

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**INQUÉRITO SOROEPIDEMIOLÓGICO PARA LEISHMANIOSE  
VISCERAL CANINA EM MUNICÍPIOS NA GRANDE VITÓRIA,  
ESPÍRITO SANTO - BRASIL**

**JOYCE DANIELA FRANCISCO BITTENCOURT**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO/2023**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**INQUÉRITO SOROEPIDEMIOLÓGICO PARA LEISHMANIOSE  
VISCERAL CANINA EM MUNICÍPIOS NA GRANDE VITÓRIA,  
ESPÍRITO SANTO - BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

**JOYCE DANIELA FRANCISCO BITTENCOURT**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO/2023**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

B624i Bittencourt, Joyce Daniela Francisco.  
Inquérito Soroepidemiológico para Leishmaniose  
Visceral Canina em Municípios na Grande Vitória, Espírito Santo -  
Brasil / Joyce Daniela Francisco Bittencourt. – 2023.  
34 f. : il.

Orientadora: Hélio Langoni.  
Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade  
Vila Velha, 2023.  
Inclui bibliografias.

1. Medicina veterinária. 2. Leishmaniose visceral. 3. Zoonoses.  
4. Cães – Doenças. I Langoni, Hélio. II. Universidade Vila Velha.  
III. Título.

CDD 636.89

**JOYCE DANIELA FRANCISCO BITTENCOURT**

**Inquérito soroepidemiológico para leishmaniose visceral canina em municípios na Grande Vitória, Espírito Santo - Brasil**

Dissertação/Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestra em Ciência Animal.

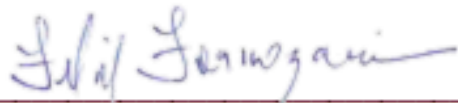
Aprovada em 22 de fevereiro de 2023,

Banca Examinadora:



---

**Prof. Dr. Gabriel Augusto Marques Rossi (Universidade Vila Velha)**



---

**Prof. Dr. Felipe Fomazari (Unesp-Botucatu)**



---

**Prof. Dr. Hélio Langoni (Unesp-Botucatu)**

**Orientador**

## **DEDICATÓRIA**

*Em memória da minha avózinha Dirce.*

*“Não sei se a vida é curta ou longa demais para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas.”*

*(Cora Coralina)*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, que me apoiaram durante toda a minha trajetória, me cobrindo de amor, carinho e incentivo.

Aos meus irmãos Marcelo e Bárbara, por todo suporte e momentos de descontração. A hora de vocês irá chegar e contem comigo para os momentos dos surtos que sempre estão presentes na vida acadêmica (risos).

Agradeço à quarta-feira das amigas e à quinta “fire”, que proporcionaram encontros com amizades verdadeiras e que foram essenciais nessa fase.

A toda equipe de residentes da área de Zoonoses e Saúde Pública do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ-UNESP Botucatu, pelo acolhimento e auxílio na realização da parte experimental da pesquisa.

Agradeço a FAPES pelo fomento ao desenvolvimento científico, que permitiu a realização dessa pesquisa.

Aos meus queridos professores Fábio Braga e Emy Hiura, que me acompanharam desde a graduação e continuam me ensinando e orientando em todos os passos da minha carreira.

Agradeço ao meu orientador Hélio Langoni, por toda paciência, carinho e conhecimentos transmitidos nesse período.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUÇÃO .....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1. ETIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	5
2.2. VETOR DA LEISHMANIOSE VISCERAL .....	6
2.3. CICLO BIOLÓGICO .....	7
2.4. HISTÓRICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL.....	8
2.5. IMPORTÂNCIA DOS CÃES PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL E APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA.....	13
2.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LVC.....	13
2.7. TRATAMENTO .....	15
2.8. MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DA LEISHMANIOSE CANINA	17
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. COMITÊ DE ÉTICA.....	19
4.2. AMOSTRA POPULACIONAL E ÁREA DE ESTUDO.....	19
4.3. REAÇÃO DE IMUNUFLUORESCENCIA INDIRETA (RIFI) .....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
6. CONCLUSÕES .....	27
7. REFERÊNCIAS.....	28

## RESUMO

FRANCISCO BITTENCOURT, JOYCE DANIELA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2023. **Inquérito Soroepidemiológico para Leishmaniose Visceral Canina em Municípios na Grande Vitória, Espírito Santo - Brasil.** Orientador: Hélio Langoni.

As Leishmanioses são um conjunto de doenças infecto-parasitárias causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania*. A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é provocada pela espécie *Leishmania chagasi* e é transmitida por flebotomíneos hematófagos, sendo os mosquitos da espécie *Lutzomyia longipalpis* os principais vetores no Brasil. A LV é uma zoonose que ocorre em mamíferos, principalmente caninos e humanos. A apresentação clínica da varia de acordo com a cepa do agente e da relação hospedeiro-parasita, os sinais clínicos observados nos cães acometidos são lesões e descamações na pele, linfadenomegalia, onicogrifose e emagrecimento progressivo, podendo progredir ao óbito. O objetivo do projeto foi realizar um estudo transversal na população canina dos municípios da Região da Grande Vitória, Espírito Santo - Brasil. Avaliou-se a prevalência da Leishmaniose Visceral nessa região, por meio de testes sorológicos (RIFI), além de caracterizar os fatores de risco associados a infecção canina. Foram analisadas 154 amostras, selecionadas pela amostragem por conveniência. Destas, 61,8% dos animais eram oriundos do município de Vila Velha, 27,9% do município de Vitória, 5,8% do município de Serra e 4,5% do município de Cariacica. Os cães possuíam idades variando de um mês a 17 anos, com idade média de 6,5 anos. Nos ensaios sorológicos não foi evidenciado a presença de anticorpos anti-*Leishmania* na população de estudo. Confirmou-se que, até o momento, a região de pesquisa é não endêmica para a Leishmaniose Visceral Canina.

**Palavras chaves:** Leishmaniose Visceral Canina, Vigilância, Sorologia, Cães, *Lutzomyia longipalpis*, Zoonose.



## ABSTRACT

FRANCISCO BITTENCOURT, JOYCE DANIELA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2023. **Seroepidemiological Survey for Canine Visceral Leishmaniasis in Municipalities in Greater Vitória, Espírito Santo - Brazil.** Advisor: Hélio Langoni.

The Leishmaniases are a group of infectious and parasitic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Visceral leishmaniasis (VL), or calazar, is caused by the species *Leishmania chagasi* and is transmitted by hematophagous sandflies, the main vectors in Brazil being the *Lutzomyia longipalpis* sandfly. VL is a zoonosis that occurs in mammals, mainly canines and humans. The clinical presentation of VL varies according to the strain of the agent and the host-parasite relationship. The clinical signs observed in affected dogs are skin lesions and scaling, lymphadenomegaly, onychogryphosis and progressive weight loss, which may progress to death. The objective of the project was to carry out a cross-sectional study in the canine population of the municipalities of the Grande Vitória Region, Espírito Santo - Brazil. To evaluate the prevalence of Visceral Leishmaniasis in this region, through serological tests (RIFI), and to characterize the risk factors associated with canine infection. We analyzed 154 samples, selected by convenience sampling. Of these, 61.8% of the animals were from Vila Velha, 27.9% from Vitória, 5.8% from Serra and 4.5% from Cariacica. The dogs' ages ranged from one month to 17 years, with an average age of 6.5 years. In serological assays, the presence of the anti-*Leishmania* antibodies was not evidenced in the study population. Confirming that, to date, the research region is non-endemic for Canine Visceral Leishmaniasis.

**Keywords:** Canine Visceral Leishmaniasis, Surveillance, Serology, *Lutzomyia longipalpis*, Zoonosis.

## 1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são um conjunto de doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Atualmente, no Brasil, existem dois tipos, a tegumentar e a visceral. A Leishmaniose Tegumentar provoca lesões na pele e/ou mucosas. A Visceral, chamada de Calazar, tem caráter crônico, sistêmico – acomete fígado, baço e medula óssea – e apresenta alta letalidade de indivíduos não tratados (cerca de 90% dos casos resultam em óbito) (BRASIL, 2014; OPAS/OMS, 2021).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica o agravo como doença infecciosa negligenciada (DIN) e estima-se que mais de um bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas e susceptíveis à infecção, com cerca de 30.000 novos casos de Leishmaniose Visceral registrados anualmente. As DIN estão associadas a fatores ambientais e socioeconômicos, como pobreza, destruição do meio ambiente, dificuldades de acesso ao sistema de saúde e outros (MOREL, 2006; OPAS/OMS, 2018, WERNECK, 2010).

A Leishmaniose Visceral está amplamente distribuída no mundo e ocorre predominantemente na África, América Latina e Ásia. Em 2021, a OMS registrou casos da doença em 81 países, em que 89% destes eram oriundos do Brasil, Eritreia, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (OPAS/OMS, 2021)

Segundo informe divulgado pela Organização Pan-Americana da Saúde (2021), a LV é considerada endêmica em 13 países das Américas. No período entre 2001 e 2020 foram registrados 67.922 novos casos. Em 2020, o Brasil foi responsável por 97% (1.933) dos incidentes (OPAS/OMS, 2021).

A princípio, a Leishmaniose Visceral era caracterizada como uma endemia rural tendo os animais silvestres como reservatórios. Porém, na década de 1980 com processo de peri-urbanização e urbanização da doença, o cão passa a ter um papel fundamental na epidemiologia da doença. Visto que é a principal fonte de infecção no ambiente urbano e que Leishmaniose Visceral Canina (LVC) precede os casos em humanos, a espécie canina caracteriza-se como reservatório (BRASIL, 2014)

Até a década de 1990, a maioria dos relatos de LV eram feitos na região Nordeste, que concentrava cerca de 90% dos casos registrados (COSTA, 1990;

WERNECK, 2010). Entretanto, a doença apresenta uma onda crescente de casos em todo país, principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, com ênfase para os municípios dos estados de Minas Gerais (Belo Horizonte), Mato Grosso do Sul (Campo Grande) e São Paulo (Araçatuba e Bauru), que registraram altas taxas da LVC e posterior relatos em humanos (ANTONIALLI et al., 2007).

No Espírito Santo, foram reportados os cinco primeiros casos de leishmaniose visceral em humanos no ano de 1966 (MARTINS et al., 1968). Segundo a Secretaria Estadual de Saúde (SESA) os municípios com maior quantidade de casos confirmados são Baixo Guandu, Pancas e Cariacica. A LV é endêmica em 10 municípios localizados nas regiões centro-oeste e noroeste do estado do Espírito Santo (PINTO et al., 2012).

Em decorrência do elevado potencial de expansão, visto a proximidade à regiões endêmicas e a ausência de controle do trânsito de animais dessas áreas, severidade da doença e da sua importância para a Saúde Pública, é necessário que sejam promovidas Medidas de Vigilância – entomológica, do reservatório e humana – como inquéritos soropidemiológicos, a fim de caracterizar a disseminação da doença e auxiliar a traçar estratégias de prevenção e controle de acordo a realidade encontrada em tais municípios.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

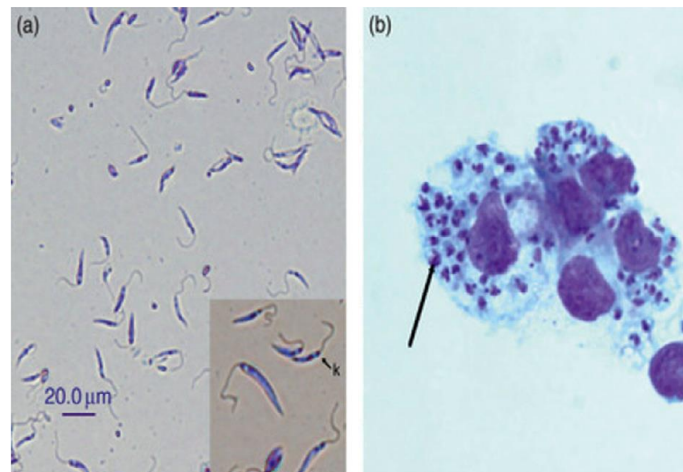
### 2.1. ETIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A Leishmaniose Visceral Canina é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. Estes são caracterizados pela presença de uma mitocôndria única, denominada cinetoplasto, que alberga o DNA mitocondrial (kDNA). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros, *Leishmania* (que inclui os complexos tropica, major, donovani e mexicana) e *Viannia* (que compreende os complexos braziliensis, guyanensis e lainsoni) (MAGILL, 2015; AKHOUNDI et al., 2016; MELBY; TRAVI; OSORIO, 2019). No Brasil, a espécie mais encontrada nos isolados de pacientes com Leishmaniose Visceral é a *Leishmania chagasi* (BRASIL, 2014).

O patógeno apresenta um ciclo heteróxico e duas morfologias, é encontrado na forma de amastigota nas células do sistema fagocítico mononuclear (macrófagos) de mamíferos e na forma de promastigota no intestino de fêmeas de flebotomíneos hematófagos (BRASIL, 2014).

As promastigotas possuem formato elipsoide ou alongado, um núcleo de dimensões variáveis (15 – 25  $\mu\text{m}$ ) e um flagelo na porção anterior (Figura 1.a). Enquanto, as amastigotas apresentam formato esférico à oval com diâmetro entre 2  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$  e são aflageladas (Figura 1.b). Em ambos os estágios é possível a visualização microscópica do cinetoplasto (MELBY; TRAVI; OSORIO, 2019).

**Figura 1.** Morfologias da *Leishmania* sp. promastigosta (a) e amastigota (b) em lâmina coradas por Giemsa



Fonte: Leishmania (MELBY; TRAVI; OSORIO, 2019)

## 2.2. VETOR DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A transmissão do agente ocorre mediante ao repasto de flebotomíneos hematófagos infectados, *Lutzomyia longipalpis*, popularmente conhecido como mosquito palha, biguiri ou mosquito pólvora, considerado o principal vetor no Brasil (BRASIL, 2014).

Esses insetos pertencem a ordem Diptera, apresentam de 2 a 3 mm de comprimento, coloração acastanhada, corpo piloso, voam em pequenos saltos e pousam com asas entreabertas (Figura 2). Possuem como característica o desenvolvimento holometábolo, ou seja, possuem uma metamorfose completa com quatro estágios no seu ciclo de vida (ovo, pupa, larva e adulto) (BRASIL, 2014; BRAZIL e BRAZIL, 2018).

O mosquito está amplamente disperso no território nacional, estando presente em 24 dos 27 estados brasileiros (SOUSA-PAULA et al., 2020). Apresenta caráter endofílico e alta adaptabilidade ao ambiente peridomiciliar, o que favorece a sua distribuição tanto na zona rural quanto na zona urbana. Ambos os sexos possuem hábitos crepusculares e noturnos, e necessitam de açúcares como fonte energética. Entretanto, as fêmeas de *L. longipalpis* ainda se alimentam de sangue de mamíferos a fim de realizar a maturação dos seus ovários. Durante o período diurno, encontram-se abrigados em locais como folhas caídas ao solo, toca de animais, fendas em

troncos de árvores, protegidos de condições climáticas desfavoráveis e de predadores naturais (BRASIL, 2014; PIMENTA et al., 2018; BRAZIL e BRAZIL, 2018).

**Figura 2.** *Lutzomyia longipalpis* realizando respasto sanguíneo



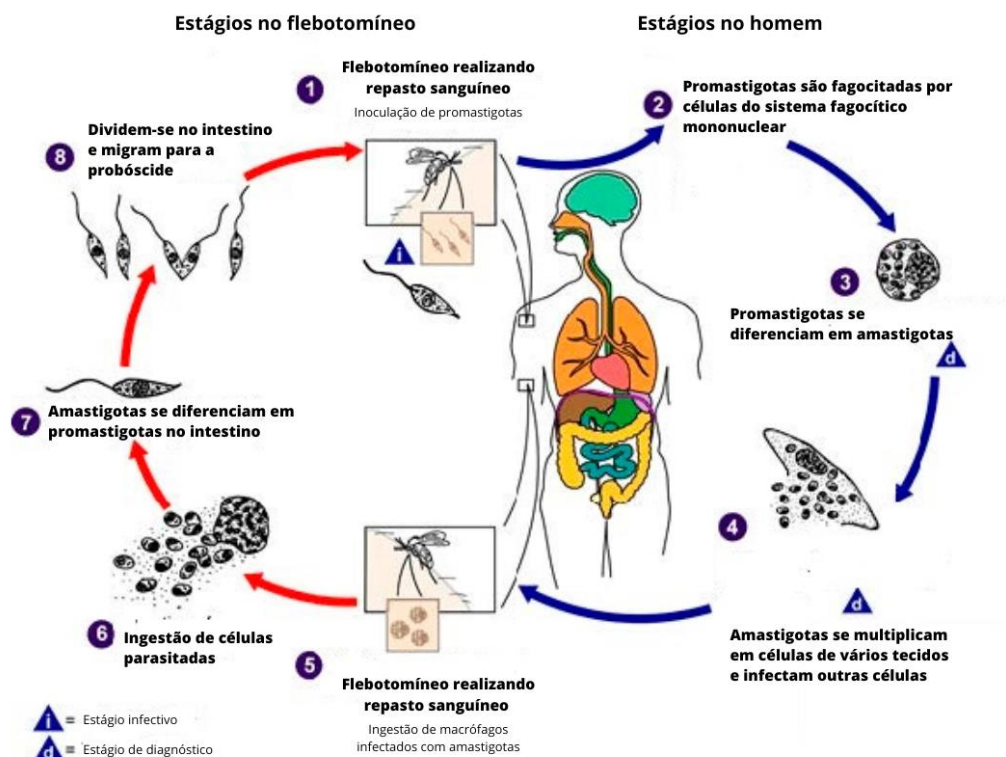
Fonte: Ray Wilson, Liverpool School of Tropical Medicine

### 2.3. CICLO BIOLÓGICO

A interação entre a *Leishmania* sp. e o seu vetor se inicia quando a fêmea do flebotomíneo ingere amastigotas do parasita durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado. Dentro do intestino do vetor, o parasito diferencia-se e passa a apresentar a morfologia flagelada, denominada promastigota procíclica. Estas replicam-se por fissão binária e, posteriormente, passam por um processo chamado metaciclogênese, originando as promastigotas metacíclicas, que possuem capacidade infectante. As promastigotas metacíclicas ficam alojadas na probóscide do vetor, até serem inoculadas em um novo hospedeiro (PIMENTA et al., 2018; BRAZIL; BRAZIL, 2018).

Após a inoculação, o agente é fagocitado por macrófagos e diferencia-se em amastigota, que se multiplica até o rompimento celular. As amastigotas são fagocitadas continuamente e distribuem-se pelo organismo do hospedeiro por via hematogênica, colonizando tecidos como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (BRASIL, 2014).

**Figura 3.** Ciclo biológico da *Leishmania* sp.



Fonte: Adaptado de Centers of Disease Control and Prevention (CDC) (2019)

## 2.4. HISTÓRICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL

No Brasil, o primeiro relato da Leishmaniose Visceral foi em 1913, quando Mignone descreveu os achados de necropsia de um paciente que havia trabalhado na construção de Estação Ferroviária de Porto Esperança – Corumbá, Mato Grosso do Sul. Em 1934, o Calazar surgiu como um problema de saúde pública, após a identificação de amastigotas do parasito em 41 amostras histológicas de pacientes das regiões Nordeste (92,7%) e Norte (7,3%), durante estudos para diagnóstico de Febre Amarela (ANTONIALLI et al., 2007; BRASIL, 2014).

O período entre os anos de 1978 e 1983 foi marcado por uma intensa seca nos estados do Piauí e Ceará. Em consequência, inicia-se o processo de migração de pessoas com seus cães da zona rural para os centros urbanos. Assim, o panorama da epidemiologia da doença sofre mudanças com o início da urbanização da LV em 1980, com o estado do Piauí registrando a primeira grande epidemia urbana entre os

anos de 1980 e 1986 (COSTA, 1990). Nas décadas seguintes, a LV surge como doença emergente em grandes cidades como Campo Grande e Três Lagoas na região Centro-Oeste; Belo Horizonte, Rio de Janeiro, Araçatuba e Bauru na região Sudeste (ANTONIALLI et al., 2007).

Sugere-se que a expansão geográfica da doença esteja relacionada ao fluxo migratório populacional, ocupação intensa e desordenada, condições socioeconômicas precárias, aspectos de vulnerabilidade social, adaptabilidade do vetor ao meio, mobilização dos reservatórios para áreas livres da doença e alterações antrópicas no meio ambiente, como o desmatamento e construções civis (CARDIM et al., 2016; GONTIJO & MELO, 2004; COSTA et al., 2011).

Atualmente, a Leishmaniose Visceral está distribuída em todo o território nacional, estando presente em 21 unidades federativas (MAIA-ELKHOURY et al., 2008; MOURA & ROCHA, 2012; BRASIL, 2014). De acordo com o Ministério da Saúde, 3.500 pessoas são acometidas anualmente e estima-se que para cada caso humano haja 200 cães infectados.

No Mato Grosso do Sul (MS), no período entre os anos de 1913 e 1993, a doença limitava-se aos municípios de Ladário e Corumbá, localizados no extremo oeste do estado. A expansão da Leishmaniose Visceral no MS ocorre no sentido oeste-leste, originando-se em Corumbá percorrendo o estado até Três Lagoas. A urbanização da doença coincide com as rotas de três grandes construções civis: Estradas de ferro (1909 a 1952); rodovia federal BR-262, finalizada na década de 1980; a construção do gasoduto Bolívia-Brasil, iniciado em 1998. A partir disso, municípios que eram livres da doença, como Campo Grande e Três Lagoas, passam a apresentar casos autóctones em humanos (ANTONIALLI et al., 2007). Na década de 2000, a capital do estado torna-se o principal foco da doença. Segundo estudos realizados em Campo Grande (FURLAN, 2010), no período de 2002 a 2006 foram confirmados 568 casos de LV em humanos.

Em São Paulo, a Leishmaniose Visceral foi detectada em cães no ano de 1998 e em humanos em 1999, ambos relatados na cidade de Araçatuba (GALIMBERTTI et al., 1999). Entre os anos de 1999 e 2011, foram registrados casos autóctones de Leishmaniose Visceral Humana em 73 municípios do estado. O principal eixo de disseminação da doença seguiu a rodovia Marechal Rondon, a



ferrovia Novoeste e o Gasoduto Bolívia-Brasil, na direção noroeste-sudeste rumo à Bauru. Os municípios com altas taxas de incidência e mortalidade foram Araçatuba, Presidente Prudente e Marília, que apresentam temperaturas elevadas e baixo índice pluviométrico (CARDIN et al., 2013; SEVA et al., 2017). Além dos fatores provocados pelas construções citadas anteriormente, propõe-se que a substituição da criação de gado pelo plantio de cana-de-açúcar impactou na expansão da LV no estado de São Paulo. Visto que houve o emprego de mão-de-obra migrante, geralmente proveniente da região Nordeste, conhecidamente endêmica para a infecção (BARATA, 2000; CARDIN et al., 2013)

A ocupação da Região do Vale do Rio Doce, localizada no leste de Minas Gerais e parte do Espírito Santo, ocorre de forma definitiva com a construção da Estrada de Ferro Vitória-Minas em 1901. Fator este que favoreceu o processo de industrialização iniciado na década de 1930, com a implantação de grandes empresas do setor siderúrgico, e que teve seu auge na década de 1970 marcando um período de grande crescimento econômico no estado de Minas Gerais (DE LIMA FERNANDES, 2007; COELHO, 2009). Decorrente disso, a região sofreu intensa devastação das matas nativas, dando lugar às ferrovias, pastagens, plantações de café e eucalipto, além de crescimento desordenado das áreas urbanas (COELHO, 2009).














Em Minas Gerais, a primeira ocorrência da Leishmaniose Visceral é descrita em 1943 por Versiani, em um paciente proveniente da região Nordeste do país. Em 1953, fica evidenciado o primeiro caso autóctone descrito por Cançados et colaboradores, em um paciente oriundo do município de Itanhomi localizado no Vale do Rio Doce (MARTINS et al., 1956). Em Belo Horizonte, Rezende & Bastos (1959) identificaram o primeiro caso autóctone da doença em uma criança, entretanto, a ausência de evidências que comprovassem a presença do vetor e de cães positivos na região levaram às suspeitas de outras formas de transmissão da doença. Assim como na região do Vale do Rio Doce, A Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) teve sua urbanização intensificada na década de 1970 e consolidada nos anos de 1980 e 1990. A LV passa a ser notificada na RMBH no ano de 1989, no município de Sabará, e nos anos subsequentes, expande por toda a região (GENARO et al., 1990; OLIVEIRA et al., 2001)

Em 1966, são relatados os cinco primeiros casos em humanos no Espírito Santo, quatro no município de Baixo Guandu e um no município de Colatina. Ainda, registra-se o primeiro caso de Leishmaniose Visceral Canina, no animal que coabitava a residência do doente, em Colatina (MARTINS, 1968). A doença torna-se endêmica no estado nas décadas de 1980 e 1990, com envolvimento dos municípios de Águia Branca, Baixo Guandu, Governador Lindenberg, Itaguaçu, Itarana, Nova Venécia, Pancas, São Gabriel da Palha, São Roque do Canaã e Água Doce do Norte, sendo o último o único dos municípios não situado no Vale do Rio Doce (FALQUETO et al., 2009).

Segundo o SINAN, de 2008 a 2021 foram registrados 91 casos confirmados de Leishmaniose Visceral em humanos no Espírito Santo, em que cerca de 71% destes eram pacientes oriundos da Microrregião Geográfica de Colatina (Figura 4) – que compreende os Municípios de Alto Rio Novo, Baixo Guandu, Governador Lindenberg, Marilândia, Pancas, São Domingos do Norte, São Gabriel da Palha, São Roque do Canaã e Vila Valério. No ano de 2012, têm-se o primeiro possível registro de um foco de Leishmaniose Visceral Canina autóctone na Região Metropolitana de Vitória, que se sucedeu a um caso humano relatado (TONINI et al., 2012).

**Figura 4.** Microrregiões Geográficas do Espírito Santo - 2011



- |   |  |  |
|---|--|--|
|  Microrregião de Montanha        |  Microrregião de Colatina     |  Microrregião de Guarapari               |
|  Microrregião de B. S. Francisco |  Microrregião de Linhares     |  Microrregião de Afonso Claudio          |
|  Microrregião de S. Mateus       |  Microrregião de Santa Tereza |  Microrregião de Itapemirim              |
|  Microrregião de Nova Venécia    |  Microrregião de Vitória      |  Microrregião de Alegre                  |
|   |  |  Microrregião de Cachoeiro do Itapemirim |

Fonte: Adaptado de Instituto Jones dos Santos Neves

## 2.5. IMPORTÂNCIA DOS CÃES PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL E APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2019), os responsáveis pela manutenção do ciclo da doença no ambiente silvestre são os canídeos silvestres (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). Enquanto no meio urbano o cão (*Canis lupus familiaris*) é o principal reservatório da forma visceral da doença, sendo observado que a enzootia na população canina antecede à ocorrência de casos humanos e que a infecção em cães é mais prevalente do que no homem.

Nesse aspecto, a interação homem-cão ganha ainda mais importância para a Saúde Pública quando observamos o aumento crescente da população de cães domiciliados em todo o território nacional. De acordo com IBGE (2019), as estimativas populacionais indicaram que havia a presença de pelo menos um cachorro em 46,1% dos domicílios do País, o que equivalente a 33,8 milhões unidades domiciliares.

A apresentação clínica da LVC é dependente do estado imunológico do hospedeiro e ao tipo de resposta imune gerada (celular ou humoral). A infecção inicia-se com uma resposta inflamatória no local do respatto, geralmente nariz e parte interna da pina auricular, formando uma lesão chamada de "cancro de inoculação". Os cães infectados podem ser classificados em três categorias de acordo com a presença de sinais clínicos: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (BRASIL, 2014; JERICÓ et al., 2015).

Os olissintomáticos podem apresentar linfadenomegalia, perda de peso e pelo opaco. Nos cães sintomáticos pode-se observar alterações dermatológicas, como alopecia e hiperqueratose, onicogribose, emagrecimento progressivo, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores (BRASIL, 2014).

## 2.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LVC

Os métodos de diagnóstico da LVC, preconizados pela Ministério da Saúde para inquéritos em saúde pública são os testes sorológicos. Até o ano de 2012 utilizava-se a Reação Imunofluorescência Indireta (RIFI) como teste confirmatório, que

consiste na reação da amostra (soro diluído) com o antígeno fixado em lâminas de microscopia para imunofluorescência, que são observados após a adição de um conjugado espécie-específico. A RIFI apresenta sensibilidade variando entre 98,8 e 100% e especificidade de 94,7 a 100% (MACHADO, 2004). A especificidade pode ser comprometida por reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos, principalmente com Leishmaniose Tegumentar e Doenças de Chagas (ALVES; BEVILACQUA, 2004; BRASIL, 2014). Observa-se que a técnica apresenta melhor sensibilidade quando utilizada em cães de regiões endêmicas e melhor especificidade quando aplicada em populações caninas de área não-endêmica (PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015).

Atualmente, utiliza-se o teste de imunoensaio cromatográfico Dual Path Platform (DPP®) para triagem e teste de ELISA® - (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para confirmação do diagnóstico, ambos os testes identificam a presença de anticorpos contra *Leishmania* sp. O animal é considerado infectado quando a amostra é reagente aos dois testes (BRASIL, 2019).

O DPP® Leishmaniose Visceral Canina é um teste rápido, produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz), que detecta anticorpos específicos contra as proteínas recombinantes K28 de *Leishmania chagasi* e a Proteína A Conjugada ao Ouro Coloidal, adsorvidos em Membrana de Nitrocelulose. De acordo com o fabricante, para a realização do teste é adicionado a amostra (sangue, soro ou plasma) e duas gotas da solução tampão ao poço designado, e à um segundo poço adiciona-se quatro gotas da solução tampão. O DPP apresenta o resultado em um período de 15 a 20 minutos, possui duas linhas de leitura (T – Linha Teste; C – Linha Controle) e considera-se positivo quando ambas são observadas. Estudos realizados por Barbosa (2015) demonstraram alta especificidade e sensibilidade do teste, 98,33% e 93,33% respectivamente.

O ELISA baseia-se na reação de anticorpos presentes na amostra (soro) com os antígenos solúveis e purificados de *Leishmania*, que são adsorvidos em microplacas. A observação da reação é possível depois que se adiciona uma anti-IgG de cão marcada com peroxidase, essa imunoglobulina se liga aos anticorpos caso estejam presentes, resultando em um produto colorido lido por espectrofotometria. O resultado é positivo se a densidade ótica é igual ou superior a três desvios-padrão do

ponto de corte quando comparado ao resultado obtido no controle negativo (BRASIL, 2014).

Além dos métodos sorológicos, o diagnóstico da LVC pode ser realizado por meio do exame parasitológico e reação em cadeia da polimerase (PCR). No exame citológico há a observação da amastigota parasitando células do sistema fagocítico mononuclear (macrófagos), as amostras coletas são provenientes da medula óssea (MO), linfonodos, fígado, baço ou líquido sinovial (ANTUNES et al., 2018; RENNÓ et al., 2019). A técnica de PCR baseia-se na identificação do kDNA e utiliza amostras de MO, sangue periférico e biópsia de pele (DE ANDRADE, 2017; NOLETO et al., 2017).

## 2.7. TRATAMENTO

Os antimoniais pentavalentes, Pentostam® (estibogluconato de sódio) e Glucantime® (antimoniato de meglumina), têm sido medicamentos de primeira escolha para o tratamento de LV humana nos últimos 60 anos. Entretanto, relatos no início da década de 1980 demonstraram sua ineficácia, em que cerca de 60% dos tratamentos (Sundar, 2001).

Com isso, foram aprovadas novas medicações com princípios ativos Anfotericina B, Miltefosina e Paromomicina. A anfotericina B é amplamente utilizada na Europa e é medicamento de segunda escolha na Índia, em que apresentou uma taxa de cura superior a 95% dos pacientes. Porém, a sua utilização torna-se limitada visto o seu alto custo (SUNDAR, 2014; BERN et al., 2006; CROFT et al., 2005)

O protocolo terapêutico indicado para o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina baseia-se no estadiamento da doença, que é definido pela análise sorológica, presença de sinais clínicos e resultados laboratoriais. As terapias indicadas têm por objetivo a redução da carga parasitária e melhora clínica do paciente infectado. No Brasil, o Grupo de Estudos sobre Leishmaniose Animal (Brasileish) propõe a associação da imunoterapia, imunomodulação, utilização de alopurinol e miltefosina (BRASILEISH, 2018; LEISHVET, 2018).

Estudos realizados por Toepp et al. (2018) e Gómez-Ochoa et al. (2009) demonstraram que a imunoterapia com proteína recombinante (A2-HIS), presente na vacina anti-*Leishmania* (Leish-Tec®), promove melhora da resposta imune, por conseguinte, o controle da progressão da doença, redução de sinais clínicos e da mortalidade dos animais infectados.

O alopurinol é um análogo da hipoxantina que possui ação leishmaniostática, visto que, o protozoário metaboliza o fármaco em uma molécula idêntica à ionsina, que interfere na síntese de ácido ribonucleico (RNA) da *Leishmania* e, conseqüentemente, interrompe a tradução de proteínas. O alopurinol é comumente utilizado em conjunto aos antimoniais pentavalentes, pois apresenta baixa toxicidade, eficácia na redução de sinais clínicos, administração facilitada (via oral) e baixo custo (BANETH; SHAW, 2002; BRASILEISH, 2018).

O tratamento com Milteforan™ (Virbac) foi autorizado por meio da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde (MAPA), sendo esta a única droga leishmanicida aprovada para o tratamento da LVC. O Milteforan é um antiparasitário que tem a miltefosina como princípio ativo. A miltefosina é um aquilfosfolípideo (hexadecilfosfocolina) que inicialmente foi desenvolvido para terapia antineoplásica, porém apresenta alta efetividade no tratamento de animais infectados, com a forma visceral da doença (SYKES; PAPICH, 2014; BRASILEISH, 2018).

O seu mecanismo de ação consiste na inibição da biossíntese de glicosilfosfatidilinositol, glicolípideo que auxilia na sobrevivência da *Leishmania* sp. dentro dos macrófagos. Além de interferir na síntese da membrana celular do parasito. O uso da miltefosina melhora a manifestação clínica da doença com diminuição da carga parasitária na pele do hospedeiro e ainda, reduz a infectividade do cão para o vetor (DOS SANTOS NOGUEIRA et al, 2019).

Recomenda-se que os animais submetidos ao tratamento com miltefosina sejam monitorados a cada 4 a 6 meses com testes de diagnóstico (sorológicos, parasitológicos e/ou moleculares) para acompanhamento da carga parasitária e revisão do protocolo terapêutico (RIBEIRO, 2016; LEISHVET, 2018).

## 2.8. MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DA LEISHMANIOSE CANINA

As medidas de controle da LVC são padronizadas e preconizadas pelo Ministério da Saúde e visam estratégias integradas a fim de atuar em todas as frentes da doença, ou seja, o controle deve ser feito focando no hospedeiro (homem e cão) e no controle entomológico. A implantação dessas medidas fica a cargo dos serviços estaduais e municipais de saúde. As medidas de prevenção voltadas para o controle da LVC vão desde a prevenção, como o encoleiramento da população canina e vacinação de animais que transitam em áreas endêmicas, até o tratamento dos animais infectados (BRASIL, 2014; MAIA-ELKHOURY, 2018).

O encoleiramento em massa com coleiras impregnadas de deltametrina a 4% demonstram-se eficazes na proteção individual do cão contra a picada dos flebotomíneos (OPAS, 2018). Atualmente, apenas a vacina produzida pela CEVA é aprovada pelo MAPA e Ministério da Saúde. A Leish-tec® é uma vacina recombinante e, segundo o fabricante, promove uma proteção individual entre 92% e 96% (CEVA, 2020).

A eutanásia é definida como medida de controle pelo Ministério da Saúde, aos animais com diagnóstico positivo para a doença, com resultados obtidos tanto por testes sorológicos quanto por método parasitológico, e que não estejam em tratamento exclusivo com miltefosina (BRASIL, 2014; MAIA-ELKHOURY, 2018). Apesar desta indicação, discute-se o aspecto de que animais eutanasiados são repostos rapidamente pelos tutores, mostrando que na prática esta indicação deve ser revista.



### 3. OBJETIVOS

Objetivo geral: Avaliar a soroprevalência da LVC em cães domiciliados na Região da Grande Vitória do estado do Espírito Santo.

Objetivos específicos:

- No caso de resultados positivos pretende-se avaliar a resposta sorológica de acordo com a origem dos animais, bem como a presença de títulos a partir da realização do diagnóstico pela RIFI;
- Caracterizar os fatores de risco associados à infecção canina.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. COMITÊ DE ÉTICA

O estudo foi aprovado previamente pela Comissão de Ética, Bioética e Bem Estar Animal da Universidade Vila Velha sob o Número de protocolo 611-2021.

### 4.2. AMOSTRA POPULACIONAL E ÁREA DE ESTUDO

A população de estudo, selecionada pela amostragem por conveniência, foi composta por 154 cães que passaram por atendimento clínico no Hospital Veterinário “Prof. Ricardo Alexandre Hippler” da Universidade Vila Velha (HV-UVV), no período entre janeiro de 2022 e novembro de 2022. Os animais foram classificados quanto a idade, sexo, raça e local de origem para posterior análise fatores de risco da doença.

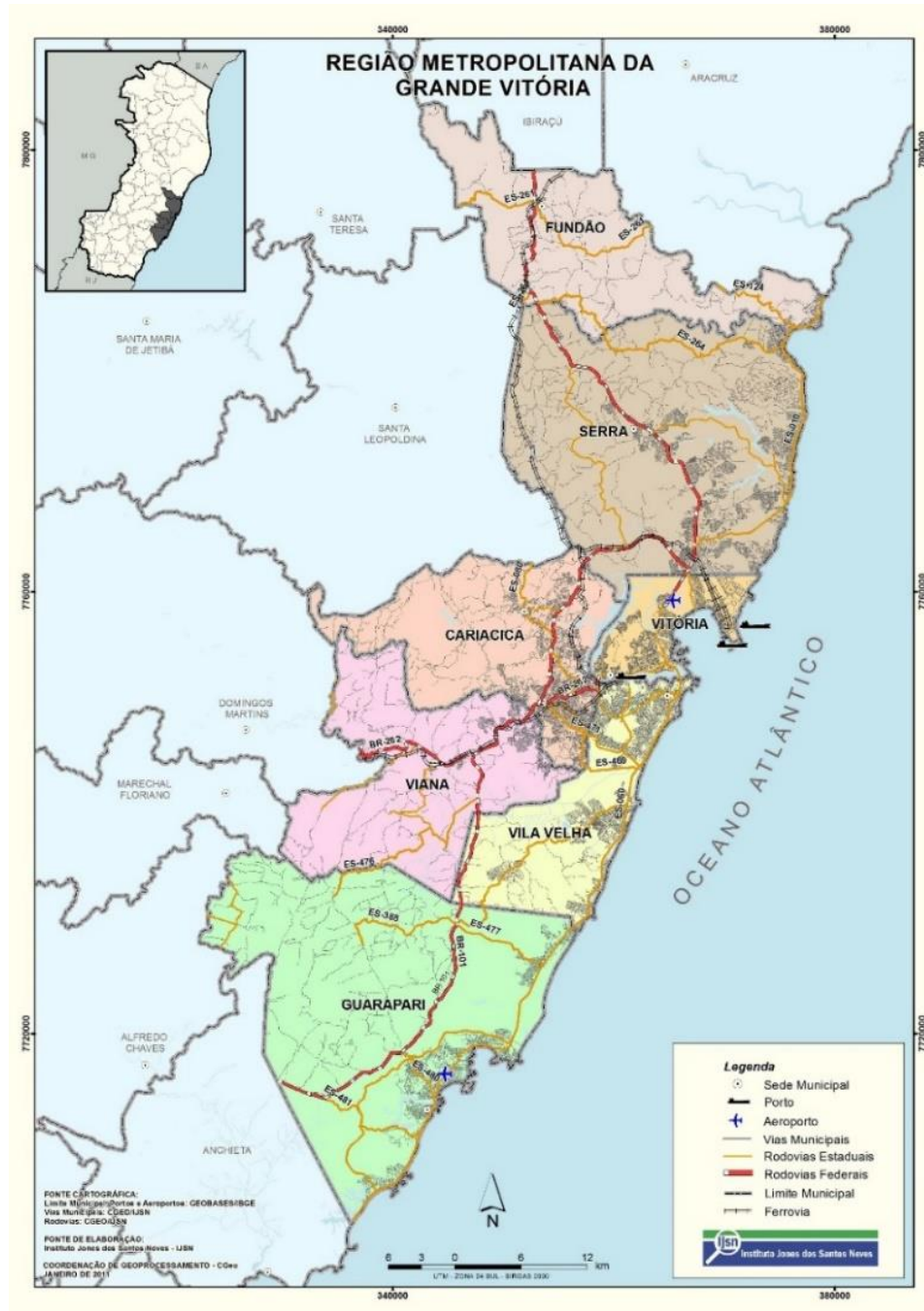
O HV-UVV está localizado no município de Vila Velha no Estado do Espírito Santo, atendendo a comunidade no entorno e das cidades vizinhas, principalmente Cariacica, Fundão, Guarapari, Serra, Viana e Vitória.

Os municípios descritos são pertencentes à Região Metropolitana da Grande Vitória (RMGV) (Figura 5), que está situada no bioma da Mata Atlântica, ocupa a extensão de 2.331 km<sup>2</sup>, abriga 1.687.704 habitantes e estima-se que 42,6% dos domicílios tenham pelo menos um cachorro (IBGE, 2010).

As amostras sorológicas utilizadas na pesquisa permaneceram acondicionadas na temperatura de -20 °C e armazenadas no Laboratório de Patologia Clínica do HV-UVV até a realização da Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

A RIFI foi realizada nos Laboratórios do Serviço de Diagnóstico de Zoonoses (SDZ) do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP.

**Figura 5.** Região Metropolitana da Grande Vitória – Espírito Santo.



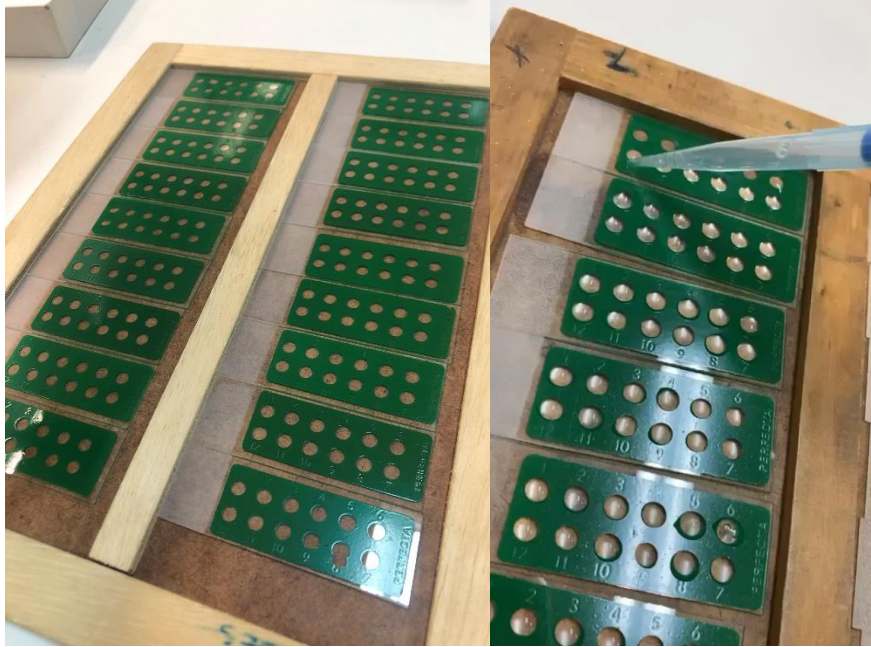
Fonte: Instituto Jones dos Santos Neves (2023)

#### 4.3. REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

A Reação de Imunofluorescência Indireta para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, foi realizada de acordo com Camargo (1966). A sensibilização das lâminas foi feita com o antígeno *Leishmania major*, pipetando-se 10 µL da suspensão de promastigotas em cada um dos orifícios, e em seguida retirada por aspiração,

restando apenas uma película fina (Figura 6). As lâminas foram secas em temperatura ambiente e mantidas em laminário a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso, por um período máximo de duas semanas.

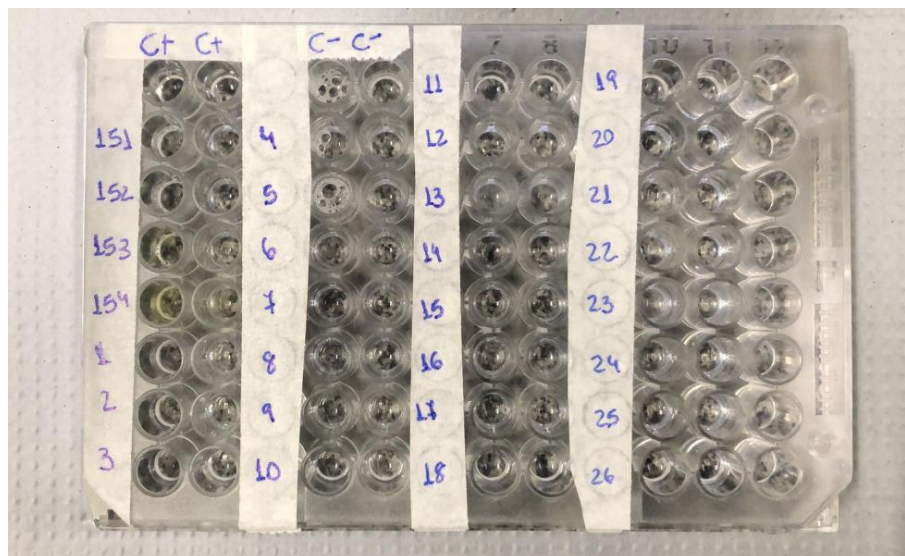
**Figura 6.** Sensibilização das lâminas com antígeno *Leishmania major*



Fonte: Arquivo pessoal da autora

As amostras foram diluídas em microplaca pipetando-se  $190\ \mu\text{L}$  de solução salina tamponada (PBS)  $0,01\text{M}$  pH 7,2 e  $10\ \mu\text{L}$  do soro na primeira perfuração para diluição inicial de 1:20. Em seguida, pipetou-se  $100\ \mu\text{L}$  da primeira diluição e  $100\ \mu\text{L}$  de PBS na segunda cavidade, obtendo-se a diluição de 1:40 que foi utilizada para prova de triagem. Os soros de controle positivo e negativo da reação foram diluídos da mesma maneira.

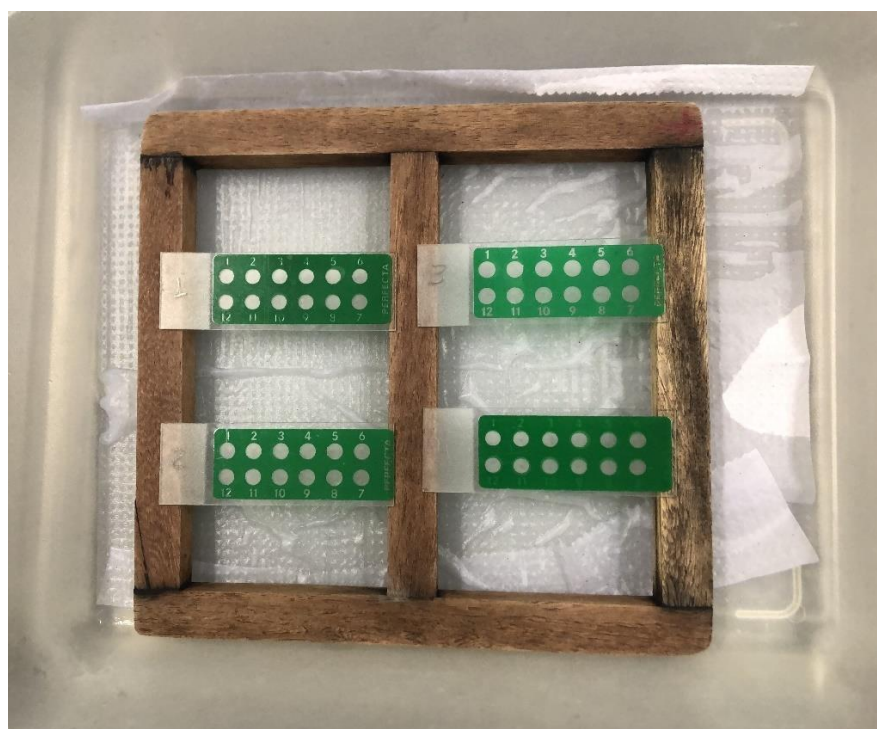
**Figura 7.** Diluição do soro com PBS 0,01M pH 7,2



Fonte: Arquivo pessoal da autora

Nas lâminas fixadas com antígeno *L. major*, foram distribuídos 10  $\mu$ L da diluição 1:40, incubando a 37°C em câmara úmida por 30 minutos (Figura 8). Após, foram realizadas duas lavagens com PBS 0,01M pH 7,2 em frasco tipo coplin por 10 minutos cada, procedida da secagem em estufa.

**Figura 8.** Preparação da câmara úmida

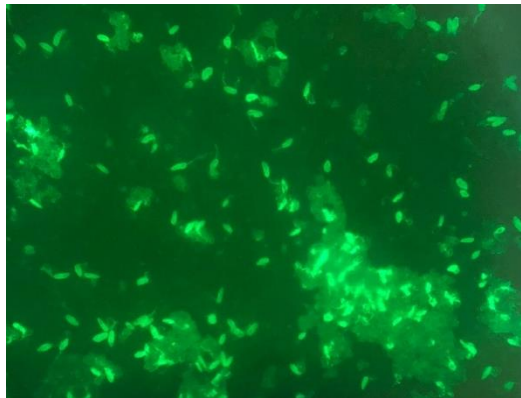


Fonte: Arquivo pessoal da autora

Posteriormente, o conjugado espécie-específico foi diluído de acordo com o seu título pré-estabelecido, em solução de azul de Evans a 20mg%, que foi previamente diluído em PBS 0,01M pH 7,2 na diluição 1:5. Foram adicionados 10  $\mu$ L do conjugado em cada uma das diluições. Realizou-se novamente o processo de incubação a 37° em câmara úmida por 30 minutos, seguido de duas lavagens com PBS 0,01M PH 7,2 e secagem em estufa, como descrito anteriormente.

Após a secagem, adicionou-se duas gotas de solução glicerinada pH 8,5 nas lâminas cobrindo-as com lamínulas, realizando a leitura em microscópio de imunofluorescência no aumento de 40. Posterior a leitura dos controles (Figura 9), procedeu-se a leitura das amostras do estudo na diluição de 1:80.

**Figura 9.** Leitura do controle positivo em microscópio de imunofluorescência



Fonte: Arquivo pessoal da autora

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 154 amostras utilizadas no inquérito sorológico, 95 (61,8%) eram de animais provenientes do município de Vila Velha, 43 (27,9%) do município de Vitória, 9 (5,8%) do município de Serra e 7 (4,5%) do município de Cariacica. Os cães possuíam idades variando de um mês a 17 anos, com idade média de 6,5 anos.

Na RIFI não houve resultados sororreagentes para *Leishmania major*. Tais resultados corroboram com os encontrados por Tonini et al. (2012), que embora tenham demonstrado sorologia positiva no teste ELISA *in house*, nos ensaios de ELISA associado a RIFI todas as amostras foram negativas para a presença de anticorpos anti-*Leishmania*. Sugere-se que tenha ocorrido reações falso-positivas com agentes disseminados na região, como *Ehrlichia canis* e *Babesia* sp. (LEANDRO JUNIOR, 2014; NAGATA et al., 2018; VIEIRA et al., 2018; BITTENCOURT et al., 2022).

Estudos de vigilância epidemiológica relacionados as soroprevalência da LVC, revelam resultados variáveis, desde nenhum animal positivo, o que significa provável região indene para a doença, até situações de endemia e de epidemia. Apresentamos resultados de algumas pesquisas cujos resultados são coincidentes com os obtidos no presente estudo (LANGONI et al., 2001; FREHSE et al. (2010); COIRO et al. 2014; MANTOVAN et al. 2021)

Durante campanha de vacinação antirrábica canina, no município de Botucatu, região indene para LVC, foram colhidas 689 amostras de sangue de cães, e todas revelaram resultados negativos na RIFI (LANGONI et al., 2001). Avaliando ainda, a possível presença da LVC no mesmo município, foi obtida uma amostragem de 676 cães que participaram da campanha de vacinação antirrábica de 2004, perfazendo 4% dos 17.910 cães vacinados, em 20 postos de vacinação, distribuídos homogeneamente, em cinco regiões da área territorial urbana. Apesar de uma amostra ter sido positiva na RIFI, tratava-se de um animal de dois anos de idade, proveniente de outro município, e se encontrava em Botucatu há três meses, tratando-se, portanto, de um caso halóctone. Este aspecto confirma a importância das ações de vigilância na LVC (CARVALHO, 2007).

Frehse et al. (2010) avaliaram a soroprevalência para LVC, em 364 cães do Centro de Controle de Zoonoses de São José dos Pinhais, PR, também área indene para LVC. Encontraram somente uma amostra reagente no ELISA (0,002%), entretanto, negativa na RIFI. O animal era assintomático. Baseados no resultado obtido, concluíram que Curitiba e área metropolitana poderia ser considerada de baixo risco para a doença, naquele momento.

Atividade de vigilância para LVC realizada por Coiro et al. (2014), com 516 amostras séricas de cães atendidos no Ambulatório de Dermatologia da Clínica de Pequenos Animais do Hospital das Clínicas da FMVZ, UNESP, Botucatu, com dermatopatias, revelaram resultado negativo para LVC, tanto na RIFI como no ELISA. Da mesma forma que Langoni et al. (2001) que trabalhando com amostras de soro de cães, obtidas em campanha de vacinação antirrábica, no mesmo município, todas foram negativas na RIFI.

Mantovan et al. (2021) pesquisando sorologicamente a resposta humoral, frente a diferentes agentes infecciosos de caráter zoonótico em 181 cães, do município de Pardinho, região de Botucatu, incluindo entre eles *Leishmania* spp, não obtiveram resultado positivo na RIFI, especificamente para este patógeno. Apesar destes resultados apresentados, que corroboram os obtidos no presente estudo, serem de regiões diferentes, não invalidam a importância da adoção de programas de controle a partir de atividades de vigilância, para tomada de decisão frente a resultados positivos para minimizar os efeitos desta grave zoonose tanto nos animais como em humanos.

Um dos aspectos limitantes do presente estudo pode ser considerado o número de amostras avaliadas, e que pretendíamos pesquisar. A ideia inicial era realizar busca ativa domiciliar, em diferentes locais da região, com uma amostragem estratificada, entretanto, fatores alheios a nossa vontade, impediram esta possibilidade. A falta de parceria com órgãos oficiais do município, dificultou a logística para obtenção das amostras. Devemos destacar ainda a pandemia do Covid 19. Nos resta agradecer a permissão da utilização de uma amostragem de conveniência, cedida pelo Serviço de Patologia Clínica do HV da UVV.

Propõe-se que a ausência de evidências da LVC esteja diretamente associada com a não observação do *Lutzomyia longipalpis* na região de estudo. A



presença do vetor tem ocorrência nas regiões Centro-Oeste e Noroeste do estado, ambas são caracterizadas por fazerem divisa com o estado de Minas Gerais e apresentarem relevo acidentado, temperaturas elevadas e baixo índice pluviométrico (PINTO, 2012; DEL CARRO et al., 2020).

Apesar do histórico de depleção das florestas ser um fator predisponente para a proliferação do vetor no ambiente, o desmatamento da Mata Atlântica não parece favorecer a disseminação do mosquito na RMGV. Diferente do que ocorre no estado do Rio de Janeiro, que apresenta condições climáticas e ambientais semelhantes, ainda assim, é possível observar a presença do *L. longipalpis* em até mesmo nas regiões litorâneas (FUZARI et al., 2016; NOVO et al., 2013).

A espécie *L. longipalpis* apresenta quatro variedades genéticas envolvidas na produção de feromônios sexuais: (S)-9- metilgermacreno-B (9MGB), 3-metil- $\alpha$ -himacaleno (3MaH), cembreno-1 e cembreno-2. A variante presente no Espírito Santo é a 9MGB, comumente encontrada no estado de Minas Gerais. Enquanto no Rio de Janeiro, a *Lutzomyia longipalpis* cembreno-1 é a mais observada, estando disseminada nos estados do Nordeste brasileiro, como o Ceará. (WARD et al, 1988; MAINGON, 2003; HAMILTON, 2005; SPIEGEL et al., 2016).

Além das diferenças relacionadas ao processo reprodutivo, sugere-se que as variantes do flebotômíneo possuam necessidades ecológicas distintas, conferindo adaptabilidade às condições ambientais no local de incidência (BAUZER et al., 2002; BOTTECCHIA et al., 2004). Cogita-se ainda a possibilidade de migração da variante genética presente no Rio de Janeiro para áreas com características similares no Espírito Santo.

Assim, ressalta-se a necessidade da implementação de medidas de prevenção e de vigilância, para controle e acompanhamento da disseminação da LVC, envolvendo o monitoramento do vetor e da doença na população canina, a partir de inquéritos soroepidemiológicos, periodicamente, com número de amostras representativo em função da população canina local, bem como com abrangência, procurando-se pontos estratégicos do local a ser estudado.

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou a ausência de infecção causada pelo protozoário *Leishmania* sp. na população canina da Região Metropolitana da Grande Vitória – Espírito Santo, avaliada, confirmando que a área de pesquisa não é endêmica, até o presente momento, para a LVC. Apesar do resultado obtido, sugere-se a continuidade de estudos a partir não somente de inquéritos sorológicos, mas também de inquéritos entomológicos, na busca do vetor responsável pela doença. Importante, ainda ressaltar, que na presença de caso de animal positivo, deve-se acionar imediatamente o Serviço de Vigilância local.

## 7. REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

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

ANTUNES, T. R. et al. Técnicas de citologia aspirativa, biópsia e citobloco de medula óssea para identificação e determinação de intensidade parasitária na leishmaniose visceral canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1362–1368, 2018.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 106, n. 4, p. 315-324, 2002.

BARBOSA, Camila Oliveira Silva. **Desempenho do teste imunocromatográfico rápido DPP®-Dual Path Platform para diagnóstico da leishmaniose visceral canina e reação cruzada com hemoparasitos**. 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

BAUZER, L. G. S. R. et al. Molecular Divergence in the period Gene Between Two Putative Sympatric Species of the Lutzomyia longipalpis Complex. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 9, p. 1624-1627, 2002.

BERN, C. et al. Reviews Of Anti-infective Agents: liposomal amphotericin b for the treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 7, p. 917-924, 2006.

BITTENCOURT, J. et al. A OCORRÊNCIA DE Babesia sp., Ehrlichia canis E Hepatozoon canis EM CÃES DOMICILIADOS, EM DOIS MUNICÍPIOS DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO – BRASIL. **Veterinária e Zootecnia**, v. 29, p. 1–9, 2022.

BOTTECCHIA, M. et al. Genetic Divergence in the cacophony IVS6 Intron Among Five Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis*. **Journal Of Molecular Evolution**, v. 58, n. 6, p. 754-761, 2004.

BRASIL, Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2016). **Nota técnica Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Coordenação de fiscalização de produtos veterinários-DFIP-SDA-CPV**. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

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. 523 p.

BRASILEISH. Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina. 2018.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Bionomy: biology of neotropical phlebotomine sand flies. In: **Brazilian sand flies**. Springer, Cham, 2018. p. 299-318.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of Chagas' disease. Technical modification employing preserved cultural forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo** 8: 227-234, 1966.

CARDIM, M. F. M. et al. Introdução e expansão da Leishmaniose visceral americana em humanos no estado de São Paulo, 1999-2011. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 4, p. 691–700, 2013.

CARVALHO, Jonas Lotufo Brant de. **Leishmaniose visceral canina: busca ativa de casos e estudo sobre o conhecimento da doença em proprietários de cães na área urbana de Botucatu**. 2007. 21 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2007.

COELHO, A. L. N. Bacia hidrográfica do Rio Doce (MG/ES): uma análise socioambiental integrada. **Revista Geografares**, v. 7, p. 131-146, 2009.

COIRO, C. J. et al. Sistemática de vigilância para leishmaniose visceral canina no município de Botucatu-SP. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 1, p. 108-116, 2014.

CROFT, S; BARRETT, M; URBINA, J. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends In Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508-512, 2005.

DE ANDRADE, A. S. R. Avaliação do swab conjuntival em inquérito canino e comparação de métodos de PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Gerais: Revista de Saúde Pública do SUS/MG**, v. 1, n. 1, p. 53-54, 2017.

DEL CARRO, K. B. et al. Assessing geographic and climatic variables to predict the potential distribution of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* in the state of Espírito Santo, Brazil. **PLOS ONE**, v. 15, n. 9, p. e0238198, 2020.

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.

FERNANDES, C. L. DE L. Economia e planejamento em Minas Gerais nos anos de 1960 e 1970. **Revista Gestão & Tecnologia**, v. 7, n. 1, 2007.

FREHSE, M. S. et al. Surveillance of canine visceral leishmaniasis in a disease-free area. **Vigilância da leishmaniose visceral canina em área indene. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 01, p. 64-66, 2010.

GENARO, O. et al. Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 2, p. 121–121, jun. 1990.

GÓMEZ-OCHOA, P. et al. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 2, p. 259-263, 2009.

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

JERICÓ, M. M.; KOGIKA, M. M.; DE ANDRADE NETO, J. P. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2015.

LANGONI, H. et al. Epidemiological vigilance for canine Leishmaniasis in the country of Botucatu, SP, Brazil. **Ars Veterinaria**. Jaboticabal, v.17, n.3, p.196-200, 2001

LEANDRO JUNIOR, Marcos Vinicius de Santana. **Análise comparativa do teste imunocromatográfico DPP-Biomanguinhos com ELISA e RIFI no diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

LEISHVET. Canine and feline leishmaniosis: practical management of canine and feline leishmaniosis. 4. ed. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 2018. 27p.

MACHADO, Juliana Giantomassi. **Comparação do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina entre laboratórios de Belo Horizonte, 2003 - 2004**. 2004. 45 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

MAGILL, A. J. Leishmania Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucosal Leishmaniasis. In: BENNETT, J. E.; DOLIN, R.; BLASER, M. J. **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases E-Book**. Elsevier health sciences, 2019. p. 3091–3107.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALBUQUERQUE, R.; SALOMÓN, O. D. Leishmaniasis-Vector Surveillance and Control in Brazil: A Challenge to Control Programs. In: **Brazilian Sand Flies**. Springer, Cham, 2018. p. 467–494.

MANTOVAN, K. B. et al. PESQUISA DE ANTICORPOS PARA *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* spp. E *Leishmania* spp. EM CÃES NO MUNICÍPIO DE PARDINHO, SÃO PAULO. **Veterinária e Zootecnia**, v. 28, p. 1–10, 2021.

MARTINS, A. V. et al. Calazar autóctone em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, vol. VIII, n. 4, p. 75-86, 1956.

MARTINS, J.; SOUZA, JC.; SILVA, E. Primeiros casos autóctones de calazar no Espírito Santo. **O hospital**, v. 73: 69-97, 1968.

MELBY, P. C.; TRAVI, B. L.; OSORIO, E. Y. Leishmania. In: **Encyclopedia of Microbiology**. Elsevier, 2019. p. 769-779.

MOREL, C. M. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 8, p. 1522–1523, 2006.

MOURA, Alexandre Sampaio; ROCHA, Regina Lunardi. **Endemias e epidemias:** dengue, leishmaniose, febre amarela, influenza, febre maculosa e leptospirose. Núcleo de Educação em Saúde Coletiva – NESCON/ UFMG, Belo Horizonte, 2012.

NAGATA, W. B. et al. Reatividade cruzada entre *Leishmania* spp. E *Ehrlichia* spp. por meio de técnicas sorológicas e moleculares. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 16, n. 3, p. 84–84, 2018.

NARCISO, T. P. et al. Leishmaniose Visceral Canina: um problema de saúde pública em expansão. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 1, p. 3699-3711, 2023.

NOLETO, R. V. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pela técnica de PCR em sangue periférico em associação com os testes RIFI e ELISA em cães de Palmas, TO. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 2–6, 2017.

OLIVEIRA, C. D. L. et al. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 5, p. 1231–1239, 2001.

OPAS. **Retratos do SUS que dá certo nos quatro cantos do Brasil.** Experiências premiadas na Mostra Brasil aqui tem SUS 2016. Brasília, 2018

OPAS/OMS. **Leishmanioses:** informe epidemiológico das Américas, 2018.

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.

PEREIRA, F. B.; VIEIRA, A. L. S.; BICALHO, E. A. G.; PEREIRA, S. G.; CARDOSO, S. R. A. Avaliação da tendência temporal e da prevalência de Leishmaniose visceral canina e humana dentre os anos de 2010 a 2019 em municípios de Minas Gerais - Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 24, n. 1cont., e2409, 2021.

PIMENTA, P. F. P. et al. Biology of the *Leishmania* – sand fly interaction. In: **Brazilian Sand Flies**. Springer, Cham, 2018. p. 319-339.

PINTO, I. S. et al. Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, State of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 37, n. 1, p. 90–96, 2012.

- RENNÓ, M. C. et al. Synovial fluid as an auxiliary diagnostic tool for different stages of canine visceral leishmaniasis. **Ciência Rural**, v. 49, n. 5, p. e20190023, 2019.
- RIBEIRO, V. M. Leishmaniose Visceral Canina: considerações do diagnóstico e tratamento nos dias atuais. **Vetscience Magazine**, n. 12, p. 6-11, 2016.
- SEVA, A. P. et al. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005353, 2017.
- SOUSA-PAULA, L. C; OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. *Lutzomyia longipalpis* (Sand Fly). **Trends In Parasitology**, v. 36, n. 9, p. 796-797, 2020.
- SPIEGEL, C. N. et al. The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 580, 2016.
- SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, n. 11, p. 849–854, 2001.
- SUNDAR, S. et al. Single-Dose Liposomal Amphotericin B for Visceral Leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 6, p. 504–512, 2010.
- SYKES, J. E.; PAPICH, M. G. **Canine and feline infectious diseases-E-BOOK**. Elsevier Health Sciences, 2014.
- TOEPP, A. et al. Randomized, controlled, double-blinded field trial to assess *Leishmania* vaccine effectiveness as immunotherapy for canine leishmaniosis. **Vaccine**, v. 36, n. 43, p. 6433-6441, 2018.
- TONINI, M. A. L. et al. First description of autochthonous canine visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 6, p. 754–756, 2012.
- VIEIRA F.T.; ACOSTA I.C.L.; MARTINS T.F. et al. Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. **Veterinary parasitology**, v.249, p.43-48, 2018.
- WARD, R.D.; PHILLIPS, A.; BURNET, B.; MARCONDES, C.B. The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. **Biosystematics of hematophagous insects**. Clarendon, Oxford, 1988.



WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644-645, abr. 2010.