguido de 66 animais (19,19%) em condição de subalimentados (ECC 2) e 19 animais (5,52%) sobrealimentados (ECC 4). Dentro desse grupo, os sororreagentes foram: 49 caninos (20,1%) apresentavam ECC-3, padrão ideal. Apenas 8 (12,3%) apresentavam escore 2 e 6 (31,6%) escore 4. Ao aplicar o teste exato de Fisher, recomendado pela literatura para este tipo de variável, e sendo observado p-valor do teste maior do que 0.05, conclui-se que não existe associação entre as variáveis de estado nutricional (escore) e positivo para leishmaniose.

Entre a sintomatologia no grupo total de cães avaliados, foram encontrados em 19 cães (5,52%) alopecia, 23 cães (6,69%) lesões variadas, 6 cães (1,74%) com pelos opacos, 2 cães (0,58%) com onicogribose e 5 cães (1,45%) com outros achados. Para os cães sorologicamente reagentes, a presença de sintomatologia representou 16% dos cães, sendo 4 cães com alopecia, 3 alguma lesão e 1 outros achados. Nenhum apresentava onicogribose ou pelos opacos. Considerando esses achados, 59 caninos eram hígidos (20,2%) e 8 não hígidos (16%). Para a variável sintomatologia, considerando os p-valores, conclui-se que não existe associação entre dermatopatias e sorologia positiva para leishmaniose, pois a maioria dos cães soropositivos eram hígidos, uma vez que, a chance de um cão ser testado positivo para leishmaniose dentro do grupo hígido é 1,33 vezes.

Quanto aos contactantes, os tutores informaram que 263 (76,45%) tinham contato com outro animal doméstico enquanto 81 (23,55%) não possuíam. Dos casos sorologicamente reagentes, 48 cães (17,4%) tinham pelo menos um, enquanto 19 (28,4%) não tinham nenhum animal com contato direto.

Quando consultado aos tutores, a origem dos cães, 288 (83,72%) foram indicados como autóctones da região e 56 (16,28%) provenientes de locais diversos. Para esta variável associada à soropositividade, 56 (19,5%) deles sempre moraram naquele local, enquanto 11 (19,6%) eram provenientes de outras regiões.

O efeito de associação dos dados de local de moradia, escore corporal, sintomatologia e contactantes e avaliação pela *Odds Ratio* para variáveis categóricas binárias (2 respostas possíveis), estão representados na Tabela 3.

Tabela 5: Análise de associação descritiva dos cães avaliados do município de João Neiva.

| Variável | | Positivo | | Negativo | | p-valor | OR | IC |
|-------------------------|-----|----------|-------|----------|-------|----------|------|---------------|
| | | n | % | n | % | | | |
| Idade | | 67 | 19,76 | 268 | 80,24 | p=0,3657 | - | - |
| Sexo | F | 38 | 22,1 | 134 | 77,9 | p=0,3255 | 1,36 | (0,79 a 2,33) |
| | M | 29 | 17,3 | 139 | 82,7 | | | |
| Sintomatologia (hígido) | sim | 59 | 20,2 | 233 | 79,8 | p=0,6174 | 1,33 | (0,59 a 2,98) |
| | não | 8 | 16 | 42 | 84 | | | |
| Escore corporal | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | p=0,2084 | - | - |
| | 2 | 8 | 12,3 | 57 | 87,7 | | | |
| | 3 | 49 | 20,1 | 195 | 79,9 | | | |
| | 4 | 6 | 31,6 | 13 | 68,4 | | | |
| | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| Autóctones | sim | 56 | 19,5 | 231 | 80,5 | p=1 | 0,99 | (0,48 a 2,04) |
| | não | 11 | 19,6 | 45 | 80,4 | | | |
| Contactantes | sim | 48 | 17,4 | 228 | 82,6 | p=0,063 | 0,53 | (0,29 a 0,98) |
| | não | 19 | 28,4 | 48 | 71,6 | | | |
| Total | | 67 | | 276 | | | | |

Fonte: Autor.

8. DISCUSSÃO

No Espírito Santo, segundo a Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo (SESA) entre os anos de 2007 e 2015 foram registrados 46 casos em humanos de LV, sendo que cinco evoluíram para óbito. Ainda de acordo com a SESA, os municípios que registraram as maiores ocorrências são: Baixo Guandu, Pancas e Cariacica, respectivamente ¹⁸.

A porta de entrada da LV no estado do Espírito Santo foi relatada em municípios que fazem parte da região da bacia do Rio Doce, sendo os municípios de Baixo Guandu e Colatina ²¹. Posteriormente, a doença se expandiu, atingindo municípios como Águia Branca, Água Doce do Norte, São Gabriel da Palha, Baixo Guandu, Governador Lindenberg, Itaguaçu, Itarana, Nova Venécia, Pancas e São

Roque do Canaã ²². O município de João Neiva faz parte da bacia do Rio Doce, é limítrofe de municípios sabidamente positivos (Colatina e São Roque do Canaã) e localiza-se próximo de Baixo Guandu. Com isso, os resultados do presente estudo podem indicar continuidade da expansão da doença pelo território do Espírito Santo e informar a importância da bacia do Vale do Rio Doce para a distribuição da leishmaniose.

Sabendo-se da importância do vetor para a distribuição da LV, foram realizados estudos para avaliar variáveis geoclimáticas que viessem a influenciar a distribuição dos flebotomíneos no Estado. Com isso, foram apontados que os municípios endêmicos compartilhavam características como: relevo acidentado, altitude de até 450 metros acima do nível do mar, afloramentos rochosos e clima seco ²³. Tais características descritas, também estão presentes no município do presente estudo, onde são encontrados relevos acidentados e irregulares com a grande maioria dos distritos e bairros situados em altitudes baixas a médias.

Ainda visando o vetor da LV, fora realizado estudo sobre a distribuição deste nos municípios endêmicos e adjacentes a eles. Onde foi possível encontrar a presença de *Lutzomyia longipalpis* em municípios não antes relatados como João Neiva, Afonso Cláudio, Mantenópolis, Rio Bananal, Santa Teresa e Vila Pavão ²⁴. Estas informações regionais, indicam o município de João Neiva com potencial para apresentar humanos e caninos infectados pelo agente da LV, uma vez que, o vetor encontra-se no ambiente.

Particularmente, a LT vem apresentando um aumento de prevalência no Estado ²⁵. Surto com número de casos significativos tem sido registrados. Em Ibatiba (ES), foram registrados 21 casos (SESA-ES) durante o ano de 2017, quando foi declarada situação de emergência por causa da doença. Enquanto que, no município de Muqui (ES), no ano de 2019, foram confirmados seis casos de LT no distrito de Desengano.

Quanto aos vetores de LT, estudo no município de Lúna (ES) ²⁶, verificou a infecção por *L. (V.) braziliensis* em 5% dos vetores avaliados pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), observando-se o Índice de Dominância 0,56 e a presença de 96,42% de espécies com capacidade vetorial no peridomicílio, indicou-se atenção especial ao município, incluindo nesse aspecto a vigilância entomológica, uma vez que o mesmo apresenta condições favoráveis para transmissão da doença.

Estudo realizado no Espírito Santo, observando casos positivos da LT em humanos e analisando as condições geoclimáticas das regiões, referenciaram que em

localidades onde as variáveis: chuva x relevo acidentado x temperatura elevada e chuva/seca x relevo acidentado x temperatura amena, são áreas típicas de ocorrência de LT ²⁷. Tais características apontadas no trabalho, são possíveis de serem evidenciadas no município do presente estudo, aumentando os indicativos da presença do vetor e, conseqüentemente, a de *Leishmania* spp. no local.

A técnica utilizada para diagnóstico neste estudo, ELISA indireta, tem sua sensibilidade e especificidade variada, dependendo principalmente do antígeno utilizado e o estado clínico do animal testado, variando de 80% a 99,5% a sensibilidade e 81% a 100% a especificidade ^{28, 12}. Afim de minimizar possíveis reações cruzadas e falsos-positivos nos resultados obtidos, foi adotado com rigor, o parâmetro de 3X o desvio padrão para indicar animais soropositivos.

Um dos pontos de grande relevância com os resultados obtidos é a geodistribuição dos casos, podendo delimitar as localidades onde há presença da infecção bem como sugerir que a mesma tem sua distribuição homogênea no município de João Neiva. Tal suposição ocorre pelo fato de terem sido coletadas amostras de 37 localidades, das 41, no interior e dessas, 18 tiveram casos positivos. Ainda pode-se dizer que a doença não apresenta sua distribuição apenas rural, uma vez que, na breve coleta na sede do município (centro e bairros ao redor), foram coletados soros caninos de 8 bairros e 4 deles tiveram animais sororreagentes.

Com os dados obtidos também foi possível notar que no município as fêmeas estão mais acometidas do que machos. Os animais soropositivos estão entre 1 ano de idade e 4 anos. Tais achados corroboram com o relatado na literatura, onde a faixa etária mais infectada era de até 3 anos de idade, mas não encontrou correlação com o sexo e a prevalência ²⁹. No presente estudo, não obteve correlação entre a variável sexo e animais positivos.

O estado nutricional da maioria dos cães positivos estava dentro do ideal (escore corporal 3/5) e em sua maioria não cursava com nenhum sinal clínico que levasse suspeita da doença. Tal achado pode acender um alerta, uma vez que mais animais podem estar positivos e sem sintomatologia, podendo servir de reservatório da doença. Ainda vale ressaltar que cães assintomáticos podem representar aproximadamente 50% dos casos positivos de *Leishmania* spp., desempenhando assim um papel muito importante em sua manutenção no ambiente ¹. No presente estudo, os animais sem sintomatologia e sororreagentes corresponderam a 20,2% e com escore corporal 3/5 corresponderam a 20,1%. Nos testes realizados não fora

encontrado associação entre a variável sintomatologia e estado nutricional e animal sororreagente.

Os dados de animais que sempre moraram na região, quanto aos cães soropositivos, 11 deles alóctones, com isso, não sabendo em qual localidade esses contraíram a doença. O dado de contactantes demonstrou que a maioria (17,4%) dos soropositivos tinham algum animal doméstico como contactante, seja ele, cão ou gato. Tal dado, quando analisado em 5% de significância não demonstra relação, mas se a significância for aumentada para 10%, cães com contactantes é um fator de risco para a distribuição da leishmaniose nos cães estudados.

O agente causador da LV nas Américas, a *Leishmania infantum*, tem o cão como principal reservatório urbano da enfermidade e, quando infectados, são altamente infecciosos para os flebotomíneos, agindo como reservatórios da doença para seres humanos ². Quanto a LT, estudos apontam o cão como um possível reservatório, onde foi demonstrado maior grau de humanos infectados onde cães também eram positivos. Foi possível ainda isolar cepas de *L. (V.) braziliensis* genotipicamente similares entre animais e humanos procedentes da mesma região ^{13, 19}. Tais achados demonstram a importância do cão como hospedeiro da *Leishmania* spp., evidenciam a importância deste trabalho e de se conhecer a distribuição da doença.

Em estudo anterior (2015) realizado no distrito Barra do Triunfo, João Neiva, foram avaliados 34 cães, onde todos foram negativos para *Leishmania* spp. em técnica de ELISA ³⁰, entretanto nossos achados, com maior abrangência amostral, indicam a presença de anticorpos para leishmaniose no grupo estudo, e por consequência, evidencia a circulação de *Leishmania* spp. bem como sua expansão territorial, incluindo para região urbanizada. Particularmente, com os achados é possível delimitar, principalmente em zona rural e distritos urbanizados, a distribuição de cães sorologicamente positivos para *Leishmania* spp..

Finalmente, este estudo indica que a região carece de novas pesquisas em relação a esta importante infecção, principalmente para determinar a espécie de *Leishmania* spp. e vetores circulantes. Ainda, o presente trabalho fornece subsídio ao poder público para implementar medidas de investigação e controle da infecção na população canina do município.

9. REFERÊNCIAS

1. OPAS. Programa de Control de Leishmaniasis. Organización Panamericana de la Salud. **Normas, pautas y procedimientos para el diagnóstico y control**. Caracas, 2019a. 196 p.
2. OPAS. Organización Panamericana de la Salud. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington, D.C.: OPS; 2019b. 200 p.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p., il.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p., il.
5. OPAS Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas**. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, 2019c.
6. OPAS Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas**. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, 2017.
7. AGUIAR G. M.; Medeiros W.M. Distribuição regional e habitats das espécies flebotomíneos do Brasil, p.207-255. In: **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.
8. GONTIJO, C.M; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v.7, n.3, p.338-49, 2004.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**: volume único [recurso eletrônico] – 3. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
10. RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Transmissores de Leishmaniose tegumentar americana. In: **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, cap. 6, P. 291-309, 2003

11. GONTIJO, B; CARVALHO, M. L. R. de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.
12. CASTRO, E. A. et al. Leishmania (*Viannia*) *braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). **Experimental parasitology**, v. 117, n. 1, p. 13-21, 2007.
13. FALQUETO, A. et al. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, V. 86, P. 499-500, 1991.
14. FALQUETO, A. et al. Participation of the dog in the cycle of transmission of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Viana, State of Espírito Santo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 155-163, 1986.
15. HEUSSER JÚNIOR, A. et al. Leishmaniose tegumentar canina no município de Balneário Camboriú, Estado de Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 713-718, 2010.
16. MANCIANTI, F. et al. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 59, n. 1, p. 13-21, 1995.
17. MANCIANTI, F.; PEDONESE, Francesca; POLI, Alessandro. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Veterinary parasitology**, v. 65, n. 1-2, p. 1-9, 1996.
18. DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (DATASUS). Doenças e Agravos de Notificação - 2007 em diante (SINAN). Disponível em: <<https://datasus.saude.gov.br/aceso-a-informacao/doencas-e-agravos-de-notificacao-de-2007-em-diante-sinan/>>. Acesso em: 10/05/2022.
19. FALQUETO, A. et al. Epidemiological and Clinical Features of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. American Cutaneous and Mucocutaneous. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1003-1010, 2003.
20. LAFLAMME, D. P. Development and validation of a body condition score system for dogs. **Canine Practice**, v.22, p.10-15, 1997
21. MARTINS, J. et al. First cases of autochthonous kala azar in the State of Espírito Santo, Brazil. **Hospital (Rio de Janeiro, Brazil)**, v. 73, n. 3, p. 745-74, 1968.
22. FALQUETO, A. et al. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 4, p. 559-565, 2009.

23. FALQUETO, A. et al. Information for specific use – case studies (p. 97 – 107). In: Natural resources information systems for rural development – Approches for Espírito Santo State, Brazil. 1ª Ed., **Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER**, 223p, ISBN-85-88024-01-2, Vitória, Espírito Santo, 2001.
24. PINTO, I. S. Associação entre variáveis geográficas e climáticas e a ocorrência de *Lutzomya longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) no estado do Espírito Santo, Brasil. 52 f. **Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo**, Brasil, 2009.
25. COSTA, M. S.; CORRADI, J. G.; DENADAI, W. Situação epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar Americana nos municípios do norte do Espírito Santo, Brasil. **Revista Científica Foz**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 15, 2019. Disponível em: <https://revista.ivc.br/index.php/revistafoz/article/view/141>. Acesso em: 30 jun. 2022.
- 26 Humberto Gripp de Faria, Laís Regina Ferreira Magnago, Gabriela dos Santos de Jesus, Yuri Vieira Almeida, Laisa Savergnini Poleze, Ana Paula Madureira, Marcos Santos Zanini. Pesquisa de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do município de Lúna, Espírito Santo. **Pubvet**, v. 13, n. 6, p. 127, 2019.
27. NASCIMENTO, G. S. S. Os Fatores Ambientais que Influenciam na Ocorrência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado do Espírito Santo. **Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo**, Brasil, 2009.
28. DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2009.
29. MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.
30. PIRES, S. P. C. Investigação da Expansão Geográfica da Leishmaniose Visceral Americana dor Meio de Inquérito de Infecção Canina dm Áreas Receptivas do Estado do Espírito Santo, Brasil. Universidade Federal Do Espírito Santo (UFES). **Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo**, Brasil, 2015.