



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Saúde Pública



FILIPE DANTAS-TORRES

**EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE
VISCERAL NO MUNICÍPIO DE PAULISTA,
ESTADO DE PERNAMBUCO, NORDESTE
DO BRASIL**

RECIFE
2006

FILIFE DANTAS-TORRES

**EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO
MUNICÍPIO DE PAULISTA, ESTADO DE PERNAMBUCO,
NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Orientador: Sinval Pinto Brandão-Filho

Recife, 2006

Dedico esta obra à minha amada esposa.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à minha família, a essência da vida.

Ao meu orientador, Dr. Sinval Pinto Brandão-Filho, pela troca de experiências e pela confiança em mim depositada.

Aos Drs. Francisco Duarte e Valdenilson Aguiar, em nome dos quais agradeço a todos da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco (SES-PE).

A todos da Secretaria Municipal de Saúde de Paulista, pelo apoio durante o trabalho de campo, em especial a Célia e Susane.

A Profa. Dra. Maria Aparecida da Glória Faustino e ao Prof. Dr. Lêucio C. Alves, em nome dos quais agradeço a todos os colegas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

A Maria Edileusa Felinto de Brito, pela troca de experiências e pelo incentivo.

Ao Dr. Wayner Vieira de Souza e ao José Constantino Silveira Júnior, estendendo a todos os colegas que colaboraram direta ou indiretamente.

A turma de Mestrado em Saúde Pública 2005, especialmente a Andréa, Luiza, Bruna e Karina, pela amizade construída durante os últimos dois anos.

A todos os colegas do Laboratório de Imunoparasitologia; sem citar nomes para não cometer injustiças.

A Sidney Pratt, pela revisão gramatical dos trabalhos publicados em inglês.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), que financiou a maior parte dessa pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do qual fui bolsista de mestrado.

RESUMO

No presente trabalho, objetivou-se estudar alguns aspectos envolvidos na epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Paulista, litoral norte do Estado de Pernambuco. Realizou-se um estudo retrospectivo dos casos humanos de leishmaniose visceral notificados em Paulista (1995–2006), o qual demonstrou ser a doença mais comum entre crianças e entre indivíduos do sexo masculino. Conduziu-se um inquérito soropidemiológico entre cães (semi)domiciliados (n=322), o qual revelou uma prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* sp. de 40,3%, a taxa mais alta já relatada em Pernambuco. A positividade no teste sorológico foi estatisticamente mais alta entre cães machos e jovens (p-valor $\leq 0,05$). Realizaram-se coletas sistemáticas com armadilhas luminosas do tipo CDC no intuito de estudar a fauna de flebotomíneos. A única espécie encontrada foi *Lutzomyia longipalpis*, a qual estava presente no entorno das casas (n=5), mas não dentro destas. Espera-se que os resultados obtidos a partir desse trabalho sirvam de base para a elaboração de novas estratégias para o controle da leishmaniose visceral no município de Paulista.

Descritores: leishmaniose visceral – epidemiologia, Psychodidae, cães.

ABSTRACT

The goal of the present investigation was to study some aspects involved in the epidemiology of visceral leishmaniasis in the municipality of Paulista, located in the north coast of Pernambuco State. A retrospective study of the human cases of visceral leishmaniasis notified in Paulista (1995–2006) was realized, which indicated that the disease is more common among children and males. A seroepidemiological survey among pet dogs (n=322) was carried out, which revealed a prevalence of anti-*Leishmania* sp. antibodies of 40.3%, the highest rate reported in Pernambuco. Serological positivity was statistically higher among male and juvenile dogs (p-value ≤ 0.05). Systematic collections with CDC light traps were carried out to study the local phlebotomine sandfly fauna. *Lutzomyia longipalpis*, the only species found, was present outside but not inside the houses (n=5). It is expected that the results obtained from the present study will serve as the basis for the development of new control strategies against visceral leishmaniasis in Paulista.

Keywords: visceral leishmaniasis – epidemiology, Psychodidae, dogs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – *acquired immunodeficiency syndrome*

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

DHT – *delayed hypersensitivity test*

ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay*

IC – intervalo de confiança

LV – leishmaniose visceral

LTA – leishmaniose tegumentar americana

PCR – *polymerase chain reaction*

DNA – deoxyribonucleic acid

RIFI – reação de imunofluorescência indireta

SFM – sistema fagocítico mononuclear

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Breve histórico	11
1.2	Etiologia	12
1.3	Hospedeiros reservatórios	14
1.4	Transmissão	15
1.5	Fatores de risco	16
1.6	Distribuição geográfica	17
1.7	Incidência e letalidade	18
1.8	Aspectos clínicos	20
1.9	Diagnóstico	20
1.9.1	<i>Diagnóstico parasitológico</i>	21
1.9.2	<i>Diagnóstico imunológico</i>	21
1.9.3	<i>Diagnóstico molecular</i>	22
1.10	Tratamento	23
1.11	Controle e prevenção	25
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Geral	30
3.2	Específicos	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Área de estudo	32
4.2	Estudo retrospectivo sobre os casos humanos	33
4.3	Coleta de flebotomíneos	33

4.4	Dissecção de flebotomíneos para pesquisa de <i>Leishmania</i> spp.	34
4.5	Inquérito sorológico	34
4.5.1	<i>Tamanho da amostra</i>	34
4.5.2	<i>Coleta de sangue</i>	35
4.5.3	<i>Exame clínico dos cães</i>	35
4.5.4	<i>Testes sorológicos</i>	35
4.6	Diagnóstico molecular	36
4.7	Análise estatística	37
4.8	Questões éticas	37
5	RESULTADOS	38
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças que permanecem como um importante problema de saúde pública em pelo menos 88 países, sendo 16 países desenvolvidos e 72 países em desenvolvimento (DESJEUX, 2004; DUJARDIN, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Mais do que isso, o impacto causado pelas leishmanioses tem aumentado nas áreas onde elas ocorrem de forma endêmica (DESJEUX, 2001). Dentre as várias formas clínicas de leishmaniose, destaca-se a visceral que geralmente é fatal quando não tratada. A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária de grande importância no mundo, estando, inclusive, na lista de prioridades da World Health Organization (WHO) (REMME *et al.*, 2002).

Em anos recentes, foram publicadas inúmeras revisões sobre a LV (ASHFORD, 2000; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006b; DESJEUX, 2004; GONTIJO; MELO, 2004; GRAMICCIA; GRADONI, 2005; GUERIN *et al.*, 2002; LAINSON; RANGEL, 2005; MURRAY *et al.*, 2005). Nos tópicos a seguir, será realizada uma breve revisão sobre os principais aspectos relacionados a essa zoonose. Embora a LV na Índia seja mencionada em alguns momentos (ver: “Breve histórico”, “Etiologia” e “Tratamento”), uma maior ênfase será dada à doença nas Américas e na região Mediterrânea.

1.1 Breve histórico

Acredita-se que a LV tenha sido descrita pela primeira vez na Grécia, em 1835, quando Roser chamou atenção para uma afecção denominada *ponos* (que quer dizer, em grego, “dor”) que acometia crianças da ilha de Spétsai, a sudeste de Peloponnèse, cuja característica principal era uma esplenomegalia dolorosa (JARRY, 1999). Em 1869, a LV era descrita na Índia, onde ficou conhecida como *kala-jwar* ou *kala-zar* (JARRY, 1999), que quer dizer, em hindi, “febre negra” (DORLAND, 1949). Essa denominação surgiu devido à febre e ao escurecimento da pele, bastante comuns em pacientes indianos (BADARÓ; DUARTE, 1996).

É interessante notar, entretanto, que num relatório datado de 1872, o inspetor geral dos hospitais civis na Índia comenta a respeito de uma enfermidade, a qual denominou de *fièvre malarique intermittente*, cujos indícios indicam que se

tratava da LV. Segundo esse relatório, a tal “desordem febril” havia sido previamente registrada em distritos como Jessore (em 1824), Nuddea (em 1832 e 1833), Hoogly (em 1857) e Burdwan (em 1862) (JARRY, 1999).

Em 1913, foi diagnosticado no Paraguai o que parece ser o primeiro caso de LV em paciente oriundo do Brasil (MIGONE, 1913): um imigrante italiano que morava em Santos, Estado de São Paulo, adoeceu após uma viagem ao Estado do Mato Grosso (ALENCAR, 1977). Em 1923, o médico pernambucano Armando Tavares comunicou o primeiro caso de LV no Estado de Pernambuco (PEREIRA *et al.*, 1985). Excluindo-se o caso diagnosticado no Paraguai, esse certamente trata-se do primeiro caso de LV descrito em território brasileiro, sendo um importante marco na história dessa doença no Brasil.

É preciso registrar que o despertar da comunidade científica para a questão da LV no Brasil se deu a partir da década de 30, quando Henrique Penna confirmou a presença do agente causal da LV em lâminas de viscerotomias de 41 pacientes falecidos com suspeita de febre amarela (PENNA, 1934). Analisando os registros desses pacientes, o renomado patologista do Instituto Oswaldo Cruz observou que a grande maioria residia em estados do Nordeste, demonstrando, já naquela época, a notável concentração de casos nessa região do Brasil.

A partir da década de 50, foram registrados inúmeros casos em todo o país, levando, inclusive, a criação da “Campanha Contra a Leishmaniose Visceral”, que teve seu início no ano de 1953 no Ceará (ALENCAR, 1959; DEANE, 1956; PESSÔA; MARTINS, 1988).

1.2 Etiologia

A LV é causada por um protozoário heteroxênico, intracelular obrigatório, que infecta as células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de diversas espécies animais. Taxonomicamente, o agente casual pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e subgênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1987; SHAW, 1994).

Em 1903, após as observações pioneiras de William Leishman e Charles Donovan foi descrito o agente etiológico do *kala-azar* indiano – na época,

denominado de *Piroplasma donovani* (LAVERAN; MESNIL, 1903), nome este rapidamente corrigido para *Leishmania donovani* (ROSS, 1903). Em 1908, a espécie *Leishmania infantum* foi descrita como sendo responsável pela LV na região Mediterrânea (NICOLLE, 1908). Aproximadamente 30 anos mais tarde, uma nova espécie, a *L. chagasi*, era incriminada como a causadora dessa doença nas Américas (CUNHA; CHAGAS, 1937). Mais tarde, entretanto, Cunha (1938, 1942) assumiria que o agente etiológico da LV nas Américas era idêntico a *L. infantum*. Desde então, têm surgido várias hipóteses e especulações acerca da origem e da taxonomia do agente causal da LV nas Américas e na região Mediterrânea (LAINSON *et al.*, 1987; MOMEN; GRIMALDI JÚNIOR; DEANE, 1987). Após inúmeros estudos genéticos e moleculares (MAURÍCIO *et al.*, 1999; MOMEN *et al.*, 1993) as espécies *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* foram formalmente referidas como sinônimos (MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000). Apesar disso, ainda hoje, a nomenclatura do agente causal da LV continua sendo alvo de debates e não há um consenso (DANTAS-TORRES, 2006c; LAINSON; RANGEL, 2006; SHAW, 2002, 2006). Há aqueles que ainda consideram *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* como espécies distintas, mas sugerem que elas devem ser separadas como subespécie (LAINSON; RANGEL, 2005). Neste caso, a nomenclatura correta seria *L. (L.) infantum infantum* e *L. (L.) infantum chagasi*. Essa possibilidade, embora aceitável, apresenta implicações diretas para a classificação taxonômica atual do gênero *Leishmania*, na qual não existem subespécies (DANTAS-TORRES, 2006c). Outro aspecto importante dessa discussão é que enquanto não há um consenso, diversos nomes têm sido utilizados para designar o mesmo parasito e isso é cientificamente inaceitável. A questão da nomenclatura do agente causal da LV é um assunto aberto e para fins didáticos, utilizaremos a designação subespecífica, defendida por alguns autores (LAINSON; RANGEL, 2005; SHAW, 2006), salvo quando estivermos referindo-nos a ambos os parasitos. Neste caso, usaremos *L. (L.) infantum* sensu lato (s.l.).

É importante lembrar que embora a presença do agente causal seja uma condição *sine qua non* para o desenvolvimento da LV, a simples presença do parasito, *per se*, não é suficiente para causar a doença. Isso pode ser facilmente compreendido quando sabemos que uma grande proporção de indivíduos pode infectar-se sem desenvolver a doença (COSTA *et al.*, 2002). Um conjunto de fatores, que vão desde a virulência do parasito até o *background* genético e imunológico do

hospedeiro, precisa atuar de forma sinérgica para que o indivíduo adoeça (CERF *et al.*, 1987; DESJEUX, 2001).

1.3 Hospedeiros reservatórios

Os canídeos (Carnivora: Canidae) reúnem os requisitos necessários para atuarem como os principais hospedeiros reservatórios de *L. (L.) infantum* s.l. (ALVAR *et al.*, 2004; ASHFORD, 1996; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006b); isto é, estão quase sempre presentes nas áreas onde a LV é endêmica, vivem próximos ao homem, são atrativos para os flebotomíneos, apresentam taxas de infecção significativas e, em geral, são infecciosos para os vetores. No ambiente doméstico, o cão assume o papel de principal hospedeiro reservatório da infecção, tanto na região Mediterrânea (ALVAR *et al.*, 2004), como nas Américas (LAINSON; RANGEL, 2005). Já no ambiente silvestre, inúmeros animais têm sido encontrados naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* s.l. (ASHFORD, 1996; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006b). No Estado da Bahia, Sherlock *et al.* (1984) relataram a infecção natural pelo agente etiológico da LV em *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae), o gambá-de-orelha-branca. Adicionalmente, tem havido especulação acerca do papel dos gatos domésticos na epidemiologia da LV, porém esse é um assunto que carece maiores estudos (DANTAS-TORRES *et al.*, 2006; SAVANI *et al.*, 2004; SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004).

De fato, existem fortes evidências que indicam que outros hospedeiros de *L. (L.) infantum* s.l., além da raposa e do cão, podem estar atuando como reservatórios. No Brasil, por exemplo, o programa de controle da LV baseado na eliminação de cães soropositivos tem sido incapaz de conter o avanço da doença. Isso tem gerado especulações acerca do papel do próprio homem como hospedeiro reservatório da infecção (DIETZE *et al.*, 1997). No início dos anos 60, demonstrou-se que indivíduos com LV ativa foram capazes de infectar fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (DEANE; DEANE, 1962). Essa possibilidade foi reforçada por resultados de um estudo mais recente (COSTA *et al.*, 2002). Seria então o homem um importante reservatório? Por questões éticas, essa é uma pergunta que dificilmente será respondida, haja vista que seriam necessários inúmeros ensaios de

infeciosidade com indivíduos apresentando LV ativa e com portadores assintomáticos da infecção. Pelo menos teoricamente, essa hipótese é inteiramente plausível. Mais do que isso, mesmo que os “portadores são” fossem pouco infectivos para os vetores, eles poderiam representar proporcionalmente uma formidável fonte de infecção devido ao grande número de indivíduos infectados (COSTA *et al.*, 2002).

1.4 Transmissão

O agente causal da LV é transmitido primariamente por flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) dos gêneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (KILLICK-KENDRICK, 1990). No Velho Mundo, várias espécies estão envolvidas na transmissão, a saber: *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus ariasi*, (KILLICK-KENDRICK, 1990, 1999). Já no Novo Mundo, a espécie *Lutzomyia longipalpis* é a principal responsável pela transmissão, mas outras espécies podem estar envolvidas (LAINSON; RANGEL, 2005).

Embora a infecção por *L. (L.) infantum* s.l. seja transmitida primariamente pela picada de uma fêmea de flebotomíneo infectada, outros modos de transmissão têm sido considerados (DANTAS-TORRES, 2006a, 2006b). Entre humanos, por exemplo, existe a possibilidade de transmissão por meio do compartilhamento de seringas infectadas entre usuários de drogas (DESJEUX; ALVAR, 2003; MOLINA; GRADONI; ALVAR, 2003), transplante de órgãos (BASSET *et al.*, 2005), transfusão sangüínea (MATHUR; SAMANTARAY, 2004), transmissão sexual (SYMMERS, 1960) e congênita (BOEHME *et al.*, 2006; ELTOUM *et al.*, 1992; MEINECKE *et al.*, 1999; PAGLIANO *et al.*, 2005).

Entre cães, está demonstrada a transmissão por meio de transfusão sangüínea (FREITAS *et al.*, 2006; OWENS *et al.*, 2001). A transmissão transplacentária havia sido estudada sem sucesso por Andrade *et al.* (2002). Porém, estudos recentes demonstraram que essa via é possível, embora pouco freqüente (ROSYPAL *et al.*, 2005; ROSYPAL; LINDSAY, 2005). Além disso, tem sido aventada a possibilidade de transmissão através de outros artrópodes, como pulgas e carrapatos (DANTAS-TORRES, 2006a, 2006b; LINARDI; NAGEM, 1973).

Carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) já foram encontrados naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* s.l., inclusive no Brasil (DANTAS-TORRES, 2006e). Além disso, sob condições experimentais, esses carrapatos são capazes de transmitir o parasito para roedores (BLANC; CAMINOPETROS, 1930; COUTINHO *et al.*, 2005). O *Rhipicephalus sanguineus*, popularmente conhecido como “carrapato vermelho do cão”, é um ectoparasito comum entre cães, que pode eventualmente parasitar o homem. Embora seja um vetor comprovado de diversos patógenos (DANTAS-TORRES *et al.*, 2004; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006), novos estudos são necessários para determinar o verdadeiro papel desse carrapato na epidemiologia da leishmaniose canina (DANTAS-TORRES, 2006a, 2006b).

Quando da elaboração das estratégias para o controle da leishmaniose canina, outras formas de transmissão também precisam ser consideradas (DANTAS-TORRES, 2006a), particularmente naquelas áreas onde casos da doença têm sido descritos, sem que a presença do vetor primário tenha sido confirmada (DANTAS-TORRES *et al.*, 2005; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2005a).

1.5 Fatores de risco

As leishmanioses, de modo geral, apresentam uma forte relação com a pobreza. Condições de moradia precárias, falta de saneamento básico e ambiental, além da proximidade com criações de animais de produção, aumentam o risco de exposição aos flebotomíneos vetores e, conseqüentemente, o risco de adquirir a infecção. Além disso, alguns fatores, como a má nutrição e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), podem aumentar o risco de adoecimento e a severidade da doença (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

Na década de 90, devido a fatores ambientais e socioeconômicos, muitas famílias da região Nordeste do Brasil abandonaram suas casas no interior e migraram para a periferia de grandes cidades, tais como Fortaleza, Natal, João Pessoa e São Luis (DESJEUX, 2001). Nessa época houve um notável incremento no número de casos de LV no Brasil, mormente em estados da região Nordeste

(ARIAS; MONTEIRO; ZICKER, 1996; DESJEUX, 2001; JERÔNIMO *et al.*, 1994). Os movimentos populacionais favorecem a introdução de indivíduos susceptíveis em áreas endêmica e, por conseguinte, o surgimento de novos casos da doença.

Em alguns focos, a presença de cães dentro ou nas proximidades das casas pode estar associada à infecção humana (CUNHA *et al.*, 1995). A presença de outros reservatórios, como o gambá-de-orelha-preta (*Didelphis marsupialis*), no peridomicílio também tem sido apontada como um fator de risco (CABRERA, 1999). A presença de galinheiros no peridomicílio pode ser entendida como um fator de risco, pois, embora resistente à infecção, a galinha exerce uma forte atração sobre os flebotomíneos e sobre alguns reservatórios de *L. (L.) infantum* s.l. (DANTAS-TORRES; ALMEIDA; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Um estudo realizado recentemente numa área urbana do Estado de Minas Gerais, os principais fatores de risco para LV encontrados foram: as condições de moradia, presença de animais e probabilidade de contato com flebotomíneos (MORENO *et al.*, 2005). No referido estudo, o sexo e a idade não foram identificados como importantes fatores de risco (MORENO *et al.*, 2005).

Em Pernambuco, a doença está intimamente associada à pressão antrópica sobre o ambiente (DANTAS-TORRES, 2006f). No município de Petrolina, foi demonstrado que a organização do espaço urbano pode influenciar enormemente a expansão da doença (CESSE *et al.*, 2001). De fato, a maioria dos casos parece está associada à pressão do homem sobre o meio ambiente e ocupação desordenada do espaço físico (SILVA; VASCONCELOS, 2002).

Na Venezuela e Colômbia, os casos estão comumente associados à presença de flebotomíneos, cães, condições sanitárias inadequadas e má nutrição (AGUILAR *et al.*, 1998). É sabido que a má nutrição é um importante fator de risco tanto para o desenvolvimento como para o agravamento da LV (CERF *et al.*, 1987).

1.6 Distribuição geográfica

Atualmente, a LV é considerada endêmica em pelo menos 65 países (DESJEUX, 2004). Apesar de sua ampla distribuição, aproximadamente 90% dos casos estão concentrados nas áreas mais pobres de cinco países: Índia, Sudão,

Brasil, Bangladesh e Nepal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). O Brasil é responsável por aproximadamente 90% dos casos registrados na América Latina. Nesse país, a doença é considerada endêmica em 19 estados, sendo que a maior parte dos casos está concentrada na região Nordeste (BRASIL, 2004).

Nos últimos 20 anos, o Brasil testemunhou uma acentuada expansão geográfica da área de ocorrência da LV, previamente conhecida como uma típica endemia rural (ARIAS; MONTEIRO; ZICKER, 1996). Atualmente, a doença encontra-se estabelecida na periferia de cidades de médio e grande porte de vários estados, tais como Pernambuco, Piauí, Minas Gerais, Ceará e Araçatuba (ARIAS; MONTEIRO; ZICKER, 1996; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2005b, 2006a; GENARO *et al.*, 1990). Entre 1990 e 2001, registrou-se uma expressiva expansão geográfica da LV em Pernambuco (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a). Atualmente, a doença encontra-se presente em quase todo o Estado (Figura 1).

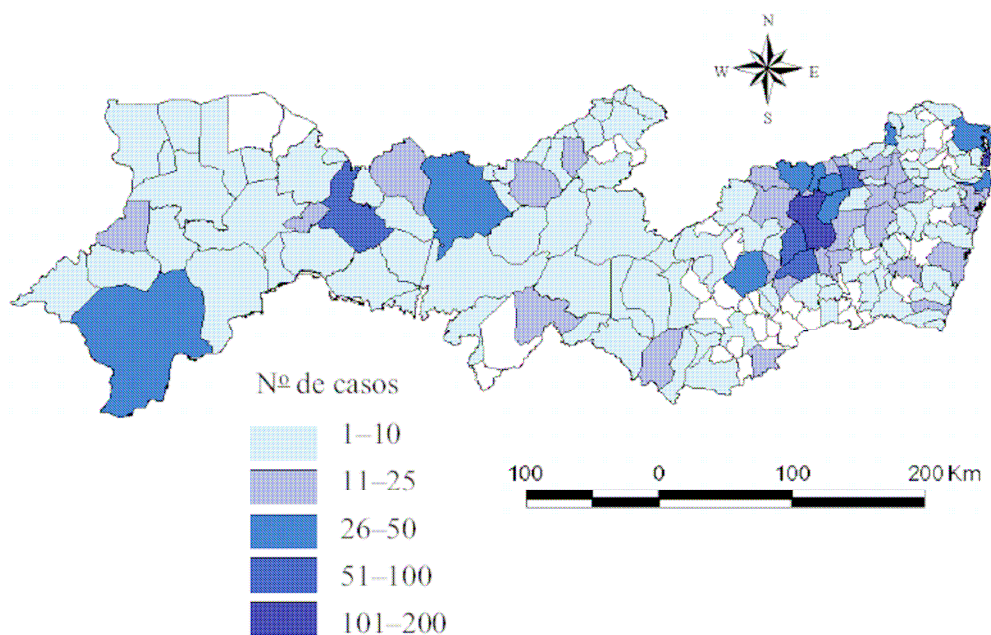


Figura 1. Distribuição dos casos de LV notificados em Pernambuco, 1990–2001.

1.7 Incidência e letalidade

Estima-se que 500.000 casos novos de LV são registrados anualmente, naqueles países onde a doença ocorre de forma endêmica (DESJEUX, 2004). O

Brasil tem notificado anualmente uma média de 3.500 casos (BRASIL, 2004), salientando-se que houve uma considerável redução do número de casos registrados entre 2000 e 2003 (DANTAS-TORRES, 2005a). Nesse período, apesar da redução das notificações (Figura 2), houve um incremento significativo na taxa de letalidade da doença no Brasil (Figura 3), que em geral situa-se por volta de 10% (BRASIL, 2004; DANTAS-TORRES, 2005a). Se não tratada adequadamente, em tempo hábil, a LV é quase sempre fatal (DUJARDIN, 2006).

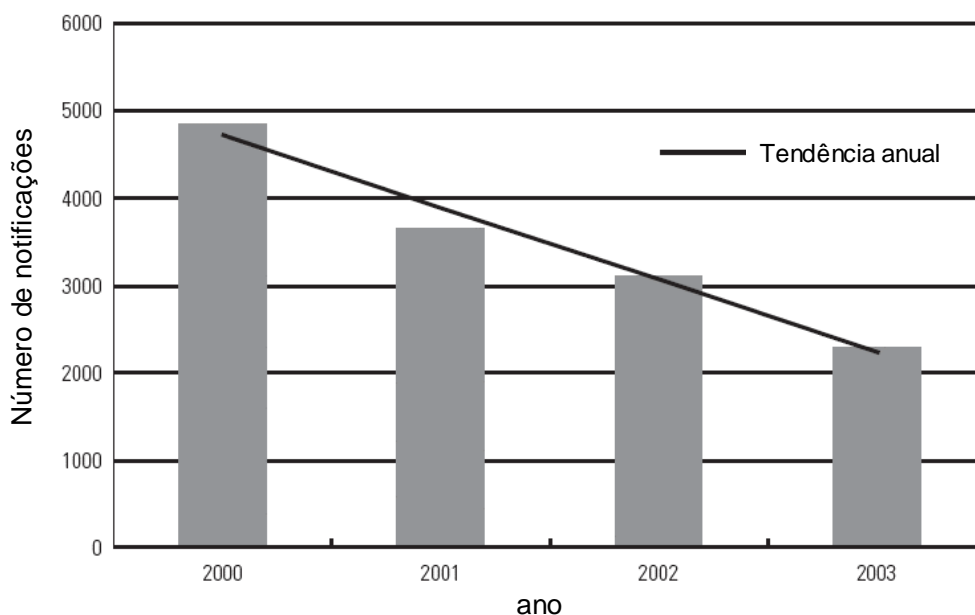


Figura 2. Casos de LV notificados no Brasil, 2000–2003 (DANTAS-TORRES, 2005a)

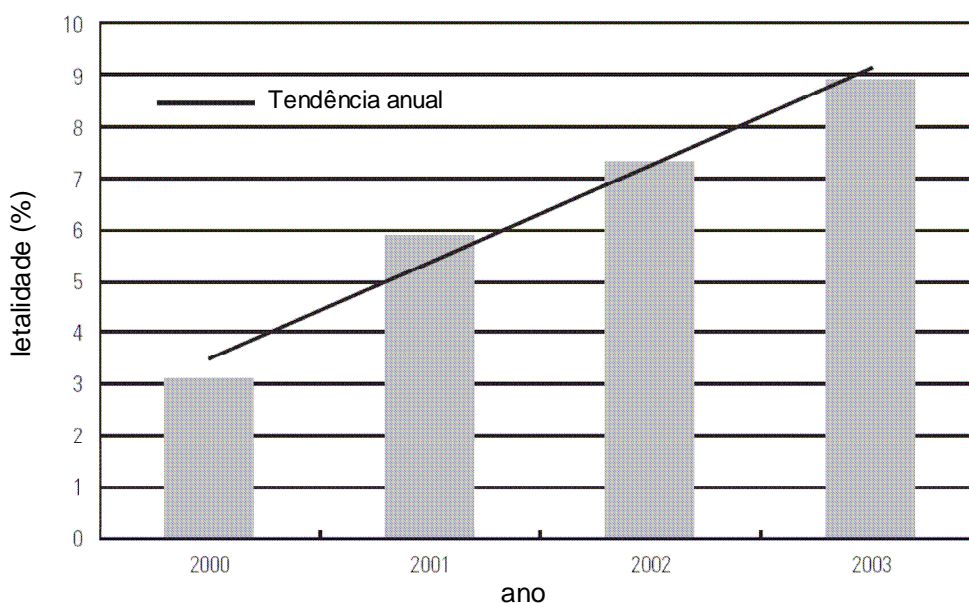


Figura 3. Letalidade da LV no Brasil, 2000–2003 (DANTAS-TORRES, 2005a)

1.8 Aspectos clínicos

Os sinais clínicos observados na LV, tanto em humanos como em cães, são comumente observados em outras enfermidades, o que torna o diagnóstico clínico difícil, particularmente na fase inicial da doença. A doença pode manifestar-se em diferentes formas clínicas que vão desde formas mais brandas (oligossintomáticas) até quadros mais graves (polissintomáticas) potencialmente fatais. Em humanos, a LV deve ser suspeitada quando o paciente apresentar febre e esplenomegalia associada ou não a hepatomegalia (BRASIL, 2004).

Nos cães a doença apresenta um amplo espectro de formas clínicas (BLAVIER *et al.*, 2001; CIARAMELLA *et al.*, 1997; DANTAS-TORRES, 2006e; FEITOSA *et al.*, 2000; KOUTINAS *et al.*, 1999) e deve ser investigada quando estiverem presentes alguns dos seguintes sinais clínicos: conjuntivite, alopecia, úlcera cutânea, perda de peso, esplenomegalia, linfadenomegalia e onicogribose.

1.9 Diagnóstico

O diagnóstico da LV tem sido usualmente obtido com base nos achados clínicos e epidemiológicos (GONTIJO; MELO, 2004). Porém, a demonstração do parasito – ou de vestígios desse – se faz necessária, principalmente porque os sinais clínicos na LV são iguais ou semelhantes àqueles observados em outras enfermidades ou condições de saúde como, por exemplo, malária, esquistossomose, tripanossomíase africana, febre tifóide e má nutrição (SINGH; SIVAKUMAR, 2003). Por essa razão, os exames laboratoriais assumem um papel importante no auxílio diagnóstico da LV.

Didaticamente, o diagnóstico laboratorial pode ser separado em três grupos distintos: 1) diagnóstico parasitológico, 2) diagnóstico imunológico e 3) diagnóstico molecular.

1.9.1 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico é dado pela demonstração de formas amastigotas do parasito, confirmando definitivamente a infecção. A pesquisa pode ser feita em material de medula óssea, pele, baço, linfonodo e fígado (ARTAN *et al.*, 2006; GONTIJO; MELO, 2004; SILVA *et al.*, 2005). Esse material pode ser usado na confecção de esfregaços ou *imprints* em lâminas, exame histopatológico, inoculação em meio de cultura ou em animais de laboratório (GONTIJO; MELO, 2004).

Embora a biópsia esplênica seja bastante sensível no diagnóstico da infecção, existe o risco de hemorragias graves, podendo inclusive, levar o paciente ao óbito devido a choque hipovolêmico (SILVA; STEWART; COSTA, 2005). Por isso, a biópsia medular tem sido o exame parasitológico de escolha em humanos (BRASIL, 2004). Em cães, particularmente naqueles doentes (ALVAR *et al.*, 2004), formas amastigotas de *L. (L.) infantum* s.l. podem ser facilmente encontradas em esfregaços de aspirado de medula óssea.

As principais vantagens dos exames parasitológicos são: baixo custo, praticidade e especificidade de 100%. A sensibilidade pode variar de acordo com o tipo de amostra examinada (baço, medula óssea, linfonodo ou pele) e com a experiência do examinador.

1.9.2 Diagnóstico imunológico

O diagnóstico imunológico baseia-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp. ou de antígenos do parasito. Em contraste com o que ocorre na leishmaniose tegumentar americana (LTA), o teste de hipersensibilidade tardia (DHT), ou intradermorreação de Montenegro, é sempre negativo durante o curso da doença, não sendo recomendado como teste diagnóstico para LV (BRASIL, 2004).

Dentre as diversas técnicas sorológicas que têm sido empregadas (CHAPPUIS *et al.*, 2006; GONTIJO; MELO, 2004; SILVA *et al.*, 2005; SUNDAR; RAI, 2002b), destacam-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio de

imunoadsorção enzimática (ELISA), sendo este mais específico e menos sensível que a RIFI (BRASIL, 2004).

Em geral, os antígenos utilizados nos testes diagnósticos são derivados de promastigotas de cultura, parasitos intactos ou moléculas solúveis (GONTIJO; MELO, 2004). Porém, é comum a ocorrência de reações cruzadas com outros membros da família Trypanosomatidae e até mesmo com microrganismos filogeneticamente distantes (SUNDAR; RAI, 2002b). Além disso, o potencial patogênico de *L. (L.) infantum* s.l. e as dificuldades enfrentadas em seu cultivo *in vitro* têm encorajado a busca de outras fontes de antígenos. Alguns antígenos recombinantes (p.ex., rk39) têm sido incorporados aos testes convencionais e os resultados são excelentes (BURNS *et al.*, 1993; CARVALHO *et al.*, 2003).

Mais recentemente, a utilização de *Crithidia luciliae* – um tripanosomatídeo não-patogênico – como fonte de antígeno para a detecção de anticorpos anti-*L. (L.) infantum infantum* provou ser uma alternativa bastante promissora (MARTINKOVIC; MARINCULIC, 2006). Isso reduziria os riscos inerentes à infecção acidental entre aqueles que manipulam as culturas de *L. (L.) infantum* s.l. (HERWALDT, 2001) e, certamente, o custo de produção de antígenos.

É preciso lembrar que os testes sorológicos apresentam algumas limitações (ALVES; BEVILACQUA, 2004; DANTAS-TORRES; BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006; GONTIJO; MELO, 2004; KOHANTEB; ARDEHALI, 2005) e que essas devem ser levadas em consideração quando da interpretação dos resultados obtidos a partir desses testes. Um resultado positivo, embora seja um forte indício de um contato prévio com o parasito, não confirma a infecção, nem a doença (DANTAS-TORRES, 2005b).

1.9.3 Diagnóstico molecular

Várias técnicas de biologia molecular têm sido desenvolvidas, particularmente a partir da década de 80 (SUNDAR; RAI, 2002b). A hibridização de DNA, por exemplo, apresenta uma alta sensibilidade (LOPEZ *et al.*, 1988). Porém, o processo de hibridização é um tanto complexo, o que limita o seu uso na rotina de diagnóstico (SUNDAR; RAI, 2002b).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) – e suas variantes – tem sido bastante estudada e atualmente é considerada a ferramenta mais promissora no diagnóstico molecular da LV (ADHYA *et al.*, 1995; ANDRESEN *et al.*, 1997; CORTES *et al.*, 2004; DEGRAVE *et al.*, 1994; FISSORE *et al.*, 2004; LE FICHOUX *et al.*, 1999; OSMAN *et al.*, 1997; OTERO *et al.*, 2000; PIARROUX *et al.*, 1994; RAVEL *et al.*, 1995; RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990; SILVA *et al.*, 2004; SPANAKOS *et al.*, 2002). Porém, os resultados da PCR podem variar muito de acordo com o tipo de amostra utilizada, metodologia usada na purificação do DNA e região-alvo escolhida para amplificação (BRASIL, 2004). Além disso, uma PCR positiva indica apenas a presença de um fragmento do DNA do parasito, não sendo capaz de confirmar se é uma infecção ativa.

Em cães, além da PCR convencional (ASHFORD *et al.*, 1995; BERRAHAL *et al.*, 1996; CAVALIERO *et al.*, 1999; IKONOMOPOULOS *et al.*, 2003; LACHAUD *et al.*, 2002; MATHIS; DEPLAZES, 1995; OZBEL *et al.*, 2000; REALE *et al.*, 1999; ROURA; SÁNCHEZ; FERRER, 1999; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004), a PCR em tempo real tem sido avaliada em pesquisas recentes e os resultados são promissores (FRANCINO *et al.*, 2006; MORTARINO *et al.*, 2004; PENNISI *et al.*, 2005).

O principal desafio em relação ao diagnóstico molecular não só da leishmaniose canina, mas das doenças parasitárias, de um modo geral, é traduzir os avanços obtidos nas pesquisas em ferramentas práticas e acessíveis.

1.10 Tratamento

Como já mencionado, a LV é potencialmente fatal se não tratada (DUJARDIN, 2006). Por isso, o tratamento dessa doença tem sido um assunto bastante pesquisado, sendo inclusive, objeto de revisões recentes (CROFT; COOMBS, 2003; MURRAY, 2004; SINGH; SIVAKUMAR, 2004; MARTY; ROSENTHAL, 2002; SUNDAR; RAI, 2002a), embora a indústria farmacêutica não tenha dispensado a devida prioridade, o que confere a LV a condição de doença negligenciada.

Desde que foram introduzidos, em 1945, os antimoniais têm sido utilizados como tratamento de primeira escolha no Brasil e na grande maioria dos países assolados pela doença (CROFT; COOMBS, 2003; GONTIJO; MELO, 2004; HERWALDT, 1999; KAFETZIS, 2003; MURRAY, 2004). Os principais antimoniais utilizados são: antimoniato de N-metil glucamina e estibogluconato de sódio. Além de tóxicas, essas drogas exigem esquemas de tratamentos prolongados – até 28 dias de administração parenteral (CROFT; COOMBS, 2003) – e nem sempre são efetivas (GONTIJO; MELO, 2004).

Outros fármacos alternativos têm sido utilizados. A anfotericina B, embora seja considerada a droga leishmanicida mais potente disponível atualmente, induz com frequência inúmeros efeitos colaterais. Novas formulações da anfotericina B, como a anfotericina B lipossomal, têm sido empregadas com sucesso (SUNDAR *et al.*, 2006). Porém, o alto custo dessas formulações tem sido um fator limitante. No Brasil, devido a seu alto custo, a anfotericina B lipossomal é recomendada apenas em casos especiais (BRASIL, 2004).

Na Índia e no Sudão, a resistência aos antimoniais tem se tornado um problema eminente (GONTIJO; MELO, 2004). Isso tem encorajado uma busca incessante por novas alternativas. Talvez o avanço mais importante tenha sido o uso do miltefosine para o tratamento da LV na Índia (SUDAR *et al.*, 2002). Esta droga, desenvolvida inicialmente como um agente anti-tumoral (CROFT; SEIFERT; DUCHENE, 2003), além de ser bastante efetiva e bem tolerada, é de uso oral. Contudo, é preciso registrar que o miltefosine pode causar efeitos teratogênicos (PRASAD *et al.*, 2004), o que impede sua utilização em gestantes.

Apesar dos esforços (ALVAR *et al.*, 2004; BANETH; SHAW, 2002; IKEDA-GARCIA *et al.*, 2006; NOLI; AUXILIA, 2005; OLIVA; FOGLIA-MANZILLO; PAGANO, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2005; SCHETTINI *et al.*, 2005; VEXENAT *et al.*, 1998), os resultados obtidos na grande maioria das tentativas de tratamento da leishmaniose canina não são dos melhores. Se por um lado inúmeros avanços foram alcançados no que concerne à recuperação clínica do animal, por outro, a taxa de cura parasitológica ainda tem sido muito baixa – aproximadamente 20% (ALVAR *et al.*, 2004).

As principais drogas utilizadas no tratamento da leishmaniose canina são os antimoniais pentavalentes, alopurinol, aminosidina e anfotericina B, usadas individualmente ou em combinação (IKEDA-GRACIA *et al.*, 2006). Todavia, é

importante lembrar que o Ministério da Saúde ainda recomenda a eutanásia dos cães soropositivos, sejam esses sintomáticos ou não (BRASIL, 2004). Além disso, o Glucantime[®] (Aventis Pharma) é um medicamento de uso exclusivo do Ministério da Saúde, que o distribui gratuitamente para o tratamento dos casos humanos de LV no Brasil. O uso do Glucantime[®] para o tratamento da leishmaniose canina está proibido, quando o mesmo for de distribuição exclusiva do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005).

1.11 Controle e prevenção

A LV é uma zoonose de difícil controle. Isso se deve a inúmeros fatores que vão além da biologia do parasito e da interação deste com seus hospedeiros vertebrados e invertebrados. Faremos aqui um breve comentário sobre as atuais medidas de controle que vêm sendo utilizadas no Brasil.

O programa de controle da LV se baseia em três medidas principais: 1) o diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, 2) inquérito sorológico e eliminação de cães soropositivos, e 3) aplicação de inseticida contra os flebotomíneos (BRASIL, 2004). Essas medidas de controle permanecem as mesmas desde a década de 50 (DEANE, 1956) e atualmente não estão sendo capazes de reduzir a incidência de casos humanos a níveis aceitáveis (COSTA; VIEIRA, 2001; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006b; DESJEUX, 1991). Ao contrário, o impacto da LV tem aumentado e a doença tem se tornado um grave problema de saúde pública na maioria dos Estados da Federação.

A eliminação de hospedeiros reservatórios, particularmente de cães soropositivos, tem sido largamente empregada no Brasil (LACERDA, 1994). Entretanto, além de ser eticamente e socialmente rejeitada (ALMEIDA *et al.*, 2005a), essa medida apresenta um baixo impacto sobre a incidência da LV em humanos (ASHFORD *et al.*, 1998; COURTENAY *et al.*, 2002; DIETZE *et al.*, 1997). Isso tem estimulado a busca de novas alternativas para o controle da doença. O uso de colares impregnados com inseticidas em cães reduz o risco de infecção entre os cães (DAVID *et al.*, 2001; REITHINGER *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2005) e,

indiretamente, para o homem, como claramente demonstrado no Iran (GAVGANI *et al.*, 2002).

Uma vacina (Leishmune[®]; Fort Dodge Saúde Animal) contra LV em cães foi recentemente registrada no Brasil (DANTAS-TORRES, 2006d). Estudos apontam que essa vacina induz níveis de proteção satisfatórios (BORJA-CABRERA *et al.*, 2002), sendo, inclusive, capaz de bloquear a transmissão entre cães (NOGUEIRA *et al.*, 2005; SARAIVA *et al.*, 2006). Para humanos, entretanto, apesar dos avanços nas pesquisas, atualmente não existe vacina comercialmente disponível (COLER; REED, 2005; SUKUMARAN; MADHUBALA, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

Informações sobre a epidemiologia da LV são fundamentais para elaboração de medidas de controle mais efetivas. Em Pernambuco, são escassas as informações sobre a epidemiologia da LV, particularmente em áreas urbanas. Paulista é o segundo município na lista daqueles que mais notificam casos de LV na região metropolitana de Recife. O conhecimento dos aspectos envolvidos na epidemiologia da LV em Paulista subsidiará a definição de estratégias para o controle desta zoonose e ampliará o conhecimento atual sobre a epidemiologia da LV em áreas urbanas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Estudar a epidemiologia da LV no município de Paulista, região metropolitana de Recife, Pernambuco.

3.2 Específicos

- Identificar o perfil dos pacientes humanos acometidos pela LV, em relação ao tempo, espaço e pessoa (sexo e idade);
- Verificar a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em cães (semi)domiciliados de diferentes bairros;
- Verificar a existência de possíveis fatores de risco associados à positividade para anticorpos anti-*Leishmania* spp. em cães (semi)domiciliados;
- Identificar as espécies de flebotomíneos presentes nas áreas de ocorrência de casos de LV;
- Estudar o comportamento da fauna de flebotomíneos;
- Verificar a infecção natural por *Leishmania* spp. em flebotomíneos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Conduziu-se o presente estudo epidemiológico no município de Paulista (latitude 07°56'27" Sul, longitude 34°52'23" Oeste), localizado no litoral Norte do Estado de Pernambuco (Figura 4), onde casos humanos de LV têm sido esporadicamente descritos (DANTAS-TORRES; DUARTE; BRANDÃO-FILHO, 2004). Paulista é um dos 14 municípios que constituem a Região Metropolitana de Recife – a área mais urbanizada do Estado – e possui um território total de aproximadamente 94 km².

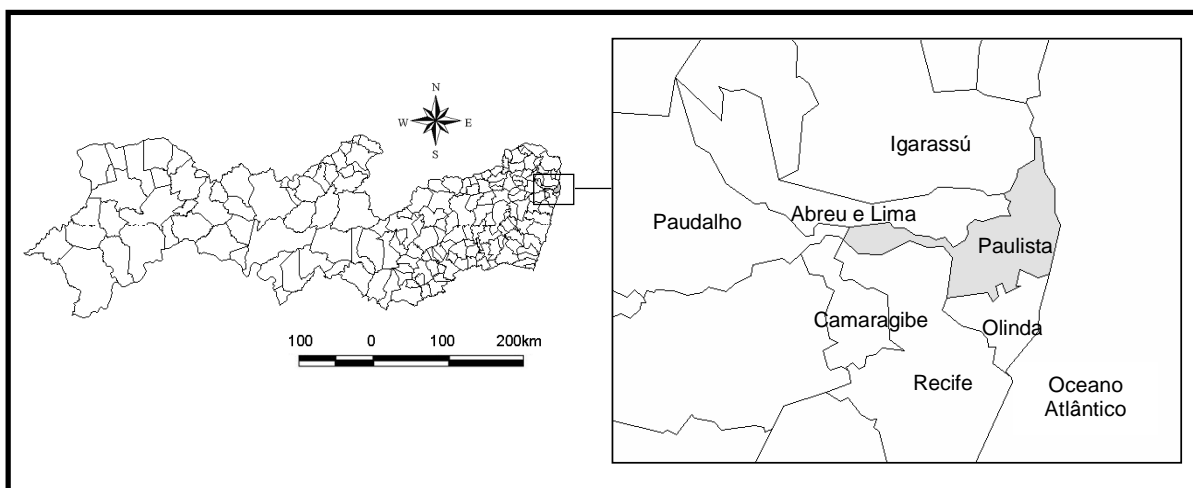


Figura 4. Localização do município de Paulista no litoral Norte do Estado de Pernambuco.

Em julho de 2005, a população de Paulista foi estimada em 294.030 habitantes (IBGE, 2005). O clima do município é tropical úmido com chuvas concentradas nos meses de fevereiro a junho. A temperatura média anual varia de 24 a 26°C. A umidade relativa do ar varia de 72,5 a 85% e o índice pluviométrico anual, em geral, excede a 1.600 mm.

Embora a cobertura vegetal seja escassa, existem algumas áreas residuais de Mata Atlântica (Figura 5), além de muitas árvores frutíferas, particularmente bananeiras. Apesar de ser considerado 100% urbano, o município de Paulista mantém algumas características tipicamente rurais, como, por exemplo, a criação de animais de produção.

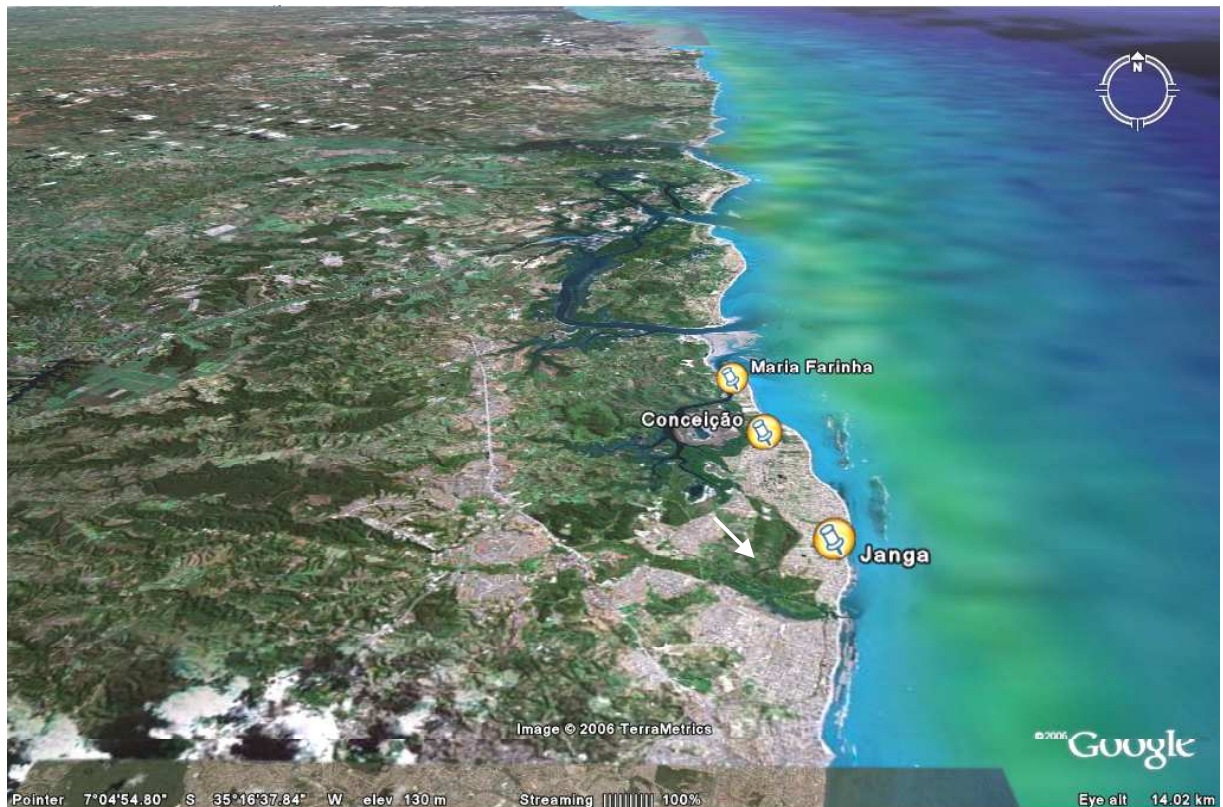


Figura 5. Imagem de satélite da reserva Parque do Janga (seta), localizado no Janga, um dos bairros que compõem a faixa litorânea do município de Paulista.

4.2 Estudo retrospectivo sobre os casos humanos notificados

A partir dos dados fornecidos pela Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, realizou-se um estudo retrospectivo dos casos humanos de LV notificados em Paulista, entre 1995 a 2006, a fim de identificar a procedência (localidade ou bairro), além do sexo e a idade de cada um dos pacientes acometidos pela doença.

4.3 Coleta de flebotomíneos

Coletaram-se flebotomíneos, toda primeira semana de cada mês, de outubro de 2005 a janeiro de 2006. Antes do início das coletas, selecionaram-se

cinco casas com base no seguinte critério: sua proximidade com áreas residuais de Mata Atlântica, presença de cães e/ou animais de produção nos quintais e sua proximidade com casas onde foram descritos casos humanos de LV.

Instalaram-se armadilhas luminosas do tipo CDC a uma altura de um metro acima do solo, dentro e fora das casas, as quais operaram das 18:00 às 6:00 horas. Adicionalmente, realizaram-se capturas manuais com auxílio de capturadores de Castro. Nesse caso, gastaram-se de 15 a 20 minutos dentro e fora de cada casa, das 18:00 às 20:00 horas. Todos os espécimes coletados mantiveram-se em tubos de vidro contendo álcool a 70% até que estes fossem processados para identificação das espécies, de acordo com chaves taxonômicas de Young e Duncan (1994).

4.4 Dissecção de flebotomíneos para pesquisa de *Leishmania* sp.

Dissecaram-se algumas fêmeas de flebotomíneos de acordo com metodologia previamente descrita (LAINSON, 1997), com mínimas modificações. De forma breve, cada fêmea foi dissecada numa pequena gota de solução salina estéril, tratada com antibiótico (200 UI de penicilina e 2,0 mg/ml de estreptomicina). Depois de separado, o tubo digestivo era examinado entre lâmina e lamínula sob microscopia óptica, aumento de 400x, para verificar a presença de formas flageladas de *Leishmania* spp. Preservaram-se a cabeça e os últimos três segmentos do abdômen das fêmeas dissecadas para posterior identificação da espécie.

4.5 Inquérito sorológico

4.5.1 Tamanho da amostra

Selecionaram-se randomicamente 322 cães (semi)domiciliados (ambos os sexos, de raças e idades variadas) para realização de um estudo sorológico quanto à presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. Calculou-se o tamanho mínimo

necessário da amostra (n=297) com base na população canina (infinita), soroprevalência esperada [3,2%; a mais alta soroprevalência canina já relatada em Paulista (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2005c)], grau de confiança de 95% e precisão de 2%.

4.5.2 Coleta de sangue

Coletaram-se alíquotas de 3–5 ml de sangue total de cada um dos cães, por punção venosa (veia cefálica, femural ou jugular). Acondicionaram-se as amostras em tubos VACUETTE[®] EDTA K3 (Greiner Bio-One), sob refrigeração. Após a coleta da amostra de sangue, usou-se uma ficha de registro para coleta de informações sobre os cães (nome, sexo e idade) e seus proprietários (nome, endereço e telefone).

No laboratório, centrifugaram-se as amostras a 3.000 rotações por minuto, durante cinco minutos, congelando-se os plasmas obtidos a –20°C até que estes fossem testados para presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp.

4.5.3 Exame clínico dos cães

Após a coleta de sangue, avaliou-se o *status* clínico de cada um dos cães, considerando-se sintomáticos aqueles que apresentavam um ou mais sinais clínicos sugestivos de LV, tais como alopecia, úlcera cutânea, linfadenomegalia, onicogribose, conjuntivite e perda de peso.

4.5.4 Testes sorológicos

Utilizou-se o *kit* IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos[®], produzido por Bio-Manguinhos, que se baseia na técnica de RIFI. É importante notar

que esse *kit* utiliza antígenos *Leishmania major-like*. De acordo com o fabricante, a sensibilidade e especificidade do teste situam-se em torno de 90 e 80%, respectivamente. Todos os procedimentos seguiram estritamente as instruções do fabricante.

Consideraram-se positivas amostras com fluorescência na diluição de 1:80, seguindo as recomendações recentes do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004).

4.6 Diagnóstico molecular

Selecionaram-se aleatoriamente 68 das 322 amostras de sangue total de cães de Paulista na tentativa de detectar a presença de fragmentos do DNA de *L. (L.) infantum* s.l. por meio da técnica de PCR. A extração do DNA procedeu-se com auxílio do GenomicPrep™ Blood DNA Isolation Kit (Amersham Biosciences), seguindo estritamente as recomendações do fabricante. As reações realizaram-se sob condições previamente descritas (LE FICHOUX *et al.*, 1999), com pequenas modificações. Após um período inicial de desnaturação de cinco minutos a 94°C, realizaram-se 35 ciclos (desnaturação, 30 segundos a 94°C; anelamento, um minuto a 67°C; síntese, 30 segundos a 72°C), com uma síntese terminal de cinco minutos a 72°C. Com padrão de peso molecular, utilizou-se DNA do fago lambda digerido com Hind III (New England BioLabs). A PCR foi realizada no Px2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation).

Utilizaram-se os *primers* RV1 (senso; 5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3') e RV2 (anti-senso; 5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'), cujo alvo é uma região conservada do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *L. (L.) infantum*. Esses oligonucleotídeos iniciadores produzem um fragmento de aproximadamente 145 pares de base (pb) (LACHAUD *et al.*, 2002; LE FICHOUX *et al.*, 1999; RAVEL *et al.*, 1995). Como controle positivo forte e controle positivo fraco, utilizaram-se 1 ng e 1 pg de DNA de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP75), respectivamente. Como controle negativo, utilizou-se solução salina estéril.

4.7 Análise estatística

Utilizou-se o teste qui-quadrado (χ^2) para comparar as taxas de soroprevalência em relação ao sexo, idade, *status* clínico e bairro de origem. Consideraram-se as estatisticamente significativas associações com p-valor $\leq 0,05$. Calcularam-se os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para cada uma das taxas de soroprevalência. Realizou-se a análise estatística com auxílio do programa Epi Info, versão 6.04d.

4.8 Questões éticas

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), apreciou o projeto referente ao presente estudo, considerando-o aprovado e licenciado (CEUA P.0299-06) (Anexo 1).

5 RESULTADOS

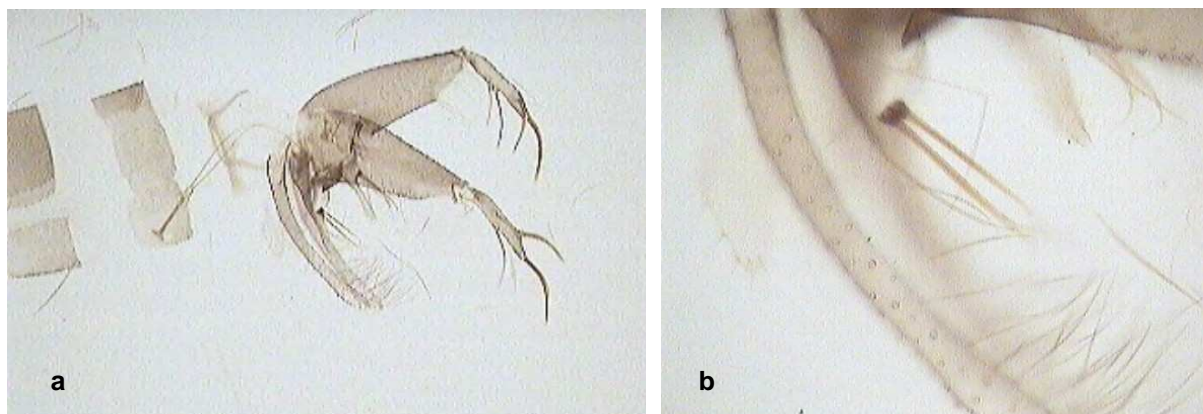
Entre 1990 e 2006, o município de Paulista notificou 32 casos de LV. Contudo, obtiveram-se apenas as fichas dos casos notificados de 1995 a 2006 (Tabela 1). Em relação ao sexo e idade, 86,6% (13/15) dos pacientes eram indivíduos do sexo masculino e 80,0% eram crianças menores de 10 anos (12/15). A idade dos pacientes variou de 10 meses a 20 anos (média = 6,4 anos, desvio padrão = 6,7 anos). A maioria das notificações originou-se do bairro de Pau Amarelo. Todos os 15 casos tiveram um desfecho favorável (cura).

Tabela 1 – Casos de LV notificados no município de Paulista, no período de 1995 a 2006.

Caso	Sexo	Idade	Bairro de residência	Ano de notificação
1	M	7 anos	Muribeca	1995
2	M	1 ano	Centro	1996
3	M	17 anos	Janga	1996
4	F	2 anos	Pau Amarelo	1999
5	M	3 anos	Pau Amarelo	1999
6	M	1 ano	Janga	1999
7	M	11 meses	Pau Amarelo	2000
8	M	4 anos	Centro	2000
9	M	10 meses	Pau Amarelo	2000
10	M	4 anos	Pau Amarelo	2000
11	F	7 anos	Pau Amarelo	2001
12	M	4 anos	Torres Galvão	2001
13	M	5 anos	Nossa Senhora do Ó	2001
14	M	19 anos	Pau Amarelo	2002
15	M	20 anos	Pau Amarelo	2002

M = masculino; F = feminino.

No que se refere ao estudo da fauna de flebotomíneos, identificaram-se apenas exemplares da espécie *Lutzomyia longipalpis* (Figura 6), a qual estava presente em todas as casas investigadas. Os espécimes machos (n=82) predominaram em relação às fêmeas (n=4). Coletaram-se flebotomíneos apenas no entorno das casas estudadas, o que indica algum grau de exofilia, exofagia ou ambos. Nas coletas manuais, capturou-se a maioria dos exemplares sobre cavalos e na parede de galinheiros. A presença de animais de produção nos quintais das casas estudadas é freqüente. Registra-se que esses animais, principalmente porcos e galinhas, são abrigados em locais com notória falta de condições sanitárias.



Figuras 6a e 6b. Genitália externa de um macho de *Lutzomyia longipalpis*. Note a presença de duas setas características na face dorsal do parâmero.

De acordo com as observações de campo, os cavalos estavam entre as fontes de alimentação preferidas de *Lutzomyia longipalpis*. Da mesma forma, galinhas chocas pareciam altamente atrativas para os flebotomíneos. Observou-se que as casas apresentavam um solo rico em matéria orgânica, como lixo e fezes de animais (bovinos, eqüinos, galináceos e suínos). Ademais, notou-se um solo com pouca capacidade de drenagem da água das chuvas, o que favorece a retenção de umidade durante todo o ano.

Nenhum dos exemplares (n=3) de *Lutzomyia longipalpis* dissecados apresentou formas flageladas de *Leishmania* sp.

A grande maioria dos cães incluídos no presente estudo não possuía raça definida, embora não tenham sido coletados dados em relação à raça dos animais. A idade dos cães variou de dois meses a 15 anos (média = 3,3 anos, desvio padrão = 2,8 anos). Cento e oitenta e quatro cães pertenciam ao sexo masculino (57,1%) e 138 eram fêmeas.

Das 322 amostras analisadas pela RIFI, 130 testaram-se positivas para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp., o que corresponde a uma soroprevalência de 40,3%.

Observou-se uma soroprevalência mais alta entre cães jovens (≤ 1 ano) de que entre cães adultos (> 1 ano) ($\chi^2 = 4,24$; p-valor = 0,039). Da mesma forma, detectou-se uma soroprevalência mais alta entre cães machos ($\chi^2 = 20,60$; p-valor = 0,000), especialmente entre aqueles do bairro do Janga ($\chi^2 = 34,45$; p-valor = 0,000). É interessante notar, em relação ao distrito de origem, que a taxa de

soroprevalência encontrada em Pau Amarelo diferiu estatisticamente daquela do Janga ($\chi^2 = 5,48$; p-valor = 0,019), mas não daquela encontrada em Nossa Senhora da Conceição ($\chi^2 = 2,068$; p-valor = 0,150). Não houve diferença significativa entre as taxas de soroprevalências encontradas no Janga e em Nossa Senhora da Conceição ($\chi^2 = 0,201$; p-valor = 0,654).

A maioria dos cães avaliados não apresentava sinal clínico de LV; isto é, apenas 37 (11,5%) dos cães eram sintomáticos. Em relação aos sinais clínicos, observaram-se: perda de peso, dermatite, alopecia, úlceras cutâneas, conjuntivite e onicogribose. Dos 130 cães soropositivos, 111 (85,4%) eram assintomáticos. Não houve diferença significativa entre as taxas de soroprevalências observadas em cães assintomáticos e sintomáticos ($\chi^2 = 2,09$; p-valor = 0,147).

As taxas de soroprevalências em relação aos dados epidemiológicos dos animais incluídos no presente estudo são apresentadas na Tabela 2. Os mesmos dados, porém, estratificados por bairro de origem (apenas os mais representativos) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 2 – Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. entre cães de Paulista em relação aos dados epidemiológicos.

Variáveis	n	RIFI positivos	Taxa de soroprevalência ^a	p-valor
Idade				
≤ 1 ano	82	41	50 (38,7–61,2)	0,039
> 1 ano	240	89	37 (30,9–43,5)	
Sexo				
Macho	184	95	51,6 (44,1–59)	0,000
Fêmea	138	35	25,3 (18,3–33,4)	
Status clínico				
Sintomático	37	19	51,3 (34,3–68)	0,147
Assintomático	285	111	38,9 (33,2–44,8)	
Total	322	130	40,3 (34,9–45,9)	

^a IC 95% entre parênteses.

Tabela 3 – Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. entre cães de Paulista em relação aos dados epidemiológicos, por bairro de origem^a.

Variáveis	Janga			Pau Amarelo			Nossa Senhora da Conceição		
	n	RIFI positivo	Taxa de soroprevalência ^b	n	RIFI positivo	Taxa de soroprevalência ^b	n	RIFI positivo	Taxa de soroprevalência ^b
Idade									
≤ 1 ano	41	17	41,4 (26,3–57,8)	26	17	65,3 (44,3–82,7)	15	6	40 (16,3–67,7)
> 1 ano	127	43	33,8 (25,7–42,7)	56	25	44,6 (31,3–58,5)	44	17	38,6 (24,3–54,5)
Sexo									
Macho	92	51	55,4 (44,7–65,8)	48	25	52 (37,1–66,7)	35	15	42,8 (26,3–60,6)
Fêmea	76	9	11,8 (5,5–21,2)	34	17	50 (32,4–67,5)	24	8	33,3 (15,6–55,3)
Status clínico									
Sintomático	22	9	40,9 (20,7–63,6)	9	6	66,6 (29,9–92,5)	6	4	66,6 (22,2–95,6)
Assintomático	146	51	34,9 (27,2–43,2)	73	36	49,3 (37,4–61,2)	53	19	35,8 (23,1–50,2)
Total	168	60	35,7 (28,4–43,4)	82	42	51,2 (39,9–62,4)	59	23	38,9 (26,5–52,5)

^a Apenas os mais representativos. Outros bairros (não incluídos) representam juntos cerca de 4% do total de amostras.

^b IC 95% entre parênteses.

Todas as 68 amostras analisadas pela técnica de PCR em sangue total testaram-se negativas (Figura 7).

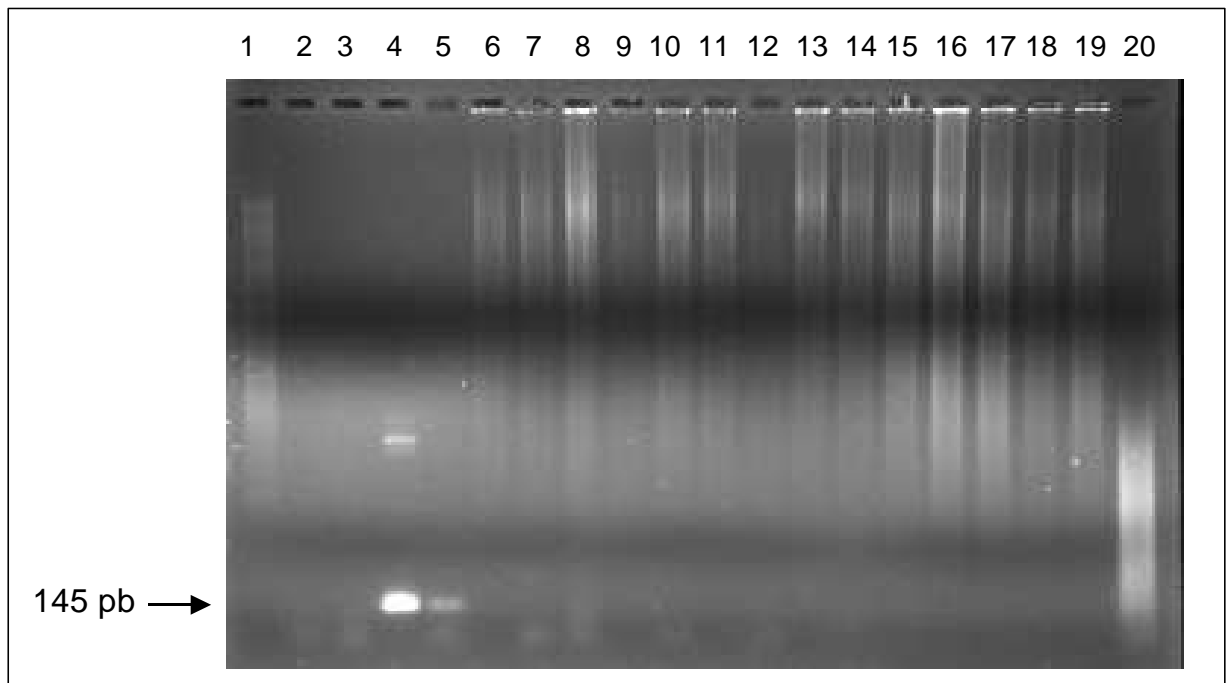


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando resultados da PCR em amostra de sangue total de cães de Paulista. Faixa 1, peso molecular; faixa 2, controle negativo da extração; faixa 3, controle negativo da PCR; faixa 4, controle positivo forte; faixa 5, controle positivo fraco; faixas 6–20, amostras.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos 16 anos (1990–2006), o município de Paulista notificou uma média de 2 casos/ano. Tomando-se como base os últimos 10 anos, o Estado de Pernambuco tem notificado em média pouco mais de 170 casos de LV por ano (BRASIL, 2006). A maioria dos pacientes reside em áreas rurais (DANTAS-TORRES, 2006f). Todavia, a LV encontra-se amplamente distribuída em Pernambuco, ocorrendo inclusive em áreas altamente urbanizadas (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a).

Nos últimos anos ocorreu uma expressiva expansão geográfica da LV em Pernambuco (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a), inclusive com o registro de surtos epidêmicos em alguns municípios como Petrolina e Caruaru (CESSE *et al.*, 2001). Dentre os fatores que podem ter contribuído para a disseminação da doença no Estado, podemos destacar o intenso fluxo migratório intermunicipal, sobretudo do interior do estado para a Região Metropolitana de Recife, mas também no sentido inverso. Isso favorece a introdução de indivíduos susceptíveis em áreas endêmicas (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a). Em alguns municípios de Pernambuco, a LV encontra-se claramente associada à pressão do homem sobre o meio ambiente (CESSE *et al.*, 2001).

O perfil de caso encontrado em Paulista também é semelhante aquele observado em outros municípios de Pernambuco (SILVA; VASCONCELOS, 2003; DANTAS-TORRES, 2006) e em outros focos da doença no Brasil (BRASIL, 2004; COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990; PASTORINO *et al.*, 2002; QUEIROZ; ALVES; CORREIA, 2004). Crianças, particularmente as menores de cinco anos, são freqüentemente afetadas pela LV no Brasil. Observa-se também predomínio de casos entre homens, embora não se saiba se decorrente da maior susceptibilidade do sexo masculino, ou mera questão de maior exposição.

É interessante notar que a maioria dos pacientes acometidos pela LV em Paulista residia em Pau Amarelo, exatamente o bairro onde foi encontrada a maior soropositividade para anticorpos anti-*Leishmania* sp. em cães. Isso reforça os resultados obtidos no inquérito sorológico e indica que a força de transmissão é, possivelmente, maior em Pau Amarelo de que em outros bairros. As razões para isso devem ser investigadas em futuros estudos.

Quando comparados aos dados de investigações sorológicas conduzidas pelas autoridades de saúde pública local, nas quais a mais alta soroprevalência encontrada foi 3,2% (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2005c), os resultados

obtidos a partir do presente estudo indicam que a prevalência da infecção por *Leishmania* sp. em cães de Paulista havia sido subestimada. Adicionalmente, a soroprevalência encontrada no município em questão é a mais alta relatada entre cães (semi)domiciliados de Pernambuco, onde a taxa de soroprevalência média é de 2,5% (ALEXANDRINO, 2001), variando de 0,32% (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2000) a 35,9% (FRANÇA *et al.*, 2003).

No Brasil, a soroprevalência pode variar bastante (COUTINHO *et al.*, 1985; FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003; IVERSON *et al.*, 1983), podendo ser tão alta quanto 67% em *clusters* altamente endêmicos (PARANHOS-SILVA *et al.*, 1996). É importante notar que o ponto de corte adotado nos estudos sorológicos mencionados acima (isto é, 1:40) difere do adotado no presente estudo. De fato, a real prevalência da infecção entre os cães investigados pode ser subestimada quando se utiliza um ponto de corte superior a 1:40. Por outro lado, essa medida aumenta a especificidade do teste, reduzindo as chances de eliminação de cães falso-positivos (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Estudos prévios não revelaram o sexo como um importante fator de risco para leishmaniose visceral canina (ABRANCHES *et al.*, 1991; ALENCAR; CUNHA, 1963; AMELA *et al.*, 1995; AMUSATEGUI *et al.*, 2003; FISA *et al.*, 1999; FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003; POZIO *et al.*, 1981; SIDERIS *et al.*, 1996), embora os resultados não estejam sempre em acordo. Na França (LANOTTE *et al.*, 1975) e na Espanha (MIRANDA *et al.*, 2005), por exemplo, soroprevalências mais altas têm sido encontradas entre cães machos. Em relação à idade, existe um consenso que a leishmaniose visceral canina apresenta uma distribuição bi-modal, com um pico no número de casos em cães com menos de três anos de idade e um outro entre as idades de oito e 10 anos (ACEDO-SANCHEZ *et al.*, 1996; AMELA *et al.*, 1995; MIRANDA *et al.*, 2005).

Uma associação significativa foi encontrada entre a positividade no teste sorológico e a idade (≤ 1 ano) e entre a positividade e o gênero (cães machos). Contudo, a hipótese que idade e gênero poderiam ser importantes fatores de risco para positividade sorológica – e até mesmo para o desfecho da doença – na área de estudo deve ser investigada em futuros estudos de caso-controle ou coorte.

Na presente investigação, não houve nenhuma análise em relação a soroprevalência em cães de diferentes raças. Embora todas as raças sejam teoricamente susceptíveis a infecção por *L. (L.) infantum* s.l., um estudo recente

demonstrou que cães da raça Ibizan hound, também conhecida como *Podenco Ibicenco* (em espanhol) ou *Ca Eivissenc* (em catalão), são mais resistentes que os de outras raças (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2000). Em contraste, certas raças (p.ex., boxer) são aparentemente mais susceptíveis a infecção por *L. (L.) infantum chagasi* (FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003). A resistência natural parece estar ligada a fatores genéticos do cão (SANCHEZ-ROBERT *et al.*, 2005), embora outros fatores, como o estado nutricional do animal, possam influenciar no desenrolar da infecção; isto é, se o animal vai adoecer, permanecer portador assintomático ou curar-se espontaneamente (ALVAR *et al.*, 2004; MORENO; ALVAR, 2002).

Os sinais clínicos observados nos cães soropositivos analisados no presente estudo estão entre aqueles comumente registrados em cães no Nordeste do Brasil, naturalmente infectados por *L. (L.) infantum chagasi* (ALMEIDA *et al.*, 2005b). Como documentado em outros estudos soroepidemiológicos (ABRANCHES *et al.*, 1991; BRANDONISIO *et al.*, 1992; MANCIANTI *et al.*, 1986; PORTÚS *et al.*, 1987), uma alta proporção de cães soropositivos não apresenta sinais clínicos de LV. Esse fato reveste-se de importância, haja vista que os cães assintomáticos são apontados como os principais hospedeiros reservatórios de *L. (L.) infantum* s.l. (ALVAR *et al.*, 2004).

Testes sorológicos são ferramentas úteis para identificação de cães portadores assintomáticos, porém os resultados obtidos a partir destes testes devem ser cuidadosamente interpretados. A RIFI é um teste de interpretação relativamente subjetiva, de difícil padronização, além de muito laboriosa para testar um grande número de amostras (ROSATI *et al.*, 2003). Apesar das suas conhecidas limitações (ALVAR *et al.*, 2004; ALVES; BEVILACQUA, 2004; REITHINGER *et al.*, 2002; ROSATI *et al.*, 2003), a RIFI permanece como o teste mais comumente utilizado para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em cães, tendo em vista a elevada sensibilidade.

Lira *et al.* (2006) realizaram um estudo para avaliar o desempenho do *kit* diagnóstico utilizado no presente estudo e encontraram uma sensibilidade de 68% e uma especificidade de 87,5%, divergindo dos valores postulados pelo fabricante. Uma vez que o *kit* utiliza antígenos *L. major-like*, existe a possibilidade de que parte da soroprevalência encontrada no presente estudo deva-se a reações cruzadas com anticorpos contra outras espécies de *Leishmania* [p.ex., *L. (Viannia) braziliensis*] ou, mesmo, contra outros parasitos (MANCIANTI; PEDONESE; POLI, 1996). Estudos

para identificar as espécies de *Leishmania* circulantes entre cães de Paulista devem ser encorajados. Da mesma forma, é importante verificar se a prevalência da infecção em cães (semi)domiciliados difere daquela em cães errantes, buscando caracterizar o verdadeiro papel desses animais como hospedeiros reservatórios.

Não houve amostra positiva na técnica de PCR em sangue total. A baixa sensibilidade da PCR nesse tipo de amostra (sangue total) já foi relatada por outros autores (LACHAUD *et al.*, 2001; REALE *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2001). É importante notar que a carga parasitária no sangue é menor do que em outros tecidos (ALVAR *et al.*, 2004; DANTAS-TORRES, 2006e). Talvez isso explique, em parte, a baixa sensibilidade da PCR em sangue total, em comparação com medula e pele, por exemplo. Outros fatores, tais como o método utilizado na extração do DNA e o protocolo utilizado na PCR também podem exercer influência sobre a sensibilidade e especificidade desta técnica (ALVAR *et al.*, 2004).

A única espécie de flebotomíneo encontrada nesse estudo foi *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor do agente causal da LV no Novo Mundo (LAINSON; RANGEL, 2005). Em estudos prévios sobre a epidemiologia da LV em áreas urbanas do Brasil, a presença de galinheiros nas proximidades das casas foi identificada como um possível fator de risco para a doença no homem (ARIAS *et al.*, 1996). Não resta dúvida que as galinhas são atrativas para fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. Por outro lado, galinhas possuem algumas características fisiológicas (p.ex., elevada temperatura corporal) que as impede de sustentar infecções por *Leishmania* (ALEXANDER *et al.*, 2002). Por essa razão, a relação entre a criação de galinhas e a incidência da LV no homem não tem sido bem esclarecida.

As condições ambientais encontradas em Paulista, como o solo rico em matéria orgânica, favorecem o estabelecimento de populações de flebotomíneos. O solo de abrigo de animais, rico em matéria orgânica, é um conhecido ecótopo para estágios imaturos de certas espécies de flebotomíneos, tais como *Lutzomyia longipalpis* (FELICIANGELI, 2004; KILLICK-KENDRICK, 1999).

Por outro lado, apesar de suas características urbanas, o município de Paulista também mantém algumas características rurais, como criação de animais de produção e cultivo de frutas e hortaliças, como banana, coco, inhame, mandioca, entre outros. Além disso, observa-se ainda a presença de pequenas áreas de Mata Atlântica residual. Essas condições favorecem o estabelecimento de populações de flebotomíneos durante o ano todo. Juntos, a elevada soroprevalência de anticorpos

anti-*Leishmania* sp. entre os cães (semi)domiciliados, a presença de *Lutzomyia longipalpis* e as condições de vida desfavoráveis de certas comunidades (p.ex., Tururu) de Paulista, sugerem um risco de futuras epidemias de LV nesse município de Pernambuco.

Existe uma enorme lacuna no que diz respeito ao conhecimento do comportamento dos flebotomíneos em relação à distribuição sazonal e hábito alimentar, não só em Paulista, mas na grande maioria dos municípios de Pernambuco. Da mesma forma, nota-se a ausência de estudos sobre a taxa de infecção natural dos vetores. O conhecimento desses aspectos é de suma importância para o desenvolvimento de estratégias de controle mais efetivas (XIMENES *et al.*, 2006).

Espera-se que os resultados obtidos a partir do presente estudo possam ajudar as autoridades de saúde pública na elaboração de novas estratégias para prevenção e controle da LV em Paulista e, quem sabe, em outros municípios de Pernambuco.

7 CONCLUSÕES

Em Paulista, a LV apresenta um padrão epidemiológico semelhante aquele observado na maioria dos focos da doença no Brasil. Grande parte dos casos são crianças menores de 10 anos, existe uma alta soroprevalência canina e *Lutzomyia longipalpis* pode ser facilmente coletada no entorno das casas localizadas próximas a áreas de Mata Atlântica remanescente.

A alta soroprevalência canina, a presença de *Lutzomyia longipalpis* no peridomicílio, além das condições sócio-econômicas e ambientais de certas comunidades, indicam o risco de futuros surtos de LV no município de Paulista.

REFERÊNCIAS

ABRANCHES, P. *et al.* Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 77, n. 4, p. 557-561, Aug. 1991.

ACEDO-SANCHEZ, C. *et al.* Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, southern Spain). **International Journal for Parasitology**, New York, v. 26, n. 3, p. 303-310, Mar. 1996.

ADHYA, S. *et al.* Detection of *Leishmania* in the blood of early kala-azar patients with the aid of the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, London, v. 89, n. 6, p. 622-624, Nov./Dec. 1995.

AGUILAR, C. M. *et al.* Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 1, p. 15-16, Jan./Feb. 1998.

ALENCAR, J. E. **Calazar canino**: contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Ceará: Imprensa Oficial, 1959. 342 p.

ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, v. 17/18, p. 129-148, 1977.

ALENCAR, J. E.; CUNHA, R. V. Inquéritos sobre calazar canino no Ceará - novos resultados. **Revista Brasileira de Malariologia de Doenças Tropicais**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3., p. 391-403, jul./set. 1963.

ALEXANDER, B. *et al.* Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta GA, v. 8, n. 12, p. 1480-1485, Dec. 2002.

ALEXANDRINO, A. C. **Diagnóstico e controle da leishmaniose visceral**: considerações sobre Pernambuco. 2001. 191 f. Tese (Doutorado)– Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

ALMEIDA, M. A. *et al.* Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 106, n. 1-2, p. 151-158, June 2005a.

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

ALVAR, J. *et al.* Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, London, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, Oxford, 2006. No prelo.

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

AMELA, C. *et al.* Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. **European Journal of Epidemiology**, Rome, v. 11, n. 2, p. 157-161, Apr. 1995.

AMUSATEGUI, I. *et al.* Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, Rome, v. 18, n. 2, p. 147-156, Feb. 2003.

ANDRADE, H. M. *et al.* *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 1/2, p. 71-81, Jan. 2002.

ANDRESEN, K. *et al.* Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 2, n. 5, p. 440-444, Mar. 1997.

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

ARTAN, R. *et al.* Liver biopsy in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Melbourne, v. 21, n. 1, p. 299-302, Jan. 2006.

ASHFORD, D. A. *et al.* Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 53, n. 3, p. 251-255, Sept. 1995.

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**, Baltimore, v. 59, n. 1, p. 53-57, July 1998.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 14, n. 5, p. 523-532, Sept./Oct. 1996.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 30, n. 12/13, p. 1269-1281, Nov. 2000.

BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose visceral (calazar). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Ed.) **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. vol. 2, cap. 97, p. 1234-1259.

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

BASSET, D. *et al.* Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. **Microbes and Infection**, Paris, v. 7, n. 13, p. 1370-1375, Oct. 2005.

BERRAHAL, F. *et al.* Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, n. 3, p. 273-277, Sept. 1996.

BLANC, G.; CAMINOPETROS, J. La transmission du kala-azar mediterraneen pae une tique: *Rhipicephalus sanguineus*. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 191, p. 1162-1164, 1930.

BLAVIER, A. *et al.* Atypical forms of canine leishmaniosis. **Veterinary Journal**, London, v. 162, n. 2, p. 108-120, Sept. 2001.

BOEHME, C. C. *et al.* Congenital visceral leishmaniasis. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta GA, v. 12, n. 2, p. 359-360, Feb. 2006.

BORJA-CABRERA, G. P. *et al.* Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). **Vaccine**, Kidlington, v. 20, n. 27/28, p. 3277-3284, Sept. 2002.

BRANDONISIO, O. *et al.* Canine leishmaniasis in the Gargano Promontory (Apulia, South Italy). **European Journal of Epidemiology**, Roma, v. 8, n. 2, p. 273-276, Mar. 1992.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2004. 120 p.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota técnica: uso do antimoniato de meglumina em cães**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21284>. Acesso em: 20 ago. 2005.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Distribuição de casos confirmados de leishmaniose visceral de 1980 a 2005**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/visceral_2006.pdf>. Acesso em: 20 out. 2006.

BURNS JR., J. M. *et al.* Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington DC, v. 90, n. 2, p. 775-779, Jan. 1993.

CABRERA, M. A. A. **Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro – RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras**. 1999. 84 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)– Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

CARVALHO, S. F. *et al.* Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 68 n. 3, p. 321-324, Mar. 2003.

CAVALIERO, T. *et al.* Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 13, n. 4, p. 330-334, July/Aug.1999.

CERF, B. J. *et al.* Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 156, n. 6, p. 1030-1033, Dec. 1987.

CESSE, E. A. P. *et al.* Organização do espaço urbano e expansão do calazar. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v. 1, n. 2, p. 167-166, maio/ago. 2001.

CHAPPUIS, F. *et al.* A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **British Medical Association**, London, v. 333, n. 7571, p. 723, Oct. 2006.

CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, London, v. 141, n. 21, p. 539-543, Nov. 1997.

COLER, R. N.; REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 244-249, May 2005.

CORTES, S. *et al.* PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 98, n. 1, p. 12-17, Jan. 2004.

COSTA, C. H. *et al.* Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 66, n. 4, p. 334-347, Apr. 2002.

COSTA, C. H.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 361-372, out. 1990.

COSTA, C. H.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 2, p. 223-228, mar./abr. 2001.

COURTENAY, O. *et al.* Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, n. 9, p. 1314-1320, Nov. 2002.

COUTINHO, M. T. *et al.* Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 128, n. 1/2, p.149-155, Mar. 2005.

COUTINHO, S. G. *et al.* A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases

occur. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 1, p. 17-22, Jan./Mar. 1985.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis: current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 19, n. 11, p. 502-508, Nov. 2003.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; DUCHENE, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 126, n. 2, p. 165-172, Feb. 2003.

CUNHA, A. M. A soro-aglutinação das leishmanias. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 35-37, 1942.

CUNHA, A. M. Infecções experimentais na leishmaniose visceral americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 4, p. 581-598, nov./dez. 1938.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* n. sp previous note. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 3-9, 1937.

CUNHA, S. *et al.* Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 89, n. 2, p. 155-158, Mar./Apr. 1995.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JÚNIOR, G.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, n. 3, p. 296-311, Mar. 1994.

DANTAS-TORRES, F. Do any insects other than phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) transmit *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from dog to dog? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 136, n. 3/4, p. 379-380, Mar. 2006a.

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

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 11, n. 61, p. 32-40, mar./abr. 2006.

DANTAS-TORRES, F. Increasing case fatality rate of visceral leishmaniasis in Brazil. **Revista Brasileira de Vigilância Sanitária**, São Paulo, v. 1, n. 4, p. 260-263, Oct./Nov./Dec. 2005a.

DANTAS-TORRES, F. Infecção, soropositividade e doença: qual a diferença? **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 5, p. 1609, set./out. 2005b.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania chagasi*: participação do *Rhipicephalus sanguineus* na transmissão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSSES, 2., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006b. p. 116-117.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 117-118, Jan./Feb. 2006c.

DANTAS-TORRES, F. Leishmune[®] vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 141, n. 1/2, p. 1-8, Oct. 2006d.

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

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 537-541, maio/jun. 2006f.

DANTAS-TORRES, F.; ALMEIDA, F. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Phlebotomine sandflies of an urban focus of visceral leishmaniosis, Pernambuco State. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, 2006. No prelo.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. A leishmaniose visceral é uma doença endêmica em Recife, Pernambuco? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 4, p. 361-362, jul./ago. 2005a.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, supl., p. 411-412, mar. 2005b.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 4, p. 352-356, jul./ago. 2006a.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Soroprevalência da leishmaniose visceral canina no município de Paulista, Pernambuco, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 26., 2005, Salvador. **Anais...** Salvador: Associação de Clínico Veterinários de Pequenos Animais, 2005c. 1 CD-ROM.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting the paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, May/June 2006b.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 1/2, p. 54-60, Aug. 2006.

DANTAS-TORRES, F.; DUARTE, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Análise situacional da leishmaniose visceral no município de Paulista, Pernambuco, Brasil. In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE ZONÓSES E BEM ESTAR ANIMAL, 1., 2004, Natal. **Anais...** Natal: Secretaria Municipal de Saúde, 2004. 1 CD-ROM.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39. n. 1, p. 64-67, Jan./Feb. 2006a.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A. Canine babesiosis: a Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 141, n. 3/4, p. 197-203, Nov. 2006.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 151-154, out./dez. 2004.

DAVID, J. R. *et al.* Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 839-847, Aug. 2001.

DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil**: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956. 162 p.

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

DEGRAVE, W. *et al.* Use of Molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 463-469, July/Aug./Sept. 1994.

DESJEUX, P. **Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory**. Geneva: World Health Organization, 1991. 47 p.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, n. 3, p. 239-243, May/June 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 305-318, Sept. 2004.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 97, suppl. 1, p. 3-15, Oct. 2003.

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

DORLAND, W. A. N. **Dorland's Illustrated Medical Dictionary**. 21.ed. Philadelphia: Saunders, 1949. 1660 p.

DUJARDIN, J. C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 4-6, Jan. 2006.

ELTOUM, I. A. *et al.* Congenital kala-azar and leishmaniasis in the placenta. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 46, n. 1, p. 57-62, Jan. 1992.

EVANS, D. **Handbook on isolation characterization and cryopreservation of *Leishmania***. Geneva: World Health Organization, 1989. 45 p.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 71-80, Mar. 2004.

FEITOSA, M. M. *et al.* Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 5, n. 28, p. 36-44, set./out. 2000.

FISA, R. *et al.* Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain): the example of the Priorat focus. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 87-97, June 1999.

FISSORE, C. *et al.* Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 42, n. 11, p. 5332-5333, Nov. 2004.

FRANCINO, O. *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 3/4, p. 214-221, Apr. 2006.

FRANÇA, L. J. O. *et al.* Frequência da leishmaniose visceral canina no município de Bezerros, Estado de Pernambuco, Brasil. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 5., 2003, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária, 2003. p. 363-364.

FRANÇA-SILVA, J. C. *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 111, n. 2/3, p. 161-173, Feb. 2003.

FREITAS, E. *et al.* Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 1/2, p. 159-167, Apr. 2006.

GAVGANI, A. S. *et al.* Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. **Lancet**, London, v. 360, n. 9330, p. 374-379, Aug. 2002.

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

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

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 35, n. 11/12, p. 1169-1180, Oct. 2005.

GUERIN, P. J. *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infectious Diseases**, London, v. 2, n. 8, p. 494-501, Aug. 2002.

HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 14, n. 4, p. 659-688, Oct. 2001.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, Oct. 1999.

IBGE. **Paulista – PE**. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/perfil.php?codmun=261070&r=2>>. Acesso em: 10 out. 2005.

IKEDA-GARCIA, F. A. *et al.* Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 2006. No prelo.

IKONOMOPOULOS, J. *et al.* Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 99-113, Apr. 2003.

IVERSSON, L. B. *et al.* Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana no município de São Paulo, Brasil (1979–1982). **Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 310-317, Nov./Dec. 1983.

JARRY, D. M. Historique des leishmanioses et de leurs complexes pathogènes. In: DEDET, J. P. (Ed.) **Les leishmanioses**. Paris: Ellipses, 1999. p. 13-20.

JERÔNIMO, S. M. B. *et al.* An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 88, n. 4, p. 386-388, July/Aug. 1994.

KAFETZIS, D. A. An Overview of paediatric leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 49, n. 1, p. 31-38, Jan./Feb./Mar. 2003.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 1-24, Jan. 1990.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 17, n. 3, p. 279-289, May/June 1999.

KOHANTEB, J.; ARDEHALI, S. Cross-reaction of sera from patients with various infectious diseases with *Leishmania infantum*. **Medical Principles and Practice**, Basel, v. 14, n. 2, p. 79-82, Mar./Apr. 2005.

KOUTINAS, A. F. *et al.* Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, South Bend IN, v. 35, n. 5, p. 376-383, Sept./Oct. 1999.

LACERDA, M. M. The Brazilian Leishmaniasis Control Program. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 489-495, July/Sept. 1994.

LACHAUD, L. *et al.* Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 39, n. 2, p. 613-617, Feb. 2001.

LACHAUD, L. *et al.* Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 40, n. 1, p. 210-215, Jan. 2002.

LAINSON, R. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the Neotropics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 3, p. 377-387, May/June 1997.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.) **The leishmaniases in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987. vol. 1, p. 1-120.

LAINSON, R. *et al.* American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v. 81, n. 3, p. 517, 1987.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811-827, Dec. 2005.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority: reply. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 118, Feb. 2006.

LANOTTE, G. *et al.* Écologie des leishmanioses dans le Sud de la France. VIII Complément à l'application épidémiologique de la technique d'immunofluorescence: les titres géométriques et arithmétiques moyens dans la leishmaniose canine. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, Paris, v. 50, p. 1-5, 1975.

LAVERAN, A.; MESNIL, F. Sur un Protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. et Mesn.), parasite d'une fièvre de l'Inde. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, Paris, n. 137, p. 957-961, 1903.

LE FICHOUX, Y. *et al.* Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 37, n. 6, p. 1953-1957, June 1999.

LIMA-JÚNIOR, A. D. *et al.* A survey of canine visceral leishmaniasis in the city of Recife, Northeastern Brazil. In: AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY PARASITOLOGISTS ANNUAL MEETING, 45., 2000, Salt Lake City. **Proceedings...** Salt Lake City: American Association of Veterinary Parasitologists, 2000. p. 32.

LINARDI, P. M.; NAGEM, R. L. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 33, n. 4, p. 529-538, 1973.

LIRA, R. A. *et al.* Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 1/2, p. 11-16, Jan. 2006.

LOPEZ, M. *et al.* The use of nonradioactive DNA probes for the characterization of *Leishmania* isolates from Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 38, n. 2, p. 308-314, Mar. 1988.

MANCIANTI, F. *et al.* Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. **Tropical Medicine and Parasitology**, Stuttgart, v. 37, n. 2, p. 110-112, June 1986.

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

MARTINKOVIC, F.; MARINCULIC, A. Antibodies against *Leishmania* cross-react with *Crithidia luciliae*: indirect immunofluorescence and Dot-ELISA study in dogs. **Parasitology Research**, Berlin, v. 98, n. 4, p. 378-380, Mar. 2006.

MARTY, P.; ROSENTHAL, E. Treatment of visceral leishmaniasis: a review of current treatment practices. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, London, v. 3, n. 8, p. 1101-1108, Aug. 2002.

MATHIS, A.; DEPLAZES, P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from human and dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 33, n. 5, p. 1145-1149, May 1995.

MATHUR, P.; SAMANTARAY, J. C. The first probable case of platelet transfusion-transmitted visceral leishmaniasis. **Transfusion Medicine**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 319-321, Aug. 2004.

MAURICIO, I. L. *et al.* Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, Cambridge, v. 119, n. 3, p. 237-246, Sept. 1999.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, n. 5, p. 188-189, May 2000.

MEINECKE, C. K. *et al.* Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. **Pediatrics**, Evanston, v. 104, n. 5, p. e65, Nov. 1999.

MIGONE, L. E. Un caso de Kalazar en Assunción (Paraguay). **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 6, p. 118-120, 1913.

MIRANDA, S. *et al.* Clinically patent canine leishmaniasis shows age, breed and sex predilection. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 3., 2005, Palermo. **Anais...** Palermo: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Istituto Superiore Di Sanita and Turkish Society for Parasitology, 2005. p. 171.

MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 97, suppl. 1, p. 29-45, Oct. 2003.

MOMEN, H.; GRIMALDI JÚNIOR, G.; DEANE, L. M. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 3, p. 447-448, July/Aug./Sept. 1987.

MOMEN, H. *et al.* Molecular evidence for the importation of Old World *Leishmania* into the Americas. **Biological Research**, Santiago, v. 26, n. 1/2, p. 249-255, 1993.

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

MORENO, E. C. *et al.* Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 6, p. 456-463, Nov./Dec. 2005.

MORTARINO, M. *et al.* PCR quantitativa nella diagnosi di *Leishmania*. **Parassitologia**, Roma, v. 46, n. 1/2, p. 163-167, giugno 2004.

MURRAY, H. W. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 71, n. 6, p. 787-794, Dec. 2004.

MURRAY, H. W. *et al.* Advances in leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, Oct./Nov. 2005.

NICOLLE, C. J. 'Sur trois cas d' infection splénique infantile à corps de *Leishman* observés en Tunisia'. **Archives de L'Institut Pasteur de Tunis**, Tunis, n. 3, p. 1-26, 1908.

NOGUEIRA, F. S. *et al.* Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, Kidlington, v. 23, n. 40, p. 4805-4810, Sept. 2005.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 213-232, Aug. 2005.

OLIVA, G.; FOGLIA MANZILLO, V.; PAGANO, A. Evoluzione dei protocolli terapeutici in corso di leishmaniosi canina. **Parassitologia**, Roma, v. 46, n. 1/2, p. 231-234, giugno 2004.

OSMAN, O. F. *et al.* Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 35, n. 10, p. 2454-2457, Oct. 1997.

OTERO, A. C. *et al.* Short report: occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 62, n. 1, p. 128-131, Jan. 2000.

OWENS, S. D. *et al.* Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 219, n. 8, p. 1076-1083, Oct. 2001.

OZBEL, Y. *et al.* A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. **Acta Tropica**, Basel, v. 74, n. 1, p. 1-6, Jan. 2000.

PAGLIANO, P. *et al.* Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 55, n. 2, p. 229-233, Feb. 2005.

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

PASTORINO, A. C. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria** (Rio de J.), Porto Alegre, v. 78 n. 2, p. 120-127, mar./abr. 2002.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 940-950, 1934.

PENNISI, M. G. *et al.* Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 29, suppl. 2, p. 301-303, Aug. 2005.

PEREIRA, G. *et al.* Leishmaniose visceral em Pernambuco: dados epidemiológicos. **Boletim Trimestral da Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias**, Recife, v. 5, n. 1, p. 53-70, 1985.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. *Leishmania donovani*: leishmaniose visceral ou calazar. In: PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. (Ed.) **Parasitologia Médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 104-124.

PIARROUX, R. *et al.* Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in

immunocompromised patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 32, n. 3, p. 746-749, Mar. 1994.

PORTÚS, M. *et al.* Estudios seroepidemiológicos sobre la leishmaniosis canina en Cataluña. **Medicina Veterinaria**, [S.l.], v. 4, p. 44-48, 1987.

POZIO, E. *et al.* Leishmaniasis in Tuscany (Italy). VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). **Acta Tropica**, Basel, v. 38, n. 4, p. 383-393, Dec. 1981.

PRASAD, R. *et al.* Miltefosine: an oral drug for visceral leishmaniasis. **Indian Journal of Pediatrics**, Calcutta, v. 71, n. 2, p. 143-144, Feb. 2004.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **Jornal de Pediatria** (Rio de J.), Porto Alegre, v. 80, n. 2, p. 141-146, mar./abr. 2004.

RAVEL, S. *et al.* A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. **Acta Tropica**, Basel, v. 59, n. 3, p. 187-196, June 1995.

REALE, S. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 37, n. 9, p. 2931-2935, Sept. 1999.

REITHINGER, R. *et al.* Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, July 2002.

REITHINGER, R. *et al.* Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal for Parasitology**, New York, v. 34, n. 1, p. 55-62, Jan. 2004.

REMME, J. H. *et al.* Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 10, p. 421-426, Oct. 2002.

RIBEIRO, V. L. *et al.* Evaluation of the potential transmission of visceral leishmaniasis in a canine shelter. **Revue de Medecine Veterinaire**, Toulouse, v. 56, n. 1, p. 20-22, Jan. 2005.

RODGERS, M. R.; POPPER, J. M.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 71, n. 3, p. 267-275, Oct. 1990.

ROSATI, S. *et al.* Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington DC, v. 10, n. 6, p. 1153-1156, Nov. 2003.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, London, v. 2, p. 1261-1262, Nov. 1903.

ROSPAL, A. C.; LINDSAY, D. S. Non-sand fly transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected BALB/c mice. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 5, p. 1113-1115, Oct. 2005.

ROSPAL, A. C. *et al.* Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 4, p. 970-972, Aug. 2005.

ROURA, X.; SÁNCHEZ, A.; FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. **Veterinary Record**, London, v. 144, n. 10, p. 262-264, Mar. 1999.

SANCHEZ-ROBERT, E. *et al.* Polymorphism of Slc11a1 (Nrp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. **Journal of Heredity**, Washington DC, v. 96, n. 7, p. 755-758, Nov. 2005.

SARAIVA, E. M. *et al.* The FML-vaccine (Leishmune[®]) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. **Vaccine**, Kidlington, v. 24, n. 13, p. 2423-2431, Mar. 2006.

SAVANI, E. S. *et al.* The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, Sao Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 120, n. 3, p. 229-233, Mar. 2004.

SCHETTINI, D. A. *et al.* Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 12, p. 1879-1883, Dec. 2005.

SHAW, J. J. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: FARRELL, J. (Ed.) **World class parasites: Leishmania**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002. p. 11-31.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 471-478, July/Aug./Sept. 1994.

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**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 577-579, Aug. 2006.

SHAW, J. J.; ISHIKAWA, E. A.; LAINSON, R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v. 83, n. 6, p. 783-784, Nov./Dec. 1989.

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

SIDERIS, V. L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in the great Athens area, Greece. **Parasite**, Issy les Moulineaux, v. 3, n. 2, p. 125-130, June 1996.

SILVA, D. F.; VASCONCELOS, S. D. A ten-year (1990-1999) survey on leishmaniasis incidence in Pernambuco State, Northeastern Brazil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 32, n. 1, p. 53-61, jan./fev./mar./abr./maio/jun. 2003.

SILVA, E. S. *et al.* Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 65, n. 6, p. 896-898, Dec. 2001.

SILVA, E. S. *et al.* Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 3, n. 2, p. 251-257, July 2004.

SILVA, E. S. *et al.* Application of direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. **Kinetoplastid Biology and Disease**, London, v. 4, p. 4, June 2005.

SILVA, M. R.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 72, n. 6, p. 811-814, June 2005.

SIMOES-MATTOS, L. *et al.* Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown? **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 99, n. 550, p. 79-87, abr./maio/jun. 2004.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 49, n. 1, p. 55-60, Jan./Feb./Mar. 2003.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Tokyo, v. 10, n. 6, p. 307-315, Dec. 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 90, n. 1/2, p. 37-45, June 2000.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 39, n. 2, p. 560-563, Feb. 2001.

SPANAKOS, G. *et al.* Development of a PCR-based method for diagnosis of *Leishmania* in blood samples. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 16, n. 6, p. 415-420, Dec. 2002.

STRAUSS-AYALI, D. *et al.* Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, n. 9, p. 1729-1733, May 2004.

SUKUMARAN, B.; MADHUBALA, R. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Current Molecular Medicine**, [S.l.], v. 4, n. 6, p. 667-679, Sept. 2004

SUNDAR, S. *et al.* Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 347, n. 22, p. 1739-1746, Nov. 2002.

SUNDAR, S.; RAI, M. Advances in the treatment of leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 15, n. 6, p. 593-598, Dec. 2002a.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington DC, v. 9, n. 5, p. 951-958, Sept. 2002b.

SUNDAR, S. *et al.* Amphotericin B colloidal dispersion for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 42, n. 5, p. 608-613, Mar. 2006

SYMMERS, W. S. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. **Lancet**, London, v. 1, p. 127-132, Jan. 1960.

VEXENAT, J. A. *et al.* Clinical recovery and limited cure in canine visceral leishmaniasis treated with aminosidine (paromomycin). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 58, n. 4, p. 448-453, Apr. 1998.

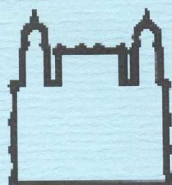
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**: disease information. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>>. Acesso em: 23 fev. 2006.

XIMENES, M. F. *et al.* Effect of abiotic factors on seasonal population dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in northeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 43, n. 5, p. 990-995, Sept. 2006.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, Gainesville, n. 54, p. 1-881, 1994.

ANEXOS

ANEXO 1

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais

MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o Programa nº **P-0299-06**, intitulado “**Leishmaniose visceral no município de Paulista, Estado de Pernambuco: Prevalência da infecção no cão doméstico**” sob a responsabilidade do **Dr. Sinval Pinto Brandão Filho**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ)** em reunião de 28/08/2006. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 17 de outubro de 2010.

Rio de Janeiro, 17 de outubro de 2006.

Dr. Octávio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA
FIOCRUZ

ANEXO 2**Artigo 1 (publicado no Veterinary Parasitology)**

ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Veterinary Parasitology 140 (2006) 54–60

**veterinary
parasitology**www.elsevier.com/locate/vetpar

Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil

Filipe Dantas-Torres^{*}, Maria Edileuza Felinto de Brito,
Sinval Pinto Brandão-Filho

*Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz,
Caixa Postal 7472, Avenida Professor Moraes Rego s/n, Campus UFPE, Recife, Pernambuco CEP 50670-420, Brazil*

Received 23 December 2005; received in revised form 8 March 2006; accepted 10 March 2006

Abstract

A cross-sectional seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among pet dogs was carried out in an urban area in the State of Pernambuco (Brazil) where human cases of visceral leishmaniasis have sporadically been reported. Using an indirect fluorescent antibody test, anti-*Leishmania* antibodies were detected in 130 out of 322 dogs, confirming previous exposure to *Leishmania* parasites. The overall seroprevalence found was 40.3% (95% confidence interval: 34.9–45.9). Data analysis revealed that serological positivity was statistically associated with male ($\chi^2 = 20.60$, P -value = 0.000) and juvenile dogs ($\chi^2 = 4.24$, P -value = 0.039). Furthermore, it was observed that 85.3% of all seropositive dogs showed no clinical signs of leishmaniasis. The results showed a high seroprevalence of anti-*Leishmania* antibodies among dogs from an urban area of Pernambuco – with a large proportion of asymptomatic seropositive dogs – indicating that the prevalence of *Leishmania* infection in this area has been underestimated.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Visceral leishmaniasis; Dog; Seroprevalence; Risk factors; Brazil

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is one of the most important parasitic diseases worldwide and remains a challenge to public health in at least 65 countries (Ashford, 2000; Moreno and Alvar, 2002; Desjeux, 2004). This disease is a zoonosis caused by *Leishmania*

(*Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), now considered as synonymous to *L. (L.) chagasi* (Maurício et al., 2000; Dantas-Torres, 2006a), though some authors have also regarded these as subspecies (Lainson and Rangel, 2005). *L. (L.) infantum* is an obligatory intracellular protozoon that is transmitted to a susceptible vertebrate host through saliva while an infected female phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) is feeding (Killick-Kendrick, 1999). Other mechanisms of transmission, such as by insects other than phlebotomine sandflies, have recently been

^{*} Corresponding author. Tel.: +55 81 21012640;
fax: +55 81 34532449.

E-mail address: fdt@cpqam.fiocruz.br (F. Dantas-Torres).

considered (Dantas-Torres, 2006b). VL is considered by far the most severe form of leishmaniasis and is often fatal if left untreated. Of the 500,000 new cases reported annually worldwide, some 90% are in five developing countries: Bangladesh, Brazil, India, Nepal, and Sudan (Desjeux, 2004). In the Americas, VL used to be considered a typical rural disease. Over the past 20 years, however, the disease has spread to urban areas, as has clearly been observed in Brazil (Costa et al., 1990; Arias et al., 1996). In this country, the case-fatality rate of VL has rapidly increased in recent years (Dantas-Torres, in press).

Canids fulfill the necessary conditions to become important reservoir hosts of *L. (L.) infantum* (Moreno and Alvar, 2002; Alvar et al., 2004). The dog is the principal domestic reservoir of *L. (L.) infantum* for human infection (Ashford, 1996; Moreno and Alvar, 2002; Alvar et al., 2004). Infected dogs, even asymptomatic ones, are potential sources of infection for phlebotomine sandflies (Molina et al., 1994). In areas where zoonotic VL is endemic, asymptomatic dogs play a major role in the transmission of *L. (L.) infantum* to humans (Alvar et al., 2004).

In the State of Pernambuco (Northeastern Brazil), where both cutaneous and visceral forms of leishmaniasis are endemic and widespread, there has been a marked increase in the number of cases reported over the past 15 years (Brandão-Filho et al., 1999, 2003; Cesse et al., 2001; Dantas-Torres and Brandão-Filho, 2005a). Additionally, cases of canine VL have recently been reported from areas previously not defined as risk areas (Dantas-Torres et al., 2005). Despite this, many aspects involved in the epidemiology of the disease in urban areas are still to be investigated. The purposes of the present study were to determine the prevalence of anti-*Leishmania* antibodies among dogs from an urban area of Pernambuco and to investigate possible risk factors associated with serological positivity.

2. Material and methods

2.1. Study area

The present cross-sectional survey was carried out in Paulista (latitude 07°56'27"S, longitude 34°52'23"W, altitude 13 m), a municipality located on the north coast

of Pernambuco where human cases of VL have sporadically been reported (Dantas-Torres et al., 2004). The local phlebotomine sandfly population is composed by a very limited number of species and *Lutzomyia longipalpis* is by far the most abundant one (Dantas-Torres and Brandão-Filho, unpublished data). With an urban area of about 94 sq km, Paulista had a population of about 300,000 inhabitants in 2005, all of them living in urban areas (Brasil, 2005). The climate is tropical with heavy rainfall between February and June. The mean annual air temperature is 25.8 °C, ranging from 24 to 26 °C. Relative air humidity ranges from 72.5 to 85%. The annual pluviometer index is usually over than 1600 mm.

2.2. Sample size

A total of 322 pet dogs (males and females, different ages and breeds) were selected at random to be included in the present study. The minimum sample size required ($n = 297$) was calculated considering the dog population (infinite), expected seroprevalence (3.2%, which is the highest seroprevalence rate reported among dogs from Paulista, Dantas-Torres and Brandão-Filho, 2005b), confidence interval (95%), and precision of 2%.

2.3. Sample and data collection

On the 24 September 2005, 3–5 ml EDTA-treated whole blood samples from all dogs were collected by cephalic vein puncture. In the laboratory, samples were centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Then, the obtained plasma was frozen at –20 °C until it could be tested for anti-*Leishmania* antibodies. After sample collection, a questionnaire was used to collect information regarding the age, gender, and district of origin of each dog.

2.4. Physical examination

The clinical status of each dog was carefully evaluated and defined according to the following criteria: a dog with two or more obvious clinical signs of leishmaniasis (weight loss, dermatitis, hair loss, mouth and skin ulcers, enlarged lymph nodes, onychogryphosis, arthritis, and conjunctivitis) was regarded as symptomatic. And a dog with only one or without any signs was intended as asymptomatic.

2.5. Serological tests

An indirect fluorescent antibody test kit (IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) was used to detect anti-*Leishmania* IgG antibodies, and the manufacturer's instructions were followed. This kit uses *Leishmania major*-like antigens; sensitivity and specificity of this kit are stated by the manufacturer to be around 90 and 80%, respectively. Samples with a clear fluorescence when diluted at 1:80 were considered positive, following the most recent recommendations of the Ministry of Health of Brazil (Brasil, 2004). Dogs reactive to a dilution of 1:40 were regarded as negative.

2.6. Statistical analysis

Chi-squared (χ^2) was used to compare seroprevalence rates relative to gender, age, clinical status and geographical location. The differences were considered statistically significant when probability (P) value ≤ 0.05 . The 95% confidence intervals (95% CI) of seroprevalence rates were calculated. Statistical analysis was performed using Epi Info software, version 6.04d (Center for Disease Control, Atlanta, USA, 2001).

3. Results

Most of the dogs included in the present survey were mongrel dogs; though no quantitative data was collected in regard the breed of each animal to permit further analysis. The mean age was 3.3 years (standard deviation = 2.8 years), ranging from 2 months to 15 years. One hundred eighty-four (57.1%) of the dogs were males and 138 (42.8%) were females.

Of the 322 samples, 130 tested positive to anti-*Leishmania* antibodies, confirming previous exposure to *Leishmania* parasites. Seroprevalence rates in relation to data are shown in Table 1. The same data, stratified by district of origin, is presented in Table 2.

The rate of seroprevalence was higher among juvenile (≤ 1 year) dogs than among adults (> 1 years) ($\chi^2 = 4.24$, P -value = 0.039). Likewise, the rate of seroprevalence was higher among males than females ($\chi^2 = 20.60$, P -value = 0.000), especially among those

Table 1

Seroprevalence rates of anti-*Leishmania* antibodies among pet dogs from Paulista in relation to epidemiological data

Dog's data	<i>n</i>	IFAT positives	Seroprevalence rates ^a	<i>P</i> -values
Age				
≤1 year	82	41	50 (38.7–61.2)	0.039
> 1 year	240	89	37 (30.9–43.5)	
Sex				
Male	184	95	51.6 (44.1–59)	0.000
Female	138	35	25.3 (18.3–33.4)	
Clinical status				
Symptomatic	37	19	51.3 (34.3–68)	0.147
Asymptomatic	285	111	38.9 (33.2–44.8)	
Total	322	130	40.3 (34.9–45.9)	

^a 95% confidence intervals are in brackets.

from the district of Janga ($\chi^2 = 34.45$, P -value = 0.000). It is interesting to note, in regard to the district of origin, that the seroprevalence rate found in Pau Amarelo was statistically different from that of Janga ($\chi^2 = 5.48$, P -value = 0.019), but not from Nossa Senhora da Conceição ($\chi^2 = 2.068$, P -value = 0.150). No significant difference was found between seroprevalence rates detected in Janga and Nossa Senhora da Conceição ($\chi^2 = 0.201$, P -value = 0.654). Most of the dogs were asymptomatic, i.e., only 37 dogs showed two or more obvious clinical signs of leishmaniasis. Weight loss, dermatitis, hair loss, skin ulcers, conjunctivitis, and onychogryphosis were the most commonly observed clinical signs. Of all seropositive dogs, 111 (85.3%) were asymptomatic. No significant difference was found in the seroprevalence rates between symptomatic and asymptomatic dogs ($\chi^2 = 2.09$, P -value = 0.147).

4. Discussion

We have conducted a cross-sectional survey to determine the prevalence of anti-*Leishmania* antibodies among domestic dogs from an urban area of Pernambuco to assess whether the prevalence differs in relation to gender, age, clinical status and district of origin. The results of this study confirmed that a significant amount of domestic dogs from the Paulista area present detectable anti-*Leishmania* IgG antibodies. When compared to data of previous serological surveys conducted by the local public health

Table 2
Seroprevalence rates of anti-*Leishmania* antibodies among pet dogs from Paulista in relation to epidemiological data, by district of origin^a

Dog's data	Janga			Pau Amarelo			Nossa Senhora da Conceição		
	n	IFAT positive	Seroprevalence rate ^b	n	IFAT positive	Seroprevalence rate ^b	n	IFAT positive	Seroprevalence rate ^b
Age (years)									
<1 year	41	17	41.4 (26.3–57.8)	26	17	65.3 (44.3–82.7)	15	6	40 (16.3–67.7)
>1 year	127	43	33.8 (25.7–42.7)	56	25	44.6 (31.3–58.5)	44	17	38.6 (24.3–54.5)
Sex									
Male	92	51	55.4 (44.7–65.8)	48	25	52 (37.1–66.7)	35	15	42.8 (26.3–60.6)
Female	76	9	11.8 (5.5–21.2)	34	17	50 (32.4–67.5)	24	8	33.3 (15.6–55.3)
Clinical status									
Symptomatic	22	9	40.9 (20.7–63.6)	9	6	66.6 (29.9–92.5)	6	4	66.6 (22.2–95.6)
Asymptomatic	146	51	34.9 (27.2–43.2)	73	36	49.3 (37.4–61.2)	53	19	35.8 (23.1–50.2)
Total	168	60	35.7 (28.4–43.4)	82	42	51.2 (39.9–62.4)	59	23	38.9 (26.5–52.5)

^a The most representatives only. Other districts (not included) represent together some 4% of the whole sample size.

^b 95% confidence intervals are in brackets.

authorities, in which the highest seroprevalence rate was 3.2% (Dantas-Torres and Brandão-Filho, 2005b), our results indicate that the prevalence of *Leishmania* infection among dogs from Paulista has been underestimated. Additionally, this is the highest seroprevalence rate reported among pet dogs from Pernambuco, where the average seroprevalence rate of anti-*Leishmania* antibodies in dogs is about 2.5% (Alexandrino, 2001), raging from 0.32% (Lima-Júnior et al., 2000) to 35.9% (França et al., 2003). In Brazil as a whole, the seroprevalence rates may vary widely (Iverson et al., 1983; Coutinho et al., 1985; França-Silva et al., 2003) and be as high as 67% in highly endemic clusters (Paranhos-Silva et al., 1996). It is important to note that the cut-off titer adopted in the serological studies mentioned above was 1:40. As a matter of the fact, the real prevalence of infection among the screened dogs may be underestimated by using a cut-off titer higher than 1:40 (e.g. 1:80). On the other hand, this increases the specificity of the test, thus reducing the culling of false-positive animals (Alves and Bevilacqua, 2004).

Previous field studies have not revealed gender as an important risk factor for canine leishmaniasis (Alencar and Cunha, 1963; Pozio et al., 1981; Abranches et al., 1991; Amela et al., 1995; Sideris et al., 1996; Fisa et al., 1999; Amusatogui et al., 2003; França-Silva et al., 2003), though results are not always in agreement. In France (Lanotte et al., 1975) and Spain (Miranda et al., 2005), for example, higher

prevalence rates were found among male dogs. With respect to age, there is consensus that canine leishmaniasis presents a bimodal distribution, with a peak in cases in dogs under the age of 3 years and another between the ages of eight to 10 years (Amela et al., 1995; Acedo-Sanchez et al., 1996; Miranda et al., 2005). In our study, a statistically significant association was found between serological positivity and age (≤ 1 year) and between serological positivity and gender (male dogs). However, the hypothesis that age and gender could be important risk factors for serological positivity – and even disease outcome – in the studied area should be investigated more thoroughly in future case-control or cohort studies.

In the present study, no analysis was performed in relation to the seroprevalence rates among dogs of different breeds. Although all breeds are theoretically susceptible to *Leishmania* infection, a recent study has demonstrated that the Ibizan hound seems to be more resistant than other breeds (Solano-Gallego et al., 2000). In contrast, certain breeds (e.g. boxers) appear to be more susceptible to *L. (L.) infantum* infection (França-Silva et al., 2003). Natural resistance has been linked to the dog's genetic background (Sanchez-Robert et al., 2005).

The clinical signs observed in the present study are among those commonly observed in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *L. (L.) chagasi* (Almeida et al., 2005). As documented in previous seroepidemiological surveys (Mancianti et al., 1986;

Portús et al., 1987; Abranches et al., 1991; Brandonisio et al., 1992), a high proportion of seropositive dogs showed no clinical signs of leishmaniasis. This is of particular importance since asymptomatic dogs are considered to be the main reservoir hosts of *L. (L.) infantum* infection (Alvar et al., 2004).

Serological tests are useful diagnostic tools for identification of asymptomatic infected dogs. Despite its known limitations (Reithinger et al., 2002; Rosati et al., 2003; Alvar et al., 2004; Alves and Bevilacqua, 2004), the IFAT remains as the most commonly used test for serological diagnosis of canine leishmaniasis. It is difficult, however, to standardize and to interpret; and it is too laborious for screening large numbers of samples (Rosati et al., 2003). A study has recently been conducted to evaluate the performance of the IFAT kit used in our study (Lira et al., 2006). The sensitivity and specificity were 68 and 87.5%, respectively, in contrast to the values stated by the manufacturer. Since this kit uses *L. major*-like antigens, there is a possibility that part of the seroprevalence found in the present study is related to cross-reaction with other species of *Leishmania* (e.g. *L. (Viannia) braziliensis*) and even other parasites, as observed in humans (Vexenat et al., 1996). Further studies in order to identify the species of *Leishmania* circulating among pet dogs from Paulista are advocated. In the same way, it is important to assess whether the prevalence of *Leishmania* infection among pet dogs differ statistically from stray ones to identify the true role of these animals as reservoirs of the parasite in urban areas in the Pernambuco.

In summary, most of the seropositive dogs from the studied area were males, juveniles, and showed no signs of leishmaniasis. Finally, since information on the epidemiology of canine leishmaniasis is important for the definition of control measures for VL (Gradoni, 1999), our data will help public health authorities develop future strategies for prevention and control of the disease in Paulista and, probably, in other municipalities of the Metropolitan Region of Recife.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). We are indebted to the Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, the

Secretaria Municipal de Saúde de Paulista, and the Universidade Federal Rural de Pernambuco for fieldwork support. We also thank Wayner Vieira de Souza for his assistance with the statistical analysis and Sidney Pratt for English revision of the manuscript. The first author is receiving a scholarship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Abranches, P., Silva-Pereira, M.C.D., Conceição-Silva, F.M., Santos-Gomes, G.M., Janz, J.G., 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.* 77, 557–561.
- Acedo-Sanchez, C., Martín-Sánchez, J., Velez-Bernal, I.D., Sanchis-Marin, M.C., Louassini, M., Maldonado, J.A., Morillas-Marquez, F., 1996. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, southern Spain). *Int. J. Parasitol.* 26, 303–310.
- Alencar, J.E., Cunha, R.V., 1963. Inquérito sobre calazar no Ceará - novos resultados. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.* 15, 391–403.
- Alexandrino, A.C., 2001. Diagnóstico e controle da leishmaniose visceral: considerações sobre Pernambuco. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Almeida, M.A., Jesus, E.E., Sousa-Atta, M.L., Alves, L.C., Beme, M.E., Atta, A.M., 2005. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106, 151–158.
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88.
- Alves, W.A., Bevilacqua, P.D., 2004. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993–1997. *Cad. Saúde Pública* 20, 259–265.
- Amela, C., Mendez, I., Torçal, J.M., Medina, G., Pachon, I., Canavate, C., Alvar, J., 1995. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur. J. Epidemiol.* 11, 157–161.
- Amusatogui, I., Sainz, A., Rodriguez, F., Tesouro, M.A., 2003. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur. J. Epidemiol.* 18, 147–156.
- Arias, J.R., Monteiro, P.S., Zicker, F., 1996. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2, 145–146.
- Ashford, R.W., 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 14, 523–532.
- Ashford, R.W., 2000. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269–1281.
- Brandão-Filho, S.P., Campbell-Lendrum, D., Brito, M.E., Shaw, J.J., Davies, C.R., 1999. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 488–494.
- Brandão-Filho, S.P., Brito, M.E., Carvalho, F.G., Ishikawa, E.A., Cupolillo, E., Floeter-Winter, L., Shaw, J.J., 2003. Wild and

- synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97, 291–296.
- Brandonisio, O., Carelli, G., Ceci, L., Consenti, B., Fasanella, A., Puccini, V., 1992. Canine leishmaniasis in the Gargano Promontory (Apulia, South Italy). *Eur. J. Epidemiol.* 8, 273–276.
- Brasil, 2004. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, 122 pp.
- Brasil, 2005. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Available from: <http://www.ibge.gov.br/cidadeat/default.php>. Accessed in: 1 October 2005.
- Cesse, E.A.P., Carvalho, E.F., Andrade, P.P., Ramalho, W.M., Luna, L., 2001. Organização do espaço urbano e expansão do calazar. *Rev. Bras. Saude Mater. Infant.* 1, 167–176.
- Costa, C.H.N., Pereira, H.F., Araújo, M.V., 1990. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980–1986. *Rev. Saúde Pública* 24, 361–372.
- Coutinho, S.G., Nunes, M.P., Marzochi, M.C.A., Tramontano, N.C., 1985. A surgery for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 80, 17–22.
- Dantas-Torres, F. Increasing case fatality rate of visceral leishmaniasis in Brazil. *Revisa*, in press.
- Dantas-Torres, F., 2006a. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 117–118.
- Dantas-Torres, F., 2006b. Do any insects other than phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) transmit *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from dog to dog? *Vet. Parasitol.* 136, 379–380.
- Dantas-Torres, F., Duarte, F., Brandão-Filho, S.P., 2004. Análise situacional da leishmaniose visceral no município de Paulista, Pernambuco, Brasil. In: Congresso Norte-Nordeste de Zoonoses e Bem Estar Animal, vol. 1, Natal. Anais. Secretaria Municipal de Saúde. 1 CD-ROM.
- Dantas-Torres, F., Brandão-Filho, S.P., 2005a. Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 (Suppl. 1), 411–412.
- Dantas-Torres, F., Brandão-Filho, S.P., 2005b. Soroprevalência da leishmaniose visceral canina no município de Paulista, Pernambuco, Brasil. In: Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA, vol. 26, Salvador. Anais. Associação de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, pp. 343–344.
- Dantas-Torres, F., Faustino, M.A.G., Lima, O.C.C., Acioli, R., 2005. Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 444–445.
- Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305–318.
- Fisa, R., Gallego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gallego, J., Portus, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain): the example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.* 83, 87–97.
- França, L.J.O., Alves, L.C., Silva, G.A.V., França, L.M.O., Brito, F.L.C., Peixoto, M.A., Nascimento, E.M.F., 2003. Freqüência da leishmaniose visceral canina no município de Bezerros, Estado de Pernambuco, Brasil. In: Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária, vol. 5, Recife. Anais. Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária, pp. 363–364.
- França-Silva, J.C., da Costa, R.T., Siqueira, A.M., Machado-Coelho, G.L., da Costa, C.A., Mayrink, W., Vieira, E.P., Costa, J.S., Genaro, O., Nascimento, E., 2003. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 111, 161–173.
- Gradoni, L., 1999. Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe. In: Killick-Kendrick, R. (Ed.), *Canine Leishmaniasis: An Update*. Hoechst Roussel Vet, Wiesbaden, pp. 32–36.
- Iverson, L.B., Camargo, M.E., Villanova, A., Reichmann, M.I.A.B., Anarade, E.A., Tolenzano, J.E., 1983. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana no Município de São Paulo, Brasil (1979–1982). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 25, 310–317.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279–289.
- Lainson, R., Rangel, E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100, 811–827.
- Lanotte, G., Rioux, J.A., Crosset, H., Völlhardt, Y., 1975. Écologie des leishmanioses dans le Sud de la France. VIII Complément à l'application épidémiologique de la technique d'immunofluorescence: les titres géométriques et arithmétiques moyens dans la leishmaniose canine. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 50, 1–5.
- Lima-Júnior, A.D., Alves, L.C., Savani Mouriz, E.S.M., Nicoletti Dória, M.C.G.O., Balduino, S.A., 2000. A survey of canine visceral leishmaniasis in the city of Recife, Northeastern Brazil. In: American Association of Veterinary Parasitologists Annual Meeting, vol. 45, Salt Lake City. Proceedings, American Association of Veterinary Parasitologists, p. 32.
- Lima, R.A., Cavalcanti, M.P., Nakazawa, M., Ferreira, A.G., Silva, E.D., Abath, F.G., Alves, L.C., Souza, W.V., Gomes, Y.M., 2006. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet. Parasitol.* 137, 11–16.
- Manciantù, F., Gradoni, L., Gramiccia, M., Pieri, S., Marconcini, A., 1986. Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trop. Med. Parasitol.* 37, 110–112.
- Mauricio, I.L., Stothard, J.R., Miles, M.A., 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today* 16, 188–189.
- Miranda, S., Roura, X., Alberola, J., Ferrer, L., Ramis, A., 2005. Clinically patent canine leishmaniasis shows age, breed and sex predilection. In: *Worldleish3*, Third World Congress on Leishmaniasis. Palermo-Terrassini Sicily, Italy, 10–15 April, (Abstract book), p. 171.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., Alvar, J., 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 491–493.
- Moreno, J., Alvar, J., 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 18, 399–405.

- Paranhos-Silva, M., Freitas, L.A., Santos, W.C., Grimaldi Jr., G., Pontes-de-Carvalho, L.C., Oliveira-dos-Santos, A.J., 1996. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 39–44.
- Portús, M., Fisa, R., Serra, T., Gállego, M., Mora, R., 1987. Estudios seroepidemiológicos sobre la leishmaniosis canina en Cataluña. *Med. Vet.* 4, 44–48.
- Pozio, E., Gradoni, L., Bettini, S., Gramiccia, M., 1981. Leishmaniosis in Tuscany (Italy). VI. Canine leishmaniosis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop.* 38, 383–393.
- Reithinger, R., Quinnell, R.J., Alexander, B., Davies, C.R., 2002. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2352–2356.
- Rosati, S., Ortoffi, M., Profiti, M., Mannelli, A., Mignone, W., Bollo, E., Gradoni, L., 2003. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 1153–1156.
- Sanchez-Robert, E., Altet, L., Sanchez, A., Francino, O., 2005. Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J. Hered.* 96, 755–758.
- Sideris, V.L., Karagouni, E., Papadopoulou, G., Garifallou, A., Dotsika, E., 1996. Canine visceral leishmaniosis in the great Athens area, Greece. *Parasite* 3, 125–130.
- Solano-Gallego, L., Lull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2000. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.* 90, 37–45.
- Vexenat, A.C., Santana, J.M., Teixeira, A.R., 1996. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 38, 177–185.

ANEXO 3**Artigo 2 (publicado na Revista de Patologia Tropical)****SHORT COMMUNICATION**

PHLEBOTOMINE SANDFLIES

OF AN URBAN FOCUS OF

VISCERAL LEISHMANIOSIS,

PERNAMBUCO STATE

Filipe Dantas-Torres,¹ Francisco de Assis Almeida² and Sinval Pinto Brandão-Filho³

ABSTRACT

We have recently found a high prevalence of anti-*Leishmania* antibodies among pet dogs in an urban area of the municipality of Paulista, coast of Pernambuco State, where cases of visceral leishmaniosis have sporadically been reported. In the present communication, preliminary notes on the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Paulista are given.

KEYWORDS: *Lutzomyia longipalpis*. Visceral leishmaniosis. Urban area. Brazil.

Visceral leishmaniosis is by far the most severe form of leishmaniosis and continues to be a serious public health problem worldwide. In the Americas, this zoonosis was previously known as a typically rural disease. In recent years, however, visceral leishmaniosis has become endemic in large urban areas, particularly in Brazil (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006a). In the attempt to improve the current understanding of the epidemiology of visceral leishmaniosis in urban areas of Brazil, we have recently carried out a cross-sectional survey on canine leishmaniosis in the municipality of Paulista, State of Pernambuco, where human cases of visceral leishmaniosis have sporadically been reported. The prevalence of anti-*Leishmania* antibodies among pet dogs was 40.3% (Dantas-Torres et al., 2006), which is the highest reported in Pernambuco (Dantas-Torres, 2006). This is of particular concern, because dogs are the principal domestic reservoir hosts of the aetiological agent of visceral leishmaniosis. From 1990 to 2001, a total of 30 cases

1 Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

2 Fundação Nacional de Saúde (FNS), Coordenação Regional de Pernambuco.

Financial support: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)

Corresponding address: Sinval P. Brandão-Filho, Departamento de Imunologia, CPqAM/FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Campus UFPE, CEP 50670-420, Recife, Pernambuco. E-mail: sinval@cpqam.fiocruz.br

Recebido para publicação em 5/5/2006. Revisto em 15/9/2006. Aceito em 20/9/2006.

of visceral leishmaniosis was reported in Paulista (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006b). Although *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) is known to occur in this area (Dantas-Torres et al., 2004), information about the phlebotomine sandfly fauna of Paulista is scarce. This preliminary note describes the phlebotomine sandfly collected in this municipality of Pernambuco.

Paulista (latitude 07°56'27"S, longitude 34°52'23"W, altitude 13 m) is located in the metropolitan region of Recife (Figure 1), the most highly urbanized area of Pernambuco. The climate is tropical with the rainy period concentrated in autumn and winter (February to June). Average annual air temperature is 25.8°C, varying from 24 to 26°C. Relative air humidity ranges from 72.5 to 85% and the annual pluviometric index is often over than 1,600mm. Total land area of Paulista is about 94 sq km. Although the vegetation coverage is scanty, there are some small areas of residual secondary forest and some fruit trees, mainly banana plants.

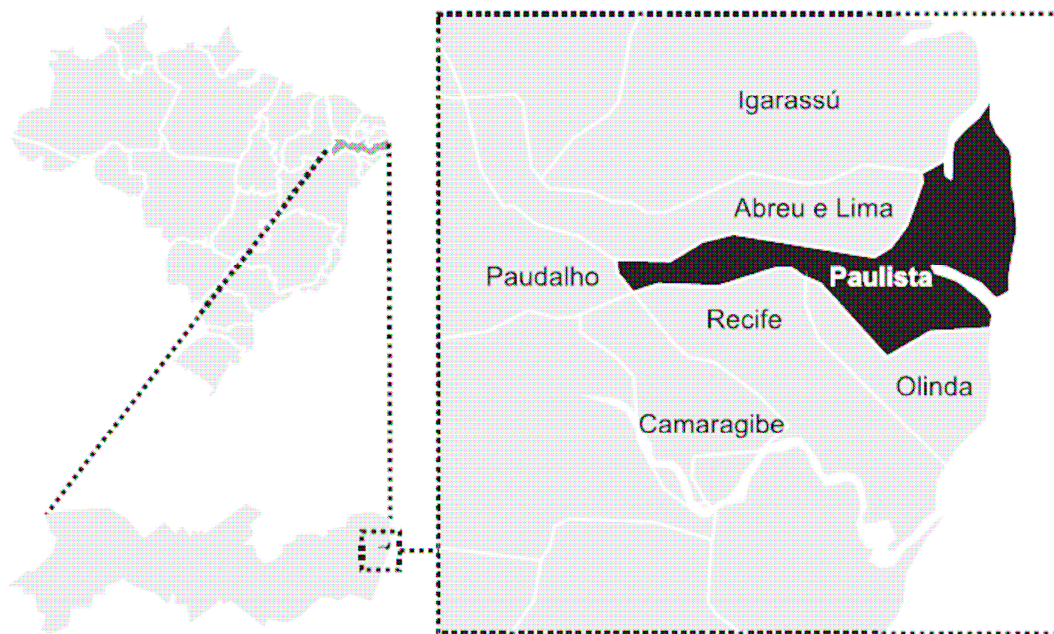


Figure 1. Location of the study area.

Prior to the phlebotomine sandfly collections, five houses were selected based on the following criteria: their proximity to residual secondary forests, presence of domestic dogs and livestock in the backyards, and their proximity to houses where cases of visceral leishmaniosis have recently been reported. CDC light traps were placed at a height of one meter above the ground level, both inside and outside the houses selected (close to animal shelters). The traps were operated between 6:00 pm and 6:00 am. Manual collections were also carried out. In this case, we spent 15–20 minutes inside and outside of each house, between 6:00 and 8:00 pm. The collections of phlebotomine sandflies took place every first week of each month, during three consecutive days, from October 2005 to January 2006. All

the specimens captured were kept in 70% alcohol until processing for identification, according to traditional taxonomic keys for New World phlebotomine sandflies (Young & Duncan, 1994).

All phlebotomine sandflies captured were identified as *Lutzomyia longipalpis*, which is the principal vector of the causal agent of visceral leishmaniasis in the New World (Lainson & Rangel, 2005). *Lutzomyia longipalpis* was found in all the houses where the collections were carried out. Since this is a preliminary study and the number of specimens per collection was very low (n = 86), no further quantitative data were provided.

Most of the specimens collected were males (2 females/84 males). No phlebotomine sandfly was collected inside the houses, indicating some degree of exophily, exophagy or both. In the manual collections, most of the specimens were collected on horses and in the walls of chicken houses, which are frequently found in the backyards of houses in the area studied. According to our field observations, horses were the blood source most preferable by *Lutzomyia longipalpis*. Likewise, hens appeared to be highly attractive to the phlebotomine sandflies. In previous studies on visceral leishmaniasis in urban areas of Brazil, the proximity of hen houses has been seen as a possible environmental risk factor for the disease in humans (Arias et al., 1996). Chickens are undoubtedly attractive for females of *Lutzomyia longipalpis*. On the other hand, chickens are unable to sustain infections with *Leishmania* parasites. For this reason, the relationship between chicken raising and visceral leishmaniasis is still not well understood (Alexander et al., 2002).

In the houses where the captures were made, the soil was rich in organic matter, such as the feces of livestock and garbage. Furthermore, the soil is poorly drained and retains some humidity throughout the year. These conditions are important for the establishment of phlebotomine sandfly populations (Killick-Kendrick, 1999; Feliciangeli, 2004). The soil of animal shelters is a well known ecotope for immature stages of certain species of phlebotomine sandflies, such as *Lutzomyia longipalpis* (Feliciangeli, 2004). There is a small secondary forest next to the five selected houses. Some of these houses were built almost within the forest. There appears to be some relationship between sites with *Lutzomyia longipalpis* and forest closeness (Lainson & Rangel, 2005).

Despite its urban features, Paulista still retains some rural characteristics, such as the presence of livestock in the backyards, and small areas of residual secondary forest, favoring the establishment of phlebotomine sandfly populations throughout the year. In view of the high seroprevalence of canine leishmaniasis (Dantas-Torres et al., 2006) and the poor living conditions of certain communities (e.g., Tururu) of Paulista, the present results indicate that there is a risk of future outbreaks of visceral leishmaniasis in the municipality of Pernambuco.

Further studies focusing on the seasonality of the phlebotomine sandfly fauna of Paulista and its natural infection rate should be undertaken. It is important to verify the prevalence of *Leishmania* infection in pet and stray dogs and also to

identify the species of *Leishmania* circulating within this canine population. Finally, a monitoring system ought to be implemented to diagnose human cases of visceral leishmaniasis in order to provide them all with early treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the Secretaria Municipal de Saúde of Paulista and the Secretaria Estadual de Saúde of Pernambuco for their help with the field collections. The first author is receiving a scholarship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

Flebotomíneos de um foco urbano de leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco.

Em estudo recente, detectamos uma elevada prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* entre cães domiciliados numa área urbana do município de Paulista, litoral do Estado de Pernambuco, onde casos humanos de leishmaniose visceral têm sido esporadicamente registrados. Na presente comunicação, são fornecidas notas preliminares sobre os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de Paulista.

DESCRITORES: *Lutzomyia longipalpis*. Leishmaniose visceral. Área urbana. Brasil.

REFERENCES

1. Alexander B, De Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis* 8: 1480-1485, 2002.
2. Arias JR, Monteiro OS, Zicker F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis* 2: 145-146, 1996.
3. Dantas-Torres F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Rev Saude Publica* 40: 537-541, 2006.
4. Dantas-Torres F, Francisco D, Brandão-Filho SP. Análise situacional da leishmaniose visceral no município de Paulista, Pernambuco, nordeste do Brasil. In: Congresso Norte Nordeste de Zoonoses e Bem Estar Animal, 1., 2004, Natal. *Anais...* Secretaria Municipal de Saúde, 2004. CD-ROM.
5. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 48: 151-156, 2006a.
6. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 352-356, 2006b.
7. Dantas-Torres F, Brito MEF, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol* 140: 54-60, 2006.
8. Feliciangeli MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 18: 71-80, 2004.
9. Killick-Kendrick R. The biology of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* 17: 279-289, 1999.
10. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 811-827, 2005.
11. Young GD, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, The West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Ent Inst* 54: 1-881, 1994.

ANEXO 4**Artigo 3 (publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical)**

ARTIGO/ARTICLE

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39(4):352-356, jul-ago, 2006

**Expansão geográfica da leishmaniose visceral
no Estado de Pernambuco**Geographical expansion of visceral leishmaniasis
in the State of PernambucoFilipe Dantas-Torres¹ e Sinval P. Brandão-Filho¹**RESUMO**

Este estudo visa demonstrar a expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, Brasil. A partir do número de casos notificados de 1990 a 2001, foram elaborados mapas temáticos sobre a evolução bi-anual da distribuição geográfica da leishmaniose visceral por município. Por fim, foi construído um mapa da distribuição cumulativa dos casos registrados durante o período estudado. De 1990 a 2001, foram notificados 1.737 casos de leishmaniose visceral em Pernambuco. Em 1990, apenas 15,2% (n = 28) dos municípios haviam registrado casos, enquanto, após pouco mais de uma década, esse percentual elevou-se para 78,3% (n = 144). A distribuição geográfica cumulativa demonstra uma clara concentração de casos no Agreste e no Sertão. Houve uma considerável expansão geográfica da leishmaniose visceral em Pernambuco, refletindo, provavelmente, o baixo impacto das atuais medidas de controle e é possível que se deva também à melhoria do sistema de notificação.

Palavras-chaves: Leishmaniose visceral. Distribuição. Urbanização. Epidemiologia.

ABSTRACT

This study aimed to demonstrate the geographical expansion of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. With data on the number of visceral leishmaniasis cases notified from 1990 to 2001, maps showing the biannual evolution of the geographical distribution of the disease per municipality were elaborated. A map of the cumulative geographical distribution of the cases registered during the whole period was also constructed. From 1990 to 2001, 1,737 cases of visceral leishmaniasis were notified in Pernambuco. In 1990, 15.2% (n = 28) of the municipalities notified cases of the disease. In contrast, this percentage increased to 78.3% (n = 144), over an eleven-year period. The map of cumulative geographical distribution during the whole period shows a notable concentration of cases in Agreste and Sertão. A notable geographical expansion of visceral leishmaniasis in Pernambuco also occurred, probably reflecting the low impact of the current control measures and, possibly, an improvement in the notification system.

Key-words: Visceral leishmaniasis. Distribution. Urbanization. Epidemiology.

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) apresenta uma ampla distribuição geográfica, além de alta letalidade, quando não instituído o tratamento adequado em tempo hábil. Associado ao seu espectro de morbidade, esta zoonose é causada por um protozoário de ciclo biológico complexo, o que a torna uma enfermidade de grande magnitude e de baixa vulnerabilidade às atuais medidas de controle. A escassez de recursos e a atual falta de infra-estrutura dos serviços de saúde, especialmente no que concerne ao diagnóstico da infecção

por *Leishmania chagasi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), na população canina e humana, tornam as atuais medidas de controle pouco factíveis. Esse quadro vem se constituindo como um paradigma, favorecendo a perpetuação do ciclo vicioso entre pobreza e doença em muitos estados brasileiros, nos quais a LV permanece como mais uma doença negligenciada. Em resposta a este cenário desfavorável, têm sido empreendidos vários esforços na tentativa de definir uma nova abordagem mais efetiva para o controle da doença no Brasil⁶.

1. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. Sinval Pinto Brandão-Filho. CPqAM/FIOCRUZ, Campus UFPE, Av Moraes Rego s/n, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

Tel: 55 81 2101-2562; Fax: 55 81 3453-2449

e-mail: sinval@cpqam.fiocruz.br

Recebido para publicação em 19/9/2005

Aceito em 15/5/2006

Atualmente, a LV é considerada endêmica em 19 estados do país, destacando-se aqueles da região Nordeste, responsáveis pela maior parte dos casos notificados¹². Sobretudo nos últimos 20 anos, a doença difundiu-se e tornou-se cada vez mais comum em áreas urbanas ou periurbanas^{5 7 13 14 20}. No Estado de Pernambuco, a situação não parece ser diferente. O paradigma da *endemia rural* é substituído pelo da doença associada a modificações ambientais, à ocupação desordenada do espaço urbano e às precárias condições de vida da população exposta ao risco. Logo, seja no espaço rural ou urbano, a LV amplia sua área de ocorrência, ultrapassando antigos limites geográficos definidos e tornando-se um sério problema de saúde pública em praticamente todo território pernambucano.

Assim, o objetivo do presente estudo é demonstrar a evolução da distribuição geográfica da LV no Estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo. O Estado de Pernambuco está localizado no centro-leste da região Nordeste do Brasil, possui um território de 98.938km² e é constituído por 184 municípios, somando-se a esses o arquipélago de Fernando de Noronha, os quais estão distribuídos em cinco mesorregiões geográficas: Região Metropolitana de Recife, Zona da Mata, Agreste, Sertão e Sertão do São Francisco (Figura 1). Com uma população de 7.918.344 habitantes, Pernambuco tem passado por um intenso processo de urbanização, claramente refletido na representatividade de sua população urbana, 6.058.249 habitantes, que em 2000 correspondia a 76,5% da população total.

Fonte de dados e construção dos mapas temáticos.

Os dados referentes aos casos de LV, notificados no período de 1990 a 2001, foram fornecidos pela Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco (SES-PE). A partir do valor bruto do total de casos notificados, foram construídos mapas temáticos que demonstram a evolução bi-anual da distribuição geográfica da LV por município. Também, foi elaborado um mapa da distribuição geográfica cumulativa dos casos notificados durante todo o período de estudo (1990-2001). Para construção dos mapas temáticos, foi utilizado o programa TerraView (release 3.0.3, INPE, Brasil), tomando-se como base cartográfica o mapa de Pernambuco, disponibilizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

RESULTADOS

De acordo com os dados da SES-PE, foram notificados 1.737 casos de LV em Pernambuco, entre 1990 e 2001. No início do período estudado (1990), apenas 15,2% (n = 28) dos municípios do estado haviam notificado um ou mais casos da doença. Ao final do período (1990-2001), esse percentual elevou-se para 78,3% (n = 144). Os municípios com maior número de casos notificados, ao longo do período estudado, encontram-se listados na Tabela 1.

A Figura 2 representa a evolução bi-anual da distribuição geográfica dos casos de LV notificados em Pernambuco. De 1990 a 1991 (Figura 2A), houve um predomínio de casos no Sertão e no Agreste, havendo, contudo, registro de casos em outras regiões, notadamente na Região Metropolitana do Recife. Nos dois anos seguintes (Figura 2B), o quadro não foi

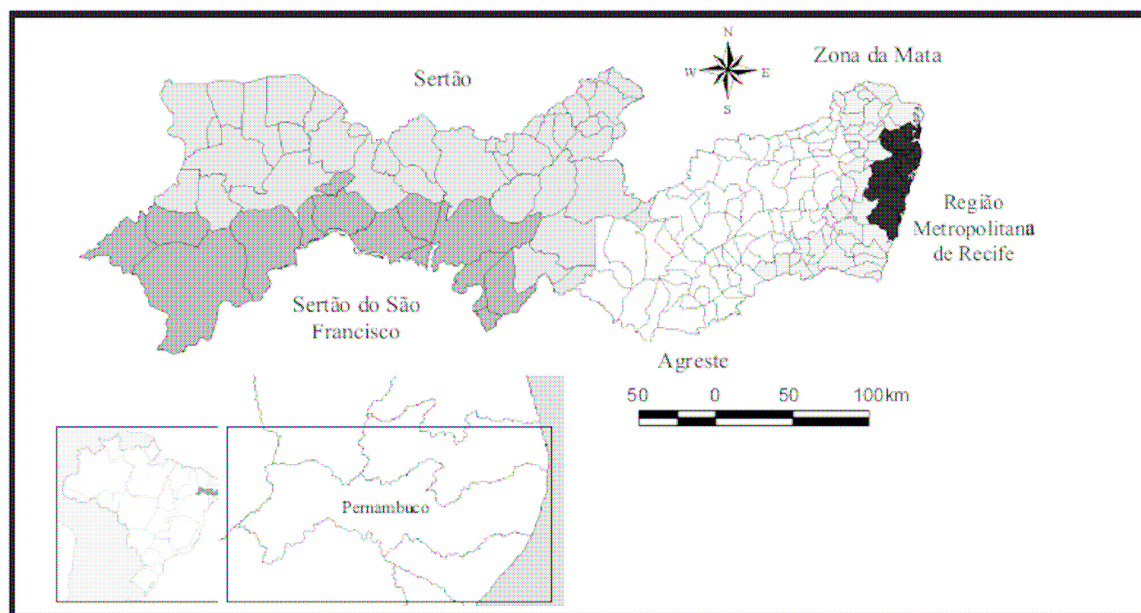


Figura 1 - Regiões geográficas do Estado de Pernambuco, Brasil.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39(4):352-356, jul-ago, 2006

muito diferente, observando-se apenas uma discreta redução do número de casos registrados no estado como um todo. Já no período de 1994 a 1995 (Figura 2C), ocorreu uma situação bem diferente: o número de casos notificados nesse período supera o quantitativo registrado nos últimos quatro anos. Houve um aumento importante do número de casos em todas as regiões de Pernambuco, mormente no Agreste. No período de 1996 a 1997 (Figura 2D), houve uma nova redução do número de casos notificados no estado, permanecendo, contudo, uma discreta concentração de casos no Agreste. Esta concentração acentuou-se no período de 1998 a 1999 (Figura 2E), com a formação de um *cluster* em volta do município de Caruaru. Nos dois últimos anos do período estudado (Figura 2F), ocorreu um notável aumento do número de casos notificados, em todas as regiões de Pernambuco, com a re-emergência de antigos focos da doença, assim como emergência de novos, a exemplo do município de Petrolina, localizado no Sertão do São Francisco.

O mapa da distribuição geográfica cumulativa dos casos de IV notificados em Pernambuco, durante todo o período estudado (Figura 3), demonstra uma clara concentração de casos em municípios do Agreste e do Sertão. Entretanto, alguns municípios de outras regiões, tais como Itamaracá na Região Metropolitana do Recife, destacaram-se entre aqueles que mais notificaram casos, ao longo do período estudado.

Tabela 1 - Municípios que mais notificaram casos de leishmaniose visceral em Pernambuco, Brasil, 1990-2001.

Município	Casos notificados	
	n ^o	%
Caruaru	165	17,2
Ilha de Itamaracá	102	10,6
Salgueiro	74	7,7
Alinho	65	6,8
Surubim	63	6,5
São Caitano	51	5,3
Goiana	44	4,6
São Vicente Ferrer	42	4,4
Petrolina	42	4,4
Riacho das Almas	38	4,0
Serra Talhada	35	3,6
São Bento do Una	31	3,2
Paulista	30	3,1
Vertentes	28	2,9
Taquaritinga do Norte	27	2,8
Frei Miguelinho	27	2,8
Agrestina	25	2,6
Cachoeirinha	25	2,6
Glória do Goitá	25	2,6
Águas Belas	23	2,4
Total	962	100,0

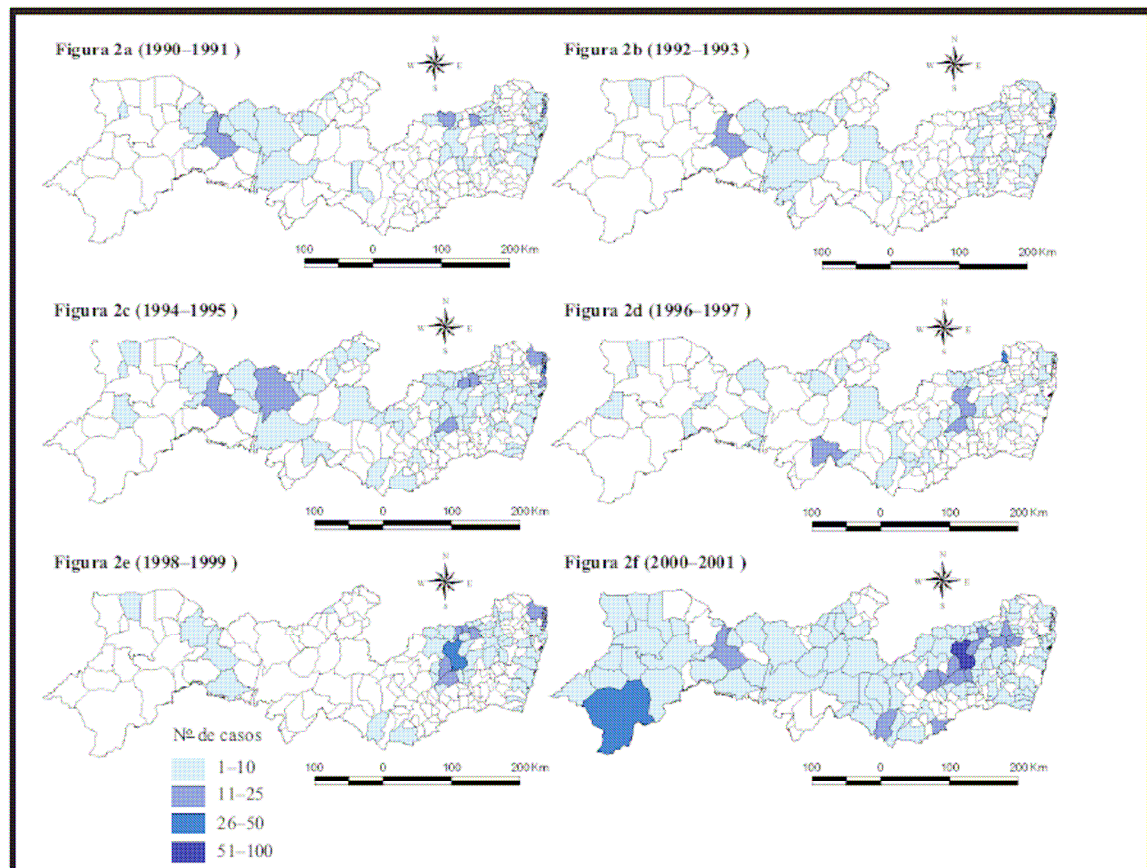


Figura 2 - Evolução bi-anual da distribuição geográfica dos casos de leishmaniose visceral notificados em Pernambuco, Brasil, 1990-2001.

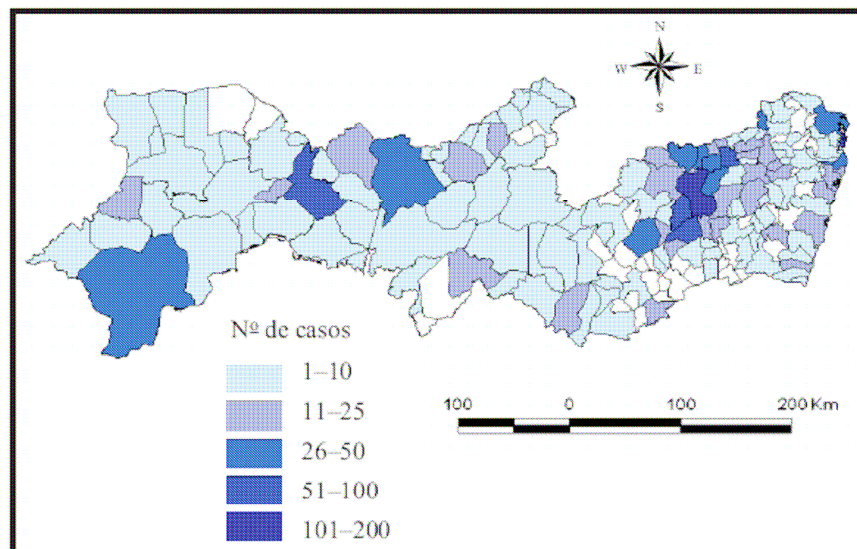


Figura 3 - Distribuição geográfica cumulativa dos casos de leishmaniose visceral notificados em Pernambuco, Brasil, 1990-2001.

DISCUSSÃO

O estudo da distribuição geográfica, seja ele analítico ou essencialmente descritivo, tem sido ferramenta largamente utilizada em estudos epidemiológicos, inclusive, relacionados à LV^{2,3,16,17,21}. Esses estudos, notadamente quando são aplicadas técnicas de análise espacial, permitem identificar padrões espaciais de morbidade e/ou mortalidade e possíveis fatores associados, bem como descrever o processo de difusão das doenças, gerando informações sobre a gênese dos agravos que acometem determinadas populações, objetivando sua predição, prevenção e controle¹⁵. O presente estudo demonstra que houve uma acentuada expansão geográfica da LV em Pernambuco, entre 1990 e 2001. Além do surgimento de novos focos, foi observada a persistência das antigas áreas de ocorrência da doença. Isso demonstra, no mínimo, que as atuais medidas de controle estão sendo insuficientes, seja para controlar a LV nas áreas endêmicas, seja para prevenir a ativação, ou reativação, de focos em áreas até então consideradas indenes.

No período estudado, a LV difundiu-se não só nas áreas clássicas do Agreste e Sertão, onde está concentrado um número importante de casos, mas também em outras regiões, notadamente na Região Metropolitana de Recife. Diversos fatores podem ter contribuído para a disseminação da doença em Pernambuco. Dentre estes, podemos destacar o intenso fluxo migratório intermunicipal, sobretudo do interior do estado para a Região Metropolitana de Recife, mas também no sentido inverso. Estes movimentos populacionais permitem tanto a introdução do agente causador da LV em áreas livres, quanto à inserção de indivíduos susceptíveis em áreas endêmicas. Muitas famílias vindas do interior se estabelecem na periferia das cidades de médio e grande porte, formando aglomerados densamente povoados que apresentam precárias condições de infra-estrutura e saneamento básico. Com efeito, observa-se a presença de crianças que, em geral, devido

à seca que devasta o interior do estado, periodicamente, apresentam-se mal nutridas, condição esta que favorece sobremaneira a expressão e o agravamento da LV. Já foi previamente demonstrado que, nestas condições, com a presença de um grande contingente de hospedeiros susceptíveis, a doença pode assumir caráter epidêmico^{1,5,7,13}.

Certamente, outros fatores devem ter influenciado o processo de expansão geográfica da LV em Pernambuco. Em Petrolina, foi demonstrado que a organização do espaço urbano pode influenciar enormemente a expansão da doença⁴. No Estado de Pernambuco, de fato, a maioria dos casos parece está associada a pressão antrópica sobre o ambiente e ocupação desordenada do espaço físico¹⁹. Outro aspecto importante a ser considerado é a notável capacidade de domiciliação do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), o qual atualmente pode ser encontrado em praticamente todo território pernambucano.

Como já demonstrado em outros estados, a distribuição geográfica da LV em Pernambuco reforça a superação do paradigma da doença *tipicamente rural*. Neste estado, o ciclo zoonótico da LV encontra-se claramente estabelecido em áreas urbanas e periurbanas, como nos municípios de Petrolina⁴ e Paulista¹¹. Contudo, nas áreas rurais, onde as precárias condições de vida da população são importantes determinantes do processo saúde-doença, assim como em áreas urbanas, a LV permanece como uma doença negligenciada, acometendo principalmente crianças¹⁹, sobretudo as mal nutridas¹⁸.

Devemos destacar algumas limitações observadas no presente estudo. Como já foi dito, os casos aqui incluídos correspondem a dados secundários da SES-PE. Observa-se em Pernambuco, de forma geral, algumas dificuldades em relação ao diagnóstico da LV. Portanto, é possível que, ao longo do período estudado, alguns casos não tenham sido notificados por falta de diagnóstico e, conseqüentemente, a real magnitude do problema tenha sido subestimada. Além disso, foram incluídos casos registrados

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39(4):352-356, jul-ago, 2006

em municípios como Recife, onde a presença de *Lutzomyia longipalpis* ainda não foi claramente demonstrada, sendo estes certamente alóctones^{8,9,10}. É preciso lembrar ainda que, uma vez que a população dos municípios pode variar enormemente, o valor bruto do total de casos apenas nos informa quais municípios notificaram, não sendo suficiente para indicar se houve maior ou menor risco à infecção e ao adoecimento em cada município.

Apesar das eventuais limitações, o presente trabalho demonstra categoricamente uma acentuada expansão geográfica da LV em Pernambuco. Serve ainda de alerta para a necessidade de novas investigações sobre o tema, com ênfase na definição das áreas de risco e na avaliação do real impacto das atuais estratégias de controle sobre a incidência da doença na população.

AGRADECIMENTOS

À Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, por ceder gentilmente os dados e pelo apoio logístico que tem prestado ao nosso grupo do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, durante as pesquisas sobre as leishmanioses em Pernambuco. Ao Dr. Wayner Vieira de Souza pelas opiniões e a José Constantino Silveira Júnior pelo apoio na elaboração dos mapas temáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias JR, Monteiro PS, Zicker F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 2:145-146, 1996.
- Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* 53:1-8, 2001.
- Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spínola RME, Cruz OG. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cadernos de Saúde Pública* 17:1263-1267, 2001.
- Cesse EAP, Carvalho EE, Andrade PP, Ramalho WM, Luna L. Organização do espaço urbano e expansão do calazar. *Revista Brasileira de Saúde Materna e Infantil* 1:167-176, 2001.
- Costa CHN, Pereira HE, Araújo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Revista de Saúde Pública* 24:361-372, 1990.
- Costa CHN, Vieira JBE. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34:223-228, 2001.
- Costa JML, Viana GMC, Saldanha ACR, Nascimento MDSB, Alvim AC, Burattini MN, Silva AR. Leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. *Cadernos de Saúde Pública* 11:321-324, 1995.
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. A leishmaniose visceral é uma doença endêmica no Recife, Pernambuco? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38:361-362, 2005.
- Dantas-Torres F, Faustino MAG, Alves LC, Acioli R, Lima OC. Classificação do município do Recife quanto à transmissão da leishmaniose visceral canina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 13 (supl 1):234, 2004.
- Dantas-Torres F, Faustino MAG, Lima OCC, Acioli RV. Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38:444-445, 2005.
- Dantas-Torres F, Francisco D, Brandão-Filho SP. Análise situacional da leishmaniose visceral no município de Paulista, Pernambuco, nordeste do Brasil. *In: Resumos do I Congresso Norte-Nordeste de Zoonoses e Bem Estar Animal*, Natal, 1 CD-ROM, 2004.
- Gontijo CME, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7:338-349, 2004.
- Jerônimo SMB, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, Luz KG, Fernandes MZ, Jernigan J, Pearson RD. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88:386-388, 1994.
- Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral AL, Fiuza VO, Rabello A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolatividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34:249-254, 2001.
- Medronho RA, Werneck GL. Técnicas de análise espacial em saúde. *In: Medronho RA (org) Epidemiologia*. Atheneu, São Paulo p.427-446, 2004.
- Mendes WS, Silva AAM, Trovão JR, Silva AR, Costa JML. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35:227-231, 2002.
- Oliveira CDL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. *Cadernos de Saúde Pública* 17:1231-1239, 2001.
- Queiroz MJA, Alves JGB, Correia JB. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. *Jornal de Pediatria* 80:141-146, 2004.
- Silva DE, Vasconcelos SD. A ten year (1990-1999) survey on leishmaniasis incidence in Pernambuco state, northeastern Brazil. *Revista de Patologia Tropical* 32:51-61, 2002.
- Silva ES, Gontijo CME, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96:285-291, 2001.
- Werneck GL, Maguire JH. Spatial modeling using mixed models: an ecologic study of visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 18:633-637, 2002.