



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**TESE DE DOUTORADO**

**USO DE MÉTODO DE BIOLOGIA MOLECULAR  
QUANTITATIVO (PCR *real-time*) NA AVALIAÇÃO DE  
RESERVATÓRIOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL**

**FRED DA SILVA JULIÃO**

**Salvador - Bahia – Brasil  
2011**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**USO DE MÉTODO DE BIOLOGIA MOLECULAR  
QUANTITATIVO (PCR *real-time*) NA AVALIAÇÃO DE  
RESERVATÓRIOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL**

**FRED DA SILVA JULIÃO**

Orientador:

Prof. Dr Edson Duarte Moreira Jr.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Doutor.

**Salvador - Bahia – Brasil  
2011**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

J94u Julião, Fred da Silva.  
Uso de método de biologia molecular quantitativo (PCR real time) na  
avaliação de reservatórios para leishmaniose visceral [manuscrito] / Fred da  
Silva Julião. - 2011.  
84 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa  
Gonçalo Moniz. 2011.

Orientador: Prof. Dr. Edson Duarte Moreira Junior, Laboratório de  
Epidemiologia Molecular e Bioestatística.

1. Leishmaniose visceral. 2. Reação em Cadeia da Polimerase.  
3. Ruminantes. 5. *Didelphis*. I. Título.

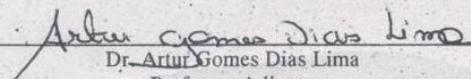
CDU 616.993.161

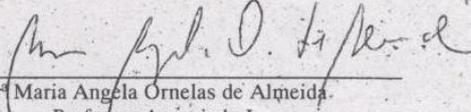
"USO DE MÉTODO DE BIOLOGIA MOLECULAR QUANTITATIVO (PCR real-time) NA  
INVESTIGAÇÃO DE RESERVATÓRIOS PARA LAISHMANIOSE VISCERAL",

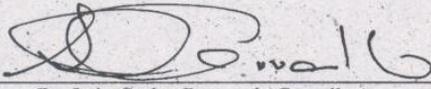
FRED DA SILVA JULIAO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

  
Dr. Artur Gomes Dias Lima  
Professor Adjunto  
UNEB

  
Dr. Maria Angela Ornelas de Almeida  
Professor Associado I  
UFBA

  
Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho  
Pesquisador Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

***“Feliz o homem que acha sabedoria,  
e o homem que adquire conhecimento;  
porque melhor é o lucro que ela dá do que o da prata,  
e melhor sua renda do que o ouro mais fino.  
Mais preciosa é do que as jóias,  
e nada do que possas desejar é comparável a ela.”***

*Provérbios 3:13-15*

## AGRADECIMENTO

A Jesus Cristo: meu mestre, escudo, fortaleza, esconderijo, exemplo de vida, amigo... A Ele devo toda honra e glória!

A meus pais (*In memoriam*), que mesmo não possuindo o ensino básico completo tinham percepção da importância do conhecimento acadêmico;

A minha esposa e filha, Eneida e Sara Julião, pelo incentivo e compreensão, principalmente nos momentos de ausência;

A cada um dos membros da família LEMB, especialmente a Dr. Edson Duarte Moreira Jr. (meu orientador) e a colega Cristiane Nascimento (pela realização dos exames de PCR *real-time*);

Ao Sr. Francisco, Sra. Janice e Sra. Maricélia (Prefeito, Secretária de Saúde e responsável da Vigilância a Saúde) de Salinas da Margarida-Bahia, por facilitarem a realização deste estudo;

Aos Agentes Comunitários de Saúde de Salinas da Margarida-Bahia, especialmente aos agentes comunitários da localidade de Encarnação de Salinas, nas pessoas de: Aurisa Santos, Lucimares Santos, Lucimar Santos, Maria Santos, Ofélia Pepe e Reinaldo Santos. Pelo exemplo de dedicação e amizade demonstrado por vocês na elaboração deste trabalho;

A FAPESB pelo auxílio financeiro através do Apoio a Projeto de Pesquisa (nº 2124/2005) e por bolsa de Apoio Técnico 1 (nº 3615/2006);

Ao CNPq pelo auxílio a Projeto de Pesquisa nº 476792/2006-1;

Ao Geógrafo Renato Reis, pela presteza ao colaborar na elaboração das imagens aéreas;

Aos Médicos Veterinários, Cyro Gomes Neto e Leane Gondim, pela colaboração na identificação dos *Didelphis albiventris*;

Ao Médico Veterinário Ademilton Silva, responsável pelos exames de rotina do Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais do Hospital de Medicina Veterinária da UFBA, pela colaboração na identificação das pulgas;

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, *Campus Santa Inês*, por liberar-me das atividades didático-pedagógicas nos dias que precederam a conclusão deste trabalho;

Agradeço a todos os amigos, colegas do CPqGM, funcionários e professores que contribuíram direta ou indiretamente, para a realização desta Tese.

JULIÃO. F. S. **Uso de método de biologia molecular quantitativo (PCR *real-time*) na avaliação de reservatórios para leishmaniose visceral**, Salvador, 2011. 84p. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose sistêmica de importância reconhecida em saúde pública, 90% dos casos no novo mundo são oriundos do Brasil. Os cães domésticos e as raposas são considerados como os principais reservatórios. A persistência da *Leishmania* em áreas endêmicas e o insucesso das medidas de prevenção, dirigidas exclusivamente ao reservatório canino, sugerem que outros animais podem ter importância na manutenção do ciclo de transmissão da LV. **OBJETIVO:** Avaliar potenciais reservatórios para LV numa área endêmica, utilizando método de biologia molecular quantitativo (PCR *real-time*). **MÉTODOS:** Foram estudados animais domésticos (bovinos, equídeos, caprinos e ovinos) e animais silvestres (marsupial), no município de Salinas da Margarida, Bahia, de 2007 a 2009. Todos os animais domésticos de produção mantidos e/ou pernoitando nas áreas urbanas do município foram incluídos. Os marsupiais foram capturados com armadilha animal modelo Tomahawk colocadas no peridomicílio das residências onde ocorreram casos de LV humana e/ou canina na localidade de Encarnação. Nos animais domésticos de produção foi coletado apenas amostra de sangue periférico e nos marsupiais, além de sangue, foi obtida uma amostra de pele através de biópsia da orelha. Em todas as amostras foi realizado PCR *real-time* para investigar a presença de DNA do parasito e estimar a carga parasitária. Os *primers* e sondas utilizados foram selecionados em gene SSU rRNA, que aparece 160 vezes no genoma de *Leishmania spp.* e é altamente conservado entre as espécies de *Leishmania*. **RESULTADOS:** No total, foram avaliados 80 animais domésticos (20 bovinos, 33 equídeos, 20 caprinos e 7 ovinos) e 103 marsupiais, todos da espécie *Didelphis albiventris*. Cinco bovinos foram positivos no teste de PCR *real-time* com carga parasitária variando de 12,7 a 183,5 parasitos/mL. Apenas um marsupial apresentou amostra de sangue positiva (6,0 parasitos/mL). Todos os demais animais testaram negativo. **CONCLUSÃO:** A técnica de PCR *real-time* pode ser uma ferramenta útil para avaliar o papel de potenciais reservatórios domésticos e silvestres para LV. A execução do PCR *real-time* é menos trabalhosa e mais prática do que a realização do teste de xenodiagnóstico, além disso, ela poder ser automatizada, permitindo a análise de grande número de amostras em estudos epidemiológicos. A detecção de carga parasitária de *Leishmania* em sangue de bovinos, em quantidade comparável à encontrada em cães, sugere que eles podem ser reservatórios para LV. A relativa abundância de bovinos nas áreas endêmicas para LV, assim como as evidências da preferência alimentar do vetor por estes animais, ressaltam a importância do papel que os bovinos podem ter na transmissão da LV. Mais trabalhos são necessários para elucidar estas questões.

### **Descritores:**

Leishmaniose visceral, Reação em Cadeia da Polimerase, Ruminantes, *Didelphis*

JULIÃO, F. S. **Use of molecular biology quantitative method (real-time PCR) in the evaluation of reservoirs for visceral leishmaniasis.** Salvador, 2011. 84p. (Doctoral thesis of Biotechnology in Health and Investigative Medicine) – Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Visceral leishmaniasis (VL) is a systemic zoonotic disease of public health relevance, 90% of cases in the new world are from Brazil. Domestic dogs and foxes are considered the main reservoirs. The persistence of *Leishmania* in endemic areas and the failure of preventive measures, directed exclusively to the canine reservoir, suggest that other animals may be important in maintaining the transmission cycle of *Leishmania*. **OBJECTIVE:** To investigate potential reservoirs for VL in an endemic area, using molecular biology quantitative method (*real-time* PCR). **METHODS:** We studied domestic animals (cattle, horses, goats and sheeps) and wildlife (marsupial), in the city of Salinas da Margarida, Bahia, from 2007 to 2009. All livestock animals maintained and/or staying overnight in the urban areas of the municipality were included. The marsupials were captured with *Tomahawk* model animal traps placed outside the home of homes where there were human and/or dog VL cases in the locality of the Encarnaçao. In livestock animals, we collected only a sample of peripheral blood and in marsupials, in addition to blood we also collected a sample of ear skin biopsy. In all samples we carried out *real-time* PCR to detect the presence of parasite DNA and to estimate the parasite load. The *primers* and probes used were selected on SSU rRNA gene, which appears 160 times in the genome of *Leishmania* spp. and is highly conserved among species of *Leishmania*. **RESULTS:** In total, 80 livestock animals were evaluated (20 cattle, 33 horses, 20 goats and 7 sheep), and 103 marsupials, all *Didelphis albiventris*. Five cattle were positive by *real-time* PCR with parasite load ranging from 12.7 to 183.5 parasites/mL. Only one marsupial had a positive blood sample (6.0 parasites/mL). All other animals tested negative. **CONCLUSION:** The *real-time* PCR technique can be a useful tool for assessing the potential role of domestic and wild reservoir for VL. The implementation of *real-time* PCR is less laborious and more practical than the test of xenodiagnosis, in addition, it can be automated, allowing for the analysis of large number of samples in epidemiological studies. Detection of *Leishmania* parasite load in the blood of cattle, in an amount comparable to that found in dogs, suggests that they may be reservoirs for VL. The relative abundance of cattle in endemic areas for VL, as well as evidence of vector feeding preference for these animals, highlight the important role that cattle may exert in the transmission of VL. More research is needed to clarify these issues.

### **Descriptors:**

Leishmaniasis, Polymerase chain reaction, Ruminants, *Didelphis*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1.</b>	Casos de LV por município/residência, Brasil (1983-2008).....	14
<b>FIGURA 2.</b>	Exemplar fêmea da espécie <i>Didelphis albiventris</i> capturado na localidade de Encarnação, Salinas da Margarida, Bahia.....	25
<b>FIGURA 3.</b>	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> .....	28
<b>FIGURA 4.</b>	Localiza�o geográfica do município de Salinas da Margarida-Bahia.....	38
<b>QUADRO 1.</b>	Estimativa da quantidade ruminantes e equídeos criados no município Salinas da Margarida, Bahia (2006 a 2009).....	39
<b>FIGURA 5.</b>	Fluxograma de coleta de espécime e teste diagnóstico para LV nos ruminantes e equídeos.....	40
<b>FIGURA 6.</b>	Coleta de sangue em ruminantes e equídeos para pesquisa de <i>Leishmania</i> através da técnica de PCR <i>real-time</i> , Salinas da Margarida, Bahia, 2008 a 2009.....	41
<b>FIGURA 7.</b>	Fluxograma de coleta dos espécimes e teste diagnóstico para LV nos marsupiais.....	42
<b>FIGURA 8.</b>	Manipula�o dos marsupiais ( <i>D. albiventris</i> ) durante a coleta de sangue e biópsia de pele para pesquisa de <i>Leishmania</i> através da técnica de PCR <i>real-time</i> .....	43
<b>FIGURA 9.</b>	Esquema da sequência da técnica PCR <i>real-time</i> .....	45
<b>FIGURA 10.</b>	Visita aos domicílios onde ocorreram casos de LV humana e/ou canina para obter coordenadas geográficas com auxílio de GPS, Salinas da Margarida, Bahia.....	49
<b>FIGURA 11.</b>	Distribui�o dos casos de LV humana e canina no município de Salinas da Margarida, Bahia, 2002 a 2008.....	50
<b>FIGURA 12.</b>	Análise da densidade de Kernel realizada com os casos de LV no município de Salinas da Margarida, Bahia, entre 2002 e 2008.....	51
<b>FIGURA 13.</b>	Cronograma das capturas de marsupiais no município de Salinas da Margarida, Bahia, 2007 a 2008.....	52
<b>FIGURA 14.</b>	Distribui�o espacial dos locais de coloca�o das armadilhas e de captura de marsupiais, localidade de Encarna�o, Salinas da	

	Margarida, Bahia, 2007 a 2008.....	53
<b>FIGURA 15.</b>	Quintais e áreas peridomiciliares onde foram capturados marsupiais ( <i>D. albiventris</i> ) na localidade de Encarnação, Salinas da Margarida, Bahia, 2007 a 2008.....	54
<b>FIGURA 16.</b>	Ruminantes e equídeos encontrados em locais de aglomerados humanos no município de Salinas da Margarida, Bahia, 2007 a 2008.....	57
<b>FIGURA 17.</b>	Cronograma da coleta das amostras de sangue em ruminantes e equídeos no município Salinas da Margarida, Bahia, 2008 a 2009.....	58

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Características de 102 marsupiais (*D. albiventris*) capturados na localidade de Encarnação, Salinas da Margarida, Bahia, 2007 a 2008.. 55
- TABELA 2.** Identifica o das espécies de pulgas encontradas em *Didelphis albiventris* no município de Salinas da Margarida, Bahia, 2007 a 2008... 56
- TABELA 3.** Distribuic o das características dos ruminantes e equídeos estudados no município Salinas da Margarida, Bahia, 2008 a 2009..... 59
- TABELA 4.** Distribuic o da carga parasitária de *Leishmania* em sangue de ruminantes e equídeos, Salinas da Margarida, Bahia, 2008 a 2009..... 59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CONDER – Companhia de Desenvolvimento Urbano da Bahia

CPqGM – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

DAT – Teste de Aglutinação Direta

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)

*et al.* – *Et alli* (e outros)

GPS – *Global Positioning System* (Sistema de Posicionamento Global)

IC – Intervalo de confiança

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LV – Leishmaniose Visceral

MS – Ministério da Saúde

OR – *Odds ratio*

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

TRALd – Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	EPIDEMIOLOGIA.....	13
1.2	BIOLOGIA E CICLO DE TRANSMISSÃO.....	15
1.2.1	<b>Agente etiológico</b> .....	15
1.2.2	<b>Vetor</b> .....	16
1.2.3	<b>Hospedeiros/Reservatórios</b> .....	18
	<b>a) Ambiente doméstico</b> .....	18
	Ser humano.....	18
	Cão doméstico.....	19
	Outros animais domésticos.....	20
	<b>b) Ambiente silvestre</b> .....	24
	Canídeos silvestres.....	24
	Marsupiais.....	25
	Outros animais silvestres.....	26
1.2.4	<b>Ciclo Biológico da <i>Leishmania</i></b> .....	27
1.3	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	29
1.3.1	<b>Parasitológico</b> .....	29
1.3.2	<b>Imunológico</b> .....	29
1.3.3	<b>Molecular</b> .....	30
	<b>a) Qualitativo</b> .....	29
	<b>b) Quantitativo</b> .....	30
1.4	MEDIDAS DE CONTROLE.....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
4.1	LOCAL DO ESTUDO.....	37
4.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	38
4.3	SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....	39
4.3.1	<b>Animais domésticos</b> .....	39
4.3.2	<b>Marsupiais</b> .....	39
4.4	COLETA DE AMOSTRA.....	40

4.4.1	<b>Animais domésticos</b> .....	40
4.4.2	<b>Marsupiais</b> .....	41
4.5	TESTE DE PCR <i>real-time</i> .....	43
4.5.1	<b>Extração de DNA</b> .....	43
4.5.2	<b>Primers e sondas</b> .....	44
4.6	COLETA DE DADOS.....	45
4.6.1	<b>Variáveis de Predição</b> .....	45
4.6.2	<b>Variáveis Dependentes (ou Eventos de Interesse)</b> .....	46
4.7	ENTRADA E EDIÇÃO DE DADOS.....	46
4.8	PLANO DE ANÁLISE DOS DADOS.....	46
4.8.1	<b>Tamanho da Amostra e Poder do Estudo</b> .....	46
4.8.2	<b>Estatística Descritiva e Analítica</b> .....	47
4.9	ANÁLISE ESPACIAL.....	47
4.10	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	47
5	<b>RESULTADOS</b> .....	49
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	61
6.1	ANIMAIS DOMÉSTICOS DE PRODUÇÃO.....	61
6.2	MARSUPIAIS.....	64
6.3	MÉRITOS E LIMITAÇÕES.....	66
7	<b>CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES</b> .....	68
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	69

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica, com primeira descrição do agente causal em 1903 por Willian Leishman e Charles Donovan (COOK, 2007). Causada pela *Leishmania chagasi* nas Américas, é uma importante causa de morbidade e mortalidade, principalmente entre crianças (BADARÓ, 1988; BEER *et al.*, 1991; CALDAS *et al.*, 2002). A LV é considerada uma das principais doenças emergentes pela Organização Mundial de Saúde, com 90% dos casos descritos no novo mundo oriundos do Brasil (GRIMALDI *et al.*, 1989; WHO, 2002).

### 1.1 EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, com espectro da doença dependente da espécie de *Leishmania*. A LV é a forma mais grave, distribuída nos cinco continentes, com incidência anual aproximada de 500 mil casos humanos (ADDY & NANDY, 1992; DESJEUX, 1996).

A LV é invariavelmente fatal se não tratada e mesmo com tratamento adequado mantém taxas de letalidade de três a 17% no Brasil (SILVA *et al.*, 2001; PEDROSA & ROCHA, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2004; REY *et al.*, 2005; BRASIL, 2006). Das 27 Unidades Federativas do Brasil, existe ocorrência de LV em 21, e até o ano de 2008 apenas a região sul do país não tinha registrado caso de LV humana autóctone, o que mais tarde foi reportado por Sirena *et al.* (2009). Entretanto, a maior parte dos casos ocorre nas regiões sudoeste e nordeste brasileiro (FIGURA 1).

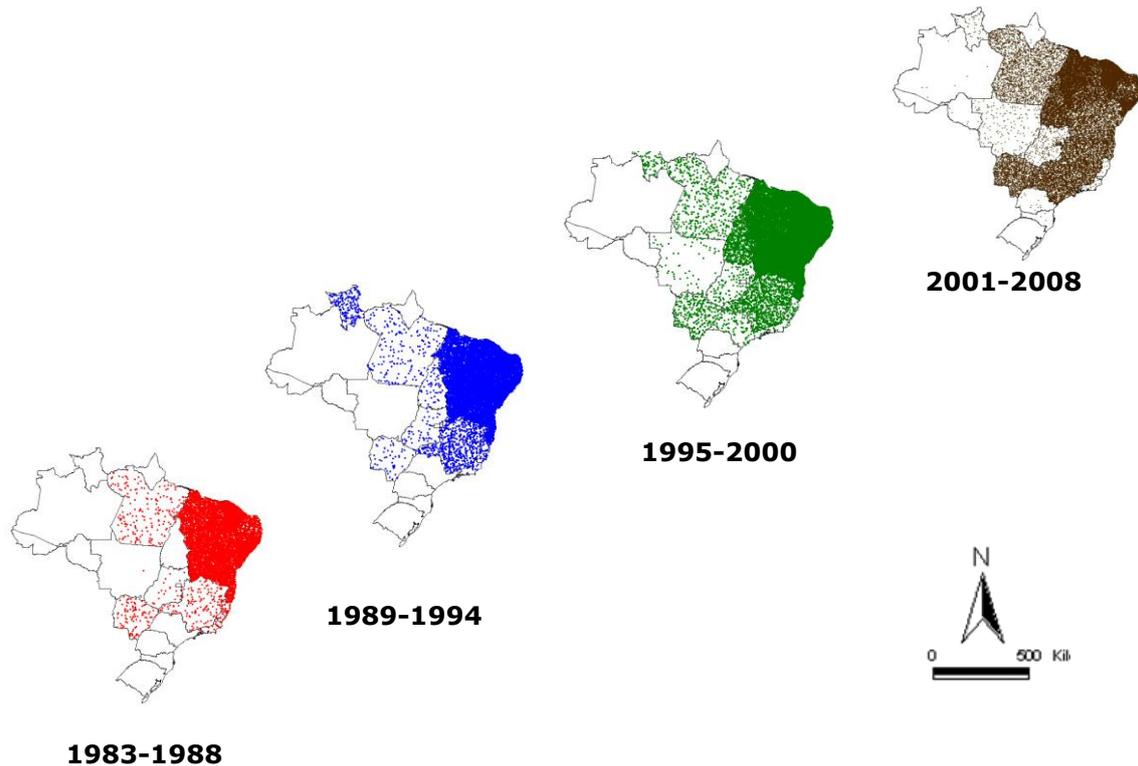


FIGURA 1. Casos de LV por município de residência, Brasil (1983-2008).

Fonte: Sinan-SVS/MS

Na primeira metade do século XX, quando foram publicados os primeiros resultados dos estudos epidemiológicos sobre esta zoonose no Brasil, a LV apresentava uma ocorrência marcadamente rural, atingindo as populações mais carentes, especialmente na região semi-árida do Nordeste (DEANE & DEANE, 1955; LACERDA, 1994; WIJEYARATNE *et al.*, 1994; XIMENES *et al.*, 1999). As degradações ambientais, alterações climáticas e as migrações de populações carentes para a periferia dos grandes centros, fixando-se em locais sem infraestrutura e em contato direto com animais, contribuíram para o processo de urbanização da doença (TESH, 1995; PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2001; FRANKE *et al.*, 2002). Provavelmente porque estas condições aumentam as populações de insetos vetores e reservatórios do parasito (CORREDOR *et al.*, 1989<sup>a</sup>; LAINSON, 1989; ARIAS *et al.*, 1996).

Este padrão de distribuição espacial tem apresentado uma crescente complexidade, com acentuada frequência de casos humanos e/ou caninos de LV em áreas urbanas, inclusive em capitais brasileiras como Aracaju-SE (TAVARES & TAVARES, 1999), Belém-PA (LAINSON *et al.*, 1969), Belo Horizonte-MG

(BEVILACQUA *et al.*, 2001; MARGONARI *et al.*, 2006), Boa Vista-RR (EVANGELISTA *et al.*, 2009), Brasília-DF (CARRANZA-TAMAYO *et al.*, 2010), Campo Grande-MS (OLIVEIRA *et al.*, 2006; BOTELHO & NATAL, 2009), Cuiabá-MT (MESTRE & FONTES, 2007, ALMEIDA *et al.*, 2009), Florianópolis-SC (SANTA CATARINA, 2010), Fortaleza-CE, (ALVES *et al.*, 1998); Goiânia-GO (LINHARES *et al.*, 2005), João Pessoa-PB (LIMA *et al.*, 2004), Maceió-AL (PEDROSA & ROCHA, 2004), Natal-RN (JERONIMO *et al.*, 2004), Recife-PE (DANTAS-TORRES *et al.*, 2005), Rio de Janeiro-RJ (MARZOCHI *et al.*, 1985); Salvador-BA (BARBOZA *et al.*, 2009), São Luís-MA (NASCIMENTO *et al.*, 1996; CALDAS *et al.*, 2002; MENDES *et al.*, 2002); São Paulo-SP, (IVERSON *et al.*, 1983) e Teresina-PI (COSTA *et al.*, 1999).

O aumento do número de casos de LV humana nas áreas endêmicas, a re-emergência de casos em áreas onde a doença havia sido erradicada e a expansão da doença a áreas previamente indenes, como a periferia de grandes centros urbanos, revela a crescente importância desta zoonose como problema de saúde pública no Brasil. A LV tem sido reportada em áreas litorâneas como: Camaçari na Bahia (CUNHA *et al.*, 1995; BARBOZA *et al.*, 2006; JULIÃO *et al.*, 2007), litoral do Estado de Sergipe (TAVARES & TAVARES, 1999), Ilha de Guaratiba no Rio de Janeiro (SILVA *et al.*, 2005) e, mais recentemente, em Salinas da Margarida, também na Bahia, que a partir de 2002 tem notificado casos de LV, incluindo óbitos humanos (SOUZA *et al.*, 2006).

## 1.2 BIOLOGIA E CICLO DE TRANSMISSÃO

### 1.2.1 Agente etiológico

Os agentes etiológicos da LV são protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*. O agente causal de LV na Índia subcontinental e leste da África é a *Leishmania donovani*, no Mediterrâneo a *Leishmania infantum* e na América Latina a *Leishmania chagasi*, sendo as duas últimas consideradas como única espécie (LAINSON & SHAW, 1978; DEREURE *et al.*, 1999; GUERIN *et al.*, 2002; SHAW, 2006).

Em seu ciclo biológico, o parasito possui duas formas distintas: amastigota e promastigota. As formas amastigotas são encontradas no interior de células do sistema fagocitário mononuclear (macrófagos e monócitos) de hospedeiros vertebrados. No trato digestório do vetor, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas, forma flagelada do parasito que é seu estágio infectante, penetrando no hospedeiro através da picada do vetor (SACKS & PERKINS, 1984).

### 1.2.2 Vetor

A *L. chagasi* é um parasito heterogênico e heteroxênico, que necessita de um vetor para completar seu ciclo biológico. Existe uma variedade de espécies de vetor em diferentes regiões geográficas (GUERIN *et al.*, 2002; DIAS-LIMA *et al.*, 2003). Sherlock (1997) sugeriu uma especificidade entre as espécies do gênero *Leishmania* e seus respectivos vetores. No Brasil, o principal vetor da *L. chagasi* é a espécie *Lutzomyia longipalpis*, inseto da classe Díptera pertencente à família Psychodidae.

Este inseto apresenta hábito noturno com maior atividade entre 18:00 e 23:00 horas, que se reduz gradativamente, até cessar entre 5:00 e 6:00 horas da manhã (DEANE & DEANE, 1962; SHERLOCK, 1996; CARRASCO *et al.*, 1998). Santos *et al.* (2003) relataram o envolvimento da espécie *Lutzomyia cruzi* no ciclo de transmissão da *L. chagasi* na região de Corumbá, Mato Grosso do Sul. De acordo com a região geográfica, os vetores recebem designações como cangalhinha, mosquito palha ou asa branca, entre outros (ALEXANDER *et al.*, 2002).

O ciclo biológico do *L. longipalpis* ocorre parcialmente no solo (REY, 2001). Após a cópula, as fêmeas depositam seus ovos, preferencialmente, em solo úmido e rico em matéria orgânica, onde permanecem de sete a 10 dias até a eclosão. Os quatro estágios larvais se sucedem, perfazendo um período de 20 a 30 dias, transformando-se então em pupa, condição em que permanecem por cerca de duas semanas, originando o inseto adulto. A longevidade das fêmeas adultas é de aproximadamente 20 dias (BRASIL, 2006).

Pouco se sabe sobre os criadouros naturais do vetor. Entretanto, os abrigos mais frequentes do inseto na fase adulta, parecem ser os espaços sob ou entre pedras e as grutas. Entretanto, o *L. longipalpis* pode ser encontrado, também, em outros ecótopos naturais como troncos e ocos de árvores, tocas de animais,

arbustos e sob as folhas que recobrem o solo (DEANE & DEANE, 1957; IVERSON *et al.*, 1983). Tanto nos estabelecimentos rurais, quanto em áreas urbana e periurbana, o inseto adulto é encontrado com mais frequência em galinheiros, chiqueiros, canis e no intradomicílio (BRASIL, 2006).

O hábito de criar cães, galinhas, bovinos e cavalos, bem como a presença de marsupiais e outros animais domésticos e silvestres no peridomicílio, parecem contribuir para o aumento da densidade populacional do vetor e o risco de transmissão do parasito (SHERLOCK *et al.*, 1988; ARIAS *et al.*, 1996; XIMENES *et al.*, 1999; BUCHETON *et al.*, 2002; MISSAWA *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2010). As galinhas e os pássaros representam uma fonte de alimentação para o vetor, porém não atuam como reservatórios do parasito. Sua importância na epidemiologia da LV parece limitar-se à atração dos vetores e animais silvestres, potencialmente reservatórios do parasito, para o peridomicílio. É possível que o acúmulo de dejetos de animais no solo favoreça o desenvolvimento do estágio larval do vetor (DYE, 1996; LANE, 1986; SINGH *et al.*, 2008).

Missawa *et al.* (2008), no município de Várzea Grande, Estado de Mato Grosso, realizaram estudo de preferência alimentar de *L. longipalpis* intra e peridomicilar. De 2.376 fêmeas capturadas, 104 estavam ingurgitadas e tiveram seu conteúdo alimentar triturado e centrifugado individualmente. O sobrenadante deste material foi testado com anticorpos contra antígenos de boi, cão, cavalo, porco, roedor, ave e ser humano, para identificação da fonte alimentar. Foi constatado que estes insetos alimentaram-se preferencialmente em aves (30,8%), roedores (21,2%) e humanos (13,5%), mas também foram encontradas fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas do sangue de gambás, bois, cavalos e cães, demonstrando o caráter antropofílico e oportunista deste inseto.

Para que ocorra a transmissão do parasito, é necessário que as fêmeas de *L. longipalpis*, durante o repasto sanguíneo nos hospedeiros infectados, ingiram monócitos ou macrófagos com a forma amastigota de *Leishmania*. No trato digestivo anterior do vetor há liberação das amastigotas dos macrófagos, que evoluem para a forma flagelada denominada de promastigota, por divisão binária, prosseguindo sua multiplicação ainda no trato digestivo. O ciclo de vida da *L. chagasi* no vetor é de quatro a sete dias, período em que as formas promastigotas transformam-se em paramastigotas, passando a colonizar o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo. Nesta etapa diferenciam-se na forma

infectante, promastigota metacíclica. Durante o repasto sanguíneo do vetor em um novo hospedeiro, as promastigotas são inoculadas e assumem a forma amastigota ao serem fagocitadas pelos macrófagos no hospedeiro vertebrado (DESJEUX, 1992; ARIAS *et al.*, 1996; ASHFORD, 2000; BRASIL, 2006).

Embora classicamente no Brasil a *L. chagasi* seja transmitida através da picada da fêmea de *L. longipalpis* e *L. cruzi*, em algumas áreas endêmicas não foram encontrados estes vetores, a exemplo do município de São Vicente Férrer, Zona da Mata em Pernambuco. Neste local, de dezembro de 2002 a novembro de 2003, um total de 23.156 insetos do gênero *Lutzomyia* foram coletados em diferentes áreas e não foi encontrada nenhuma das espécies com conhecida capacidade vetorial (CARVALHO *et al.*, 2007). A detecção de *Leishmania* em carrapatos e pulgas sugere a possibilidade de outros vetores (SHERLOCK, 1964; COUTINHO *et al.*, 2005; COUTINHO & LINARDI, 2007; SILVA *et al.*, 2007; DANTAS-TORRES *et al.*, 2010).

Existe ainda a possibilidade de parasitos do gênero *Leishmania* serem transmitidos por outros meios que não o vetorial, como: transfusão de sangue; transplante de órgãos; uso comum de seringa contaminada, em especial nos usuários de drogas injetáveis; ingestão de pulgas e/ou carrapatos infectados; transmissão venérea e transmissão transplacentária (SCORZA *et al.*, 1984; COHEN *et al.*, 1991; RAJASEKARIAH, 2001; PAREDES *et al.*, 2003; MATHUR & SAMANTARAY, 2004; COUTINHO *et al.*, 2005; CARDO, 2006; FREITAS *et al.*, 2006; COUTINHO & LINARDI, 2007; SILVA *et al.*, 2009<sup>a</sup>; SILVA *et al.*, 2009<sup>b</sup>).

### 1.2.3 Hospedeiros/Reservatórios

#### a) Ambiente doméstico

##### Ser humano

O ser humano é considerado o reservatório para LV na Índia, onde a doença é causada por *L. donovani*. Isto é menos evidente nos casos do novo mundo, onde canídeos domésticos e silvestres, além de marsupiais são considerados os principais reservatórios (SHAW, 1988; DESJEUX, 1992).

Na Ilha de Marajó, Pará, Quinzel *et al.* (1992) analisaram a preferência alimentar de *L. longipalpis* para humanos, cães e galinhas, demonstrando a preferência dos vetores pelo ser humano. No entanto, ao se alimentarem em pessoas infectadas, a taxa de infecção nos vetores é baixa, o que reduz a importância do humano como reservatório do parasito (SHERLOCK, 1996).

O papel do ser humano como reservatório pode ganhar em significado durante surtos epidêmicos de LV e na ocorrência de elevada densidade populacional do vetor (ASHFORD, 1996). Embora seja relatado o caráter antropofílico da *L. longipalpis* (MISSAWA *et al.*, 2008), a proximidade de animais aos humanos pode lhes conferir um caráter protetor por servir de alimentação alternativa ao vetor (BERN *et al.*, 2000; ALEXANDER *et al.*, 2002; SINGH *et al.*, 2010)

Deane (1958) afirmou a importância do cão como um potencial reservatório, especialmente em virtude do intenso parasitismo cutâneo, mas não despreza o envolvimento do ser humano, atuando como reservatório no ciclo de transmissão da *L. chagasi*. Trabalhos conduzidos por Dietze *et al.* (1997) e por Dereure *et al.* (2003) apontaram para a participação do ser humano como reservatório, contribuindo inclusive para a transmissão da doença à população canina.

### **Cão doméstico**

Desde os primeiros estudos sobre os possíveis reservatórios de *L. chagasi*, o cão doméstico tem sido incriminado (DEANE e DEANE, 1954<sup>a</sup>; DEANE, 1958), sendo esta hipótese apoiada por diversos outros estudos que imputam ao cão doméstico o papel de reservatório, inclusive atuando como um elo entre o ciclo silvestre do parasito e o ambiente domiciliar (AZAB *et al.*, 1984; ABRANCHES *et al.*, 1991; AHFORD *et al.*, 1998; DEREURE *et al.*, 2003)

Shaw (1988) conceitua os reservatórios primários de *Leishmania* como sendo hospedeiros mamíferos de parasitos responsáveis pela manutenção de infecção no meio silvestre, enquanto os reservatórios secundários são os animais que quando infectados, não são capazes de manter o ciclo enzoótico. Desta forma o pesquisador não considera o cão doméstico como reservatório primário de *L. chagasi* uma vez que o cão afetado pode morrer, inviabilizando a sobrevivência do parasito. A

importância desta espécie seria então secundária, atuando principalmente como amplificadora, dinamizando o ciclo de transmissão em uma determinada área.

Lesão de pele, apetite reduzido, linfadenopatia generalizada, esplenomegalia, onicogrifose, lesão ocular (blefarites em associação com dermatites faciais, ceratoconjuntivite, uveíte, edema de córnea), alopecia periorbital, epistaxe, claudicação, palidez de mucosa, úlceras de pele; emaciação, falência renal e diarreia, são sinais clínicos que os cães podem apresentar quando estão com LV (ABRANCHES *et al.*, 1991; CIARAMELLA *et al.*, 1997; FERRER, 1999<sup>b</sup>; SILVA *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2005). Porém, nem todos os cães adoecem e algumas manifestações clínicas podem sugerir outras enfermidades, inexistindo sinais específicos para LV, o que viabiliza a permanência do cão infectado na área, propagando a infecção (BRAGA *et al.*, 1998; AGUIAR *et al.*, 2007)

### **Outros animais domésticos**

Espécies domésticas, inclusive animais de produção, são capazes de atrair os vetores de *Leishmania* sp., e algumas são capazes de manter o parasito em seus organismos, contribuindo potencialmente para a perenidade do ciclo do protozoário.

Em estudo de soroprevalência para LV realizado no Sudão, utilizando o teste de aglutinação direta, encontrou-se reação positiva de 68,7% dos equídeos (66/96), 21,4% (9/42) dos bovinos e 8,5%(5/59) dos caprinos analisados. Entretanto, ao empregar o teste ELISA em bovinos e caprinos, a soroprevalência foi de 47,6% (20/42) e 13,6% (8/59), respectivamente (MUKHTAR *et al.*, 2000). Os autores sugerem a exposição dos animais domésticos, especialmente equídeos e bovinos, à infecção por *Leishmania*. Ximenes *et al.* (1999) afirmaram que os cavalos apresentam alta capacidade de atrair *L. longipalpis*. Contudo, esta espécie doméstica não está descrita como reservatório de *L. chagasi*, podendo, no entanto, desempenhar um papel secundário, atraindo os vetores para o peridomicílio.

Cerqueira *et al.* (2003) inocularam equídeos experimentalmente com *L. chagasi* e concluíram que a importância destes animais na cadeia epidemiológica da LV está ligada ao aumento da reprodução e densidade populacional do vetor, favorecida por esta fonte alimentar. Os autores observaram que, apesar dos equídeos soroconverterem e manterem formas amastigotas do parasito no fígado,

estes não desenvolveram sinais clínicos nem foram capazes de infectar experimentalmente o *L. longipalpis* ao serem submetidos ao xenodiagnóstico.

Fernández-Bellon *et al.* (2006) avaliaram as respostas imunes humoral e celular de equínos à *L. infantum* em área endêmica para LV em Barcelona, Espanha. Foram analisados 112 equínos com dois ELISA (um com proteína A e outro com anti-IgG) e 55 por ensaio de proliferação linfocitária. Nenhuma amostra foi reagente ao ELISA com anti-IgG. No entanto, 16 (14,3%) foram reagentes no ELISA com proteína A. Quanto à resposta celular, 20 animais apresentaram proliferação linfocitária; e quatro animais foram positivos em ambos os testes. Os autores concluíram que a resposta imune em equínos ocorre mesmo com ausência de manifestações clínicas e que, em área endêmica, a exposição destes animais ao parasito é comum. No entanto, indicam que a resposta imune em equínos é geralmente efetiva na prevenção do desenvolvimento da doença.

Rolão *et al.* (2005) em Portugal descreveram o primeiro caso de infecção por *Leishmania* em um equíno que apresentava uma lesão ulcerada de pele, sendo o diagnóstico baseado em teste sorológico e detecção do DNA do parasito por PCR *real-time* usando uma sonda específica para *L. infantum*. Concluíram que a infecção equína por *L. infantum* necessita ser melhor explorada para esclarecer a forma clínica em equínos e o papel deles como reservatório do parasito em área endêmica.

Desde o primeiro achado de *Leishmania* sp. em corte histológico e leptonas em cultura de material de úlcera, o gato doméstico tem sido indicado como possível reservatório de *Leishmania* (MELLO, 1940; KIRKPATRICK *et al.*, 1984; SHERLOCK, 1996; MAROLI *et al.*, 2007; NASEREDDIN *et al.*, 2008). No entanto, o primeiro relato no continente americano de infecção natural de *L. chagasi* em gato doméstico ocorreu no município de Cotia, Estado de São Paulo, onde não havia casos autóctones de LV humana ou canina (SAVANI *et al.*, 2004). A comprovação de transmissibilidade de *L. infantum* de gato para um vetor ocorreu em 2005, na Ilha de Lipari (Sicília, Itália) quando xenodiagnóstico com *Phlebotomus perniciosus* foi realizado neste animal naturalmente infectado pelo protozoário (MAROLI *et al.*, 2007). No Brasil, o primeiro caso de infecção de *L. Longipalpis* por *L. Infantum*, de um gato naturalmente infectado foi publicado por Silva *et al.*, em 2010. Neste trabalho, destacou-se a necessidade de mais estudos para determinar a taxa de ocorrência de LV entre gatos domésticos, a relação de infectividade de *L. longipalpis* em áreas endêmicas e qual o papel destes animais na epidemiologia da doença.

Al-Zahrani *et al.* (1989) investigando o peridomicílio de 50 pacientes com LV na Arábia Saudita, constataram a frequente presença de ovinos, caprinos, gatos e cães em áreas próximas a casas destes pacientes. Fisa *et al.* (1999) realizaram um levantamento sorológico, na região nordeste da Espanha, área endêmica de LV, com amostras de 151 ovinos e 147 caprinos para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*, por dot-ELISA. Neste estudo, encontraram 21 ovinos e 15 caprinos soropositivos, porém com títulos baixos (1:100 – 1:400). Estes fatos levam a hipótese de incremento do risco de infecção em humanos atribuído à criação de animais domésticos no peridomicílio (ALEXANDER *et al.*, 2002).

No município de Jequié, Bahia, foi realizado por Moraes-Silva *et al.*, (2006), inquérito sorológico em 92 suínos (*Sus scrofa domesticus*), que viviam livremente, utilizando o teste ELISA, e inoculação experimental com *L. chagasi* em três animais que ficaram confinados durante 12 meses. Dos animais confinados, foi realizado xenodiagnóstico com *L. longipalpis* e coletadas mensalmente amostras de sangue, pele, fígado e medula óssea, a partir de dois meses da inoculação experimental. Dos animais inoculados foi feita pesquisa direta do parasito nas amostras coletadas, além de PCR em medula óssea e teste sorológico por ELISA. Embora tenha-se encontrado soroprevalência de 40,2% nos suínos incluídos no inquérito sorológico e produção de anticorpos nos animais inoculados, não foi detectado o parasito em nenhuma das técnicas usadas nas amostras dos animais inoculados experimentalmente. Os autores concluíram que os suínos não seriam reservatórios de *L. chagasi* e que sua importância na epidemiologia da LV poderia estar restrita à atração e manutenção do vetor no peridomicílio, representando um aumento da chance de adquirir a doença em áreas com presença dos suínos.

Em áreas endêmicas de LV, os bovinos são frequentemente picados por vetores de *Leishmania* (KILLICK-KENDRICK, 1990<sup>a</sup>). No entanto, existe escassez no conhecimento sobre a suscetibilidade destes animais à infecção, atribuindo apenas o papel de atração de vetor e aumento de risco de ocorrer a infecção em humanos (KILLICK-KENDRICK, 1990<sup>b</sup>; BUCHETON *et al.*, 2002; MISSAWA *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2010). No entanto, Bern *et al.* (2000) indicam que no Nepal, devido a preferência alimentar do vetor por bovinos e bubalinos, a presença destes animais nos peridomicílios seja um fator protetor para LV nas pessoas (OR 0,27; IC 0,13 – 0,80).

Khanal *et al.* (2010) coletaram amostras sorológicas de bovinos, bubalinos e caprinos provenientes de duas regiões do Nepal, uma endêmica para LV e outra não endêmica – com distância de 60 km entre elas. As amostras foram submetidas ao teste de aglutinação direta (DAT) para avaliar resposta à infecção por *L. donovani*, estabelecendo um ponto de corte de  $\geq 1:800$ . Dos 185 animais da área endêmica, 10% (2/20) dos bovinos, 22,7% (5/22) dos bubalinos e 23,1% (33/143) dos caprinos foram soropositivos. Enquanto que, nos 63 animais da área não endêmica, houve soropositividade em 9,5% (2/21) dos bovinos e 5,9% (1/17) dos bubalinos. Os autores concluíram que os animais domésticos podem colaborar com a dispersão espacial do parasito aumentando o risco de infecção em humanos por servirem como fonte alimentar potencialmente infectada ao vetor.

Bhattarai *et al.* (2010) no Nepal detectaram DNA de *Leishmania* pela técnica da PCR em sangue de ruminantes criados em área endêmica para LV. Os resultados revelaram que 4% (1/24) dos bubalinos, 5% (1/20) dos bovinos e 16% (23/144) dos caprinos estavam infectados. Os autores consideraram que a coleta da amostra ocorreu cinco meses após a temporada de pico do número de casos humanos e a alta prevalência encontrada nos caprinos sugeriu que estes pequenos ruminantes podem ser infectados com *L. donovani* e que esta infecção pode persistir por vários meses.

Mutinga *et al.* (1989) no Quênia, demonstraram que os caprinos são hospedeiros de *L. donovani* ao isolarem o parasito em punção de linfonodos, baço, fígado, lesão de orelha e lesão de vulva, de animais naturalmente infectados, além de reproduzirem experimentalmente a infecção em caprinos sadios. Ainda no Quênia, Williams *et al.* (1991) encontraram caprinos com diagnóstico clínico e parasitológico de LV e demonstraram a presença do parasito na pele, fígado, baço, rim, linfonodos e traquéia, descrevendo a infecção visceral pela *L. aethiopica*.

Embora alguns autores afirmem que galinhas não sejam hospedeiros de *Leishmania*, estando relacionada na cadeia epidemiológica como atrativos de animais potenciais reservatórios e do vetor (ARIAS *et al.* 1996; DYE, 1996; ALEXANDER *et al.*, 2002), um estudo com infecção experimental em galinhas demonstrou a parasitemia em amostras de tecidos destes animais através de PCR *real-time* (OTRANTO *et al.*, 2010).

## **b) Ambiente silvestre**

### **Canídeos silvestres**

No Ceará, Deane & Deane (1954<sup>b</sup>) tiveram sucesso em demonstrar a presença de *Leishmania* através da punção hepática de uma raposa, sendo os primeiros a registrar a infecção neste animal silvestre e alertar quanto ao seu potencial papel de reservatório do parasito.

No ambiente natural, a raposa tem sido incriminada como o principal reservatório da *L. chagasi* (ALENCAR, 1956; DEANE, 1958; NADIM *et al.*, 1978). Uma possível conexão ecoepidemiológica do referido reservatório silvestre com o ambiente doméstico foi sugerida por Cerqueira *et al.* (2000), ao verificarem a ocorrência, em raposas, de espécies de pulgas que parasitam o homem e mamíferos domésticos.

A ocorrência de raposas *Cerdocyon thous* naturalmente infectadas por *L. chagasi*, porém assintomáticas, no Estado do Pará, reforça a suposição desta espécie ser um reservatório primário do parasito, envolvido na manutenção do ciclo silvestre (SILVEIRA *et al.*, 1982).

Na região Amazônica, Lainson *et al.* (1990) encontraram infecções assintomáticas em espécimes de *C. thous*, e demonstraram seu potencial em infectar os vetores, sugerindo o envolvimento desta espécie, também, na manutenção do endemismo da doença em regiões desabitadas ou esparsamente habitadas pelo homem.

Estudo sorológico, utilizando o ELISA em área endêmica para LV em Israel, encontrou 7,6% (4/53) dos chacais com anticorpos anti-*Leishmania* e apenas 4,5% (1/22) das raposas (*Vulpes vulpes*). Portanto, estes canídeos foram apontados como possíveis reservatórios do agente nesta região (BANETH & JAFFE, 1999). Embora menos citado na literatura que as raposas, também tem se incriminado o chacal como reservatório importante na cadeia epidemiológica da LV (DESJEUX, 2001; HALPERN & WANG, 2001). A participação de canídeos silvestres na epidemiologia da LV tem sido apontada, entre outros, em países como Espanha (FISA *et al.*, 1999), Itália (BETTINI *et al.*, 1980; MANCIANTI *et al.*, 1994), Israel (BANETH & JAFFE, 1999) e Portugal (ABRANCHES *et al.*, 1982; ABRANCHES *et al.*, 1984).

## Marsupiais

Os sariguês ou gambás, animais da ordem Marsupialia, são mamíferos sinantrópicos com ampla distribuição na América do Sul. Apresentam uma bolsa no abdômen (marsúpio), na qual os filhotes completam o desenvolvimento. São comumente encontrados em áreas urbanas, tem hábito crepuscular e se alimentam de frutos, insetos, filhotes de aves e pequenos mamíferos, répteis e anfíbios. A Figura 2 mostra uma fêmea da espécie *Didelphis albiventris*, onde se verifica o marsúpio (CÁCERES, 2002; DURANT, 2002; ANTUNES, 2005; KRAUSE & KRAUSE, 2006).



FIGURA 2. Exemplo fêmea da espécie *Didelphis albiventris* capturado na localidade de Encarnação, Salinas da Margarida, Bahia.

Fonte: Arquivo pessoal

Os marsupiais, pertencentes ao gênero *Didelphis*, são considerados hospedeiros naturais de agentes etiológicos de algumas doenças infecciosas e parasitárias como leptospirose, riquetsioses, helmintoses, tripanossomíase e leishmanioses (SHERLOCK *et al.*, 1988; STEINDEL *et al.*, 1995; CARREIRA *et al.*, 2001; CABRERA *et al.*, 2003; ANTUNES, 2005).

As primeiras descrições de marsupiais didelfídeos infectados por *Leishmania* sp. ocorreram no Brasil (YOSHIDA *et al.*, 1979; SHERLOCK *et al.*, 1984), em seguida na Colômbia (CORREDOR *et al.*, 1989<sup>b</sup>; TRAVI *et al.*, 1998), sugerindo a inclusão destes animais nos estudos epidemiológicos sobre a LV.

Estudos demonstram uma alta suscetibilidade da espécie *Didelphis marsupialis* à infecção por *L. donovani*, sugerindo a participação deste reservatório nos focos da doença (HANSON *et al.*, 1980; CORREDOR *et al.*, 1989<sup>a</sup>; CABRERA *et al.*, 2003). Esta suscetibilidade já foi demonstrada em inoculação experimental com *L. chagasi* (ROA *et al.*, 2002) e pesquisa sorológica e molecular de marsupiais naturalmente infectados (SANTIAGO *et al.*, 2007; SCHALLIG *et al.*, 2007).

Travi *et al.* (1998) observaram elevada concentração de amastigotas de *Leishmania* na pele de um *D. marsupialis*, o que viabilizaria a infecção do vetor durante sua alimentação neste hospedeiro. Os autores relataram, também, que estes animais, quando infectados, podem apresentar sinais clínicos como apatia progressiva, redução de apetite, sinais de desidratação e descamação cutânea.

Gomes-Neto (2006), na localidade de Barra do Pojuca, região litorânea de Camaçari, Bahia, capturou exemplares de *D. albiventris* para estimar a prevalência de infecção por *L. chagasi* por técnicas imunológica e molecular. Em soro de 15 animais examinados no teste ELISA com proteína A, foi encontrado 26,7% de soroprevalência, enquanto pela técnica de PCR, utilizando amostra de sangue, 64% (11/17) dos animais estavam infectados.

No ambiente domiciliar, os marsupiais são atraídos por restos de comida e criação de galinhas, as quais são presas fáceis para estes predadores. De acordo com SHERLOCK *et al.* (1988), variações estacionais nas populações de marsupiais são relacionadas com a variação da incidência de casos humanos e caninos de LV.

### **Outros animais silvestres**

Foi realizado estudo sorológico por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) de 34 gansos (*Anser anser*), sete patos (*Cairina moschata*), cinco faisões (*Phasianus colchicus*) e duas galinha-d'angola (*Numida meleagris*) em áreas endêmicas para LV canina, Apulia e Basilicata, na Itália. Três gansos e um faisão foram sororreagente, justificando a investigação destes animais na epidemiologia da LV (OTRANTO *et al.*, 2010).

No município de Jacobina, Bahia, Sherlock *et al.* (1988) observaram a presença de formas semelhantes à leishmania em esfregaço de fragmento de baço e fígado de cutia (*Dasyprocta aguti*) e em esfregaço de baço de rato-punura

(*Cercomys cunicularius*) e rato-do-mato (*Oryzomys eliurus*). Heisch *et al.* (1959) encontraram gerbis com *L. donovani* no Quênia, o que foi confirmado com inoculação da emulsão de baço destes animais em hamsters. No Sudão, MUKHTAR *et al.* (2000) investigaram a prevalência de LV em diversas espécies de animais, encontrando soropositividade em ratos pelo teste de aglutinação direta e ELISA.

Inoculação experimental com *L. infantum* foi realizada em seis macacos (*Macaca mulatta*) no Rio de Janeiro-Brasil. Os macacos desenvolveram uma doença sistêmica, mostrando as características de LV em humanos, tais como: febre, diarreia, perda de peso, anemia, hipergamaglobulinemia e linfocitose transitória, assim como linfonodos, fígado e/ou baço aumentados. Os autores confirmaram a suscetibilidade do *M. mulatta* como primata não humano hospedeiro de *L. infantum* (PORROZZIA *et al.*, 2006).

No zoológico de Belo Horizonte (Estado de Minas Gerais, Brasil), de 41 primatas não humanos, um macaco (*Callicebus nigrifrons*) foi encontrado naturalmente infectado com *L. Chagasi*, quando analisaram amostras de sangue por técnicas de PCR e imunohistoquímica, e este animal desenvolveu uma doença fatal com sinais clínicos e lesões compatíveis com LV. Outros 17 macacos, de diferentes espécies, também tiveram amostras de sangue positivas em PCR, embora não apresentassem sinais clínicos da doença (MALTA *et al.*, 2010)

Entre os animais sinantrópicos, o morcego é considerado uma das fontes alimentares preferenciais da *L. longipalpis* (DIAS *et al.*, 2003). Fato adicional é que Lima *et al.* (2008) confirmaram a infecção natural por *L. chagasi* em morcego da espécie *Carollia perspicillata*, na Venezuela, sugerindo a possibilidade da participação destes animais no ciclo epidemiológico da LV.

#### **1.2.4 Ciclo Biológico de *Leishmania***

O ciclo biológico da *L. chagasi* é do tipo heteroxênico envolvendo como transmissor as fêmeas da espécie *L. longipalpis*. A infecção para o hospedeiro invertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo em hospedeiro infectado, devido à ingestão de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), macrófagos e leucócitos, parasitados pelas formas amastigotas. Durante o trajeto pelo trato digestivo anterior, ou no estômago do vetor, os macrófagos rompem-se, liberando as

formas amastigotas. Estas sofrem divisão binária e transformam-se rapidamente em promastigotas, adaptando-se às novas condições fisiológicas existentes (PESSOA, 1972).

Ao exercer novo repasto sanguíneo sobre um hospedeiro vertebrado, o vetor libera as formas promastigotas presentes na glândula salivar, as quais serão fagocitadas por células do SFM, macrófagos teciduais e granulócitos neutrófilos. No interior dos macrófagos, o parasito sofre a transformação para a forma amastigota, intracelular obrigatória, capaz de desenvolver-se e multiplicar-se, como ilustrado na Figura 3 (NEVES *et al.* 1997; FERRER *et al.* 1999<sup>a</sup>; REY, 2001).

A multiplicação, por divisão binária simples, é iniciada pela duplicação do cinetoplasto no interior do vacúolo fagocitário dos macrófagos. Após sucessivas multiplicações, na ausência do controle parasitário pela célula hospedeira, esta se rompe e as amastigotas liberadas serão fagocitadas por outros macrófagos (NEVES *et al.* 1997; REY, 2001). A partir daí, ocorre a visceralização das amastigotas, principalmente nos órgãos linfóides, tais como medula óssea, baço, fígado e linfonodos, embora macrófagos infectados ocasionais possam ser encontrados em todos os tecidos, incluindo sangue, pele, pulmões, rins, testículos, meninges e outros (NEVES *et al.*, 1997; FERRER *et al.*, 1999<sup>b</sup>; REY, 2001).

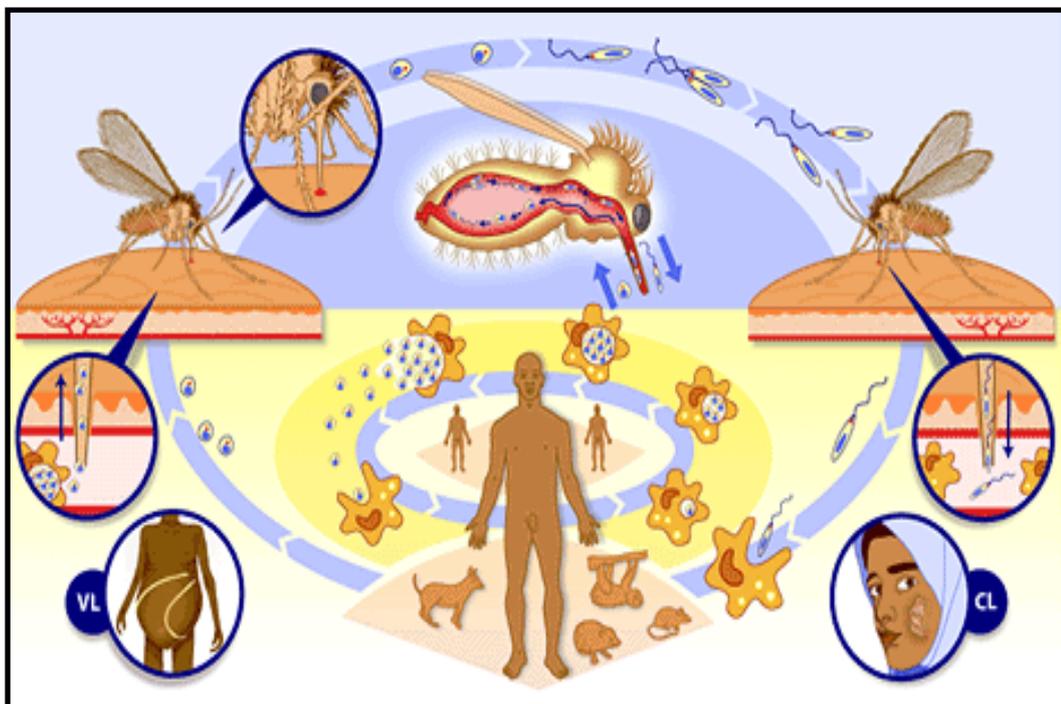


FIGURA 3. Ciclo biológico de *Leishmania*. Fonte: [www.who.int](http://www.who.int).

### 1.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da LV pode ser efetuado por técnicas parasitológicas, identificação morfológica do agente; imunológicas que objetivam a identificação de anticorpos específicos contra o parasito ou anticorpos e moleculares, amplificando fragmentos específicos do DNA do parasito (FERRER, 1999<sup>a</sup>).

#### 1.3.1 Parasitológico

O requisito básico, seguro e determinante no diagnóstico laboratorial da LV é a documentação de formas amastigotas (DOURADO *et al.*, 2007). Dos métodos parasitológicos, o mais utilizado é o esfregaço de medula óssea. Também podem ser material de biópsia aspirativa ou fragmentos de baço, fígado e linfonodos. Entretanto, apesar da especificidade, estes métodos apresentam baixa sensibilidade (DEANE e DEANE, 1954<sup>a</sup>; DEANE e DEANE, 1954<sup>b</sup>; DEANE e DEANE, 1955; DEANE, 1961; YAN-JIA, 1982; TRAVI *et al.*, 1998; MOREIRA *et al.*, 2002).

O xenodiagnóstico com *L. longipalpis* constitui outro recurso diagnóstico, possibilitando o isolamento de formas promastigotas do parasito, após o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado. Constitui-se em uma técnica pouco invasiva e com alta especificidade, no entanto excessivamente trabalhosa e pouco prática para examinar grande número de indivíduos (SHERLOCK, 1996; TRAVI *et al.*, 2001; RUIZ-PIÑA & CRUZ-REYES, 2002; MICHALSKY *et al.*, 2007).

#### 1.3.2 Imunológico

Dentre as técnicas sorológicas mais citadas na literatura, pode-se listar a RIFI, hemaglutinação passiva, ensaio imunoenzimático (ELISA), *immunoblotting*, fixação de complemento, aglutinação direta, dipstick, teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH<sup>®</sup> (DiaMed IT-LEISH<sup>®</sup>) e Teste Rápido com Anticorpo *Leishmania donovani* – TRALd (RASSAM & AL-MUDHAFFAR, 1980; YAMAMOTO *et al.*, 1988;

RACHAMIM *et al.*, 1991; SCOTT *et al.*, 1991; ARIAS *et al.*, 1996; REITHINGER & DAVIES, 2002; ASSIS *et al.*, 2008).

A RIFI é o teste mais utilizado para realização de inquéritos sorológicos, podendo, no entanto, apresentar reações cruzadas com outras enfermidades, como a leishmaniose tegumentar americana e a doença de Chagas (BRASIL 2006; SAVANI *et al.*, 2003). A técnica de ELISA, devido a sua alta sensibilidade e especificidade, tem sido empregada com mais frequência nas pesquisas epidemiológicas (REITHINGER & DAVIES, 2002).

RIFI e ELISA são técnicas recomendadas pelo Ministério da Saúde brasileiro para a avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários. A técnica de ELISA é recomendada para a triagem inicial de cães, enquanto que a RIFI ainda é utilizada, tanto para confirmação dos soros caninos reativos no teste ELISA, quanto como técnica oficial para o diagnóstico de rotina (BRASIL, 2006). Entretanto, o uso de métodos indiretos apenas não se basta para o diagnóstico das leishmanioses, já que eles não são definitivos (SCHALLIG *et al.*, 2007). Alguns métodos demonstrativos indiretos até comprovam a existência dos agentes, como os exames moleculares.

O material biológico coletado em hospedeiros suspeitos de infecção pode ser também examinado com finalidade diagnóstica por técnicas de imunohistoquímica, cultivo e através da inoculação em hamsters (GLEISER, 1957; ABRANCHES *et al.*, 1982).

### **1.3.3 Molecular**

#### **a) Qualitativo**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular que geralmente apresenta alta sensibilidade e especificidade, podendo ser usada para confirmação dos resultados sorológicos. A técnica pode ser empregada em amostras de pele, medula óssea, sangue, fígado e baço para o diagnóstico de leishmaniose (DYE, 1992; NUZUM *et al.*, 1995; FERRER, 1999<sup>b</sup>; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; LEONTIDES *et al.*, 2002). Esta técnica também foi avaliada utilizando amostra de urina e *swab* conjuntival no diagnóstico de LV, como

alternativa para diagnóstico das leishmanioses com uso de amostras coletadas de forma menos invasiva (SOLANO-GALLEGO, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008).

### **b) Quantitativo**

O teste de PCR *real-time*, método de amplificação de DNA quantitativo, pode estimar a carga parasitária de *Leishmania sp.*, e ser usado como marcador prognóstico em pacientes com LV, pela sensibilidade e especificidade quando se utiliza amostras de sangue periférico de pacientes com LV (BASTIEN *et al.*, 2008).

O PCR *real-time* tem sido utilizado para avaliar a carga parasitária de *Leishmania sp.* em amostras de humanos e animais, podendo ser usado para avaliar o papel destas espécies como reservatório para LV e facilitar o monitoramento da carga parasitária durante o tratamento farmacológico (SCHULZ *et al.*, 2003; VITALE *et al.*, 2004; TABAR *et al.*, 2008).

## 1.4 MEDIDAS DE CONTROLE

Teoricamente é possível erradicar a LV americana, interrompendo-se o ciclo de transmissão do parasita. Entretanto, os métodos convencionais de controle até agora empregados não são práticos ou eficientes (SENRA *et al.*, 1985; EVANS *et al.*, 1992). Estudos sobre o papel da triagem e eliminação de cães soropositivos no controle da LV humana realizados nos Estados do Espírito Santo, Ceará e Bahia, demonstraram que não houve uma diminuição significativa entre as taxas de incidência da infecção em humanos e cães nas áreas de intervenção quando comparadas às áreas controle. Uma das explicações para o insucesso desta estratégia é o direcionamento limitado ao reservatório canino, diante da possibilidade da presença de outros possíveis reservatórios (EVANS *et al.*, 1992; DIETZE *et al.*, 1997; ASHFORD *et al.*, 1998; MOREIRA-JR. *et al.*, 2004).

A LV tem sido associada a muitas espécies de mamíferos em áreas endêmicas. Na América do Sul, marsupiais têm sido encontrados infectados em uma frequência variável de 30% em uma região da Colômbia, a 91,6% no Brasil (CORREDOR *et al.*, 1989<sup>b</sup>; TRAVI *et al.*, 1994; SANTIAGO *et al.*, 2007). Estes

animais adaptam-se ao ambiente urbano com facilidade, sendo extremamente ubíquos em áreas da Bahia, onde cerca de 44% dos mamíferos capturados em armadilhas na área endêmica de Jacobina eram *D. marsupialis* (SHERLOCK *et al.*, 1988). Estes dados corroboram com a hipótese de que estas espécies são importantes reservatórios da *Leishmania* em regiões endêmicas (TRAVI *et al.*, 1994). Entretanto, ainda não existem evidências definitivas quanto à sua importância na transmissão do agente desta zoonose.

O conjunto de medidas de controle da LV no Brasil, apresentadas no Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (BRASIL, 2006) constitui-se, na verdade, em um aperfeiçoamento das ações preconizadas na década de cinquenta durante os primeiros estudos realizados por Deane & Deane (1954<sup>a</sup>), Alencar (1956) e Deane (1958). As atuais recomendações estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, redução da população dos vetores, eutanásia dos reservatórios caninos e atividades de educação em saúde. Ressaltando que as ações voltadas para o diagnóstico e tratamento dos casos humanos e as atividades educativas devem ser priorizadas e sempre integradas às demais medidas.

De acordo com a política de saúde vigente no Brasil (BRASIL, 2006), o controle da LV é de responsabilidade do Sistema Único de Saúde (SUS), sendo que a Portaria n.º 1.399, de 15/12/99, regulamenta as atribuições pertinentes ao âmbito estadual e/ou municipal. Cabe às Secretarias Municipais de Saúde, com o apoio das Secretarias Estaduais de Saúde, a responsabilidade de organizar a rede básica de saúde para suspeitar, assistir, acompanhar e/ou encaminhar para referência hospitalar os pacientes humanos com LV. O atendimento é realizado por demanda passiva, registro e busca ativa de casos em áreas de maior risco, ou quando indicados pela vigilância epidemiológica.

O planejamento das ações voltadas ao controle vetorial considera as características epidemiológicas e entomológicas de cada localidade e devem ser articuladas com as demais medidas de controle. O controle químico do vetor por meio da utilização de inseticidas de ação residual é dirigido apenas ao combate do inseto adulto e tem como objetivo evitar e/ou reduzir o contato entre o inseto transmissor e a população humana, diminuindo o risco de transmissão da *L. chagasi*. A utilização desta medida é recomendada nas seguintes situações:

- Áreas onde ocorreu o primeiro registro autóctone de um caso de LV humano, seguido da confirmação entomológica da presença do vetor;
- Áreas com transmissão moderada e intensa, onde as influências sazonais sobre a dinâmica populacional do vetor são conhecidas, sendo então indicado o controle químico no período do ano em que se verifica o aumento da densidade vetorial.
- Em áreas onde estas informações não são disponíveis, recomenda-se a primeira borrifação ao final do período chuvoso, repetindo-a após três ou quatro meses.
- Os locais mais indicados para a borrifação são as paredes internas e externas do domicílio, incluindo o teto, bem como os abrigos de animais ou outras dependências no peridomicílio.

Atividades de educação em saúde fazem parte das ações de controle da LV e objetivam conscientizar a população quanto à sua ocorrência na região, sintomatologia e os serviços de saúde pública disponíveis. Inclui-se nestas ações a capacitação de técnicos de saúde para desenvolverem atividades de educação em saúde junto à comunidade, considerando os diferentes estratos sociais e a compreensão global do processo saúde/doença, no qual intervêm fatores sociais, ambientais, econômicos, políticos e culturais.

O controle do reservatório canino é realizado com a eutanásia de todos os animais sororreagentes e/ou com resultado parasitológico positivo. A Resolução n.º 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, dispõe sobre os procedimentos e métodos de eutanásia em animais.

A eutanásia dos cães soropositivos, como medida de controle do reservatório, tem se mostrado pouco eficiente em reduzir a incidência da doença nas populações humanas (DYE, 1992; PARANHOS-SILVA *et al.*, 1996; DIETZE *et al.*, 1997; GAVGANI *et al.*, 2002). A reduzida eficiência diagnóstica do RIFI, utilizado como teste padrão nos inquéritos sorológicos caninos, favorece a ocorrência de resultados falsos negativos, resultando na permanência de cães infectados nas áreas investigadas, o que viabiliza a reposição do parasito nas populações caninas e humanas suscetíveis (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001).

## 2 OBJETIVOS

### GERAL

Avaliar potenciais reservatórios para leishmaniose visceral numa área endêmica do Estado da Bahia, utilizando método de biologia molecular quantitativo (PCR *real-time*).

### ESPECÍFICOS

1. Investigar a presença de DNA de *Leishmania* e quantificar a carga parasitária através de PCR *real-time*, em animais bovinos, equídeos, caprinos e ovinos no município de Salinas da Margarida-Bahia;
2. Investigar a presença de DNA de *Leishmania* e quantificar a carga parasitária através de PCR *real-time* em marsupiais capturados no município de Salinas da Margarida-Bahia;
3. Comparar a carga parasitária nas amostras dos animais estudados com dados reportados em cães infectados com *Leishmania chagasi* em Salinas da Margarida-Bahia.

### 3 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços no conhecimento da epidemiologia da LV, ainda existem lacunas substanciais nas informações sobre os principais reservatórios desta zoonose. Torna-se imperativo determinar qual o papel de algumas espécies de animais domésticos e silvestres atuarem como reservatório para LV.

Animais silvestres (raposas e marsupiais) e domésticos (ovinos, caprinos, bovinos, suínos e eqüídeos) têm sido reportados como potenciais reservatórios para LV (DEANE & DEANE, 1955; DEANE & DEANE, 1962; SILVEIRA *et al.*, 1982; KIRKPATRICK *et al.*, 1984; SHERLOCK *et al.* 1984; SHERLOCK *et al.*, 1988; CORREDOR *et al.*, 1989<sup>b</sup>, MUTINGA *et al.*, 1989; TRAVI *et al.*, 1994; SHERLOCK, 1996; BANETH & JAFFE, 1999; FISA *et al.*, 1999; XIMENES *et al.*, 1999; MUKHTAR *et al.*, 2000; HALPERN & WANG, 2001; CERQUEIRA *et al.*, 2003; DEREURE *et al.*, 2003; MORAES-SILVA *et al.*, 2006; MAROLI *et al.*, 2007). É preciso identificar quais animais domésticos e/ou silvestres têm de fato importância como reservatório para LV. Sobretudo, é necessário determinar a importância destas espécies através de métodos que quantifiquem a carga parasitária.

A diversidade de animais como fonte alimentar para *Lutzomyia longipalpis*, incluindo ruminantes e eqüídeos, e a positividade em testes parasitológicos para LV, sugere o potencial destes animais como reservatórios para LV (MUTINGA *et al.*, 1989; WILLIAMS *et al.*, 1991; MORRISON *et al.*, 1993; AGRELA *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2003; ROLÃO *et al.*, 2005; MISSAWA *et al.*, 2008; BHATTARAI *et al.* 2010).

As técnicas tradicionais de avaliação da infectividade de reservatórios por xenodiagnóstico implicam na manutenção de colônias de flebotomíneos e dependem da capacidade técnica de dissecar as glândulas salivares destes vetores para interpretação final do resultado, sendo, portanto, extremamente trabalhosas e difíceis de aplicar na triagem de grande número de animais.

A aplicação de métodos capazes de quantificar a carga parasitária presente em diferentes tecidos animais, comparando as quantidades observadas em reservatórios reconhecidos com aquelas encontradas em animais suspeitos, pode oferecer respostas importantes para uma completa reformulação dos atuais programas de prevenção da LV.

O uso de método de biologia molecular quantitativo (PCR *real-time*) é sensível e pode ser aplicado em grande número de amostras. Portanto, esta ferramenta representa uma alternativa viável para responder estas questões de grande relevância científica.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho é o resultado de um estudo de corte transversal em animais domésticos (ruminantes e equídeos) e silvestre (marsupial), numa área endêmica de LV humana. Em seguida, apresentamos informações detalhadas sobre as etapas do estudo.

### 4.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no município de Salinas da Margarida, situado na região do Recôncavo Sul da Bahia e pertencente à microrregião de Santo Antônio de Jesus. Esta cidade, a  $12^{\circ}55'S$  de latitude e  $38^{\circ}45'W$  de longitude, possui uma população de 13.465 habitantes, segundo o último censo populacional (IBGE, 2011). A área do município é de  $150 \text{ km}^2$ , com distância até a capital de 229 km por percurso rodoviário ou 56 km por percurso marítimo (FIGURA 4). O município está localizado em região litorânea. Possui clima úmido e salubre, com temperatura média anual de  $25,4^{\circ}\text{C}$  e vegetação típica de manguezal.

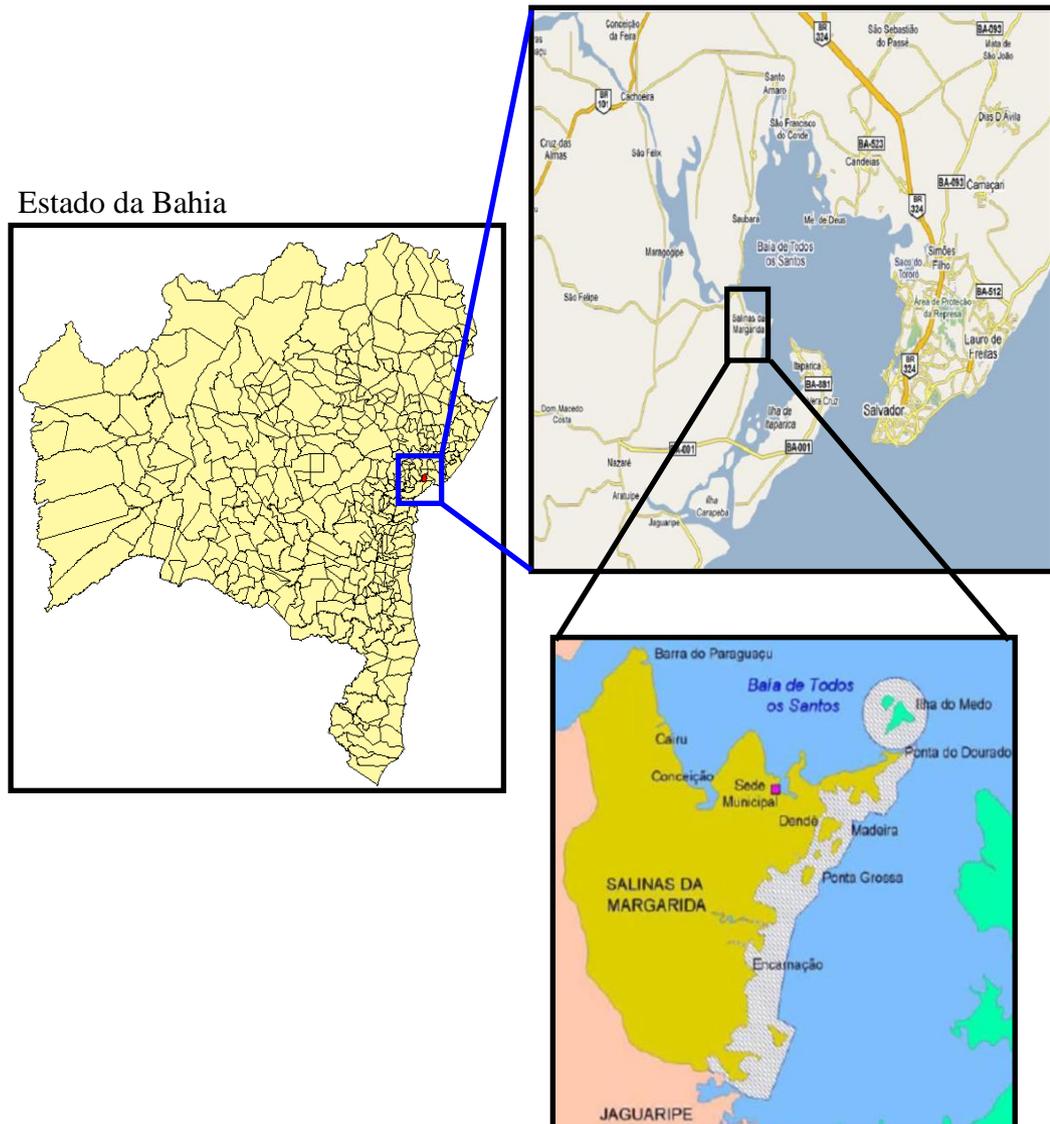


FIGURA 4. Localização geográfica do município de Salinas da Margarida-Bahia.  
 Fonte: adaptado do Google Maps e [www.terramar.org.br](http://www.terramar.org.br).

## 4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Os animais estudados foram:

- Animais domésticos:

- a) Equídeos (*Equus caballus*, *Equus asinus*)
- b) Bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*)
- c) Ovinos (*Ovis aries*)
- d) Caprinos (*Capra hircus*)

- Animal silvestre:

- a) Marsupiais (*Didelphis albiventris*)

## 4.3 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

### 4.3.1 Animais domésticos

Os animais domésticos que fizeram parte deste estudo foram selecionados no período de 2008 e 2009. Foram incluídos ruminantes e equídeos que eram mantidos ou pernoitavam nas áreas próximas a edificações com histórico de casos de LV humana e/ou canina. A estimativa da população desses animais no município do estudo é apresentada no Quadro 1.

QUADRO 1. Estimativa da quantidade de animais ruminantes e equídeos criados no município Salinas da Margarida, Bahia (2006 a 2009).

Fonte: IBGE

<b>Animais</b>	<b>Ano 2006</b>	<b>Ano 2009</b>
<b>Bovinos</b>	276	105
<b>Equídeos</b>	25	190
<b>Ovinos</b>	10	0
<b>Caprinos</b>	46	0

### 4.3.2 Marsupiais

Os marsupiais selecionados foram capturados na localidade de Encarnação, onde ocorreu o maior número de casos de LV humana e canina. A captura dos marsupiais foi feita com armadilhas do tipo *tomahawk*. Foram utilizadas frutas como isca e as armadilhas eram distribuídas sempre no final da tarde em locais previamente estabelecidos pela equipe de campo (peridomicílio das residências onde ocorreram casos de LV humana e/ou canina). Na manhã seguinte, as armadilhas eram vistoriadas e as vazias eram recolhidas para serem higienizadas e colocadas em novos locais. Os marsupiais capturados foram transportados até local apropriado para coleta das amostras. Os animais de espécies diferentes daquelas de interesse, eventualmente capturados, eram libertados imediatamente.

As coordenadas geográficas dos locais onde eram colocadas as armadilhas, também foram documentadas com auxílio de aparelho de Sistema de Posicionamento Global (GPS).

#### 4.4 COLETA DAS AMOSTRAS

##### 4.4.1 Animais domésticos

Dos ruminantes e equídeos foi coletado sangue total conforme ilustrado no fluxograma da Figura 5. Em todas as amostras foi realizado PCR *real-time* para investigar a presença de DNA do parasito e estimar a carga parasitária.

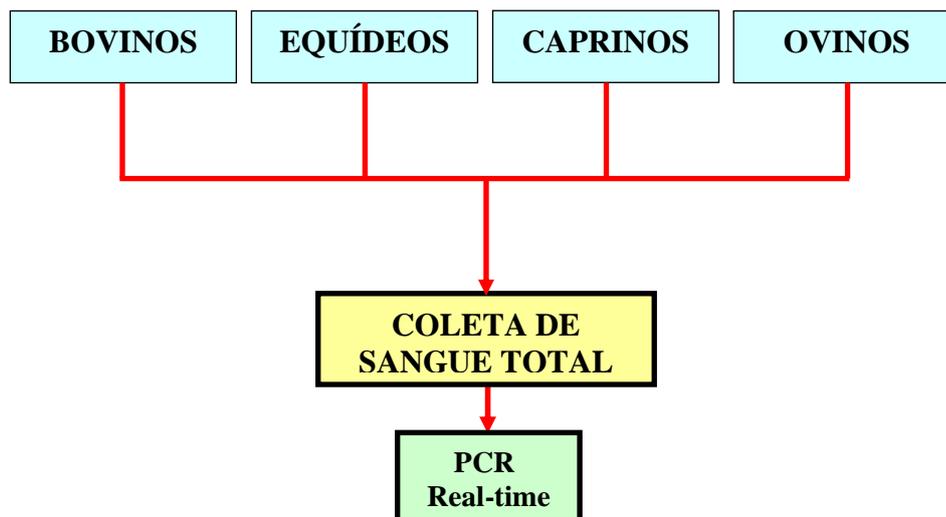


FIGURA 5. Fluxograma de coleta de espécime e teste diagnóstico para LV nos ruminantes e equídeos

A coleta de sangue total foi realizada diretamente através da punção da veia jugular externa ou mamária (bovinos) dos ruminantes e equídeos, conforme ilustrado na Figura 6. Todas as coletas foram realizadas por Médico Veterinário após autorização dos proprietários, que auxiliavam na contenção dos animais. Em cada animal foi coletado sangue apenas única vez.



FIGURA 6. Coleta de sangue em ruminantes e equídeos para pesquisa de *Leishmania* através da técnica de PCR *real-time*, Salinas da Margarida, Bahia, 2008 a 2009. **Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 4.4.2 Marsupiais

Foi coletado sangue total e realizado uma biópsia de pele de orelha dos marsupiais, conforme ilustrado no fluxograma da Figura 7. Em todas as amostras foi realizado PCR *real-time* para investigar a presença de DNA do parasito e estimar a carga parasitária.

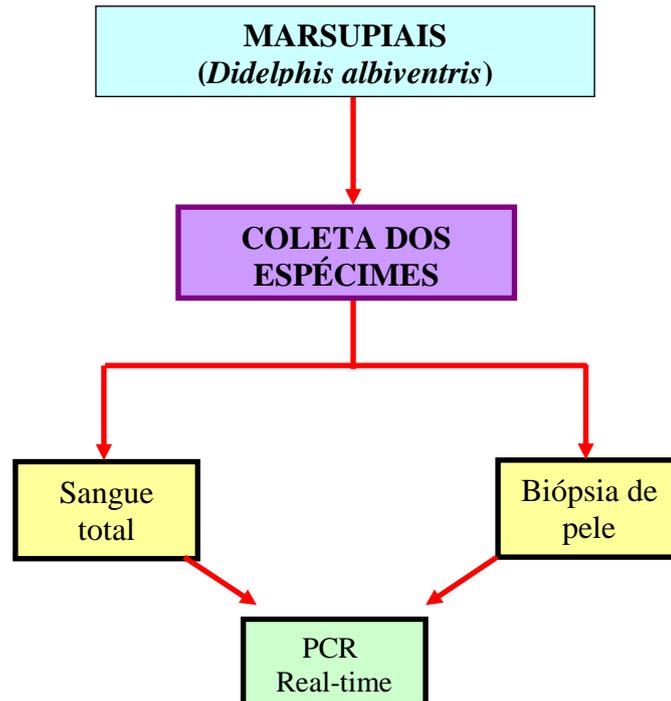


FIGURA 7. Fluxograma de coleta dos espécimes e teste diagnóstico para LV nos marsupiais

A manipulação dos marsupiais capturados para coleta de amostras de sangue intracardíaco ou da veia caudal, biópsia de pele de orelha, inspeção física e avaliação clínica, foi feita após anestesia dissociativa, utilizando xilazina e ketamina (Figura 8). Após coleta dos espécimes, os animais eram mantidos em observação até completo retorno anestésico, quando então eram libertados na natureza.



FIGURA 8. Manipulação dos marsupiais (*D. albiventris*) durante a coleta de sangue e biópsia de pele para pesquisa de *Leishmania* através da técnica de PCR *real-time*.  
Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.5 TESTE DE PCR *real-time*

##### 4.5.1 Extração de DNA

Foram utilizados 200  $\mu$ L de sangue para extração de DNA usando o *kit* de extração “QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit” da Qiagen de acordo com as recomendações do fabricante. Para extração de DNA das amostras de pele, foi utilizado 25 mg de tecido e processado pelo *kit* de extração “Qiamper Blood&Tissue” da Qiagen, também de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração e a pureza do DNA extraído foi avaliado utilizando o espectrofotômetro.

#### 4.5.2 Primers e sondas

Os *primers* e sondas foram selecionados no gene Ssu rRNA, que aparece 160 vezes no genoma de *Leishmania* spp. e é altamente conservado entre as espécies de *Leishmania* (VAN-EYS *et al.*, 1992). A seleção dos *primers* e sonda foi realizada previamente (BOSSOLASCO *et al.*, 2003; BOSSOLASCO, 2004) utilizando o programa *Primer Express* (Perkin-Elmer –Applied Biosystems, Cheshire, United Kingdom). Segue abaixo informações detalhadas sobre *primer* e sonda:

5'-AAGGTCAAAGAACAAGGCCAAG-3' (forward)

5'-GCATCGGAGTCGG-3' (reverse)

5'-AGGAGCGTGTCCCCGTGGAGG-3'(sonda).

A sonda fluorogênica foi sintetizada utilizando uma molécula FAM ligada na extremidade 5' e um TAMRA ligado na extremidade 3'(PE-Applied Biosystems). As etapas de amplificação e detecção foram realizadas utilizando um termociclador apropriado para a técnica: ABI Prism 7500 *Real-time* PCR System (PE-Applied Biosystems).

Foram utilizados 5 µL das amostras e 20 µL da mistura (12,5 µL de TaqMan® Universal PCR Mastermix, Perkin-Elmer -Applied Biosystems, 900nM do Primer direto, 300nM do primer reverso e 200nM da sonda) para a reação de PCR. Os parâmetros utilizados no termociclador para amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 50 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1minuto. Um valor de *threshold cycle* ( $C_t$ ) foi calculado para cada amostra pela determinação do ponto onde a fluorescência ultrapassou o limiar de detecção.

Uma curva padrão foi obtida com os valores de cada amostra e com amostras controles. O número de parasitos foi calculado pela média de três repetições de cada amostra. A sensibilidade deste método foi estimada em 0.625 parasitos/mL. A Figura 9 mostra uma representação esquemática das etapas do PCR *real-time* e a curva padrão utilizada na padronização dos resultados.

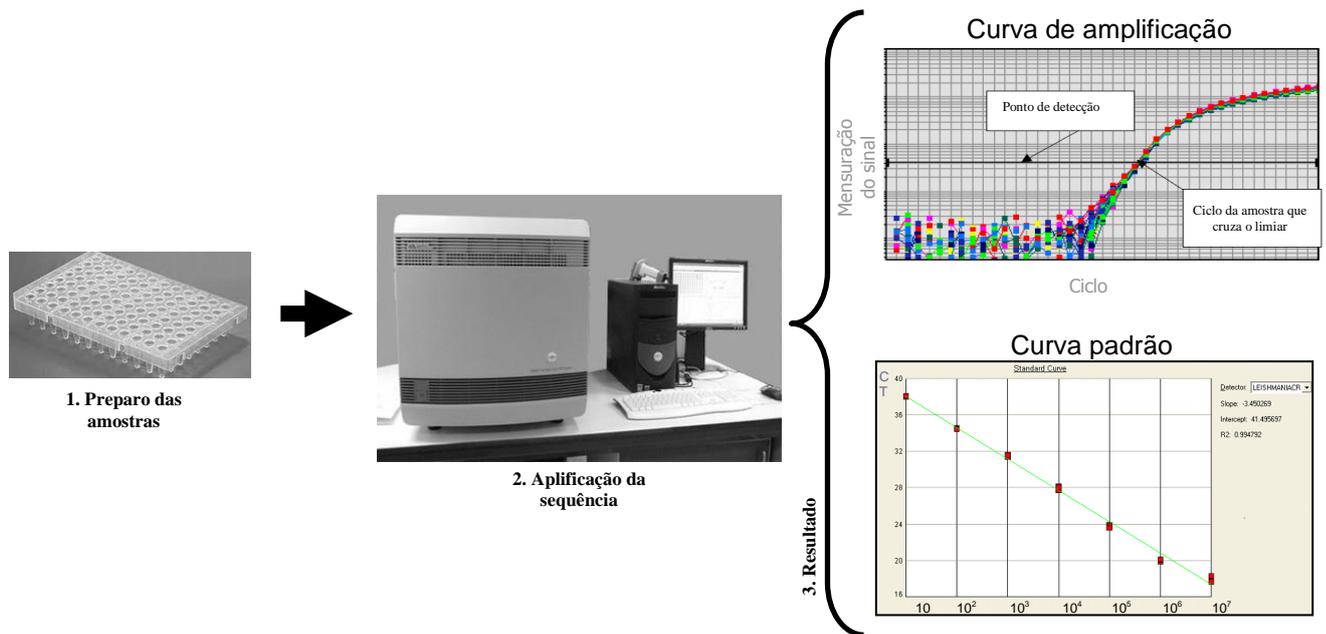


FIGURA 9. Esquema da sequência da técnica PCR *real-time* e demonstração do resultado final. **Fonte:** Adaptado da internet

#### 4.6 COLETA DE DADOS

Os dados referentes ao local de residência ou captura dos animais, bem como outros dados relacionados aos animais avaliados e amostras biológicas coletadas foram obtidos por Médico Veterinário e registrados em questionários, juntamente com os resultados dos testes diagnósticos.

##### 4.6.1 Variáveis de Predição

Informações como: local e data de captura dos animais silvestres, data de coleta do material, idade aproximada, sexo, espécie, estado nutricional, presença de lesões, tamanho, entre outras, foram compiladas em questionário específico.

#### **4.6.2 Variáveis Dependentes (ou Eventos de Interesse)**

O evento de interesse avaliado foi a carga parasitária determinada por PCR *real-time* (variável contínua) nas amostras biológicas coletadas dos animais.

#### **4.7 ENTRADA E EDIÇÃO DE DADOS**

As informações coletadas dos questionários pré-codificados e os resultados dos testes de laboratório foram compilados em banco de dados informatizado, para posterior análise estatística. A entrada dos dados foi feita em uma tela de entrada criada no programa EPI-Info versão 6.03, com sistema de checagem automática de erros.

Em seguida, o banco de informações foi editado. Esta etapa compreende a aferição da qualidade do processo de entrada de dados e a correção dos erros detectados. Isto foi feito por exame da distribuição de frequência de cada variável para identificação de: 1. Valores fora de limites; 2. Checagem de valores inválidos; 3. Identificação de entradas em duplicata; e 4. Checagem de dados incompatíveis ou contraditórios.

#### **4.8 PLANO DE ANÁLISE DOS DADOS**

##### **4.8.1 Tamanho da Amostra e Poder do Estudo**

O tamanho da amostra neste estudo foi estimado de acordo com o número mínimo capaz de gerar uma estimativa estável da prevalência da infecção nas diferentes situações. Assim, estimou-se uma amostra total de 100 marsupiais, assumindo uma prevalência da infecção nestes animais de 5%. O tamanho da amostra de bovinos, equídeos, caprinos e ovinos não foi determinado previamente, uma vez que a intenção foi realizar um inquérito em toda população desses animais existente próximo aos aglomerados humanos na localidade do estudo.

#### 4.8.2 Estatística Descritiva e Analítica

As frequências das variáveis principais e das covariáveis foram apresentadas com as respectivas distribuições. As medidas de tendência central (média e mediana) foram calculadas com intervalo de confiança de 95% e percentil de 25% e 75%.

#### 4.9 ANÁLISE ESPACIAL

Inicialmente, foi feito um levantamento de todos os casos de LV humana e canina registrados pela Secretaria de Saúde de Salinas da Margarida-BA no período de 2002 a 2008. Para espacialização dos casos de LV, procederam-se identificação e aquisição de fotografias aéreas digitais do município de Salinas da Margarida disponíveis na Companhia de Desenvolvimento Urbano do Estado da Bahia (CONDER).

Estas imagens foram escaneadas com 600dpi e georreferenciadas atribuindo coordenadas UTM referenciadas a SAD/69. Posteriormente, foi construído um banco de dados no Software ArcView 3.1. Com posse deste material, realizaram-se visitas a cada casa onde houve caso(s) de LV humana e/ou canina marcando as coordenadas geográficas com auxílio de aparelho de GPS. Realizou-se, então, espacialização dos casos de LV humana e canina sobre a fotografia aérea georreferenciada. Foi possível, então, visualizar a dispersão geográfica dos casos da doença no município desde o ano de 2002, quando ocorreu o primeiro caso humano, até o ano de 2008, ocasião da última atualização.

A partir das imagens georreferenciadas e marcados com os pontos correspondentes aos casos de LV humana e canina, foi realizado o cálculo da densidade de Kernel com largura de banda de 300 metros, com a utilização do software TerraView<sup>®</sup>. Dessa forma, foi avaliada a densidade de LV humana e canina, identificando a concentração dos casos. Trata-se de um método de interpolação exploratória que gera uma superfície de densidade para a identificação visual de concentração do evento, indicando aglomeração na distribuição espacial chamadas de “áreas quentes”. É uma técnica estatística, de interpolação, não paramétrica, em que a distribuição de pontos ou eventos é transformada numa “superfície contínua

de risco” para a sua ocorrência. Permitindo uma rápida visualização de áreas que merecem atenção, sendo considerada, portanto, muito útil ao fornecer uma visão geral da distribuição dos eventos (BRASIL, 2007).

#### 4.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As autorizações para atividades com finalidade científica junto ao IBAMA foram geradas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) com os números 11716-1, 11716-2 e 11716-3 contemplando todo o período de execução do projeto. Tal autorização foi liberada após apreciação pelo IBAMA do projeto submetido ao sítio: <<http://www4.icmbio.gov.br/sisbio/>>.

Todo o trabalho de captura, coleta de material e processamento das amostras dos marsupiais foi realizado por pessoas autorizadas pelo IBAMA. Todos os técnicos e pessoas de apoio envolvidos na pesquisa levaram em conta os procedimentos necessários a biosegurança na captura e no manejo com animais, bem como todas as normas de cuidado e respeito no trabalho envolvendo animais.

Os dados de distribuição espacial da LV humana e canina tiveram autorização do comitê de ética em pesquisa do CPqGM/FIOCRUZ com parecer de aprovação Nº 216/2010.

## 5 RESULTADOS

No total, foram reportados pela Secretaria Municipal de Saúde do município Salinas da Margarida, 97 casos de LV humana e 151 casos de LV canina, entre 2002 e 2008. Oitenta e oito casos humanos e 110 caninos tinham informações completas de endereço nas fichas de notificação. As residências desses casos foram visitadas e as coordenadas geográficas coletadas com auxílio do GPS, conforme ilustrado na Figura 10.



FIGURA 10. Visita aos domicílios onde ocorreram casos de LV humana e/ou canina para obter coordenadas geográficas com auxílio de GPS, Salinas da Margarida, Bahia. **Fonte:** Arquivo pessoal

A Figura 11 mostra imagem aérea do município de Salinas da Margarida e a espacialização geográfica dos casos de LV humana e canina, permitindo visualizar a distribuição desses eventos em relação aos aglomerados urbanos. A localidade de Encarnação teve o maior número de casos humanos e caninos de LV, seguidos da localidade de Dendê. Das seis localidades do município (Sede, Encarnação, Barra de Paraguaçu, Cairu, Conceição e Dendê), apenas na localidade de Barra do Paraguaçu não foi identificado caso de LV no período estudado.

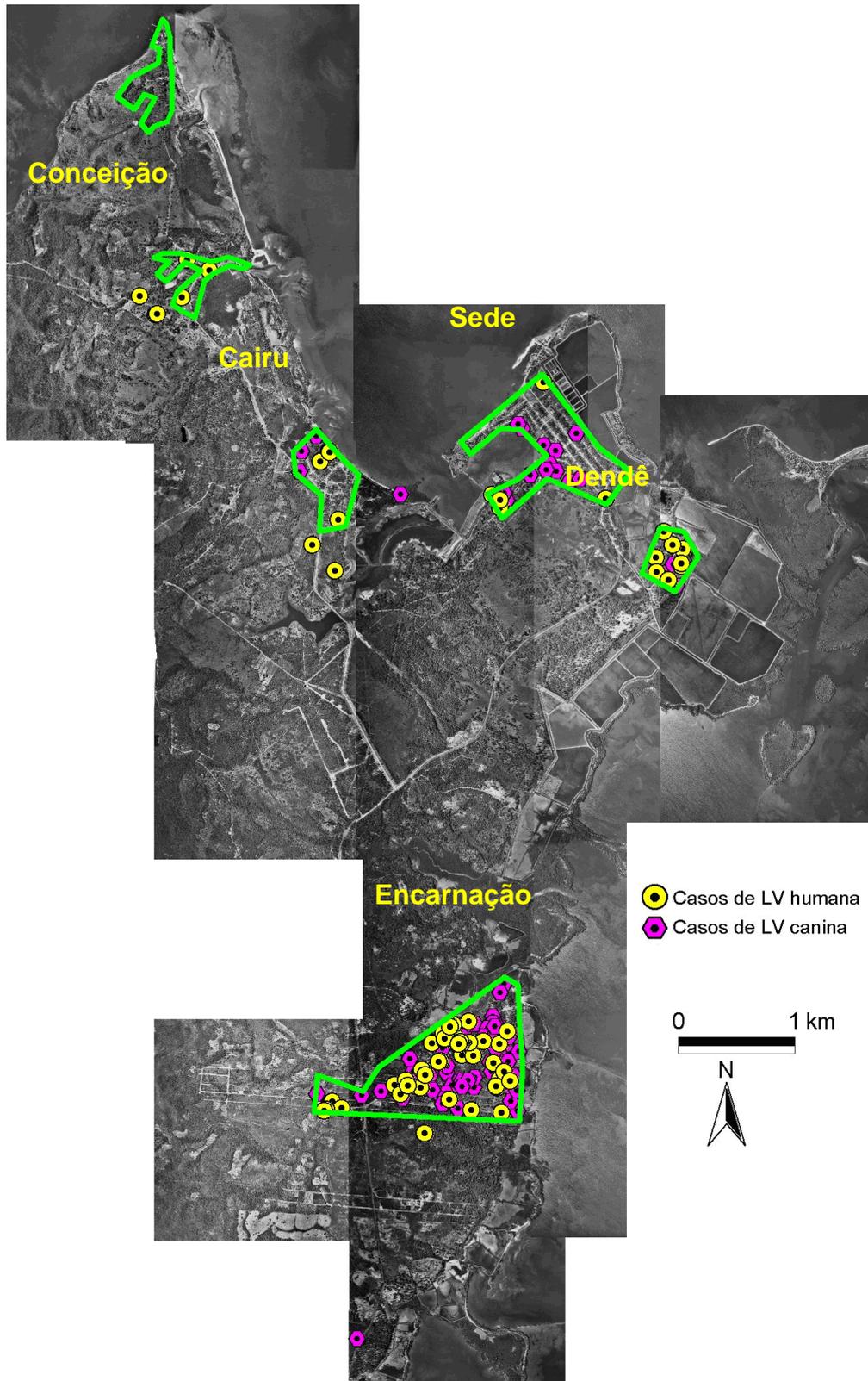


FIGURA 11. Distribuição dos casos de LV humana e canina no município de Salinas da Margarida, Bahia, 2002 a 2008.

Fonte: Adaptação de fotografias aéreas da CONDER/1989.

O cálculo da densidade de Kernel com as imagens georreferenciadas e as coordenadas correspondentes aos casos de LV humana e canina confirmam que a maior concentração de casos de LV humana e canina ocorreu na localidade de Encarnação (Figura 12).

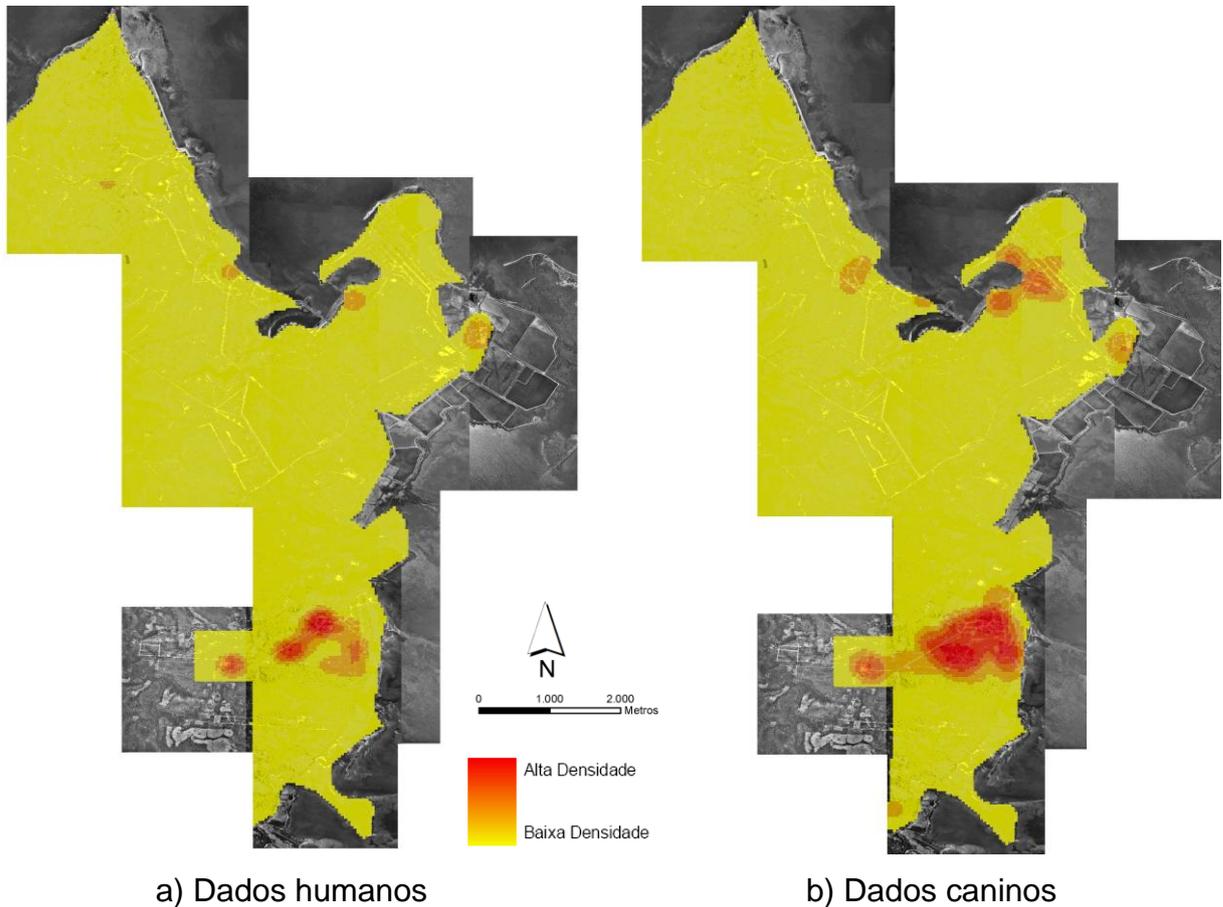


FIGURA 12. Análise da densidade de Kernel realizada com os casos de LV humana e canina no município de Salinas da Margarida, Bahia, entre 2002 e 2008.

**Fonte:** Adaptação de fotografias aéreas da CONDER/1989.

### *Marsupiais (Didelphis albiventris)*

Entre os meses de janeiro de 2007 e outubro de 2008 foram capturados 103 sariguês (*D. albiventris*) nas armadilhas colocadas em peridomicílios na localidade de Encarnação. A Figura 13 apresenta o número de marsupiais capturados a cada mês de trabalho durante o período do estudo.

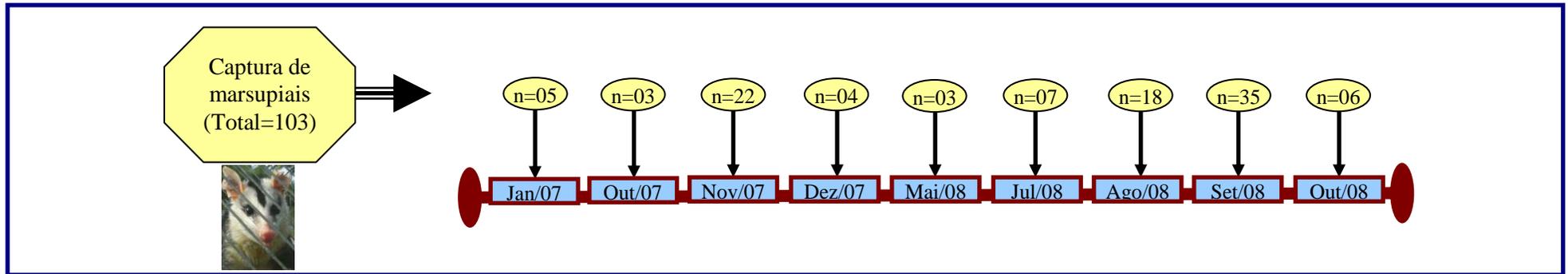


FIGURA 13. Cronograma das capturas de marsupiais no município de Salinas da Margarida, Bahia, 2007 a 2008.

As armadilhas para captura dos sariguês foram colocadas em 97 locais diferentes na localidade de Encarnação. Houve captura em 53 locais distintos (54,6%). A Figura 14 mostra a distribuição espacial dos pontos correspondentes aos locais onde foram colocadas as armadilhas e onde ocorreu a captura de marsupiais. Não é possível identificar um padrão na distribuição dos locais onde foram capturados animais, já que estão dispersos em toda a localidade, inclusive nas áreas mais urbanizadas e com maior densidade de edificações.



FIGURA 14. Distribuição espacial dos locais de colocação das armadilhas e de captura de marsupiais, na localidade de Encarnação, Salinas da Margarida, Bahia, 2007 a 2008. **Fonte:** Adaptação de fotografias aéreas da CONDER/1989.

Quanto às características dos quintais e das áreas peridomiciliares onde foram distribuídas as armadilhas para captura dos marsupiais, observa-se quase sempre a presença de vegetação nas proximidades das residências e a presença de animais domésticos, resultando num micro-clima rico em matéria orgânica e umidade conforme pode ser observado na Figura 15.



FIGURA 15. Quintais e áreas peridomiliares onde foram capturados marsupiais (*D. albiventris*) na localidade de Encarna o, Salinas da Margarida, Bahia, 2007 a 2008. Fonte: Arquivo pessoal.

Todos os 103 marsupiais capturados pertenciam   espécie *Didelphis albiventris*, sendo 41,3% machos e 58,7% fêmeas. A maior parte apresentava aspecto de adultos jovens (90,4%) e escore corporal normal (89,5%). A quantifica o de altera es em pelo, pele, unhas, fígado, baço e linfonodos   apresentada na Tabela 1.

TABELA 1. Características de 102\* marsupiais (*D. albiventris*) capturados na localidade de Encarnação, Salinas da Margarida, Bahia, 2007 a 2008.

<b>Características</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
<b>Sexo</b>		
Macho	42	(41,2)
Fêmea	60	(58,8)
<b>Faixa etária</b>		
Novo (imaturo)	5	(4,9)
Adulto	92	(90,2)
Velho	5	(4,9)
<b>Tamanho corporal</b>		
< 15 cm	1	(1,0)
15 a 30 cm	28	(27,5)
31 a 45 cm	73	(71,5)
<b>Escore corporal</b>		
Caquexia	0	(0,0)
Magro	9	(8,8)
Sem altera�o	93	(91,2)
<b>Pelo</b>		
Alopecia focal	5	(4,9)
Alopecia geral	0	(0,0)
Sem altera�o	97	(95,1)
<b>Pele</b>		
Ulcera�es	3	(2,9)
Sem altera�o	99	(97,1)
<b>Unhas</b>		
Alteradas	1	(1,0)
Sem altera�o	101	(99,0)
<b>Fígado</b>		
Hepatomegalia	23	(22,5)
Atrofia	0	(0,0)
Sem altera�o	79	(77,5)
<b>Baço</b>		
Esplenomegalia	17	(16,7)
Atrofia	2	(2,0)
Sem altera�o	83	(81,4)
<b>Linfonodos</b>		
Enfartados	1	(1,0)
Sem altera�o	101	(99,0)

\* Não foi possível coletar informa es em um dos 103 marsupiais capturados.

Durante a coleta de material nos marsupiais, foi observado que 12,5% deles estavam infestados por pulgas. As espécies foram identificadas como *Ctenocephalides felis* e *C. canis*. Estas pulgas são comuns em ambiente doméstico e frequentemente parasitam cães e gatos. Na Tabela 2 são apresentados os resultados da identifica o de pulgas encontradas nos marsupiais. Entre os 11

animais infestados foram coletadas 33 pulgas, 26 (79%) exemplares *C. felis* e sete (21%) da espécie *C. canis*.

Tabela 2. Identificação das espécies de pulgas encontradas em *Didelphis albiventris* no município de Salinas da Margarida, Bahia, 2007 a 2008.

<i>Didelphis albiventris</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>		<i>Ctenocephalides canis</i>		Total
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	
S002	1	5	1	0	7
S009	1	2	0	0	3
S019	0	2	0	0	2
S020	0	0	1	0	1
S021	4	2	0	0	6
S031	1	0	0	0	1
S043	2	2	2	2	8
S084	0	1	0	0	1
S085	1	0	0	0	1
S100	0	1	1	0	2
S101	1	0	0	0	1
Total	11	15	5	2	33

Foram coletadas amostras de sangue total e biópsia de pele para pesquisa de *Leishmania* pela técnica de PCR *real-time* em todos os 103 *D. albiventris* capturados. Apenas uma amostra de sangue foi positiva para DNA do parasito (0,97%), apresentando carga parasitária correspondente a 6,0 parasitos/mL. Tratava-se de um animal macho, adulto, com 33 cm de corpo e sem nenhuma alteração aparente na avaliação clínica. Nenhuma das amostras de biópsia de pele testou positivo no exame de PCR *real-time*.

### *Ruminantes e Equídeos*

Ao todo, 80 animais, entre bovinos, equídeos, caprinos e ovinos, foram incluídos no estudo. Os ruminantes e equídeos andavam soltos pelas ruas ou eram usados no transporte de cargas nas áreas urbanas do estudo (FIGURA 16).



FIGURA 16. Ruminantes e equídeos encontrados em locais de aglomerados humanos no município de Salinas da Margarida, Bahia, 2007 a 2008.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

A Figura 17 apresenta o cronograma e o número específico de ruminantes e equídeos incluídos na investigação de LV durante o período do estudo.

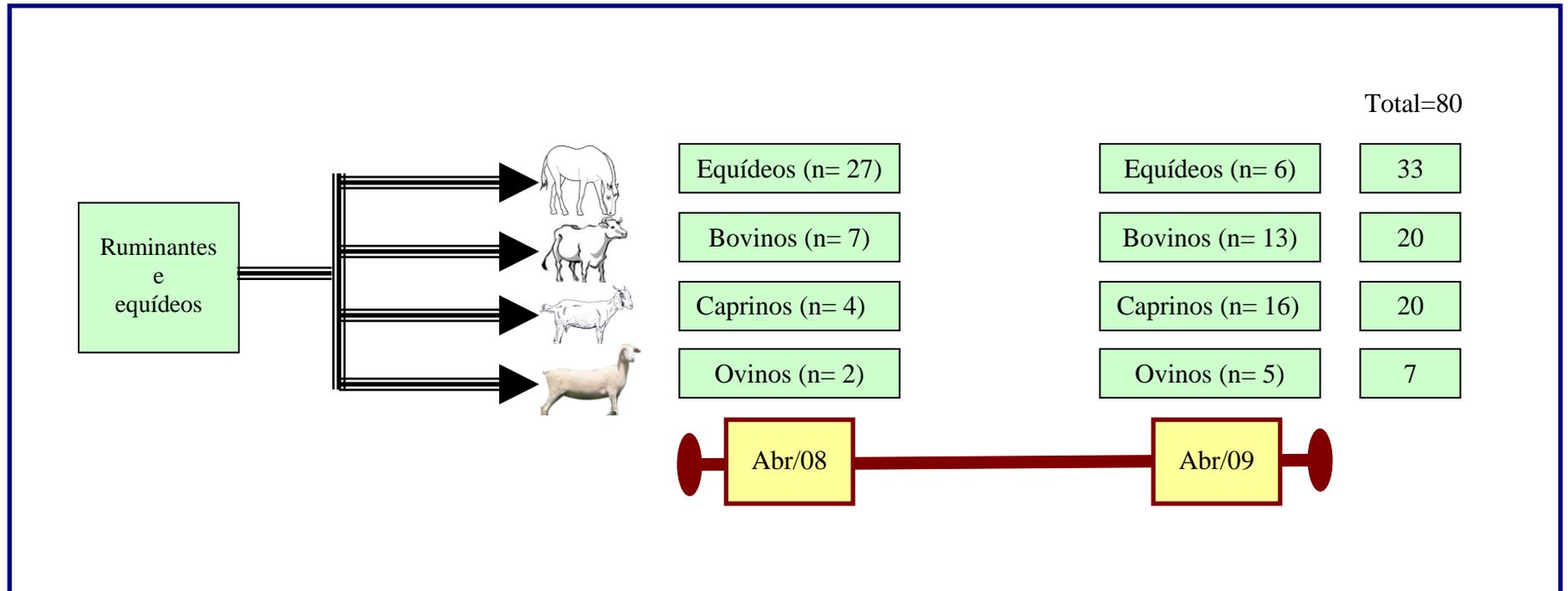


FIGURA 17. Cronograma da coleta das amostras de sangue em ruminantes e equídeos no município Salinas da Margarida, Bahia, 2008 a 2009.

Do total de 80 animais domésticos de produção avaliados, 56,6% tinham mais de três anos de idade; mais de 70% eram fêmeas; aproximadamente metade era considerada animal para reprodução e cerca de dois terços estava há mais de um ano na área do município. As características dos animais são apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3. Distribuição das características dos ruminantes e eqüídeos estudados no município Salinas da Margarida, Bahia, 2008 a 2009.

<b>Características</b>	<b>Bovino</b> (n=20)	<b>Eqüídeo</b> (n=33)	<b>Caprino</b> (n=20)	<b>Ovino</b> (n=7)
<b>Idade*</b>				
Sem Informação	0 (0,0)**	4 (12,1)	0 (0,0)	0 (0,0)
<12	1 (5,0)	1 (3,0)	3 (15,0)	1 (14,3)
12 a 36	12 (60,0)	7 (21,2)	6 (30,0)	2 (28,6)
>36	7 (35,0)	21 (63,6)	11 (55,0)	4 (57,1)
Total	20 (100,0)	33 (100,0)	20 (100,0)	7 (100,0)
<b>Sexo</b>				
Macho	2 (10,0)	17 (51,5)	2 (10,0)	2 (28,6)
Fêmea	18 (90,0)	16 (48,5)	18 (90,0)	5 (71,4)
Total	20 (100,0)	33 (100,0)	20 (100,0)	7 (100,0)
<b>Tipo de Exploração</b>				
Sem Informação	11 (55,0)	9 (27,3)	5 (25,0)	7 (100,0)
Passeio/Roça/Trabalho	4 (20,0)	2 (6,1)	0 (0,0)	0 (0,0)
Reprodução	0 (0,0)	22 (66,6)	3 (15,0)	0 (0,0)
Venda	5 (25,0)	0 (0,0)	12 (60,0)	0 (0,0)
Total	20 (100,0)	33 (100,0)	20 (100,0)	7 (100,0)
<b>Tempo na área*</b>				
Sem Informação	6 (30,0)	1 (3,0)	3 (15,0)	0 (0,0)
<3	3 (15,0)	2 (6,1)	1 (5,0)	0 (0,0)
3 a 6	2 (10,0)	4 (12,1)	3 (15,0)	0 (0,0)
6 a 12	8 (40,0)	8 (24,2)	13 (65,0)	1 (14,3)
>12	1 (5,0)	18 (54,6)	0 (0,0)	6 (85,7)
Total	20 (100,0)	33 (100,0)	20 (100,0)	7 (100,0)

\*Expressos em meses; \*\*n(%)

Os dados da Tabela 4 resumem os resultados da avaliação de carga parasitária em amostras de sangue dos ruminantes e eqüídeos através da técnica de PCR *real-time*. Em cinco dos 20 bovinos (25%) examinados foi detectado DNA de *Leishmania*. Nos eqüídeos, caprinos e ovinos não houve detecção de DNA de *Leishmania* nas amostras de sangue pelo teste de PCR *real-time*.

TABELA 4. Distribuição da carga parasitária de *Leishmania* em sangue de animais domésticos de produção, Salinas da Margarida, Bahia, 2008 a 2009.

<b>Carga parasitária (Parasito/mL)</b>	<b>Bovinos (n=20)</b>	<b>Caprinos (n=20)</b>	<b>Ovinos (n=7)</b>	<b>Eqüídeos (n=33)</b>
Negativo	15 (75%)*	20 (100%)	7(100%)	33(100%)
<1 a 10	0	0	0	0
>10 a 100	4 (20%)	0	0	0
>100 a 1.000	1 (5%)	0	0	0
>1.000	0	0	0	0

\*n(%)

A carga parasitária encontrada nos bovinos foi de 12,7; 18,3; 42,7; 66,8 e 183,5 parasitos/mL. Dos bovinos parasitados, um foi proveniente da localidade de Cairú e quatro de Encarnação. Todos aparentemente saudáveis, quatro eram fêmeas gestantes ou em lacta o. Apenas um bovino tinha menos de 12 meses de idade (macho da localidade de Encarna o) e três animais tinham mais de 12 meses de permanência na  rea.

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo principal avaliar o papel de animais domésticos (bovinos, equídeos, caprinos e ovinos) e silvestre (marsupial) como potenciais reservatórios para LV no município de Salinas da Margarida, Bahia. Tendo em vista as dificuldades da realização do método de xenodiagnóstico, utilizamos método de biologia molecular quantitativo (PCR *real-time*); por apresentar bom desempenho (alta sensibilidade e especificidade) e poder avaliar a carga parasitária num grande número de amostras em tempo relativamente curto (SCHULZ *et al.*, 2003; VITALE *et al.*, 2004; TABAR *et al.*, 2008).

### 6.1 ANIMAIS DOMÉSTICOS: RUMINANTES E EQUÍDEOS

A prevalência de bovinos positivos no teste de PCR *real-time* para *Leishmania* neste estudo, 25% (5/20), foi inusitada. Na revisão bibliográfica, o único trabalho a identificar presença de DNA de *Leishmania* em bovinos (BHATTARAI *et al.*, 2010), publicado há menos de um ano, encontrou positividade menor, tanto em bovinos (5%) como em búfalos (4%), enquanto em caprinos foi detectada uma prevalência intermediária de 16%. Este estudo realizado no Nepal investigou o potencial de animais domésticos na transmissão da LV, mapeando as infecções por *Leishmania* em pessoas saudáveis e em animais. Os autores argumentam que, a despeito da LV no subcontinente indiano ser considerada uma antroponose, as causas da persistência da *L. donovani* durante os períodos entre surtos epidêmicos não são bem conhecidas. Apesar da detecção do DNA de *Leishmania* nestes animais domésticos não significar, necessariamente, que eles sejam reservatórios para LV, estes achados sugerem o potencial desses animais como reservatórios.

Além disso, estudos sobre preferência alimentar de flebótomos indicam que eles são atraídos cinco vezes mais por bovinos do que por pessoas (LLOYD & NAIPER, 1930; DINESH *et al.*, 2001) e que esses vetores se alimentam mais frequentemente em animais (62,8%) do que em humanos (24,9%), conforme dados da Índia (PALIT *et al.*, 2005). Na Colômbia, resultados da análise do conteúdo alimentar de 579 *Lu. longipalpis* coletados numa área endêmica para LV mostraram

que os flebótomos se alimentavam predominantemente nos bovinos, embora houvesse também repastos com sangue de suínos, equínos, humanos, cães, marsupiais, pássaros e répteis (MORRISON *et al.*, 1993).

A carga parasitária detectada em bovinos no nosso trabalho foi semelhante à carga de *Leishmania* encontrada em amostras de sangue periférico de cães avaliados em outro trabalho na mesma área endêmica (NASCIMENTO, 2011). Neste estudo, 98 cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania* tiveram amostras de sangue total, secreção conjuntival, biópsia de pele e aspirado de medula óssea e linfonodo testadas para a presença de DNA de *Leishmania* por PCR *real-time*. Das 98 amostras de sangue, 56 foram positivas (57%). Dois terços dos cães positivos apresentavam carga parasitária menor do que 10 parasitos/mL, 21% de 10 a 10<sup>2</sup> parasitos/mL e 12% de 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> parasitos/mL. Portanto, a carga parasitária máxima encontrada em sangue de bovinos no nosso inquérito foi igual àquela reportada em sangue de cães por Nascimento (2011).

Em outro estudo na Suíça (LOBSIGER *et al.*, 2010), foi descrito um novo agente etiológico de leishmaniose cutânea numa vaca. Inicialmente, o diagnóstico foi clínico e imunohistológico. Posteriormente, as comparações das sequências dos produtos de PCR classificaram o agente como não pertencente às espécies de *Leishmania* do Velho e do Novo Mundo. As análises mostraram tratar-se de agente idêntico ao isolado previamente em dois cavalos na Alemanha, apresentando 98% de homologia com a *Leishmania* sp. *siamensis* (organismo recentemente identificado num paciente com LV na Tailândia). Ainda não foram identificados potenciais vetores da transmissão nestes casos, nem foi elucidada qual a relevância epidemiológica-veterinária deste agente etiológico. No nosso trabalho, das amostras de bovinos não foram realizadas análises das sequências dos produtos de PCR amplificados. As sondas utilizadas para realizar o PCR *real-time* no nosso estudo eram dirigidas para sequência no gen ribossomal, que aparece repetidamente no genoma de *Leishmania* spp. e é altamente conservado entre as espécies do gênero *Leishmania*. Apesar da especificidade da técnica usando estas sondas, é possível que outras espécies e, até mesmo novas espécies do gênero *Leishmania*, também testem positivo no ensaio de amplificação utilizado no nosso trabalho.

O papel de animais domésticos como reservatório para LV também foi investigado por inquéritos soropidemiológicos e do uso da tecnologia de sistema geográfico de informação (KHANAL *et al.*, 2010). A prevalência de anticorpos anti-

*Leishmania* neste estudo no Nepal foi de aproximadamente 10% em bovinos e de 23% em búfalos e caprinos. Estes autores concluíram que a presença de caprinos soropositivos aumentou o risco de teste positivo entre os humanos, sugerindo que independentemente desta espécie se constituir num reservatório para LV, a presença de caprinos tem importância na distribuição dos casos de LV. No Sudão, Mukhtar *et al.* (2000) reportaram que a soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania*, utilizando-se ensaio imunoenzimático (ELISA), foi de 47,6% em bovinos e 13,6% em caprinos, diminuindo para 21,4% e 8,5%, respectivamente, com o teste de aglutinação direta. Na Arábia Saudita, inquéritos epidemiológicos utilizando *dot*-ELISA revelaram uma soropositividade de 10,2% em caprinos e 13,9% em ovinos (AL-ZHRANI *et al.*, 1989). No norte da Espanha, a soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* em equínos foi de 14,3%, usando ELISA (FERNÁNDEZ-BELLON *et al.*, 2006).

Além das evidências indiretas dos resultados de estudos soroepidemiológicos, Mutinga *et al.*, em 1989, identificaram formas amastigotas e isolaram formas promastigotas de *Leishmania* num caprino no Quênia. Posteriormente, neste mesmo país, Williams *et al.* (1991) reportaram a detecção de sequência de DNA de cinetoplasto de *Leishmania* usando teste de PCR em diferentes tecidos de outro caprino. Em Portugal, foi descrito um caso de leishmaniose em equíno, diagnosticado através de PCR *real-time* usando sonda específica para *L. infantum* (ROLÃO *et al.*, 2005). Entretanto, Cerqueira *et al.* (2003) não conseguiram infectar experimentalmente quatro equínos, inoculados com elevado número de formas promastigotas de *L. chagasi*. Os animais não desenvolveram infecção patente nem foram capazes de infectar o vetor *Lu. longipalpis* em testes de xenodiagnóstico.

No nosso estudo, nenhuma das amostras de equídeos, caprinos ou ovinos testou positivo para DNA de *Leishmania* pela técnica de PCR *real-time*. Apesar de termos realizado um censo e incluído todos os animais destes grupos na área do estudo, o número de animais avaliados em cada uma das ordens foi pequeno. Assim sendo, o poder estatístico do nosso estudo para avaliar a prevalência de infecção por *Leishmania* nestes animais foi limitado, devido ao tamanho reduzido da amostra. É possível também, que a realização do PCR em amostras de sangue destes animais, no lugar de amostras de tecidos mais ricos em parasitos (como aquelas obtidas da punção ou biópsia de medula óssea, linfonodo, baço e pele), tenha

reduzido a sensibilidade da nossa técnica. No entanto, a PCR *real-time* tem sido reconhecida como técnica capaz de identificar cargas baixas de *Leishmania* em sangue periférico (MARY *et al.*, 2004; FRANCINO *et al.*, 2006).

## 6.2 ANIMAIS SILVESTRES: MARSUPIAIS

No presente estudo, nenhuma amostra de pele e apenas uma amostra de sangue de *D. albiventris* foi positiva para a presença de DNA de *Leishmania* pelo teste de PCR *real-time*. Estes resultados sugerem uma baixa prevalência da infecção por *Leishmania* nos marsupiais (*D. albiventris*) nesta área endêmica para LV. A carga parasitária da amostra positiva em sariguê foi baixa comparada à carga detectada em bovinos do nosso estudo e à carga descrita em cães positivos na mesma área no estudo conduzido por Nascimento (2011).

Os resultados reportados aqui podem significar que, de fato, a prevalência da infecção por *Leishmania* em *D. albiventris* é baixa. Ou, alternativamente, é possível que a nossa estimativa tenha sido subestimada por viés de seleção. Foram testados apenas os exemplares de *D. albiventris* capturados nas armadilhas, justamente aqueles mais ativos e suficientemente saudáveis para se deslocar amplamente e localizar as iscas de alimentos nas armadilhas. Assim sendo, animais infectados e sintomáticos tinham menor probabilidade de serem capturados e entrar para nossa amostra, portanto, subestimando a prevalência da infecção por *Leishmania* no nosso estudo.

Outra possível explicação para a baixa prevalência da infecção por *Leishmania* nos marsupiais de nosso trabalho seria a variação amostral e/ou a sazonalidade da infecção. Embora a captura dos marsupiais tenha ocorrido durante um período total de quase dois anos, 55% dos animais foram capturados nos meses de novembro/2007 e setembro/2008. Assim, mudanças e, particularmente, reduções nas taxas de infecção destes animais nestes meses poderiam influenciar demasiadamente nossas estimativas.

O Ministério da Saúde considera a espécie *D. albiventris* como reservatório silvestre da LV no Brasil (BRASIL, 2006), embora a escassez de informações sobre o papel destes animais como reservatórios de *L. chagasi* alguns estudos sugerem

esta possibilidade. Cabrera *et al.* (2003), numa avaliação dos fatores de risco para infecção por *L. chagasi* em cães numa área endêmica no estado do Rio de Janeiro, concluíram que a presença de *D. marsupialis* nos quintais das residências aumentava o risco de infecção nos cães e que 29% dos marsupiais examinados na área eram soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania* pelo teste de imunofluorescência (IF). Em outro estudo realizado numa área endêmica para LV na Colômbia, foi isolado *L. chagasi* em 37% (12/37) dos *D. marsupialis* examinados (CORREDOR *et al.*, 1989<sup>a</sup>).

Em estudos experimentais, Hanson *et al.* (1980) e Roa *et al.* (2002) identificaram formas amastigotas de *Leishmania* em baço e fígado de sariguês inoculados com promastigotas de *L. chagasi*. Na região metropolitana de Belo Horizonte, foi avaliada uma amostra de 111 sariguês (*D. marsupialis*), 21,6% soropositivos na IF e 25% testaram positivos no PCR para *Leishmania* (SCHALLIG *et al.*, 2007). Santiago *et al.* (2007) investigando número semelhante de marsupiais (102 *D. marsupialis* e 10 *D. aurita*) em Bauru, no interior do Estado de São Paulo, reportaram 91,6% de positividade na reação de PCR do sangue destes animais e 71% de soropositividade no teste de ELISA, sugerindo a participação de espécies do gênero *Didelphis* no ciclo de transmissão da *Leishmania* na área estudada.

Recentemente, Quintal *et al.* (2010) utilizaram PCR convencional e PCR *real-time* para avaliar a presença de *Leishmania spp* em amostras de pele de *D. albiventris* (n=191) e *Micoureus paraguayanus* (n=95) capturados no parque estadual do Morro do Diabo no Estado de São Paulo. Todas as amostras de *D. albiventris* testaram negativas no PCR convencional, mas 1,6% foram positivas no PCR *real-time*. Entre os espécimes de *M. paraguayanus*, a positividade foi de 7,4% no PCR convencional e 11,6% no PCR *real-time*.

A identificação de pulgas que comumente parasitam cães e gatos (*Ctenocephalides canis* e *C. felis*) em marsupiais no nosso estudo fornece evidência da capacidade de adaptação do *D. albiventris* ao ambiente doméstico e da sua sinantropia. Além disso, conforme sugerido por Cerqueira *et al.* (2000), este achado pode indicar uma conexão epidemiológica entre um potencial hospedeiro silvestre de *L. chagasi* e o ambiente doméstico; ou ainda, aumentar o potencial destes animais como reservatório, uma vez que estas espécies de pulga já foram identificadas com *Leishmania* e com potencial para provocar infecção em hamsters (COUTINHO & LINARDI, 2007).

O uso de técnicas de biologia molecular para avaliar a importância de possíveis reservatórios da LV apresenta algumas vantagens. Porém, a interpretação dos resultados deste tipo de estudo deve ser cuidadosa e precisa levar em consideração outras informações sobre a dinâmica das populações envolvidas e sobre a ecologia dos animais e dos vetores. É importante, sobretudo, distinguir espécies animais que não passam de hospedeiros incidentais, daquelas que funcionam, de fato, como hospedeiros reservatórios. Já que apenas os últimos têm importância na transmissão e na manutenção da LV.

Recentemente, Silva *et al.* (2005) propuseram cinco critérios para identificar reservatórios de espécies de *Leishmania* relacionados a ocorrência de LV. Resumidamente, estes critérios são: 1) Superposição da distribuição geográfica e temporal de vetores e hospedeiros; 2) Presença do mesmo parasito nos “reservatórios” e em humanos; 3) Manutenção do parasita em pele e no sangue em quantidade suficiente para infectar os vetores; 4) Prevalência da infecção acima de 20% e 5) Sobrevivência do hospedeiro por tempo longo o suficiente para garantir a transmissão do parasito. Neste estudo demonstramos uma superposição da distribuição geográfica e temporal de potenciais hospedeiros e casos humanos, detectamos uma prevalência acima de 20% em bovinos e, principalmente, apresentamos evidências que a carga parasitária em sangue periférico nestes animais é comparável àquela detectada em cães, hospedeiros de reconhecida importância para LV. Entretanto, nem todos os critérios foram investigados, e é necessário de realizar mais estudos para avaliar o papel destes animais como reservatórios para LV.

### 6.3 MÉRITOS E LIMITAÇÕES

Nosso estudo fez uma tentativa inovadora de utilizar técnica de biologia molecular quantitativa (PCR *real-time*) para avaliar potenciais reservatórios animais para LV. Os *primers* e sondas utilizados foram selecionados de genes que aparecem repetidas vezes no genoma de *Leishmania* spp. e que são altamente conservados entre as espécies de *Leishmania*. O método do xenodiagnóstico, tradicionalmente utilizado para avaliar reservatórios, é laborioso e demorado, além de não ser adequado para avaliar grande número de amostras. Além da originalidade da

proposta, no nosso trabalho foram avaliados animais numa área endêmica, vivendo nas proximidades das residências dos casos humanos.

Entre as limitações do presente estudo está o tamanho da amostra de animais domésticos, apesar de termos realizado um censo destes animais na área de estudo e termos incluído toda a população presente, o número final em cada ordem animal foi pequeno, limitando o poder estatístico do nosso estudo. Além disso, somente foram coletadas amostras de sangue periférico nos animais de criação, por questões éticas relacionadas à utilização de métodos invasivos para coletar amostra nestes animais. Em relação à amostra de marsupiais, apesar do número relativamente grande de animais avaliados, não foi capturado nenhum exemplar com alterações clínicas, portanto, o método de captura pode ter introduzido viés na seleção da amostra.

## 7 CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES

A partir dos nossos achados, é possível concluir que:

1) A técnica de PCR *real-time* pode ser uma ferramenta útil para avaliar o papel de potenciais reservatórios domésticos e silvestres para LV. Podendo, inclusive, utilizar amostra de sangue periférico na triagem dos animais, em vez de biópsia de órgãos e tecidos de mais difícil obtenção. A execução do PCR *real-time* é menos trabalhosa e mais prática do que a realização do teste de xenodiagnóstico, além disso, pode ser automatizada, permitindo a análise de grande número de amostras em estudos epidemiológicos;

2) A detecção de carga parasitária de *Leishmania* em sangue periférico de bovinos, sugere que eles podem ser reservatórios para LV. A relativa abundância de bovinos nas áreas endêmicas para LV, assim como as evidências da preferência alimentar do vetor por estes animais, ressaltam a importância do papel que os bovinos podem ter na transmissão da LV. Outros trabalhos são necessários para elucidar estas questões.

3) A baixa prevalência, bem como a baixa carga parasitária de *Leishmania*, encontradas em *D. albiventris* no nosso estudo sugerem que estes marsupiais tenham papel limitado como reservatório para LV nesta área. Entretanto, novos estudos incluindo amostras mais representativas da população destes animais em áreas endêmicas são necessários para esclarecer este assunto.

Finalmente, os resultados do nosso trabalho dão suporte à elaboração e condução de novos projetos para validar o uso da técnica de PCR *real-time*, em lugar do teste de xenodiagnóstico, como método de triagem e investigação inicial do potencial de espécies animais atuarem como reservatório para LV.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, P., *et al.* Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **Journal of Parasitology**, n. 77, v. 4, p. 557-561, 1991.
- ABRANCHES, P., *et al.* Kala-azar in Portugal. I. Attempts to find a wild reservoir. **Journal of Tropical Medicine Hygiene**, n. 85, p. 123-126, 1982.
- ABRANCHES, P., *et al.* Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. **Journal of Tropical Medicine Hygiene**, n. 87, p. 197-200, 1984.
- ADDY, M. A. & NANDY, A. Ten years of kala-azar in west Bengal, Part I. Did post-kala-azar dermal leishmaniasis initiate the outbreak in 24-Parganas? **Bull World Health Organ**, n. 70, v. 3, p. 341-346, 1992.
- AGUIAR, P. H. P., *et al.* Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmaniose chagasi* em uma área endêmica do Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.4, p. 283-294, 2007.
- AGRELA, I., *et al.* Feeding Behavior of *Lutzomyia pseudolongipalpis* (Diptera: Psychodidae), a Putative Vector of Visceral Leishmaniasis in Venezuela. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 3, p. 440-445, 2002.
- ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral no Novo Mundo. **Publicações Médicas**, v. 27, n. 196, p. 1-12, 1956.
- ALEXANDER. B., *et al.* Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1480-1485, 2002.
- ALMEIDA, A. B. P. F., *et al.* Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 156-159, 2009.
- ALMEIDA, M. A. O., *et al.* Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 227-232, 2005.
- ALVES, A. L., *et al.* Levantamento epidemiológico da leishmaniose em cães vadios da cidade de Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**, v. 8, n. 2, p. 63-68, 1998.
- AL-ZAHRANI, M. A., *et al.* Leishmania infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 5. Diversity of parasites causing visceral leishmaniasis in man and dogs in the south-west. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 4, p. 503-510, 1989.
- ANTUNES, G. M. **Diversidade e potencial zoonótico de parasitos de *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Marsupialia: Didelphidae)**. 2005. 122 f. Tese (Doutorado

em Ciências veterinárias: Parasitologia). Universidade do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. 2005.

ARIAS, J. R., *et al.* The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. V. 2, n. 2, p. 145-146, 1996.

ASHFORD, D. A., *et al.* Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 53-57, 1998.

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

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

ASSIS, T. S. M., *et al.* Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, n. 17, v. 2, p. 107-116, 2008

AZAB, M. E., *et al.* Canine and rodent leishmanial isolates from Egypt. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 263-264, 1984.

BADARÓ, R. Progressos nas pesquisas de leishmaniose visceral na área endêmica de Jacobina-Bahia 1934-1989. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 4, p. 159-164, 1988.

BANETH, G. & JAFFE, C. L. Canine visceral leishmaniasis in Israel: an overview of an emerging disease with reference to wild canids and human infection. In: **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain, p. 40-44, 1999.

BARBOZA, D. C. P. M., *et al.* Estudo de coorte em áreas de risco para leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 152-163, 2006.

BARBOZA, D. C. P. M., *et al.* Inquérito epidemiológico da leishmaniose visceral canina em três distritos sanitários do Município de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 2, p. 434-447, 2009.

BASTIEN, P., *et al.* Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than "Conventional" PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1897-1900, 2008.

BEER, P. D., *et al.* A killing disease epidemic among displaced Sudanese population identified as visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 3, p. 283-289, 1991.

BERN, C. *et al.* Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed-net use is strongly protective. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63,

n. 3 e 4, p. 184–188, 2000.

BETTINI, S., *et al.* Leishmaniasis in Tuscany (Italy): (II) *Leishmania* from wild rodentia and merican in a human and canine leishmaniasis focus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 1, p. 77-83, 1980.

BEVILACQUA, P. D., *et al.* Urbanização da Leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, 2001.  
Disponível em: < [mer://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352001000100001&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000100001&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 24 Jan. 2011.

BHATTARAI *et al.* Domestic Animals and Epidemiology of Visceral Leishmaniasis, Nepal, **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 231-237, 2010

BOSSOLASCO, S. *et al.*, Real-Time PCR Assay for clinical Management of human immunodeficiency virus-Infected Patients with Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5080–5084, 2003.

BOSSOLASCO, S., *et al.* ERRATUM: Real-Time PCR Assay for clinical Management of human immunodeficiency virus-Infected Patients with Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1858, 2004.

BOTELHO, A. C. A. & Natal, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 503-508, 2009.

BRAGA, M. D. M., *et al.* Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 5, p. 419-424, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Departamento de Vigilância Epidemiológica**. Brasília-DF, 2006: 122 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Introdução à Estatística Espacial para a Saúde Pública**. Brasília-DF, v. 3, p. 44-48. Cap. 2, 2007.

BUCHETON, B. *et al.* The interplay between environmental and host factors during an outbreak of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1449–1457, 2002.

CABRERA, M. A. A., *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assenssment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CÁCERES, N. C. Food Habits and Seed Dispersal by the White-Eared Opossum, *Didelphis albiventris*, in Southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 37, n. 2, p. 97-104, 2002.

CALDAS, A. J. M., *et al.* Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in North-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p.21-28, 2002.

CARDO, L. J. *Leishmania*: risk to the blood supply. **Transfusion**, v. 46, p. 1641-1645, 2006.

CARRANZA-TAMAYO, C. O., *et al.* Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 396-399, 2010.

CARRASCO, J., *et al.* Behaviour of *Lutzomyia longipalpis* in na area of southern Honduras endemic for visceral/atypical cutaneous leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 92, n. 8, p. 869-876, 1998.

CARREIRA, J. C. A., *et al.* *Trypanosoma cruzi* in the Scent Glands of *Didelphis marsupialis*: the Kinetics of Colonization. **Experimental Parasitology**, v. 97, p. 129–140, 2001.

CARVALHO, M. R., *et al.* A fauna de flebotomíneos envolvida em área de incidência de leishmaniose visceral americana na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p. 1227-1232, 2007.

CERQUEIRA, E. J. L., *et al.* Considerações sobre pulgas (Siphonaptera) da raposa *Cerdocyon thous* (Canidae) da área endêmica de leishmaniose visceral de Jacobina, Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 1, p. 91-93, 2000.

CERQUEIRA, E. J. L., *et al.* Inoculação experimental de *Equus asinus* com *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36, n. 6, p. 695-701, 2003.

CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.

COHEN, C. Leishmaniasis acquired in Belgium. **The Lancet**, v. 338, n. 13, p.128, 1991.

COOK, G. C. Tropical medicine: Na illustrated history of the pioneers. The causative agent of visceral leishmaniasis (kal-azar): William Leishman (1865-1926) and Charles Donovan (1863-1951). **Editores Elsevier**. Great Britain. Cap. 12. 2007.

CORREDOR, A. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania chagasi* in Colombia, South America. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 195, 1989<sup>a</sup>.

CORREDOR, A., *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40. n. 5, p. 480-486, 1989<sup>b</sup>.

COSTA, C. H. N., *et al.* Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and hygiene**, v. 93, p. 464, 1999.

COUTINHO, M. T. Z. & LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 320–325, 2007.

COUTINHO, M. T. Z., *et al.* Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149–155, 2005.

CUNHA, S., *et al.* Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan center of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and hygiene**, v. 89, p. 155-158, 1995.

DANTAS-TORRES, F., *et al.* Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 444-445, 2005.

DANTAS-TORRES, F., *et al.* Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. **Experimental Parasitology**, v. 125, p. 184–185, 2010.

DEANE, L. M. & DEANE, M. P. Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani*, no Ceará. **O Hospital**, v. 45, n. 6, p. 437, 1954<sup>a</sup>.

DEANE, L. M. & DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas American e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **O Hospital**, v. 45, n. 4, p. 45-47, 1954<sup>b</sup>.

DEANE, L. M. & DEANE, M. P. Observações ameri abrigos e criadouros de flebótomos no nordeste do Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 2, n. 9, p. 225-46, 1957.

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

DEANE, L. M. Reservatórios da *Leishmania donovani* no Brasil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 78, 161-169, 1961.

DEANE, L.M. & DEANE, M. P. Observações preliminaries sobre a American og compartiva do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani*, em área endêmica de Calazar, no Ceará. **O Hospital**, v. 48, n. 1, p. 61-76, 1955.

DEANE, L.M. Epidemiologia e profilaxia do calazar americano. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 4, n. 10, p. 431-449, 1958.

DEREURE, J., *et al.* Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1103-1108, 2003.

DEREURE, J., *et al.* Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin. In: **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain; p. 18-25. 1999.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Statistics Quarterly**, v. 45, p. 267-75, 1992.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Dermatology Clinic journal articles**, v. 4, p. 417-423, 1996.

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

DIAS, F. O. P., *et al.* Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1373-1380, 2003.

DIAS-LIMA, A. G., *et al.* Horizontal stratification of the sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in a transitional vegetation between caatinga and tropical rain forest, state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 733-737, 2003.

DIETZE, R., *et al.* Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 1240-1242, 1997.

DINESH, D. S., *et al.* Seasonal and nocturnal landing/biting behaviour of *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 95, p. 197-202, 2001.

DOURADO, Z. F., *et al.* Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 3, p. 205-214, 2007.

DURANT, P. Notes on white-eared opossum *Didelphis albiventris* LUND, 1840 from Mérida Andes, Venezuela. **Revista de Zoología Americano Latinoamericana**, v. 9, n. 1, Art 1, p. 01-07, 2002.

DYE, C. Leishmaniasis epidemiology: the theory catches up. **Parasitology**, v. 104: p. S7-S18, 1992.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 2, p. 125-130, 1996.

EVANGELISTA, L. S. M., *et al.* Leishmaniose visceral canina no Estado de Roraima. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 3, n. 2, Ed. 63, Art 93, 2009.

Disponível em: [mer://www.pubvet.com.br/artigos\\_det.asp?artigo=93](http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=93). Acesso em: 27 jan. 2011.

EVANS, T. G., *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, p. 1124-1132, 1992.

FERNÁNDEZ-BELLON, H., *et al.* Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 181–185, 2006.

FERREIRA, S. A., *et al.* Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR–hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 257–263, 2008.

FERRER L., *et al.* Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **The Veterinary Record**, v. 136, p. 514-516, 1999.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. **In: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain. P. 6-10, 1999.  
FISA, R., *et al.* Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. **Veterinary Parasitology**, v. 83, p. 87–97, 1999.

FISA, R., *et al.* Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. **Veterinary Parasitology**, v. 83, p. 87-97, 1999.

FRANCINO O., *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214–221, 2006.

FRANKE, C. R., *et al.* Impact of the El Niño/ Southern oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 914-917, 2002.

FREITAS, E., *et al.* Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, n. 137, p. 159–167, 2006.

GAVGANI, A. S. M., *et al.* Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 5, p. 511-515, 2002.

GLEISER, C. A., *et al.* Visceral leishmaniasis in a dog imported into the United States. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, p. 227-231, 1957.

GOMES-NETO, C. M. B., *et al.* **Pesquisa sobre o envolvimento do marsupial *Didelphis albiventris* Lund, 1840 (Didelphimorphia, Didelphidae) e de cães domiciliados no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral no município de Camaçari, localidade de Barra do Pojuca, Bahia.** 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos). Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária. 2006.

GRIMALDI, G. Jr., *et al.* A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and**

**Hygiene**, v. 41, n. 6, p. 687-725, 1989.

GUERIN, P. T., *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet.**, v. 2, p. 494-501, 2002.

HALPERN, J. & WANG, N. E. Leishmaniasis. **Journal Medicine**, v. 2, n. 9, 2001.

HANSON, W. L., *et al.* *Leishmania donovani* in the Opossum (*Didelphis marsupialis*). **The Journal of Parasitology**, v. 66, n. 4, p. 700-701, 1980.

HEISCH, R. B., *et al.* The isolation of a *Leishmania* from gerbils in Kenya. **Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 62, p. 158-159, 1959.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Primeiros Resultados do Censo 2010 < [mer://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1](http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1)>. Acesso em 28 jan. 2011.

IVERSON, L. B., *et al.* Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana no município de São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 6, p. 310-317, 1983.

JERONIMO, S. M. B., *et al.* An Emerging Peri-Urban Pattern of Infection with *Leishmania chagasi*, the Protozoan Causing Visceral Leishmaniasis in Northeast Brazil. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 36, p. 443-449, 2004.

JULIÃO, F. S., *et al.* Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 8, p. 319-324, 2007.

KHANAL, B., *et al.* Spatial analysis of *Leishmania donovani* exposure in humans and domestic animals in a recent kala azar focus in Nepal. **Parasitology**, v. 137, p. 1597–1603, 2010.

KILLICK-KENDRICK, R. K. Are cattle a reservoir host of kala-azar in India? **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 84, n. 5, p. 754, 1990<sup>a</sup>.

KILLICK-KENDRICK, R. K. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, p. 1-24, 1990<sup>b</sup>.

KIRKPATRICK, C. E., *et al.* *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: Experimental infections in domestic cats. **Experimental Parasitology**, v. 58, p. 125-131, 1984.

KRAUSE, W. J & KRAUSE, W. A. **The opossum: Its amazing story**. Department of Pathology and Anatomical Sciences, School of Medicine, University of Missouri, Colombia. 80p, 2006.

LACERDA, M. M. The brazilian leishmaniasis control program. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 489-495, 1994.

LAINSON, R. & SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 273, n. 22, p. 595-600, 1978.

LAINSON, R. Demographic America and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: Demography and Vector-borne Disease. M.W. Service, Ed. **Boca raton: CRC Press**, p. 85-106, 1989.

LAINSON, R., *et al.* Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 135-137, 1990.

LAINSON, R., *et al.* Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para state, Brazil. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 63, n. 6, p. 741-745, 1969.

LANE, R. P. Chicken house of sandflies. **Parasitology Today**, v. 2, n. 9, p. 248-249, 1986.

LEONTIDES, L. S., *et al.* A cross-sectional study of *Leishmania* spp. Infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 19-27, 2002.

LIMA, H., *et al.* Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 412-414, 2008.

LIMA, W. G., *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, v. 92, p. 43–53, 2004.

LINHARES, G. F. C., *et al.* Relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 69-72, 2005.

LLOYD, R. B. & NAIPER, L. E. The blood meal of sand-flies investigated by means of precipitin antisera. **Indian Journal of Medical Research**, v. 18, p. 347–359, 1930.

LOBSIGER, L. *et al.*, An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 408–414, 2010

MALTA, M. L. C., *et al.* Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 193–197, 2010.

MANCIANTI, F., *et al.* Serologic survey for leishmaniasis in free-living red fox (*Vulpes vulpes*) in Italy. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, n. 3, p. 454-456, 1994.

MARGONARI C; F. C. R., *et. Al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 31-38, 2006.

MAROLI M, P. M. G., *et al.* Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, 145, p. 357–360, 2007.

- MARZOCHI, M. C. A., *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977 – 1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 349-57, 1985.
- MATHUR, P. & SAMANTARAY, J. C. The first probable case of platelet transfusion-transmitted visceral leishmaniasis. **Transfusion Medicine**, v. 14, p. 319–321, 2004.
- MELLO, G. B. Verificação da infecção natural do gato (*Felix domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. **Brasil Médico**, v. 54, n. 12, p. 180, 1940.
- MENDES, W. S., *et al.* Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 227-231, 2002.
- MESTRE, G. L. C. & FONTES, C. J. F. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 42-48, 2007.
- MICHALSKY, E. M., *et al.* Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 67–76, 2007.
- MISSAWA, N. A., *et al.* Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365-368, 2008.
- MORAES-SILVA, E., *et al.* Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. Infantum* infection. **Acta Tropica**, v. 98, p. 176–182, 2006.
- MOREIRA, M. A. B., *et al.* Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 2, p. 103-106, 2002.
- MOREIRA-Jr, E. D., *et al.* Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 245–252, 2004.
- MORRISON, A. C., *et al.* Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 68-75, 1993.
- MUKHTAR, M. M., *et al.* Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminary report. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 33-36, 2000.
- MUTINGA, M. J., *et al.* Leishmaniasis in Kenya: description of leishmaniasis of domestic goat from Transmara, Narock District, Kenya. **Tropical Medicine Parasitology**, v. 40, p. 91-96, 1989.

NADIM, A., *et al.* Present status of kala-azar in Iran. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 27, n. 1, p. 25-28, 1978.

NASCIMENTO, C. S. **Validação do método de biologia molecular quantitativo (PCR *real-time*) para investigar o papel do reservatório canino na leishmaniose visceral humana.** 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina investigativa). Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia. 2011.

NASCIMENTO, M. D. S. B., *et al.* Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da leishmaniose visceral no estado do Maranhão – Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 3, p. 233-240, 1996.

NASEREDDIN, A., *et al.* Feline leishmaniasis in Jerusalem: Serological investigation. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 364–369, 2008.

NEVES, D. P., *et al.* Parasitologia Humana. 9<sup>o</sup> ed. **Editora Atheneu**. São Paulo; 1997. Capítulos 06 e 09.

NUZUM, E., *et al.* Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of the Polymerase Chain Reaction on patient blood. **Journal Infectious Diseases**, v. 171, p. 751-754, 1995.

OLIVEIRA, A. G., *et al.* Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 869-874, 2006.

OTRANTOA, D., *et al.* Experimental and field investigations on the role of birds as hosts of *Leishmania infantum*, with emphasis on the domestic chicken. **Acta Tropica**, v. 113, p. 80–83, 2010.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B., *et al.* Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.

PALIT, A., *et al.* Host preference of *Phlebotomus argentipes* and *Phlebotomus papatasi* in different biotopes of West Bengal, **International Journal of Environmental Health Research**, v. 15, p. 449–454, 2005.

PARANHOS-SILVA, M., *et al.* A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 1, p. 39-44, 1996.

PAREDES, R. R., *et al.* Leishmaniasis in HIV infection. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n. 1, p. 39-49, 2003.

PEDROSA, C. M. & ROCHA, E. M. Clinical and epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in children up to 15 years of age in Alagoas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 4, p. 300-304, 2004.

PESSOA, S. B. Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: **Ed. Guanabara Koogan**, 1972.

PORROZZIA, R., *et al.* *Leishmania infantum*-induced primary and challenge infections in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a primate model for visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 926-937, 2006.

QUEIROZ, M. J., *et al.* Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area **Journal of Pediatrics**, v. 80, n. 2, p. 141-146, 2004.

QUINNELL, R. J., *et al.* Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 6, p. 195-200, 1992.

QUINTAL, A. P. N., *et al.* *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. **Veterinary Parasitology**, 2010, doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.011 (*Article in Press*)

RACHAMIM, N., *et al.* Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: Comparison of three methods. **Animals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 85, n. 5, p. 503-508, 1991.

RAJASEKARIAH, G. H. R. Worldleish II: impressions from a 'new leishmaniac'. **TRENDS in Parasitology**, v. 17, n. 9, p. 403-405, 2001.

RASSAM, M. B. & AL-MUDHAFFAR, S. A. Comparative diagnostic study of kala azar. **Animals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 74, n. 3, p. 283-287, 1980.

REITHINGER, R. & DAVIES, C. R. Canine leishmaniasis: Novel strategies for control. **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 7, p. 289-290, 2002.

REY, L. C., *et al.*, American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. **Journal of Pediatrics**, v. 81, n. 1, p. 73-78, 2005.

REY, L. Parasitologia. *Leishmania* e Leishmaniasis: Os parasitos. **Editora Guanabara Koogan AS**. 3<sup>o</sup> m. Rio de Janeiro, 2001. Capítulos 15 a 19.

ROA, D. M., *et al.* Amiloidosis em *Didelphis marsupialis* infectado experimentalmente com *Leishmania chagasi*. **Biomédica**, v. 22, p. 237-240, 2002.

ROLÃO, N., *et al.* Equine infection with *Leishmania* in Portugal. **Parasite**, n. 12, p. 183-186, 2005.

RUIZ-PIÑA, H. & CRUZ-REYES, A. The opossum *Didelphis virginiana* as a Synanthropic Reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 613-620, 2002.

SACKS, D. L. & PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, p. 1417-1419, 1984.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Saúde. Diretoria de Vigilância

Epidemiológica. **Nota técnica nº. 007/2010/DIVE/SES**. Disponível em: <[http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/noticias/2010/nota\\_tecnica\\_lvc\\_fpolis.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/noticias/2010/nota_tecnica_lvc_fpolis.pdf)>. Acesso em: 24 jan. 2011.

SANTIAGO, M. E. B., *et al.* An investigation of *Leishmania* spp. In *Didelphis* spp. From urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 283–290, 2007.

SANTOS, S. O., *et al.* The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato grosso do Sul State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 633-634, 2003.

SAVANI, E. S. M. M., *et al.* Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 2, p. 260-262, 2003.

SAVANI, E. S., *et al.* The first American case of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 120 p. 229–233, 2004.

SCHALLIG, H. D. F. H., *et al.* *Didelphis marsupialis* (Common Opossum): A Potential Reservoir Host for Zoonotic Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 3, p. 387-393, 2007.

SCHULZ, A., *et al.*, Detection, Differentiation, and Quantitation of Pathogenic *Leishmania* Organisms by a Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Real-Time PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1529–1535, 2003.

SCORZA, J. V., *et al.* *Didelphis marsupialis*: reservorio primario de *Leishmania* sp. En la ciudad de Trujillo, Venezuela. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 36, p. 194-200, 1984.

SCOTT, J. M., *et al.* A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 3, p. 272-277, 1991.

SENRA, M. S., *et al.* Leishmaniose visceral em Santarém/PA: Aspectos gerais do controle, inquérito sorológico em cães e tratamento dos casos humanos. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 37, p. 47-59, 1985.

SHAW, J. J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83 (Supl), p. 486-490, 1988.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 577-579, 2006.

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

SHERLOCK, I. A. Há especificidade dos flebotomíneos para as leishmanias? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30 (Supl. 1), p. 151-155, 1997.

SHERLOCK, I. A. Notas sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 16, n. 1, p. 19-26, 1964.

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

SHERLOCK, I. A., *et al.* Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. VI – Investigações sobre reservatórios silvestres e comensais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 1, p. 23-27, 1988.

SILVA, A. V. M., *et al.* Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 324-328, 2005.

SILVA, E. S., *et al.* Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 12, p. 550-552, 2005.

SILVA, E.S., *et al.* Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

SILVA, F. L., *et al.* Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 55–59, 2009<sup>a</sup>.

SILVA, O. A., *et al.* La leishmaniose viscérale canine dans le Nord-Est du Brésil : aspects épidémiologiques. **Bulletin of the Exotic Pathology Society**, v. 100, n. 1, p. 49-50, 2007.

SILVA, S. M., *et al.* First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 97, p. 131–133, 2010.

SILVA, S. M., *et al.* First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 159–162, 2009<sup>b</sup>.

SILVEIRA, F. T., *et al.* Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 6, p. 830-832, 1982.

SINGH, R., *et al.* Breeding ecology of visceral leishmaniasis vector sandfly in Bihar

state of Índia. **Acta Tropica**, v. 107, p. 117–120, 2008.

SINGH, S. P., *et al.* Risk factors for visceral leishmaniasis in India: further evidence on the role of domestic animals **Tropical Medicine and International Health**, v 15 (supl. 2), p 29–35, 2010.

SIRENA, M. G. A., *et al.* Leishmaniose visceral, 1º caso autóctone no Rio Grande do Sul. **Boletim Epidemiológico: Núcleo Hospitalar de Epidemiologia Hospital Nossa Senhora da Conceição**. v. 2, n. 4, 16p., 2009.

SOLANO-GALLEGO, L., *et al.* Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 315–319, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L., *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in na área of canine Leishmaniasis endemicity using PCR on Several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560-563, 2001.

SOUZA, V. M. M., *et al.* Estudo Epidemiológico de um Surto de Leishmaniose Visceral numa Área de Manguezal. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 76, n. 1, p. 14-24, 2006.

STEINDEL, M., *et al.* Biological and isoenzymatic characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from sylvatic reservoirs and vectors from the state of Santa Catarina, Southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 60, p. 167-177, 1995.

TABAR, M. D., *et al.* Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. **Journal of Small Animal Practice**, v. 49, p. 325–328, 2008.

TAVARES, L. M. S. A. & TAVARES, E. D. Incidência, Distribuição Geográfica e Aspectos Ambientais das Áreas Endêmicas da Leishmaniose Visceral em Sergipe. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 1, p. 47-52, 1999.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies?. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, p.287-292. 1995.

TRAVI, B. L., *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 64, n. 3 e 4, p. 119–124, 2001.

TRAVI, B. L., *et al.* *Didelphis marsupialis*, an Important Reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 50, n. 5, p. 557-565, 1994.

TRAVI, B. L., *et al.* *Leishmania (Leishmania) chagasi*: Clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of new world visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 88, p.73-75, 1998.

VITALE, F., *et al.* TaqMan-Based Detection of *Leishmania infantum* DNA Using

Canine Samples. **Annals New York Academy Sciences**, v. 1026, p. 139–143, 2004.

WHO. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly Epidemiological Record**, v. 77, n. 44, p. 365-372, 2002.

WIJEYARATNE, P. M., *et al.* Endemic disease and development: the leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, p. 349-364, 1994.

WILLIAMS, A. O., *et al.* Leishmaniasis in a domestic goat in Kenya. **Molecular and Cellular Probes**, v. 5, p. 319-325, 1991.

XIMENES, M. F. F. M., *et al.* Density of sandfly (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4, p. 427-432, 1999.

YAMAMOTO, Y. I., *et al.* Estudo da eficiência das reações de imunofluorescência e de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 143-152, 1988.

YAN-JIA, L. A review of Kala-azar in China from 1949 to 1959. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 4, p. 531-537, 1982.

YOSHIDA, E. L. A., *et al.* Encontro de espécie do gênero *Leishmania* em *Didelphis aurita* no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 21, n. 2, p. 110-113, 1979.