



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO



PPGCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA ANIMAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ANDREA TELES DOS REIS

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, ESPACIAL, MOLECULAR E SOROLÓGICO
DE *Leishmania infantum* EM CÃES DOMÉSTICOS NO MUNICÍPIO DE
BELÁGUA, CERRADO MARANHENSE**

SÃO LUÍS

2021

ANDREA TELES DOS REIS

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, ESPACIAL, MOLECULAR E SOROLÓGICO
DE *Leishmania infantum* EM CÃES DOMÉSTICOS NO MUNICÍPIO DE
BELÁGUA, CERRADO MARANHENSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva, Conservação e Reprodução Animal

Linha de pesquisa: Epidemiologia e Controle de Doenças dos Animais e Microbiologia dos Alimentos.

Orientadora: Prof^ª Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira

SÃO LUÍS

2021

ANDREA TELES DOS REIS

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, ESPACIAL, MOLECULAR E SOROLÓGICO
DE *Leishmania infantum* EM CÃES DOMÉSTICOS NO MUNICÍPIO DE
BELÁGUA, CERRADO MARANHENSE**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira (Orientadora)
(Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA/UEMA)

Profa. Dra. Joicy Cortez de Sá (1º Membro)
(Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana - UNICEUMA)

Prof. Dra. Andréa Pereira da Costa (2º Membro)
(Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA/UEMA)

Reis, Andrea Teles dos.

Estudo epidemiológico, espacial, molecular e sorológico de *Leishmania infantum* em cães domésticos no município de Belágua, cerrado maranhense / Andrea Teles dos Reis. – São Luís, 2021.

67 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2021.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira.

Elaborado por Giselle Frazão Tavares - CRB 13/665

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por sempre iluminar meu caminho, me abençoando e me dando forças em todos os momentos da minha vida.

A minha mãe, por ser a melhor que alguém poderia ter. Por todos os ensinamentos, carinho e por sempre acreditar em mim. Meu espelho de vida: “Tenha coragem e seja gentil”.

À minha família, fonte de amor. Meus irmãos, Fernando e Rodrigo, meus sobrinhos Ísis e Samuel, aos meus primos Amanda, João Neto e Rafaela, as minhas tias Josiane e Claudia. Muito obrigada pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim! Meu amor de sempre e para sempre! *In Memoriam*: Maria do Carmo Teles Cabral e Maria do Socorro Teles.

As minhas amigas Carla Fernanda, Thais Bastos e Raynara Fernanda que sempre me apoiaram, por tantos momentos divididos, tanto de angústias como de vitórias, que tornaram minha jornada mais leve, carrego para vida como um grande presente.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, pela oportunidade oferecida para a realização desse mestrado.

À minha orientadora, Prof.^a Rita Seabra, por todo ensinamento, incentivo e sempre acreditar em meu potencial, e por todos os momentos de descontração na PPG. Sem seu apoio e dedicação não seria possível a realização deste trabalho. Muito obrigada! Gratidão!

A Prof.^a Andrea Costa, pela co-orientação, disponibilidade, profissionalismo e amizade. Sem a sua participação e orientação esse trabalho não ficaria completo. Sou muito grata por ter aprendido tanto com você. E ao Prof. Francisco Costa “Xico” que sempre esteve presente da forma que pôde para auxiliar nas dúvidas e enriquecer nosso trabalho com

seu grande conhecimento. Obrigada pela disposição em sempre ajudar e contribuir com o trabalho.

Ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz pelo antígeno para o teste. E ao Prof. Hamilton Pereira dos Santos por colaborar nessa pesquisa disponibilizando o laboratório de Imunodiagnóstico. Muito obrigada!

À ArtGeo em especial a Admo Júnior, pela paciência, dedicação e pelo conhecimento compartilhado, contribuindo com a elaboração do meu mapa. Muito obrigada!!

Aos professores, estagiários, colegas e funcionários do LAMP que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que de uma maneira contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído. Obrigada!

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime,
pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

RESUMO

A leishmaniose visceral canina é um grave problema de saúde pública. A doença se desenvolve em uma dinâmica complexa que relaciona fatores ambientais, biológicos e ecológicos que permitem a interação entre o parasita, o vetor e o hospedeiro além de fatores socioeconômicos. Objetivou-se realizar um estudo epidemiológico, espacial, molecular e sorológico de *Leishmania infantum* em cães domésticos no município de Belágua, Maranhão. Foram coletadas 205 amostras de sangue de cães, aplicados questionários aos proprietários, para obtenção de dados epidemiológicos e fatores de risco da zoonose na região, e obtidas as coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras para realização do mapa de risco da doença no município. Para o diagnóstico sorológico da infecção por *Leishmania infantum* as amostras foram submetidas à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), e o DNA extraído para a realização da reação em cadeia da polimerase convencional (PCR), para a investigação molecular. Do total de amostras coletadas, 122 (59,51%) foram soropositivos para *Leishmania infantum* na RIFI, com títulos variando de 80 a 1.280 e um cão apresentou-se positivo no teste de PCR, sendo também sororeagente na RIFI. Na avaliação clínica foi observado que dos cães soropositivos 112 (91,80%) eram sintomáticos e 10 (5,46%) assintomáticos. Na análise espacial, o estimador de densidade Kernel permitiu determinar o local de maior risco para a ocorrência da doença, sendo que as áreas com maior concentração de casos estão nos bairros com grande número de habitações precárias e falta de saneamento básico. Constatou-se que há associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a variável de matéria orgânica no ambiente. Este é o primeiro relato da ocorrência de *L. infantum* em cães no município de Belágua, pelos resultados obtidos, constatou-se que a leishmaniose visceral canina está presente no município, colocando em risco crescente a população humana.

Palavras chaves: Diagnóstico, Leishmaniose visceral canina, Maranhão.

ABSTRACT

Leishmaniosis is a great public health. The disease develops in a complex dynamics that involves environmental, biological and ecological factors that allow the interaction between the parasite, the vector and the host, besides socio economic factor. The objective was to perform an epidemiological, spacial, molecular and serological study of *Leishmania infantum* in domestic dogs in the municipality of Belágua, located in Maranhão state. A total of 205 blood samples were collected, questionnaires were applied to the owners in order to obtain epidemiological data and risk factors of this zoonosis and geographic coordinates of the site of samples collection to make a risk map of the disease. For serological diagnosis the samples were submitted to the Indirect Immunofluorescence Test (IFAT), and DNA was extracted to perform the Polymerase Chain Reaction (PCR) for molecular investigation. From the total of samples collected 122 (59.51%) were seropositives for *Leishmania infantum* by IFAT, with titer varying from 80 to 1.280. One dog was positive for IFAT and PCR. In the clinical evaluation it was observed that from the seropositives dogs, 112 (91.80%) were symptomatic e 10 (5.46%) were asymptomatic. In the special analysis, the Kernel density estimator allowed to determine the local major risk for the disease occurrence being the areas of greater concentration of cases were in the neighborhoods of greater number of precarious houses and with lack of basic sanitation. The results demonstrated an association statistically significant ($p < 0.05$) for the variable presence of organic matter in the environment. This is the first report of *L. infantum* in dogs in the municipality of Belágua and it is important since it could be an increasing risk for human infection.

Keywords: Diagnosis, Canine visceral leishmaniasis, Maranhão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de casos de Leishmaniose Visceral no mundo.....	16
Figura 2. Mapa epidemiológico de distribuição no Brasil da Leishmaniose visceral, divididos por Unidades Federativas (UFs) mostrando o status de endemidade, no Brasil, em 2018.....	17
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp.....	23
Figura 4. Mapa de localização do município de Belágua, Maranhão.....	32
Figura 5. Mapa de densidade de Kernel com distribuição para casos confirmados por teste sorológico de leishmaniose visceral canina no município de Belágua, Maranhão, Brasil.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise univariada (teste Qui-quadrado) das associações entre variáveis independentes e presença ou ausência de <i>Leishmania infantum</i> por teste sorológico em cães residentes no município de Belágua, Maranhão.....	36
Tabela 2. Análise univariada (teste Qui-quadrado) das associações entre os sinais clínicos e presença ou ausência de <i>Leishmania infantum</i> por teste sorológico em cães residentes no município de Belágua, Maranhão.....	38

LISTA DE SIGLAS

CDC Centro Controle E Prevenção De Doenças

CEEA Comissão de Ética em Experimentação Animal

CBT Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos

DDP Dual Path Platform

DNA Ácido Desoxirribonucleico

EDTA Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (Enzyme-linked immunosorbent assay)

IOC Fiocruz Instituto Oswaldo Cruz

LVC Leishmaniose Visceral Canina

MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS Ministério da Saúde

OMS Organização Mundial da Saúde

PCR Reação da Cadeia de Polimerase

qPCR PCR em tempo real

RIFI Reação de Imunofluorescência

SINAN Sistema de Agravos de Notificação

SIRGAS Sistema de Referência Geocêntrico para as Américas

TAE Tris-Acetato-EDTA

UEMA Universidade Estadual do Maranhão

UTM Universal Transversa de Mercator

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Leishmaniose visceral.....	16
2.1.1 Epidemiologia.....	16
2.1.2 Agente etiológico.....	18
2.1.3 Vetores, Transmissão e Reservatórios.....	20
2.1.4 Ciclo biológico.....	22
2.1.5 Aspectos clínicos.....	23
2.1.6 Diagnóstico.....	24
2.1.7 Medidas de prevenção e controle.....	26
2.1.8 Fatores de risco.....	28
2.1.9 Geoprocessamento como ferramenta de vigilância epidemiológica da Leishmaniose visceral.....	29
3 OBJETIVO.....	31
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos.....	31
4 METODOLOGIA.....	31
4.1 Considerações éticas.....	31
4.2 Área de estudo.....	31
4.3 Inquérito epidemiológico.....	32
4.4 Obtenção das amostras biológicas.....	33
4.5 Testes sorológicos.....	33
4.6 Testes moleculares.....	33
4.7 Georreferenciamento e análise espacial.....	34
4.8 Análise estatística.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
6 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXOS.....	59

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é considerada uma zoonose parasitária de caráter crônico, causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908) (DIAS, 2018), transmitida principalmente pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz; Neiva, 1912) (OLIVEIRA et al., 2013) tendo o cão (*Canis familiaris*) (Lineu, 1758) como principal reservatório em áreas urbanas (WERNECK, 2014), e hospedeiro vertebrado de grande importância na disseminação da doença, por apresentar maior susceptibilidade que outros mamíferos, além de ser o mais próximo da população humana (MORAES, 2016).

Nas Américas, a leishmaniose é considerada grave problema de saúde pública devido a sua magnitude e complexidade clínica, biológica e epidemiológica, afetando predominantemente a população com menor condição sócio-econômica nos países em desenvolvimento (MAIA-ELKHOURY et al., 2016).

A leishmaniose visceral tem ampla distribuição mundial e 97% dos casos no continente americano ocorrem no Brasil, principalmente na Região Nordeste (OPAS, 2020; DO NASCIMENTO, 2021), que tem os maiores índices da doença sendo considerada endêmica com episódios de epidemia, em especial na zona urbana (BATISTA et al., 2014).

No estado do Maranhão, a dispersão de leishmaniose visceral canina e humana está ocorrendo em associação com a degradação ambiental de áreas silvestres devido à urbanização, arborização em quintais, acúmulo de lixo, presença de animais silvestres no perímetro urbano e descontinuidade do serviço das medidas de controle de zoonoses, o que consequentemente favorecem a ocorrência de um aumento no número de criadouros e a proliferação de *Lutzomyia longipalpis* (REBÊLO et al., 1999; COSTA et al., 2015; WERNECK; COUTO, 2018).

Essa expansão vem ocorrendo no espaço e tempo, com aumento do número de municípios afetados e do número de casos e óbitos (CARDIM, 2016; FONTOURA et al., 2016). Dessa forma, o georreferenciamento em saúde tornou-se uma ferramenta essencial para a epidemiologia das doenças de impacto para a saúde pública, a exemplo da leishmaniose visceral (ARAÚJO, 2017; DA PAIXÃO SEVÁ, 2017). O uso de Sistemas de Informação Geográfica (SIG) e ferramentas de análise espacial permitem analisar esse processo, possibilitando a compreensão dos padrões espaciais da distribuição da doença

e identificação de áreas com alto risco para ocorrência de novos casos da doença, direcionando assim as ações e políticas públicas de saúde (MAIA, 2014; CARDIM, 2016; FONTOURA et al., 2016; ARAÚJO, 2017).

Vale ressaltar a importância do avanço nos estudos sobre a doença, principalmente nos municípios do Maranhão, pois o estado é classificado com transmissão intensa, de acordo com a estratificação referente ao período de 2017 a 2019 no Sistema de Agravos de Notificação - MS (SINAM) (BRASIL, 2021). Dessa forma, se faz necessários estudos que nos revele a real situação em alguns municípios maranhenses, onde trabalhos dessa natureza são escassos, a exemplo do município de Belágua, que apresenta baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH). Os dados disponíveis apontam que o município passou de muito baixo (0,320) em 2000, à baixo (0,512) em 2010. Ressalta-se que o município de Chapadinha, região próxima à Belágua possui uma alta prevalência para a doença e, no período de 2010-2019, tiveram 105 casos de leishmaniose visceral humana confirmados notificados no Sistema de Agravos de Notificação - MS (SINAM) (BRASIL, 2020), reforçando ainda mais a necessidade de conhecer a infecção e as condições de sanidade canina no município alvo do estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

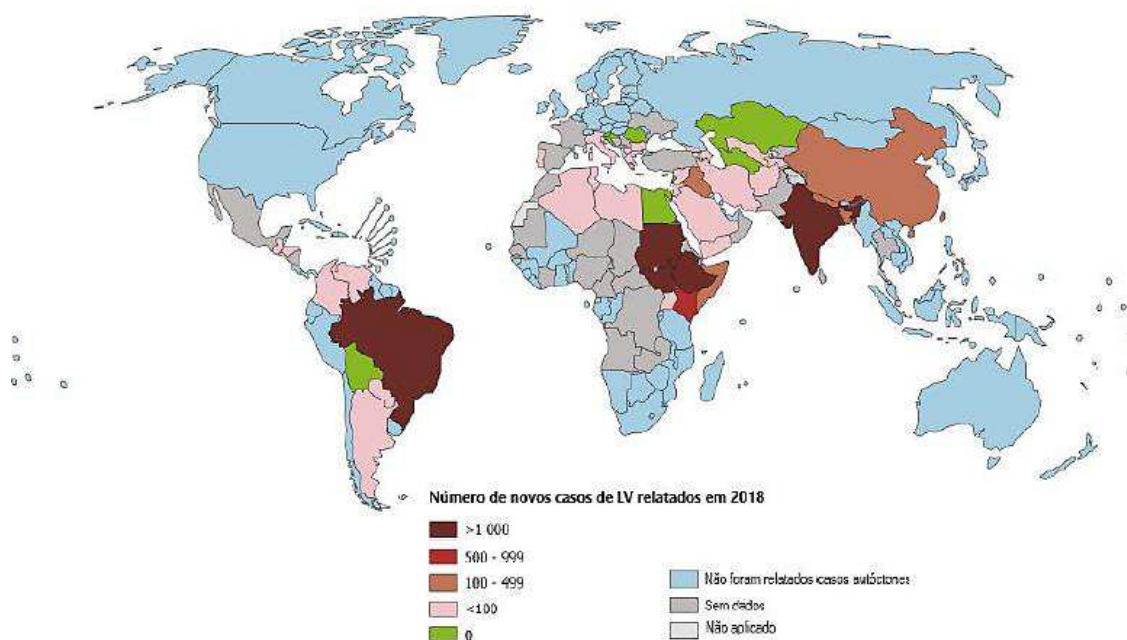
2.1 Leishmaniose visceral

2.1.1 Epidemiologia

A leishmaniose visceral é uma doença negligenciada (WHO, 2018), causada por protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), que causam formas clínicas que afetam a pele, as mucosas e as vísceras, sendo transmitidas aos seres humanos e a animais por meio de flebotomíneos (STEVERDING, 2017; OPAS, 2019). Os cães domésticos são considerados os principais reservatórios de *L. infantum* (BANETH et al., 2008; BRASIL, 2006).

A leishmaniose visceral é a forma clínica mais grave, estima-se que ocorram cerca de 50.000 a 90.000 casos novos da doença anualmente no mundo, dos quais, mais de 95% estão concentrados em dez países: Bangladesh, Brasil, China, Etiópia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2019), conforme mapa representado na figura 1.

Fig 1. Distribuição de casos de leishmaniose visceral no mundo.



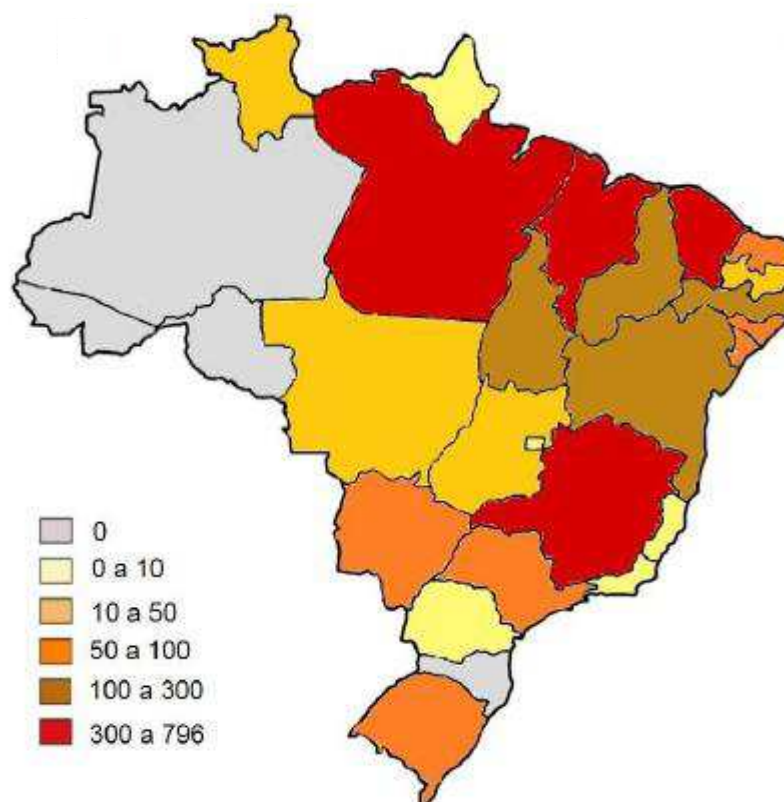
Fonte: Modificado de WHO, 2019.

Nas Américas, a leishmaniose visceral humana é endêmica em 12 países, com 97% dos casos sendo reportados no Brasil, com aproximadamente, 4.200 a 6.300 casos

por ano (OPAS, 2019; WHO, 2020), conforme ilustrado na figura 2. O número de cães infectados no Brasil, possui uma alta prevalência de infecção canina e está associada a um alto risco da doença em humanos (BANETH et al., 2008; BRASIL, 2006; 2017; MARCONDES et al., 2019).

A doença esteve presente nas 5 regiões brasileiras e em 25 das 27 unidades federativas, no período de 2014 a 2018. Neste período, o Nordeste notificou o maior número de casos (9.454), seguida das regiões Sudeste (3.232), Norte (3.043), Centro Oeste (1.042) e Sul (57). O estado com maior registro de caso no período de 2014 a 2018 foi o Maranhão com 2.672 casos (BRASIL, 2020). O Maranhão apresenta uma área endêmica para a leishmaniose visceral humana e canina, com registros de caso desde a década de 80, com graves surtos já relatados (SILVA et al., 2009; SALES et al., 2017).

Fig 2. Mapa epidemiológico de distribuição no Brasil da leishmaniose visceral, divididos por Unidades Federativas (UFs) mostrando o status de endemicidade, no Brasil, em 2018.



Fonte: Modificado de BRASIL, 2020.

De todos os animais identificados como reservatórios da leishmaniose visceral o cão, sob o ponto de vista epidemiológico, é considerado o reservatório doméstico mais importante, sendo um dos alvos do programa de controle da doença no Brasil (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

A prevalência de cães infectados em áreas endêmicas no Brasil é alta, podendo atingir até 60% da população canina em algumas regiões (PALTRINIERI et al., 2016). Estima-se que 80% da população canina infectada permaneça assintomática e, por isso, o papel do cão é primordial na manutenção da endemia em áreas periurbanas (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Esses animais servem de fonte de infecção para o vetor e, muitas vezes, deixam de ser identificados numa população devido à ausência de sintomas, ou ainda, em função de resultados falso-negativos nos exames sorológicos (BANETH et al., 2008), o que torna os cães fontes importantes de infecção para contaminação de vetores, mantendo o ciclo da doença no meio silvestre e no domiciliar (BRASIL, 2014).

Devido à grande quantidade de cães errantes nas cidades, a leishmaniose visceral está se tornando uma doença urbanizada e conseqüentemente, aumenta sua disseminação. A vinda de animais silvestres para as cidades, muitas vezes ligado à destruição de habitats, influencia na epidemiologia da doença, devido esses animais serem reservatórios do parasita (SALES et al., 2017).

Assim, essa enfermidade em franca expansão, tem ganhado destaque no cenário nacional, apontando para a necessidade de novos estudos epidemiológicos da doença; com elementos envolvidos no ciclo de transmissão, tais como os determinantes ambientais, sociais e técnicas de geoprocessamento, buscando conhecer as rotas das espécies que circulam num determinado foco de transmissão, e a relação parasito-hospedeiro (ABRANTES et al., 2018).

2.1.2 Agente etiológico

A leishmaniose visceral é causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, que pertencente a ordem Kinetoplastida e da família Trypanossomatidae (HONIBGERG, 1963; BRASIL, 2006). A ordem Kinetoplastida, apresentam uma região especializada da mitocôndria, que é única nos tripanossomatídeos, denominada cinetoplasto (DEGRAVE et al., 1994; SHAW, 2006; LEVINE et al., 1980).

Há relatos de pelo menos 30 espécies diferentes de *Leishmania* distribuídas pelo Velho e Novo Mundo (LOPES et al., 2016). As espécies de importância em saúde pública estão classificadas dentro dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (AKHOUNDI et al., 2017).

O complexo de importância na infecção visceral é o complexo *L. donovani*, complexo do subgênero *L. (Leishmania)*, presente no continente asiático, *Leishmania (Leishmania) infantum*, presente na Europa e África e *Leishmania (Leishmania) chagasi* nas Américas. A *L. (L.) chagasi* responsável pela doença nas Américas, considerada por alguns autores espécie semelhante a *L. (L.) infantum* (BRASIL, 2006).

No Brasil, a leishmaniose visceral, tanto humana quanto canina, é causada pela *Leishmania infantum* (Novo Mundo), recentemente diferenciada da *Leishmania infantum* (Velho Mundo) através de estudos baseados em relações filogenéticas (MARCILI et al., 2014; ESPINOSA et al., 2018; SILVA et al., 2019). *L. infantum* é um protozoário que compõe um grupo de parasitos intracelulares obrigatórios do sistema fagocítico mononuclear, possuindo formas promastigota (flagelo externo) e amastigota (flagelo interno), que se localizam no tubo digestivo do inseto vetor e nos tecidos de mamíferos vertebrados, respectivamente (BRASIL, 2014; SILVA, 2017).

Em 2005 foi proposta uma nova classificação de eucariotas unicelulares por Adl e cols., revista pelos autores em 2012, atualizando a classificação anterior de Levine e cols. (1980). Esta nova classificação foi elaborada por um comitê de especialistas e chancelada pela “International Society of Protistologists” incluindo, além de protozoários, todos os eucariotas. A proposta de Adl e cols. é baseada na existência de seis “supergrupos” de eucariotas: Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata e Excavata, os quais representariam os grupamentos básicos tradicionais, anteriormente denominados reinos. Neste novo modelo são abandonadas as categorias tradicionalmente utilizadas, tais como classe, subclasse, superordem e ordem (NEVES, 2016).

Segundo esta nova classificação, ao citar uma determinada espécie de protozoário, o nome deve ser acompanhado por dois ou três ranks superiores entre colchetes. No caso da *Leishmania infantum*, o nome deve ser escrito como *Leishmania infantum* [Discoba: Discicristata], que agora pertence ao supergrupo Excavata (ADI; COLS, 2012).

2.1.3 Vetores, Transmissão e Reservatórios

No Brasil, duas espécies vetoras estão relacionadas com a transmissão de *L. infantum*, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938), sendo a primeira como principal transmissora; enquanto a segunda, encontrada apenas nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2014; 2019).

No entanto, um estudo na região da grande São Paulo, onde casos caninos foram relatados na ausência de *L. longipalpis*, apresentaram evidências de *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926) como potencial vetor desse parasita na região (GALVIS-OVALLOS, et al., 2017). Além disso, a espécie *Lutzomyia intermedia* (Lutz; Neiva, 1912) foi recentemente identificada como vetor no litoral do município do Rio de Janeiro, encontrando-se totalmente adaptada ao ambiente antrópico (VIEIRA, 2019). Ainda, é possível que *Lutzomyia migonei* (França, 1920), também participe da transmissão da leishmaniose, devido à sua alta densidade em áreas com ausência de *L. longipalpis*, encontrada em Pernambuco (CARVALHO et al., 2007).

A espécie *L. longipalpis*, pertencente à ordem Diptera, e família Psychodidae, denominado de flebótomos (LEWIS, 1974). Os flebotomíneos são popularmente conhecidos no Brasil como asa branca, asa dura, birigui, frebóti, cangalhinha, mosquito palha, tatuquira entre outros (LIMA, 2014). São insetos pequenos, com coloração castanha clara e com presença de cerdas. Este vetor apresenta muita adaptação em ambientes modificados, sendo encontrado no intradomicílio e peridomicílio (LAINSON; RANGEL, 2005).

As formas imaturas têm habitat terrestre, desenvolvendo-se em locais ricos em matéria orgânica em decomposição, baixa incidência de luz, especialmente de natureza vegetal (AGUIAR et al., 2003; RÊGO, 2013). Além disso, o inseto possui uma atividade crepuscular e noturna. Durante o dia, eles permanecem em repouso, em lugares sombreados e úmidos (BRASIL, 2014). O período de maior densidade populacional dos vetores é observado logo após a estação chuvosa (REGUERA et al., 2016).

Os machos alimentam-se de seiva e néctar de plantas, além de frutas maduras. Já as fêmeas são hematófagas, se alimentando de sangue diferentes tipos de hospedeiros vertebrados para que elas possam fazer o processo de oviposição, contudo apresentam a capacidade de transmissão da doença aos hospedeiros (RANGEL; LAINSON, 2003).

Durante a hematofagia o inseto libera saliva que apresenta diferentes substâncias, tais como anticoagulantes, antiagregantes plaquetários, imunossupressores e vasodilatadores, que além de facilitarem a obtenção de sangue, atuam combatendo reações fisiológicas do hospedeiro como os processos inflamatórios e imunológicos no local da picada (RIBEIRO et al., 1995, KAMHAWI, 2000; BATES, 2007).

Com o desenvolvimento urbano e a necessidade de desmatamento, os flebótomos passaram a conviver em ambientes peri-urbanos e, conseqüentemente, encontraram ambientes propícios para sua sobrevivência, uma vez que o acúmulo de matéria orgânica em áreas verdes urbanas, como praças, parques e margens de córregos oferecem condições ambientais para o seu desenvolvimento e proliferação. A elevação da densidade vetorial propiciada pelas condições citadas, caracteriza um potente fator de risco para a transmissão de leishmaniose visceral no meio urbano (REIS et al., 2017; KUSCHNIR et. al., 2020). A infecção ocorre em áreas urbanas e rurais, o que representa uma ameaça à saúde animal e pública (LIMA et al., 2019).

Mesmo com a dispersão dos flebotomíneos para quase todas as regiões do Brasil, a ausência do vetor em áreas onde existem casos de leishmaniose visceral sugere a existência de outros modos de transmissão da enfermidade (DANTAS- TORRES, 2011). Carrapatos e pulgas têm sido incriminados como possíveis vetores de *L. infantum*, sem comprovação de que de fato sejam, vetores competentes (COUTINHO; LINARDI, 2007; FERREIRA et al., 2009; OTRANTO, 2009; DANTAS-TORRES, 2011; PAZ et al., 2010).

Já foi descrita também a ocorrência de transmissão venérea, transplacentária e por transfusão sanguínea; entretanto, até o momento, estes não são mecanismos de importância epidemiológica (FREITAS et al., 2006; SILVA et al., 2009; NAUCKE; LORENTZ, 2012).

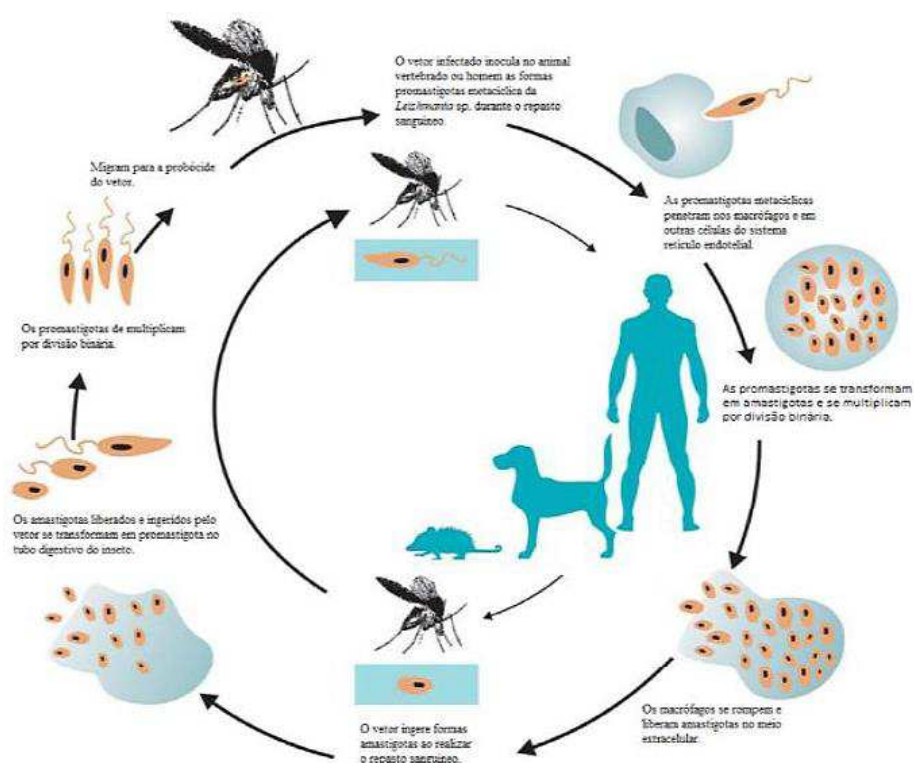
Os reservatórios são essenciais para a manutenção da doença no ambiente. Na área urbana, o cão é a principal fonte de infecção, representando fonte de infecção para o vetor e um elo na transmissão para o homem (BANETH, 2008; MIRÓ et al., 2008). Os gatos devem ser incluídos nos estudos epidemiológicos, pois apresentam potencial para ser um reservatório secundário. Alguns estudos na região Nordeste já relata a presença de *L. infantum* em gatos domésticos (BEZERRA et al., 2019), inclusive no estado do Maranhão (ROCHA et al., 2019).

No ambiente silvestre, o parasita é capaz de infectar xenartros (LAINSON et al., 1989; DE ARAÚJO et al., 2013), hyraxes (TALMI-FRANK et al., 2010), roedores (CALDART et al., 2017), marsupiais (BRASIL, 2014; MONTOYA et al., 2016; BRASIL, 2019), quirópteros (LIMA et al., 2008; COSTA et al., 2015; REZENDE et al., 2017), lagomorfos (MOLINA et al., 2012; TSOKANA et al., 2016), procionídeos (LAINSON et al., 1989; LAINSON, 2010), felinos (MAROLI et al., 2007; DAHROUG et al., 2011) perissodactyla (AGUILAR et al., 1989; SOARES et al., 2013) e primatas (LAINSON et al., 1989; MALTA et al., 2010). Determinar o papel preciso desempenhado por cada host no ciclo de transmissão permanece um desafio.

2.1.4 Ciclo biológico

O ciclo de transmissão da leishmaniose visceral (Figura 3) é do tipo heteroxênico, envolve interações entre o parasito, os vetores, os hospedeiros vertebrados e os diferentes habitats (BASTOS, 2012).

A fêmea flebotomíneo, durante seu repasto sanguíneo, inocula no hospedeiro mamífero a forma infectante do parasito que não realiza divisão binária, denominada de promastigota metacíclica (MULLER, 2016). No vertebrado, as formas promastigotas são rapidamente fagocitadas por células do sistema fagocitário mononuclear, onde ocorre a diferenciação para forma amastigota, que é altamente especializada e adaptada para sobreviver no fagolisossomo (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; VON STEBUT, 2015). Nessas células, a forma amastigota multiplica-se por divisão binária, até que ocorra a lise celular, para prosseguir a infecção de outras células (KEVRIC CAPPEL; KEELING, 2015). Este estágio crônico pode ter duração de meses, anos ou até mesmo durar a vida toda, podendo não ter sintomas perceptíveis dependendo do estado imunológico e susceptibilidade do hospedeiro (SHARMA, 2008; SINGH, 2010). O ciclo completa-se quando o vetor se alimenta de um reservatório infectado, ingerindo assim, as formas amastigotas. No intestino médio dos flebotomíneos, ocorre a diferenciação destas em promastigotas não infectantes, denominadas de promastigotas procíclicas, elas por meio de divisão binária se multiplicam, e subsequentemente, retornam à probóscide, onde se diferenciam em promastigota metacíclica até serem inoculadas em outro hospedeiro vertebrado (GOMES, 2016), reiniciando novamente o ciclo.

Fig 3. Ciclo biológico de *Leishmania* sp.

Fonte: OPAS, 2019.

2.1.5 Aspectos clínicos

A sintomatologia clínica da leishmaniose visceral canina é complexa e determinada por vários fatores, como a resposta imune do cão, a carga parasitária, a genética e até mesmo fatores ambientais. Sendo assim, alguns cães mantêm a doença de forma subclínica por anos, sem nenhum sintoma, e outros desenvolvem a doença de forma controlada ou grave e aguda, evoluindo para uma doença crônica debilitante que pode levar à morte do animal (RIBEIRO, 2018).

As manifestações clínicas apresentadas pela leishmaniose visceral são variadas. Assim, os cães costumam ser divididos em sintomáticos, assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos (SILVA, 2015b; CHAGAS, 2017). Na forma assintomática o animal não apresenta sinais clínicos evidentes da infecção, porém exames sorológicos podem apontar a presença do parasito. A enfermidade é classificada como

oligossintomática quando manifesta até dois sinais clínicos e estes são inespecíficos, como pelos opacos, aumento do tamanho dos linfonodos, perda de peso discreta. Neste caso a sorologia poderá apresentar títulos baixos, o que pode resultar na interpretação de um falso-negativo (BRASIL, 2006).

Na forma sintomática várias alterações clínicas podem ser observadas nos cães como o emagrecimento progressivo, adinamia, onicogribose, queda de pêlo, ceratoconjutivite, aparecimento de feridas, encurvamento do dorso, linfadenopatia, hepatomegalia e esplenomegalia (BRASIL, 2016).

Estas manifestações clínicas são devido aos variados tipos de resposta imune, porém o mecanismo patogênico permanece o mesmo. As lesões são uma decorrência de uma reação inflamatória contra o parasito, que pode acontecer na pele, órgãos viscerais como: fígado, rins ou intestino, olhos, ossos e mucosas. As lesões cutâneas são as principais reclamações ou queixas dos tutores, dentre este são dermatite esfoliativa não prurídica com ou sem alopecia, dermatite erosiva-ulcerativa, dermatite nodular, pústula, anemia e emagrecimento (SOLANO-GALLEG0 et al., 2011).

Um ponto importante a ser considerado é que tanto animais sintomáticos quanto assintomáticos podem ser fonte de infecção para o inseto vetor, permitindo a transmissão do parasito para o homem e outros vertebrados (MOLINA et al., 1994; MICHALSKY et al., 2007). Desse modo, a modelagem matemática indica que a chave para o sucesso potencial do controle da leishmaniose visceral canina pode ser a identificação de cães assintomáticos (ESTEVA; VARGAS, 2017; ZOU et al., 2017).

2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina é complicado, devido à complexa patogênese e amplo espectro de achados clínico-patológicos. A imunossupressão causada pela doença facilita infecções oportunistas, o que pode dificultar ainda mais o diagnóstico. Dessa forma é necessária a associação entre os parâmetros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais para o diagnóstico definitivo (BRASIL, 2018; ZIEMNICZAK, 2021).

O diagnóstico clínico ocorre quando o cão é identificado com os sinais e sintomas que apontam para a suspeita de um caso de leishmaniose visceral. E o diagnóstico epidemiológico ocorre em momentos de surto, com registro e confirmação da autoctonia de casos confirmados (BRASIL, 2014).

Os principais métodos de diagnóstico laboratorial podem ser: parasitológicos, sorológicos e moleculares (DUTHIE et al., 2018). O diagnóstico parasitológico envolve amostras teciduais de medula óssea, linfonodos e baço. A punção medular pode apresentar sensibilidade entre 60 e 85%, enquanto a análise histopatológica alcança sensibilidade de até 40% quando feita nos linfonodos poplíteos (MOREIRA et al., 2007; SUNDAR, 2002). Já a punção esplênica é o método que oferece maior sensibilidade (95%) para demonstração do parasito (BRASIL, 2014). O diagnóstico parasitológico é um método seguro, uma vez que o resultado positivo é dado pela observação direta de amastigotas (ZIEMNICZAK, 2021). Contudo, a desvantagem é que a técnica é arriscada e dolorosa, além de ser um método invasivo, em programas de saúde pública se torna inviável devido ao grande número de animais que são avaliados (BRASIL, 2014). A especificidade desse método é de aproximadamente 100% e a sensibilidade é em torno de 80% em cães sintomáticos (BRASIL, 2006; FONSECA, 2013).

Entre os testes mais empregados para o diagnóstico sorológico, estão: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste imunocromatográfico. Sendo, os métodos preconizados pelo Ministério da Saúde (MS) para a detecção da leishmaniose visceral canina são os testes imunocromatográfico DPP® do instituto Biomanguinhos como triagem e a ELISA como método confirmatório (BRASIL, 2011b; COURA-VITAL et al., 2014).

A RIFI é comumente usada em estudos epidemiológicos e utiliza o próprio parasita como antígeno. A especificidade e sensibilidade dessa técnica são próximas a 100% em animais sintomáticos. No Brasil, os títulos obtidos na RIFI, sendo iguais ou superiores a partir da diluição de 1:80, são considerados amostras reagentes (FARIA; ANDRADE, 2012; BRASIL, 2017b).

O diagnóstico sorológico tem vantagens significativas para o seu emprego, não sendo invasivo, pode ser automatizado e permite a análise simultânea de grande número de amostras (SOUZA et al. 2013; MENDES et al. 2013). Porém, sua realização requer alto nível de habilidade, experiência e equipamento especializado e de alto custo. No entanto, um grande problema desse método é que pode apresentar reações cruzadas com leishmaniose tegumentar americana e tripanossomíase (FARIA; ANDRADE, 2012; SOLANO-GALLEGO et. al., 2014; PALTRINIERI et. al, 2016).

Outro método de diagnóstico são os métodos moleculares. Este é uma ferramenta sensível e específica capaz de identificar a presença do parasito até mesmo ao nível de espécie (YILDIZ et al., 2017), baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR). Dentre os materiais biológicos que podem ser analisados, estão: biópsias ou aspirados de linfonodo, baço, medula óssea e órgãos onde ocorrem a proliferação do protozoário (NISHIDA; DELMASCHIO, 2017; GONZÁLEZ-BARRIOS, 2018).

Recentemente a PCR avançou muito com o uso da PCR quantitativa em tempo real (qPCR), que é uma variação do método molecular, e que fornece uma análise quantitativa e qualitativa em seus resultados, sendo um diagnóstico de alta especificidade para *Leishmania*. A utilização dessa técnica na identificação das leishmanioses tem demonstrado resultados interessantes em investigações epidemiológicas (SILVA et al., 2017; BENNAI et al., 2018; MEDKOUR et al., 2019). Além detectar o material genético e quantificá-lo, esse permite a identificação das diferentes espécies responsáveis pela infecção. No entanto, apesar dos métodos baseados em qPCR se mostrarem muito eficazes no diagnóstico das leishmanioses, ainda não existe um método padronizado (GALLUZZI et al., 2018). Além disso, essa técnica molecular não é acessível na rotina da vigilância epidemiológica, por necessitar de reagentes e equipamentos com alto custo, de laboratório com capacidade para sua realização e de correta análise dos resultados (ROCHA, 2019).

2.1.7 Medidas de prevenção e controle

O controle da leishmaniose visceral no Brasil é um grande desafio devido as condições sociais e políticas desfavoráveis, resultando no aumento dos casos e expansão territorial da doença (CONTI et al., 2016). Dessa forma, as medidas de prevenção e controle das doenças endêmicas devem ser desenvolvidas como estratégias de controle integrado, associando manejo ambiental, diagnóstico e tratamento precoce com práticas educativas. A educação em saúde no Brasil recebe poucos incentivos e recursos para mobilização de ações preventivas individuais e coletivas (FRANÇA, et al., 2013). As ações de vigilância epidemiológica, como a emissão de alertas epidemiológicos para os serviços de saúde e clínicas veterinárias, é outra medida importante quando houver a confirmação de um caso (BRASIL, 2018).

Apesar de todas as medidas de controle existentes, prevenir a disseminação da leishmaniose visceral tem sido ineficaz no Brasil (ROMERO; BOELAERT, 2010). Nesse

contexto, pesquisadores preconizam medidas alternativas de controle, como vacinação em massa e tratamento de cães, uma vez que essas abordagens são capazes de induzir redução na carga parasitária e bloquear a transmissão de *L. infantum* em flebotomíneos, evidenciando a redução de novos casos de leishmaniose visceral canina e humana (PESSOA-SILVA et al., 2019).

No entanto, a vacinação contra doença é uma ferramenta recente para donos de animais de estimação. As duas vacinas comerciais disponíveis têm baixa eficácia protetora de cerca de 68-71% (Canileish® 68,4%; Leish-Tec® 71%) (PALATNIK, 2012; OLIVIA et al., 2014; FERNANDES et al., 2014).

O controle das formas imaturas do vetor não é realizado tendo em vista a grande dificuldade na identificação dos criadouros naturais do inseto (BRASIL, 2006; CASANOVA et al., 2013). Mas, alguns estudos demonstram que o uso regular de inseticidas repelentes tópicos é altamente eficaz na prevenção de picadas de flebotomíneos (MIRÓ et al., 2017; GÁLVEZ et al., 2018) e, portanto, da transmissão de *L. infantum* (OTRANTO et al., 2013; BRIANTI et al., 2014).

O uso constante de inseticidas repelentes não só protege os cães de flebotomíneos infectados em outros hospedeiros (e, portanto, de se infectarem e atuarem como fontes de infecção), mas também permite uma redução desses vetores na vizinhança de humanos, potencialmente resultando em uma redução de infecções humanas e incidência clínica da leishmaniose visceral. É recomendado o uso de coleiras com Deltametrina 4% em cães, quando se tem um caso suspeito, pois evita que o vetor se aproxime do animal infectado (GAVGANI et al., 2002; COURTENAY et al., 2019).

Além disso, medidas de prevenção e controle relacionados aos criadouros do vetor, estão associados com o manejo ambiental, uma vez que os vetores necessitam de matéria orgânica para sua reprodução e alimentação (SCANDAR et al., 2011; COSTA et al., 2014). Desta forma, o manejo ambiental como planejamento de limpeza de terrenos baldios, quintais, podas de árvores, remoção de folhas em praças e jardins, destino adequado de resíduos sólidos oriundos de residências e comércios, controle do desmatamento e queimadas são ações importantes para o controle da Leishmaniose visceral (BRASIL, 2014).

Portanto, é necessário a utilização de estratégias mais apropriadas em regiões endêmicas, que respeitem as características ecológicas e a epidemiologia dos municípios alvo (BERN et al., 2010). Logo, é muito importante o conhecimento dos dados

relacionados à doença em determinado município endêmico para que a adoção de medidas de controle seja mais acertada, de acordo com a situação do município, do estado e do país (REGUERA et al., 2016).

2.1.8 Fatores de risco

O ambiente característico e propício à ocorrência da leishmaniose visceral é aquele de baixo nível socioeconômico, pobreza, promiscuidade, prevalente em grande medida no meio rural e na periferia das grandes cidades (BRASIL, 2014). Além desses fatores, migração, destruição ambiental, condições precárias de saneamento, desnutrição, são também alguns dos fatores sociais e ambientais associados a transmissão da leishmaniose visceral (WERNECK, 2010; TELES et al., 2015).

O desmatamento é um fator preponderante, uma vez que reduz a disponibilidade de fonte alimentar para os flebotomíneos, expondo o cão e o homem, que passam a ser as fontes mais acessíveis. Além disso, o intenso processo migratório provoca o deslocamento de pessoas que levam seus animais domésticos, muitas vezes infectados, o que também contribui para a expansão e urbanização da doença (BRASIL, 2006).

A criação de animais pode piorar as condições sanitárias locais devido à produção de resíduos orgânicos, o que favorece a atração e a manutenção do vetor no ambiente (FELICIANGELI, 2004; LAINSON; RANGEL, 2005). A participação de outras espécies de animais (aves, equinos, gambás, ovelhas, cabras e roedores) na epidemiologia da leishmaniose visceral parece estar associada à capacidade de atração dos vetores ao peridomicílio, por propiciarem boas condições ambientais para fauna de flebotomíneos e servirem de fonte alimentar para o vetor (AZEVEDO et al. 2008, AFONSO et al. 2012, ROHOUSOVA et al. 2015).

O papel das aves no ciclo epidemiológico da leishmaniose visceral também é controverso. No agreste pernambucano foi comprovado que a criação de aves ao redor das moradias pode atuar como barreira zooprofilática para a infecção por *L. infantum*, diminuindo a população de flebotomíneos no interior das residências e elevando a quantidade no interior dos galinheiros (COSTA, 2011), porém alguns autores (RODRIGUES et al., 1999; ALEXANDER et al. 2002; LAINSON; RANGEL, 2005; SANT'ANNA et al., 2010) verificaram que a presença de galinhas nas residências está relacionada a uma maior proliferação do vetor da leishmaniose visceral, e que a presença de patos, roedores, pássaros e galinhas próximo aos domicílios aumenta o risco de ocorrência de leishmaniose visceral em seres humanos (BORGES et al., 2009).

A presença de mata ou de muita vegetação nas proximidades das residências também pode ser um fator de risco para a ocorrência de leishmaniose visceral canina (BARBOSA et al., 2010; BIGELI; OLIVEIRA JR.; TELES, 2012).

Há uma tendência dos grupos de baixa renda residirem em áreas com más condições urbanísticas e sanitárias e em situações de risco e degradação ambiental, talvez porque estas sejam as únicas áreas acessíveis à população com menor poder aquisitivo (MIRANDA, 2008). Além disso, fatores relacionados aos tutores, como a renda e o nível de escolaridade, também são indicados como fatores de risco para doença (COURA-VITAL et al. 2011, SILVA et al. 2017).

Dificuldades na eliminação do reservatório, a capacidade adaptativa do vetor associada a medidas de controle vetorial insuficientes e o alto custo das estratégias de controle, também podem estar contribuindo para uma maior disseminação da doença (OLIVEIRA et al. 2008).

Contudo estratégias como, melhoria da água e saneamento básico, intensificação do tratamento de doenças e controle de vetores e medidas veterinárias de saúde pública para doenças zoonóticas negligenciadas (WHO, 2010; 2012; 2013), estão atreladas ao conceito de saúde unificada, a qual propõe uma mudança cultural no que diz respeito ao reconhecimento da conexão entre animais, humanos e o ecossistema, evidenciando a importância dessa abordagem no controle de doenças zoonóticas e na melhoria em termos de equilíbrio ambiental (MOLYNEUX et al., 2017).

2.1.9 Geoprocessamento como ferramenta de vigilância epidemiológica da Leishmaniose visceral

Os estudos epidemiológicos buscam compreender a causalidade, a frequência e distribuição de agravos em uma população com o objetivo de descrever o perfil situacional, analisar as relações dos fatores condicionantes ao desequilíbrio do processo saúde-doença, recomendar ações de controle e avaliar os serviços de saúde quanto sua efetividade e resolutividade (CAVALCANTE, 2020).

A leishmaniose visceral, em franca expansão, tem ganhado destaque no cenário nacional nas últimas décadas, apontando para a necessidade de novos estudos geográficos e epidemiológicos da doença; além da avaliação da efetividade das ações de controle dos programas vigentes (ABRANTES et al., 2018). Sendo assim, estudo da distribuição

espacial da doença auxilia a entender a associação de muitas variáveis do processo doença - saúde, permitindo a adoção de medidas profiláticas e de controle mais apropriadas (BRUHN et al., 2018).

Dessa forma, a avaliação pelo padrão espacial propicia o conhecimento do grau de extensão e melhora a precisão da localização das regiões com maior concentração de casos (MENON et al., 2016). Além da superposição de planos de informação georreferenciados sobre relevo, clima, vegetação, dentre outros, que permitem a visualização ampla do local de estudo (FERREIRA, 2016).

Estudos sobre a avaliação temporal espacial da leishmaniose visceral no Brasil mostra o aparecimento de aglomerados endêmicos da enfermidade, chamados de “clusters” ou pontos quentes, localizados em comunidades de baixo nível socioeconômico (DEWAN et al., 2017).

O método de georreferenciamento por meio da densidade de Kernel produz mapas a partir de pontos marcados em determinado evento geográfico criando superfícies contínuas e favorecendo a visualização das áreas de aglomeração dos pontos chamadas de “clusters” ou pontos quentes dos eventos geográficos, identificando as áreas com maior número de casos de uma doença (LIMA et al. 2005; DEWAN et al., 2017).

O mapa de Kernel é gerado por meio de uma grade, onde cada quadrante (pixel) corresponde a um núcleo que é visualizado no mapa em colorações diferentes correspondentes a unidade sobre determinada área de influência do evento geográfico. Ou seja, quanto mais intensa a coloração, maior a possibilidade do evento na área de influência (BRASIL, 2006; BERGAMASCHI, 2010).

Por essa razão, a função Kernel pode atuar como uma ferramenta adequada no mapeamento dos casos da leishmaniose visceral canina, indicando áreas de concentração de casos e contribuindo, portanto, para os órgãos gestores de saúde.

Sendo assim, a avaliação de doenças endêmicas na perspectiva de vários elementos envolvidos no ciclo de transmissão, tais como os determinantes ambientais e sociais, tem sido o enfoque dos estudos empregando técnicas de geoprocessamento. Essa ferramenta de geoprocessamento, pode representar uma alternativa na identificação de fatores ambientais que se associem com a ocorrência da doença, e seus eixos de expansão, através da elaboração de mapas digitais (ABRANTES et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar um estudo epidemiológico, espacial, molecular e sorológico de *Leishmania infantum* em cães domésticos no município de Belágua, Cerrado Maranhense.

3.2 Específicos

- + Aplicar inquérito epidemiológico aos proprietários dos animais examinados;
- + Detectar anticorpos específicos para *L. infantum* através dos testes de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).
- + Realizar o diagnóstico molecular de *L. infantum*;
- + Mapear a distribuição de *L. infantum* no município de Belágua;

4 METODOLOGIA

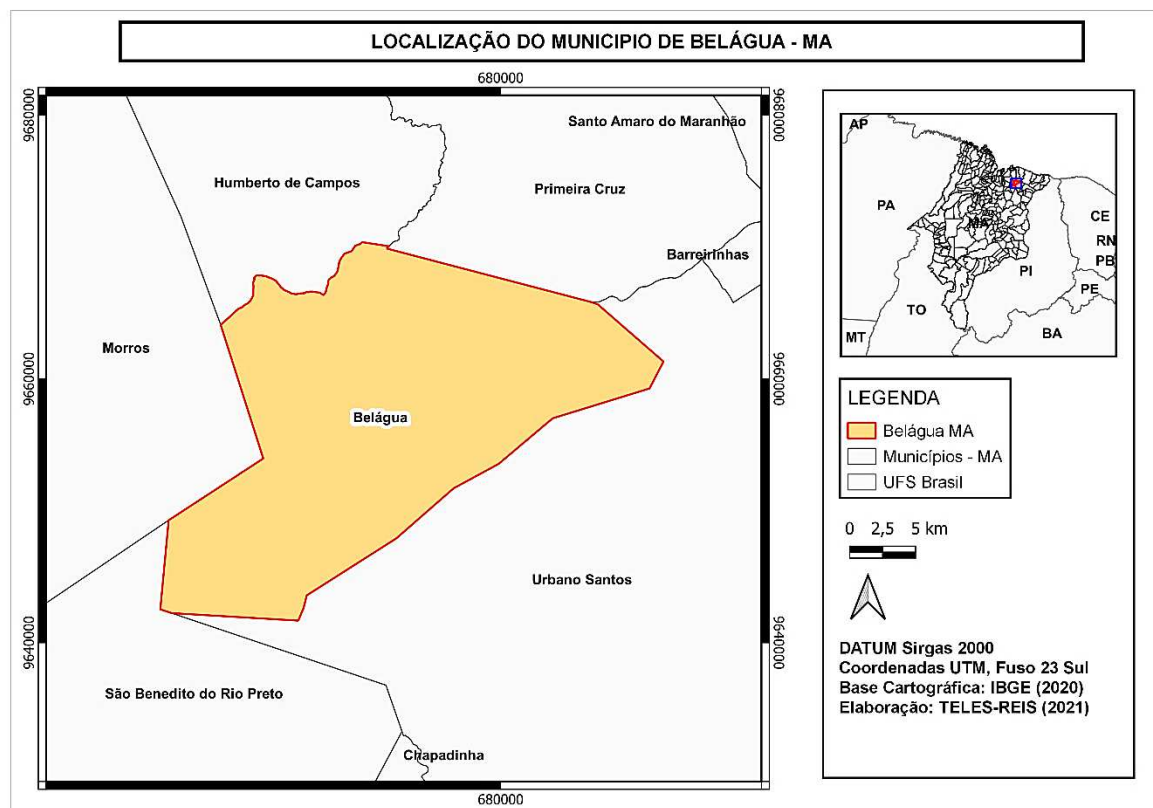
4.1 Considerações éticas

Este projeto foi submetido à Plataforma Brasil e aprovado na Comissão de Ética em Experimentação Animal – (CEEAA) /UEMA da Universidade Estadual do Maranhão, sob o protocolo nº 042/2019.

4.2 Área de estudo

Belágua é um município do estado do Maranhão que está inserido na Mesorregião Leste Maranhense (Figura 4), Microrregião de Chapadinha, abrange uma área de 499 km², com uma população de aproximadamente 7.528 habitantes e densidade demográfica de 13,06 habitantes/km², (IBGE, 2020). Limita-se ao Norte com o município de Primeira Cruz, a Leste com o município de Santa Quitéria do Maranhão, a Oeste com os municípios de São Benedito do Rio Preto e Morros e ao Sul com o município de Urbano Santos. Com base na última campanha de vacinação que ocorreu em Belágua, a Secretaria de Saúde do município, estima que a população canina na área urbana, seja de 1000 cães.

Fig 4. Mapa de localização do município de Belágua, Maranhão.



Fonte: Próprio autor, 2021.

O clima de Belágua, segundo a classificação de Köppen, é tropical (AW') subúmido com dois períodos bem definidos: um chuvoso, que vai de janeiro a junho, e outro seco, correspondente aos meses de julho a dezembro (CORREIA FILHO, 2011).

4.3 Inquérito epidemiológico

Para estudo, foram selecionados através de busca ativa e amostragem por conveniência cães domésticos de ambos os sexos, com idade a partir de 6 meses, no período de novembro de 2019 e fevereiro de 2020. Durante as coletas de sangue, aplicou-se um questionário aos proprietários acima de 18 anos, a fim de se obter dados sobre: origem, manejo, comportamento do animal e a presença de caracteres ambientais visando estabelecer os possíveis fatores de risco da zoonose na região. As informações dos cães foram anotadas em fichas individuais, e cada proprietário assinou um termo de consentimento livre e esclarecido, para participar da pesquisa, declarando assim que foram informados a respeito dos procedimentos que foram realizados. Todos os animais

foram submetidos a análise clínica, através da anamnese, exame clínico e físico do animal para verificar a presença de sinais clínicos da doença.

4.4 Obtenção das amostras biológicas

De cada animal, uma amostra de sangue de 5ml foi coletada por venopunção das veias cefálica ou jugular, totalizando 205 amostras. As amostras foram divididas em duas alíquotas, uma em tubo contendo EDTA para extração de DNA e outra em tubo sem anticoagulante, para obtenção do soro para a realização dos testes sorológicos.

4.5 Testes sorológicos

Os soros obtidos de amostras de sangue dos cães foram testados por ensaio de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), com ponto de corte de 1:80. As formas promastigotas de *L. infantum* foram cedidas pela USP (cepa CBT 153), e pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) (cepa IOC 579) em que foram usados como antígeno. O teste de RIFI foi realizado de acordo com Oliveira et al. (2008), no Laboratório de Parasitologia, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Medicina Veterinária da UEMA.

4.6 Testes moleculares

O DNA das amostras de sangue dos cães foi extraído usando o Kit InstaGene™ Matrix da Bio-Rad, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram submetidas a reação em cadeia da polimerase convencional (PCR), com amplificação de 223 pb de DNA genômico de *L. infantum*, usando o CatLeishF iniciador (5' GACAACGGCACCGTCGGCGCCAAAATAAAAG 3') e primer CatLeishR (5' CAGTACGGCGGTTTCGCTTGTCTGTTGAAGC 3') (SILVA et al., 2019). As condições ideais para amplificação das sequências de CPA do tipo catepsina L foram: 34 ciclos de desnaturação a 94 ° C por 1 min, anelamento a 64 ° C por 1 min e extensão a 72 ° C por 45s, conforme descrito por Silva et al., (2019). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 50 V/100 mA, corado com Syber Safe (Invitrogen) e a visualização das bandas fotografados em transiluminador de luz U.V

4.7 Georreferenciamento e análise espacial

Um receptor do Sistema de Posicionamento Global (GPS Garmin® eTrex 30) foi conectado na frente da residência do cão e a latitude e longitude foram registrados no questionário.

A representação espacial dos casos de leishmaniose visceral canina e sua análise estatística foram realizadas utilizando o QGIS versão 3.16.6 (QGIS Development Team 2021). Os dados georreferenciados foram inseridos na base cartográfica digitalizada do município, obtido no site do IBGE, utilizando o Sistema Geodésico de Referência, SIRGAS 2000 e sistema de coordenadas UTM zona 23S.

Um mapa de densidade de Kernel foi produzido para demonstrar as áreas com maior risco de contaminação da doença. A análise estatística da estimativa das curvas de densidade foi através da função quártica, que permite examinar a variação nos padrões de pontos espaciais, estimando a densidade de casos LVC em uma escala que varia de muito alta a muito baixa. Os clusters foram gerados utilizando um raio de 30m.

4.8 Análise estatística

O número de cães amostrados na área urbana de Belágua foi calculada considerando uma população de 1000 cães (Secretária de Saúde do município de Belágua), frequência esperada de 11,14% (COSTA et al., 2015), efeito de desenho 1,0 e um cluster, com nível de confiança (IC) de 95%.

As análises dos dados descritivos foram obtidas a partir das informações dos questionários epidemiológicos. As variáveis coletadas foram: sexo (fêmea/macho), dormitório (dentro de casa/ fora de casa), recolhimento das fezes (sim/não), restrição de movimento (sai à rua/ não sai à rua), animais de peridomicílio (sim/não), matéria orgânica (sim/não), sinais clínicos (sim/não) e pcr (negativo).

Além disso, associações dos fatores de risco com presença ou ausência de *L. infantum* por teste sorológico em cães foram testados usando teste qui-quadrado (χ^2) de Pearson. O valor de significância adotado foi de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram feitas usando Software Epi Info™ versão 7.2, desenvolvido pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 205 cães domésticos, desses, 122 (59,51%) foram soropositivos para *L. infantum* na RIFI, com títulos variando de 80 a 1.280. Correspondendo (81,97%) para títulos de 1:160, (36,89%) para 1:320, (15,57%) para 1:640, e (1,64%) para 1:1280. Um cão sororeagente na RIFI também apresentou-se positivo no teste de PCR.

O método sorológico é empregado no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, sendo um dos principais determinantes da infecção em inquéritos caninos. No entanto, a acurácia desse diagnóstico vem sendo questionada, pois as falhas nos métodos sorológicos são um dos fatores que contribuem para a ineficiência das ações de vigilância e controle da doença (ROMERO; BOELAERT, 2010; GRIMALDI et al., 2012; WERNECK, 2016).

A reação cruzada com outros agentes infecciosos, é um fator que prejudica a especificidade do teste. Isso ocorre porque diferentes patógenos, especialmente filo geneticamente próximos, exibem epítomos semelhantes. Porém no presente estudo, para aumentar a sensibilidade e especificidade, usamos promastigotas das cepas CBT 153 e IOC 579 que foram isolados nesta pesquisa como o antígeno na RIFI (COSTA et al., 2015).

No diagnóstico molecular detectou-se a presença de DNA de *L. infantum* em uma amostra de sangue canino. As amostras positivas em RIFI e negativas na PCR indicam que foram detectados anticorpos para *L. infantum* no exame sorológico e, no entanto, não houve detecção do DNA do parasita no cão. Este fato, conforme é sugerido em outros estudos (GONTIJO et al., 2003; GONTIJO et al., 2004), pode estar associado à produção de anticorpos para outros tripanossomatídeos que podem interferir na reação de imunofluorescência indireta para leishmaniose. E a PCR pode não ter detectado amostras com baixas cargas parasitárias que poderiam acontecer em cães assintomáticos ou em início de infecção.

Além disso, pode ser devido ao fato de que a parasitemia sanguínea pode ser intermitente (MANNA et al., 2008) e a carga do parasita *Leishmania* no sangue é muito menor do que a carga encontrada em outros tecidos (PALTRINIERI et al., 2016; TRAVI et al., 2018). Mesmo assim, o resultado do estudo epidemiológico demonstra que o parasita está presente no local de estudo.

A fonte da amostra tem influência significativa na capacidade dos testes moleculares de identificar cães infectados (SOLANO-GALLEGO et al., 2016). No entanto, embora o sangue periférico não seja a amostra mais sensível, é a mais útil para pesquisas a campo porque a coleta de amostra é menos invasiva e o uso de sangue periférico permite a realização de sorologia simultaneamente (LACHAUD et al., 2002a; LACHAUD et al., 2002b), permitindo a detecção de a maioria dos cães infectados. Dessa forma Solano-Gallego et al. (2011), recomenda que a PCR sanguínea seja utilizada sempre acompanhada de sorologia e outras técnicas diagnósticas para a interpretação dos resultados.

As características da população canina avaliada apresentaram os seguintes resultados: cães machos 120 (58.54 %), fêmeas 85 (41.46) recolhimento das fezes 170 (82.93%), dormem fora de casa 178 (86.83 %), sai à rua 142 (69.27%), convivem com outros animais no peridomicílio 152 (74.15 %) e vivem próximos a matéria orgânica 164 (80%).

Não houve diferença estatística significativa das associações entre variáveis epidemiológicas dos cães e presença ou ausência de *L. infantum* por teste sorológico em relação ao sexo do cão, recolhimento das fezes, local que o animal dorme, restrição de movimento, presença de animais no peridomicílio, sinais clínicos e o teste de PCR, no entanto, constatou-se que houve associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a variável de matéria orgânica no ambiente (Tabela 1).

Tabela 1. Análise univariada (teste Qui-quadrado) das associações entre variáveis independentes e presença ou ausência de *Leishmania infantum* por teste sorológico em cães residentes no município de Belágua, Maranhão.

Variável	Categoria	Positivo/ exposto	%	Negativo/ exposto	%	P valor
Sexo	Macho	70/120	58.33	50/120	41.67	0,34
	Fêmea	52/85	61.18	33/85	38.82	
Recolhimento das fezes	Sim	100/170	58.82	70/170	41.18	0,33
	Não	22/35	62.86	13/35	37.14	
Local que o animal dorme	Fora de casa	108/178	60.67	70/178	39.33	0,19
	Dentro de casa	14/27	51.85	13/27	48.15	
	Sai à rua	83/142	58.45	59/142	41.55	

Restrição de movimento	Não sai à rua	39/63	61.90	24/63	38.10	0,32
Animais no peridomicílio	Sim	93/152	60.12	59/152	39.88	0,23
	Não	30/54	57.14	24/54	42.86	
Matéria orgânica	Sim	103/164	62.80	61/164	37.20	0,03*
	Não	20/41	48.78	21/41	51.22	
Sinais clínicos	Sim	112/183	61.20	71/183	38.80	0,08
	Não	10/22	45.45	12/22	54.55	
PCR	Positivo	1/1	100	0/1	0	0,29
	Negativo	121/204	59.31	83/204	40.69	

Legenda: $P < 0,05^*$ = valor estatístico significativo.

Quanto ao sexo, Silva et al. (2016) verificaram maior risco de infecção em cães machos, que pode ser justificado por serem mais utilizados para a caça e como cão de guarda, dois fatores que aumentam a exposição do animal ao flebótomo. Contudo resultados obtidos por Azevedo et al. (2008), Silva et al. (2013) e Figueiredo et al. (2014) verificaram que os machos e as fêmeas estão igualmente expostos ao risco de infecção por *L. infantum*, o que também foi observado no presente estudo.

Quanto ao acesso à rua e o local que o animal dorme, mais da metade dormem fora de casa e tem acesso à rua. Segundo Gálvez et al. (2010) e Cortes (2012), os cães que vivem fora de casa ou com acesso frequente ao ambiente externo a casa, apresentam maior risco de se infectarem com a doença, principalmente devido à maior exposição aos flebotomos, pois o vetor é ativo a partir do crepúsculo.

No entanto, observa-se que essa exposição ao inseto vetor também está associado com as características ambientais do peridomicílio. Ou seja, cães que vivem próximos a áreas verdes, com presença de animais no peridomicílio, à exemplo de galinheiros, e detritos orgânicos, pode favorecer a proliferação dos flebotomíneos, sendo um fator de risco tanto para os cães quanto aos seres humanos. Entretanto uma limpeza da matéria orgânica acumulada evita a proliferação dos flebotomíneos, reduzindo a população e diminuindo o contato destes com os seres humanos (COURA-VITAL et al., 2011; BRITO et al. 2016).

Os sinais clínicos identificados neste estudo são os comumente observados em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Dos 183 animais com sinais clínicos para

leishmaniose visceral canina, apresentaram emagrecimento progressivo 112 (54.64%) onicogribose 112 (54.64%), lesões em borda de orelha 109 (53.55%), alopecia 103 (50.27%), lesões em focinho (47.54%), pelo opaco e sem brilho 86 (42.08%), lesões pelo corpo (39.34%), feridas na pele 77 (37.56%) e secreção ocular (33.33%).

Na análise univariada, as variáveis com valor $p < 0,5$ foram: pelo opaco e sem brilho, lesões em borda de orelha, lesões em focinho e lesões pelo corpo (Tabela 2).

Tabela 2. Análise univariada (teste Qui-quadrado) das associações entre os sinais clínicos e presença ou ausência de *Leishmania infantum* por teste sorológico em cães residentes no município de Belágua, Maranhão.

Variável	Categoria	Positivo/ exposto	%	Negativo/ exposto	%	P valor
Emagrecimento progressivo	Sim	60/99	60.61	39/99	39.39	0,38
	Não	62/106	58.49	44/106	41.51	
Onicogribose	Sim	59/99	59.60	40/99	40.40	0,49
	Não	63/106	59.43	43/106	40.57	
Secreção ocular	Sim	39/61	63.39	22/61	36.07	0,20
	Não	83/144	57.64	61/144	42.36	
Alopecia	Sim	53/92	57.61	39/92	42.39	0,30
	Não	69/113	61.06	44/113	38.94	
Pelo opaco e sem brilho	Sim	53/105	50.48	52/105	49.52	0,003*
	Não	69/100	69	31/100	31	
Ferida na pele	Sim	48/77	62.34	29/77	37.66	0,26
	Não	74/128	57.81	54/128	42.19	
Lesões em borda de orelha	Sim	68/98	69.39	30/98	30.61	0,003*
	Não	54/107	50.47	53/107	49.53	
Lesões em focinho	Sim	60/86	69.77	26/86	30.23	0,005*
	Não	62/119	52.10	57/119	47.90	
Lesões pelo corpo	Sim	58/72	80.56	14/72	19.44	0,000002*
	Não	64/133	48.12	69/133	51.88	

Legenda: $P < 0,05^*$ = valor estatístico significativo.

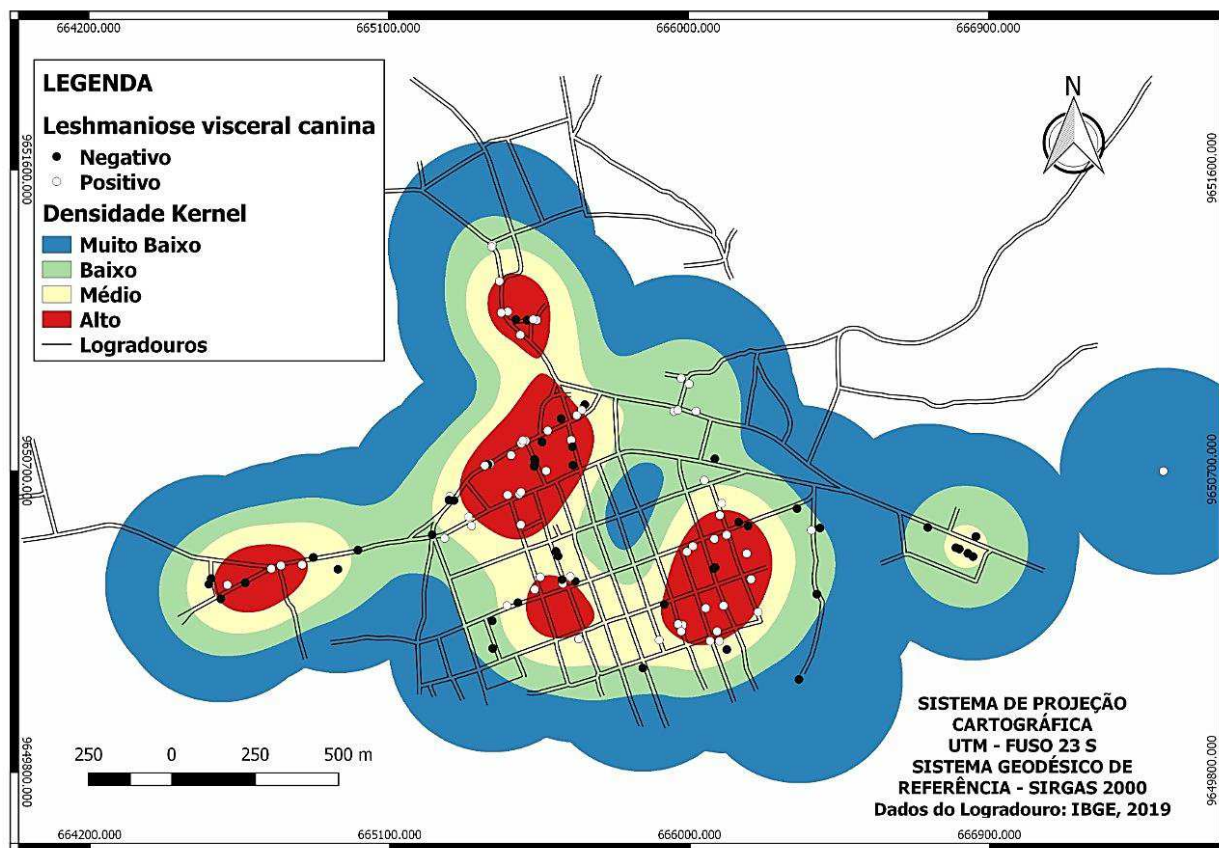
Essas manifestações clínicas corroboram com os achados de Baneth et al. (2008) e Ramsey et al. (2010). E segundo Salzo (2008) as lesões cutâneas estão presentes em 90% dos cães com leishmaniose visceral canina. Bem como, o aparecimento destas lesões principalmente no focinho ou orelha e áreas de alopecia ocorre devido à multiplicação do parasito em macrófagos (MARINHO et al., 2017).

Na avaliação clínica foi observado que dos cães soropositivos 112 (91,80%) eram sintomáticos e 10 (5,46%) assintomáticos. Ressalta-se que todos os animais classificados como sintomáticos ou assintomáticos tiveram resultados reagentes confirmados em testes sorológicos para *L. infantum*. Aliás, de acordo com Figueiredo et al. (2014), cães sintomáticos têm cerca de três vezes mais chance de serem positivos nos testes sorológicos em relação aos assintomáticos. E apesar da baixa quantidade de cães assintomáticos, esse fato tem grande importância no contexto epidemiológico, uma vez que esses animais são capazes de infectar o vetor e manterem o ciclo de transmissão, disseminando a doença (COURA-VITAL et al. 2011; ABRANTES et al. 2018).

Com relação a análise espacial, o estimador de densidade Kernel permitiu determinar o local de maior risco para a ocorrência da doença, sendo que as áreas com maior concentração de casos estão destacadas em vermelho (Figura 5). Essas áreas estão situadas no perímetro urbana do município de Belágua, com densidades variando de muito baixo à alto.

O georreferenciamento e a construção de mapa permite a compreensão dos padrões espaciais da doença. Vários autores têm utilizado essa metodologia para o monitoramento das medidas de controle e planejamento em saúde (MACHADO-COELHO et al., 1999; MARGONARI et al., 2006; PRADO et al., 2011; MAYRINK et al., 2013; BORGES et al., 2014; MENEZES et al., 2015; TOLEDO et al., 2017). Nessa pesquisa, os mapas de distribuição geográfica da leishmaniose visceral canina, demonstram uma distribuição heterogênea da doença quanto aos métodos de investigação utilizados.

Fig 5. Mapa de densidade de Kernel com distribuição para casos confirmados por teste sorológico de leishmaniose visceral canina no município de Belágua, Maranhão, Brasil.



Fonte: Próprio autor, 2021.

O setor censitário de Belágua, apresenta bairros com grande número de habitações precárias e falta de saneamento básico, corroborando os dados de Cerbino Neto (2003) e Guimarães et al. (2005), que afirmam que os maiores números de casos ocorrem em áreas de ocupação desordenada e baixa infraestrutura, próximas de matas, com presença de animais silvestres, ocasionando uma abundância de vetores e reservatórios, que contribui para a uma alta soroprevalência canina.

Além disso, as casas da zona urbana do município apresentam características ambientais e sociais propícias à manutenção do ciclo de transmissão, como a criação de animais no peridomicílio e as precárias condições sanitárias decorrentes do acúmulo frequente de matéria orgânica. Silva et al. (2018) citam que a ruralização das áreas urbanas tende a homogeneizar os fatores de risco das áreas rurais. Inclusive a vegetação predominante no município de Belágua é o cerrado, ainda bastante densa e preservada, ambiente favorável à sobrevivência do vetor (*L. longipalpis*) da doença.

Apesar da grande incidência de casos de leishmaniose canina no município, a doença é pouco abordada pelas autoridades de saúde e pelo poder público, levando a uma escassez de informação para a população local sobre os procedimentos a serem seguidos em caso de suspeita de contaminação. Portanto, é necessário ações de controle por meio dos órgãos públicos e serviços de saúde do estado e do município para a realização de campanhas para o conhecimento da doença, eliminação dos flebótomos e proteção dos cães, integrando o conceito de saúde única, humano, animal e ambiente.

Este estudo é a primeira pesquisa e inquérito sorológico da leishmaniose visceral canina realizado no município de Belágua localizado na região do cerrado maranhense do Nordeste do Brasil e apresenta informações importantes sobre a zoonose. Regiões próximas à Belágua possuem uma alta prevalência para a doença, no período de 2010-2019 teve 105 casos confirmados notificados no Sistema de Agravos de Notificação – Maranhão (SINAM) (BRASIL, 2020).

6 CONCLUSÕES

Este é o primeiro relato da ocorrência de *L. infantum* em cães provenientes no município de Belágua. Ressalta-se que as características ambientais, baixo nível socioeconômico e o saneamento precário, podem tornar a população canina susceptível à infecção.

O teste sorológico e molecular específico para *L. infantum* demonstra a presença do agente no município, e pelo mapa de risco é possível compreender a dispersão dos casos caninos na cidade.

Esses resultados apontam que a leishmaniose visceral canina está dispersa no município, colocando em risco sua população humana, indicando a necessidade de alerta aos órgãos de vigilância epidemiológica para estabelecer medidas de prevenção e controle dessa zoonose, incluindo ações educacionais e sanitárias.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, Tuanne Rotti et al. Environmental factors associated with canine visceral leishmaniasis in an area with recent introduction of the disease in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, p. e00021117, 2018.

ADL, Sina M. et al. A Classificação Revisada de Eucariotos **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 59: 429-514, 2012.

ADL, Sina M. et al. A nova classificação de nível superior de eucariotos com ênfase na taxonomia de protistas. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, pág. 399-451, 2005.

AFONSO, Margarete Martins dos Santos et al. Estudos sobre os hábitos alimentares de populações de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) de áreas endêmicas de leishmaniose visceral americana no nordeste do Brasil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

AGUIAR, Gustavo Marins de; MEDEIROS, Wagner Muniz de. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: **Flebotomíneos no Brasil**. 2003. p. 207-255.

AGUILAR, Cruz Manuel et al. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 1, p. 19-28, 1989.

AKHOUNDI, Mohammad et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular aspects of medicine**, v. 57, p. 1-29, 2017.

ALEXANDER, Bruce et al. Papel do frango doméstico (*Gallus gallus*) na epidemiologia da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Doenças Infecciosas Emergentes**, v. 8, n. 12, p. 1480, 2002.

ARAÚJO, Damião da Conceição. Análise espacial dos casos humanos de leishmaniose visceral. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 24, n. 2, p. 71-75, 2017.

AZEVEDO, Márcia Ávila A. de et al. Avaliação da Leishmaniose visceral canina em Poxoréo, Estado do Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 3, p. 123-127, 2008.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 4. ed. Philadelphia: **Elsevier Saunders**. p. 735-748. 2012.

BANETH, Gad et al. Leishmaniose canina - novos conceitos e percepções sobre uma zoonose em expansão: parte um. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BARBOSA, David Soeiro et al. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à Leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 653-659, 2010.

BASTOS, Mônica Macedo et al. O uso de porfirinas em terapia fotodinâmica no tratamento da leishmaniose cutânea. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 257-267, 2012.

BATES, Paul A. Transmissão de promastigotas metacíclicos de *Leishmania* por flebotomíneos. **Journal of International Parasitology**, v. 37, n. 10, pág. 1097-1106, 2007.

BATISTA, Francisca Miriane Araujo et al. Leishmaniose: perfil epidemiológico dos casos notificados no estado do Piauí entre 2007 e 2011. **Revista Univap**, v. 20, n. 35, p. 44-55, 2014.

BENNAI, Kahina et al. Detecção molecular do DNA de *Leishmania infantum* e identificação da refeição sanguínea do hospedeiro em *Phlebotomus* em um foco hipoendêmico de leishmaniose humana no norte da Argélia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, pág. e0006513, 2018.

BERGAMASCHI, RODRIGO BETTIM. SIG aplicado à segurança no trânsito—Estudo de caso no município de Vitória—ES. **Monografia apresentada ao Departamento de Geografia da UFES. Vitória**, 2010.

BERN, Caryn; COURTENAY, Orin; ALVAR, Jorge. De bovinos, flebotomíneos e homens: uma revisão sistemática de análises de fatores de risco para leishmaniose visceral do sul da Ásia e implicações para a eliminação. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, p. e599, 2010.

BEZERRA, José Artur Brilhante et al. Serological and molecular investigation of *Leishmania* spp. infection in cats from an area endemic for canine and human leishmaniasis in Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 790-796, 2019.

BIGELI, Julio Gomes; OLIVEIRA JÚNIOR, Waldesse Piragé de; TELES, Natália Melquie Monteiro. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 18-23, 2012.

BORGES, Bárbara KA et al. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1035-1043, 2009.

BORGES, Luiz Felipe Nunes Menezes et al. Prevalência e distribuição espacial da leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, p. 352-357, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Estado Saúde de Santa Catarina. **Vigilância Da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)**. Santa Catarina: Superintendência de Vigilância em Saúde, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução de letalidade. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília-DF; p. 80, 2011 b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília 1. ed. atual. p. 773, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: MS, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, Brasil. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. 2 ed. p. 705, 2017b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília; 2019.

BRASIL. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde Ministério da Saúde. ISSN 9352-7864. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações**. 2020.

BRIANTI, Emanuele et al. Eficácia de um colar de imidaclopride (10%) / flumetrina (4,5%) de liberação lenta para a prevenção da Leishmaniose canina. **Parasitas e Vetores**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2014.

BRITO, Flávio Gonçalves et al. Leishmaniose visceral canina na Região Nordeste do Brasil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 1-4, 2016.

BRUHN, Fábio Raphael Pascoti et al. Spatial and temporal relationships between human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006–2013. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2018.

CALDART, Eloiza Teles et al. Leishmania in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of Leishmania (*Leishmania*) *amazonensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, p. 17-27, 2017.

CARDIM, Marisa Furtado Mozini et al. Leishmaniose visceral no estado de São Paulo, Brasil: análise espacial e espaço-temporal. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p. 48, 2016.

CARVALHO, Maria Rosimery de et al. Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 1227-1232, 2007.

CASANOVA, Cláudio et al. Criadouros de larvas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) em áreas urbanas endêmicas de leishmaniose visceral no sudeste do Brasil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. e2443, 2013.

CAVALCANTE, Francisco Roger Aguiar. Leishmaniose visceral humana: aspectos epidemiológicos, temporais e espaciais no estado do Ceará e no município de Sobral. 2020.

CERBINO NETO, José. Fatores associados a incidência de leishmaniose visceral em Teresina-PI na década de 90. 2003.

CHAGAS, Rebecca Lunière De Abreu. Leishmaniose visceral canina: perfil epidemiológico do Distrito Federal, 2013 a 2017. 2017.

CONTI, Renata Vivas et al. Evolução epidemiológica da Leishmaniose visceral em períodos de tempo, com base nas mudanças demográficas e nas conquistas científicas no Brasil. 2016.

CORREIA FILHO, Francisco Lages et al. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea: estado do Maranhão: relatório diagnóstico do município de Aldeias Altas**. CPRM, 2011.

CORTES, Sofia et al. Fatores de risco para leishmaniose canina em uma região endêmica do Mediterrâneo. **Parasitologia Veterinária**, v. 189, n. 2-4, pág. 189-196, 2012.

COSTA, Andréa Pereira et al. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum chagasi* infection in wild mammals from Maranhão state, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 11, p. 656-666, 2015.

COSTA, Andrea Pereira et al. Environmental factors and ecosystems associated with canine visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 12, p. 765-774, 2015.

COSTA, Kalidia Felipe de Lima et al. Awareness of visceral Leishmaniasis and its relationship to canine infection in riverside endemic areas in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 5, p. 607-612, 2014.

COSTA, Pietra Lemos et al. **Comportamento da fauna de flebotomíneos, com ênfase em *Lutzomyia Longpalpis*, em área endêmica para Leishmaniose Visceral no Município de Passira, Agreste de Pernambuco**. 2011. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

COURA-VITAL, Wendel et al. Evaluation of the change in the canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new diagnosis proposal. **PLOS One**, v. 9, n. 3, p. e91009, 2014.

COURA-VITAL, Wendel et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs from urban areas of Brazil identified by molecular methods. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, no. 8, p. e1291, 2011.

COURTENAY, Orin et al. Insecticide-impregnated dog collars reduce infantile clinical visceral leishmaniasis under operational conditions in NW Iran: a community-wide cluster randomised trial. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007193, 2019.

COUTINHO, Maria Teresa Zanatta; LINARDI, Pedro Marcos. As pulgas de cães infectados com Leishmaniose visceral canina podem transferir a infecção para outros mamíferos. **Parasitologia Veterinária**, v. 147, n. 3-4, p. 320-325, 2007.

COUTO, I. M. et al. Visceral Leishmaniasis: Epidemiology and health education. **Open Journal of Epidemiology and Public Health**, v. 1, p. 1-7, 2018.

DA PAIXÃO SEVÁ, Anaiá et al. Risk analysis and prediction of visceral Leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005353, 2017.

DAHROUG, Magyda AA et al. The first case report of *Leishmania (leishmania) chagasi* in *Panthera leo* in Brazil. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 1, n. 3, p. 249-250, 2011.

DANTAS-TORRES, Filipe. Carrapatos como vetores de parasitas *Leishmania*. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 155-159, 2011.

DE ARAUJO, Vitor Antonio L. et al. Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Pará State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. **Parasitology**, v. 140, n. 4, p. 455-460, 2013.

DEGRAVE, Win et al. Uso de sondas moleculares e PCR para detecção e tipagem de *Leishmania*-a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463-469, 1994.

DEWAN, Ashraf et al. Exploring spatial and temporal patterns of visceral leishmaniasis in endemic areas of Bangladesh. **Tropical Medicine and Health**, v. 45, n. 1, p. 1-10, 2017.

DIAS, Daniel S. et al. Recombinant prohibitin protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral Leishmaniasis. **Cellular Immunology**, v. 323, p. 59-69, 2018.

DO NASCIMENTO, Lucimary; DE ANDRADE, Etielle Barroso. Epidemiologia da Leishmaniose canina no município de Pedro II, Piauí, entre os anos de 2013 e 2019. **Pesquisa e Ensino em Ciências Exatas e da Natureza**, v. 5, p. 1623, 2021.

DUTHIE, Malcolm S.; LISON, Aurore; COURTENAY, Orin. Advances toward diagnostic tools for managing zoonotic visceral Leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 881-890, 2018.

- ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430-442, 2018.
- ESTEVA, Lourdes; VARGAS, Cristobal; DE LEÓN, Cruz Vargas. O papel dos assintomáticos e dos cães na propagação da leishmaniose. **Biociências Matemáticas**, v. 293, p. 46-55, 2017.
- FARIA, Angélica Rosa; ANDRADE, Hélida Monteiro de. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.
- FELICIANGELI, MD Criadouros naturais de flebotomíneos. **Entomologia Médica e Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 71-80, 2004.
- FERNANDES, Consuelo Barreto et al. Comparação de duas vacinas comerciais contra a Leishmaniose visceral em cães de áreas endêmicas: IgG e subclasses, parasitismo e transmissão de parasitas por xenodiagnóstico. **Vaccine**, v. 32, n. 11, p. 1287-1295, 2014.
- FERREIRA, Marília Gabriele Prado Albuquerque et al. Papel potencial das pulgas caninas no ciclo de *Leishmania* spp. **Parasitologia Veterinária**, v. 165, n. 1-2, p. 150-154, 2009.
- FERREIRA, Marcos Cesar. **Iniciação à Análise Geoespacial**. SciELO-Editora UNESP, 2016.
- FIGUEIREDO, Márcia Janete de Fátima Mesquita de et al. Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, p. 102-106, 2014.
- FONSECA, Aliani Moura. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral utilizando proteínas de *Leishmania infantum* com função desconhecida. 2013.
- FONTOURA, Iolanda Graep; FONTOURA, Volmar Moraes; NASCIMENTO, Luiz Fernando Costa. Análise espacial da ocorrência de leishmaniose visceral no estado do Tocantins, Brasil. **Ambiente and Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 11, p. 1088-1095, 2016.
- FRANÇA, Viviane Helena de; MARGONARI, Carina; SCHALL, Virgínia Torres. Percepção de professores do ensino básico em relação as suas práticas educativas sobre leishmanioses: um estudo em área endêmica de Minas Gerais. **Ensaio Pesquisa em Educação em Ciências (Belo Horizonte)**, v. 15, n. 3, p. 35-51, 2013.
- FREITAS, Eloisa et al. Transmissão de *Leishmania infantum* por transfusão sanguínea em cães: potencial para infecção e importância de fatores clínicos. **Parasitologia Veterinária**, v. 137, n. 1-2, p. 159-167, 2006.
- GALLUZZI, Luca et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2018.

GÁLVEZ, R. et al. Controlando flebotomíneos para prevenir a infecção canina por *Leishmania infantum*: um caso de conhecer seu inimigo. **Pesquisa em Ciência Veterinária**, v. 121, p. 94-103, 2018.

GÁLVEZ, R. et al. Tendências emergentes na soroprevalência da leishmaniose canina na região de Madri (centro da Espanha). **Parasitologia Veterinária**, v. 169, n. 3-4, pág. 327-334, 2010.

GALVIS-OVALLOS, Fredy et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 24, 2017.

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

GOMES, Loize Bombardelli. Avaliação da antigenicidade de mimotopos de *Leishmania amazonensis* no diagnóstico de leishmanioses. 2016.

GONTIJO, Bernardo; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.

GONZÁLEZ BARRIOS, Laura Alicia. Leishmaniose canine: ferramentas moleculares usadas para diagnóstico e pesquisa de amostras biológicas. **Compêndio de Ciências Veterinárias**, v. 8, n. 2 P. 36-43, 2018.

GRIMALDI JR, Gabriel et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54-59, 2012.

GUIMARÃES, K. S. et al. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 131, n. 3-4, p. 305-309, 2005.

HONIGBERG, Bronislaw M. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. **Progress in Protozoology**, p. 68, 1963.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2020).

KAMHAWI, S. et al. A competência vetorial de *Phlebotomus sergenti* é específica para *Leishmania tropica* e é controlada pela fixação do intestino médio mediada por lipofosfoglicanos, espécie-específica. **Parasitology**, v. 121, n. 1, p. 25-33, 2000.

KEVRIC, Ines; CAPPEL, Mark A.; KEELING, James H. Infecções por *Leishmania* no novo e no velho mundo: uma revisão prática. **Clínicas Dermatológicas**, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015.

KUSCHNIR, Renata Caetano et al. **Avaliação de parâmetros clínico-laboratoriais e imunológicos e sua relação com recidiva na leishmaniose visceral**. 2020. Tese de Doutorado.

LACHAUD, L. et al. Valor de dois métodos de PCR para o diagnóstico da Leishmaniose visceral canina e a detecção de portadores assintomáticos. **Parasitology**, v. 125, n. 3, p. 197, 2002a.

LACHAUD, Laurence et al. Comparação de seis métodos de PCR usando sangue periférico para detecção de leishmaniose visceral canina. **Jornal de Microbiologia Clínica**, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002b.

LAINSON, Ralph; RANGEL, Elizabeth F. *Lutzomyia longipalpis* e a ecoepidemiologia da Leishmaniose visceral americana, com referência particular ao Brasil: uma revisão. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAINSON, Ralph et al. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. 2010.

LAINSON, Ralph et al. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of onkeys, sloths and procyonids In Amazonian Brazil. 1989.

LEVINE, ND et al. Uma Nova Classificação dos Protozoários. O Comitê De Evolução Sistemática Da Sociedade De Protozoólogos. **The Journal of protozoology**, v. 27, n. 1, pág. 37-58, 1980.

LEWIS, D. J. The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. **Annual Review of Entomology**, v. 19, n. 1, p. 363-384, 1974.

LIMA, Denise Alves et al. Aspectos epidemiológicos, sociais e ambientais relacionados a transmissão e ao controle da Leishmaniose visceral canina na Ilha da Marambaia, Mangaratiba–Rio de Janeiro. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 9, n. 3, p. 64-81, 2019.

LIMA, Denise Alves de et al. **Estudo da fauna flebotomínica em área de notificação de casos autóctones de leishmaniose visceral canina, na Ilha da Marambaia, Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro**. 2014. Tese de Doutorado.

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

LIMA, Maria Luiza C. de et al. Análise espacial dos determinantes socioeconômicos dos homicídios no Estado de Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 2, p. 176-182, 2005.

LOPES, ME Moura et al. Indigenous microbiota and Leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 1, p. 37-44, 2016.

MACHADO-COELHO, GL et al. Leishmaniose tegumentar americana no Sudeste do Brasil: agrupamento no espaço-tempo. **Jornal Internacional de Epidemiologia**, v. 28, n. 5, pág. 982-989, 1999.

MAIA, Carina Scanoni et al. Análise espacial da Leishmaniose visceral americana no município de Petrolina, Pernambuco, Brasil. **Hygeia-Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 10, n. 18, p. 167-176, 2014.

MAIA-ELKHOURY, Ana Nilce Silveira et al. Exploring spatial and temporal distribution of cutaneous leishmaniasis in the Americas, 2001–2011. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005086, 2016.

MALTA, Marcelo Campos Cordeiro et al. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 1-2, p. 193-197, 2010.

MANNA, Laura et al. Quantificação de DNA de *Leishmania* por PCR em tempo real em cães naturalmente infectados tratados com miltefosina. **Anais da Academia de Ciências de Nova York**, v. 1149, n. 1, p. 358-360, 2008.

MARCILI, Arlei et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 44-51, 2014.

MARCONDES, Mary; DAY, Michael J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 261-272, 2019.

MARGONARI, Carina et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 31-38, 2006.

MARINHO, Carolina Pereira et al. Achado citopatológico de formas amastigota de *Leishmania* spp. na língua de um canino: Relato de caso. **PUBVET**, v. 11, p. 1074-1187, 2017.

MAROLI, Michele et al. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 357-360, 2007.

MAYRINK, Wilson et al. Ensaio randomizado cluster para avaliar a eficácia de uma vacina contra a leishmaniose tegumentar na microrregião de Caratinga, sudeste do Brasil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 4, pág. 212-219, 2013.

MEDKOUR, Hacene et al. Evidência molecular de *Leishmania infantum* e *Leishmania guyanensis* em bugio vermelho (*Alouatta seniculus*) da Guiana Francesa. **Doenças Transmitidas Por Vetores E Zoonoses**, v. 19, n. 12, pág. 896-900, 2019.

MENDES, Tiago Antônio de Oliveira et al. Identification of strain-specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. e2524, 2013.

MENEZES, Júlia Alves et al. Uma abordagem integrada usando análise espacial para estudar os fatores de risco para leishmaniose em área de transmissão recente. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MENON, Sonia S. et al. Controle descentralizado da Leishmaniose visceral humana em áreas urbanas endêmicas do Brasil: uma revisão da literatura. **Medicina Tropical e Saúde**, v. 44, n. 1, p. 1-9, 2016.

MICHALSKY, Erika Monteiro et al. Infectividade de cães soropositivos, com diferentes formas clínicas de Leishmaniose, a flebotomíneos de *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitologia Veterinária**, v. 147, n. 1-2, p. 67-76, 2007.

MIRANDA, Gabriella Moraes Duarte et al. **Leishmaniose visceral em Pernambuco: a influência da urbanização e da desigualdade social**. 2008. Tese de Doutorado.

MIRÓ, Guadalupe et al. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 371-377, 2008.

MIRÓ, Guadalupe et al. Novel areas for prevention and control of canine leishmaniosis. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 718-730, 2017.

MOLINA, R. et al. Infectividade de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* por *Phlebotomus perniciosus* colonizado. **Transações da Sociedade Real de Medicina Tropical e Higiene**, v. 88, n. 4, p. 491-493, 1994.

MOLINA, R. et al. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 1-2, p. 268-271, 2012.

MOLYNEUX, David H.; SAVIOLI, Lorenzo; ENGELS, Dirk. Doenças Tropicais Negligenciadas: progresso para enfrentar a pandemia crônica. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 312-325, 2017.

MONTOYA, Ana et al. *Leishmania infantum* infection in Bennett's Wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) in a Spanish wildlife park. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 47, n. 2, p. 586-593, 2016.

MORAES, Alessandra Regina Thom Pimentel de et al. Avaliação da combinação da oxigenação hiperbárica com óleos de *Copaifera* sp e *Carapa guianensis* no tratamento da leishmaniose experimental. 2016.

MOREIRA, M. A. B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 245-252, 2007.

MULLER, Hérick Sampaio. Avaliação do antígeno metalopeptidase mitocondrial para diagnóstico sorológico de Leishmaniose visceral. 2016.

NAUCKE, Torsten J.; LORENTZ, Susanne. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2012.

NEVES, David Pereira Parasitologia humana / David Pereira Neves. - 13. ed. -- São Paulo: Editora Atheneu, 2016.

NISHIDA, Leonardo Henrique Gomes; DELMASCHIO, Isabela. Leishmaniose visceral canina–revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária-UNORP**, v. 1, n. 2, p. 07-15, 2017.

OLIVA, Gaetano et al. Um ensaio randomizado, duplo-cego e controlado de eficácia da vacina LiESP / QA-21 em cães virgens expostos a duas estações de transmissão de *Leishmania infantum*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3213, 2014.

OLIVEIRA, E. F. et al. Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in urban area endemic for visceral leishmaniasis. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 2, p. 277-284, 2013.

OLIVEIRA, Trícia Maria F. et al. Estudo da reatividade cruzada em amostras de soro de cães positivos para *Leishmania* sp., *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, pelo ensaio imunoenzimático indireto e pela reação de imunofluorescência indireta. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. p. 7-11, 2008.

OPAS. Leishmanioses: Relatório Epidemiológico das Américas. 2019.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde, 2020.

OTRANTO, Domenico et al. Prevenção da leishmaniose canina em uma área hiperendêmica usando uma combinação de 10% de imidacloprida / 4,5% de flumetrina. **PLOS One**, v. 8, n. 2, p. e56374, 2013.

OTRANTO, Domenico; DANTAS-TORRES, Filipe. Pulgas e carrapatos como vetores de *Leishmania* spp. para cães: é preciso cautela. **Parasitologia Veterinária**, v. 168, n. 1-2, p. 173-174, 2009.

PALATNIK-DE-SOUSA, Clarisa B. Vaccines for canine Leishmaniose. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 69, 2012.

PALTRINIERI, Saverio et al. Exames laboratoriais para diagnóstico e monitoramento da Leishmaniose canina. **Patologia Clínica Veterinária**, v. 45, n. 4, p. 552-578, 2016.

PAZ, Gustavo Fontes et al. Avaliação da capacidade vetorial de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) na transmissão da Leishmaniose visceral canina. **Parasitology Research**, v. 106, n. 2, p. 523-528, 2010.

PESSOA-E-SILVA, Rômulo et al. O diagnóstico da Leishmaniose visceral canina no Brasil: enfrentando velhos problemas. **Parasitologia Experimental**, v. 199, p. 16, 2019.

PRADO, Patrícia Fernandes do et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral humana e canina em Montes Claros, Estado de Minas Gerais, Brasil, entre 2007 e 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 561-566, 2011.

QGIS Development Team (2021) Quantum GIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. Disponível em: <http://qgis.osgeo.org>.

RAMSEY I.K., et al. Sistema hematopoético e linforreticular. In: Ramsey I.K. & Tennant B.J. (Eds). **Manual de Doenças Infecciosas em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca Editora, p.90-93. 2010.

RANGEL, Elizabeth F.; LAINSON, Ralph. Flebotomíneos do Brasil. In: **Flebotomíneos do Brasil**. 2003. p. 368-368.

REBÊLO, José Manuel Macário et al. Sandflies (Diptera, Psychodidae) from an endemic Leishmaniasis area in the cerrado region of the State of Maranhão, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, n. 3, p. 623-630, 1999.

RÊGO, Felipe Dutra. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e as Leishmanioses na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, BR. 2013.

REGUERA, Rosa M. et al. Situação atual da prevenção e tratamento da leishmaniose canina. **Parasitologia Veterinária**, v. 227, p. 98-114, 2016.

REIS, Lisiane Lappe dos et al. Changes in the epidemiology of visceral Leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 638-645, 2017.

REZENDE, M. B. et al. Detection of *Leishmania* spp. in bats from an area of Brazil endemic for visceral leishmaniasis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 6, p. e36-e42, 2017.

RIBEIRO, JMC Saliva de insetos: função, bioquímica e fisiologia. In: Mecanismos reguladores na alimentação de insetos. Springer, Boston, MA, 1995. p. 74-97.

RIBEIRO, Raul Rio et al. Canine Leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-12, 2018.

ROCHA, Ana Maria Sampaio. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no Município de Ouro Preto Minas Gerais Brasil. 2019.

ROCHA, Ana Vitória Verde Oliveira et al. "Diagnosis and epidemiology of *Leishmania infantum* in domestic cats in an endemic area of the Amazon region, Brazil." **Veterinary Parasitology** vol. 273 (2019): 80-85. doi:10.1016/j.vetpar.2019.08.007.

RODRIGUES, Alina C. et al. Criação peridomiciliar de galináceos aumenta o risco de Leishmaniose visceral humana. 1999.

ROHOUSOVA, Iva et al. Exposição a *Leishmania* spp. e flebotomíneos em animais domésticos no noroeste da Etiópia. **Parasitas e Vetores**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2015.

ROMERO, Gustavo AS; BOELAERT, Marleen. Control of visceral Leishmaniasis in Latin America—a systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, p. e584, 2010.

SALES, Daniela Pinto et al. Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina e Humana no Estado do Maranhão, Brasil (2009-2012). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 24, n. 3, 2017.

SALZO, P. S. Aspectos dermatológicos da Leishmaniose canina. **Nosso clínico, São Paulo**, v. 11, p. 30-34, 2008.

SANT'ANNA, Mauricio RV et al. Chicken blood provides a suitable meal for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and does not inhibit *Leishmania* development in the gut. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2010.

SCANDAR, Sirle Abdo Salloum et al. Ocorrência de Leishmaniose visceral americana na região de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 8, n. 88, p. 13-22, 2011.

SINAM. Ministério da Saúde. SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. 2021.

SHARMA, Umakant et al. Insetos vetores de *Leishmania*: distribuição, fisiologia e seu controle. **Journal Vector Borne Diseases**, v. 45, n. 4, p. 255-72, 2008.

SHAW, Philip et al. Intellectual ability and cortical development in children and adolescents. **Nature**, v. 440, n. 7084, p. 676-679, 2006.

SILVA, Ryan Emiliano et al. Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2019.

SILVA, Sydnei Magno et al. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 159-162, 2009.

SILVA, Claudia Bezerra da et al. Seroepidemiological aspects of *Leishmania* spp. in dogs in the Itaguai micro-region, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 39-45, 2013.

SILVA, Debora Marcolino. Leishmaniose visceral canina: análise do valor preditivo positivo da combinação dos testes diagnósticos DPP e ELISA em cães submetidos a eutanásia no Centro de Controle de Zoonoses do Distrito Federal. 2015b.

SILVA, Fabiana L. et al. Transmissão venérea da Leishmaniose visceral canina. **Parasitologia Veterinária**, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, 2009.

SILVA, José D. et al. Leishmaniose visceral em cães de assentamentos rurais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1292-1298, 2017.

SILVA, Karolyne Botelho Marques et al. Análise espacial da Leishmaniose visceral no município de Palmas, Tocantins, Brasil. **Hygeia-Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 13, n. 25, p. 18-29, 2017.

SILVA, Raizza Barros Sousa et al. Seroprevalence and risk factors associated with canine visceral leishmaniasis in the State of Paraíba, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. 683-688, 2018.

SILVA, Raizza et al. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 625-629, 2016.

SINGH, SP et al. Fatores de risco para Leishmaniose visceral na Índia: mais evidências sobre o papel dos animais domésticos. **Medicina Tropical e Saúde Internacional**, v. 15, p. 29-35, 2010.

SOARES, Isabel R. et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 665-669, 2013.

SOLANO-GALLEGÓ, Laia et al. Diagnóstico sorológico da Leishmaniose canina: comparação de três testes comerciais ELISA (Leiscan®, ID Screen® e Leishmania 96®), um teste rápido (Speed Leish K®) e um IFAT interno. **Parasitas e Vetores**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2014.

SOLANO-GALLEGÓ, Laia et al. Diretrizes LeishVet para o manejo prático da Leishmaniose canina. **Parasitas e Vetores**, v. 4, n. 1, p. 1-16, 2011.

SOLANO-GALLEGÓ, Laia et al. Redução precoce de anticorpos específicos para *Leishmania infantum* e parasitemia sanguínea durante o tratamento em cães com doença moderada ou grave. **Parasitas e Vetores**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2016.

SOUZA, Ana Paula et al. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. **PLOS One**, v. 8, n. 6, p. e66110, 2013.

STEVEDING, Dietmar. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2017.

SUNDAR, Shyam; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TALMI-FRANK, Dalit et al. *Leishmania tropica* in rock hyraxes (*Procavia capensis*) in a focus of human cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 82, n. 5, p. 814, 2010.

TELES, Ana Paula Silva et al. Fatores de risco associados à ocorrência da Leishmaniose visceral na área urbana do município de Campo Grande/MS. **Hygeia-Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 11, n. 21, p. 35-48, 2015.

TOLEDO, Celina Roma Sánchez de et al. Vulnerabilidade à transmissão da leishmaniose visceral humana em área urbana brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, 2017.

TORRES-GUERRERO, Edoardo et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 2017.

TRAVI, Bruno L. et al. Leishmaniose visceral canina: Diagnóstico e manejo do reservatório que vive entre nós. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006082, 2018.

TSOKANA, C. N. et al. First evidence of *Leishmania* infection in European brown hare (*Lepus europaeus*) in Greece: GIS analysis and phylogenetic position within the *Leishmania* spp. **Parasitology Research**, v. 115, n. 1, p. 313-321, 2016.

VIEIRA, Vanessa Rendeiro et al. **Estudo sobre a ecologia dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) em ambientes de grande ação antrópica e silvestre, da orla marítima dos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil**. 2019. Tese de Doutorado.

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. JDDG: **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 13, n. 3, p. 191–201, 2015.

WERNECK, Guilherme L. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo. 2016.

WERNECK, Guilherme L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. 2010.

WERNECK, Guilherme Loureiro. Effectiveness of control strategies against visceral Leishmaniasis in Brazil: there is no silver bullet. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, p. 1-3, 2018.

WERNECK, Guilherme Loureiro. Leishmaniose visceral no Brasil: fundamentos e preocupações em relação ao controle de reservatórios. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 5, p. 851-856, 2014.

WHO. World Health Assembly resolution WHA66.12: Neglected Tropical Diseases: prevention, control, elimination and eradication. 2012.

WHO. World Health Assembly resolution WHA66.12: Neglected Tropical Diseases: prevention, control, elimination and eradication. 2013.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. Fact sheet. 2019. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

WHO. Controle das Leishmanioses. Relatório de uma reunião do Comitê de Especialistas da OMS no Controle de Leishmanioses (Genebra). 2010.

WHO. World Health Organization. Leishmaniosis. Epidemiological situations. 2018.

YILDIZ, Mustafa et al. Síntese, caracterização e aplicação de um novo quimiossensor colorimétrico de base de Schiff solúvel em água à base de polietilenoimina para cátions metálicos e atividade biológica. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 252, p. 55-61, 2017.

ZIEMNICZAK, Henrique Momo et al. Canine visceral leishmaniasis in Rondônia, Brazil: a report of an autochthonous case. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 15, n. 1, 2021.

ZOU, Lan; CHEN, Jing; RUAN, Shigui. Modeling and analyzing the transmission dynamics of visceral leishmaniasis. **Mathematical Biosciences & Engineering**, v. 14, n. 5&6, p. 1585, 2017.

ANEXOS

Letnrl4'wnt<a ctJ altt o\$5n aanitttt n t1n cijne tton mufjclplns tjn OnlAg<iü e Pin8ldnnln Jkccollno ccm vtelJJ é j)/Urnc\$Éu dn cncdn tmana e gnimal.

2. Número de Participantes da Pesquisa: 200

4. Área do Conhecimento.
Grande Área 5: Ciências Agrárias

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

5. Name _____

RITA DE MARIA SEABRA NOGUEIRA

6. CPF
206.957.993-04

7. Endereço (Rua, n.º):

DEPUTADO LUIS EDUARDO MAGALHAES CALHAU aportamentg 403 torre mlloq SAO LUIS
MARAHIAO 6007141 \$

8. Nacionalidade
bR1S|LE|RO

9. Telephone:

98991879699

10. Outro Telefone:

1J. E all:

1i!a e b!))@professor.uema.br

** C^A n'sso: Dtsc8nro que confiado e cumpr)rei os requisitos da Resolução ChtS 468/t2 e suas col plementares. Comprometo-me 8
 utlf.zat pS rnate'ncâis e dados coletados exclusivamente para os fins previsios no protocolo e a publicar oa raaultados eejBfh 6les favorávela ou não.
 4co? a e responsab kdades pela condução clenlfica do projeto ecima, Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente asginada
 f*+*MI 'S MsWwsÀveis e tnr4 pRrte integrante de documentação do mesmo.

Data: 30 106 1 2021

PSendo

Assinatura

INSTITUIÇÃO PROPONENTE

12. Nome:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

13. CNIPJ:

06.352.421/0001-68

14. Unidade/orgão'

15. Triefc«>a:
552t

16. Outro Telefone:

Termo de compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 486/12 e suas alterações e que esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.

Antoni Alice Costa Rodriguez


CPF:

270.728.003-87

Pro-Reitora Adj. de Pesquisa e Pós-graduação

Data

Data 10 / 06 / 2021


Assinatura

Assinatura

PATROCINADOR PRINCIPAL

17. Nome

1187 UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ (UEPR)

18. Telefone

(000) 0000 0000

19. E-mail

0000000000000000

Termo de Compromisso: Declaram que cederão e cederão as imagens da Universidade do Paraná, do Estado do Paraná e do Brasil, para fins de pesquisa, sem fins lucrativos, e utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins acima mencionados, não podendo ser utilizados para fins comerciais, políticos ou de qualquer outra natureza. Aceito as responsabilidades pela conduta realizada de acordo com o presente termo.

Nome

Prof. Dr. Maria Sônia Pereira

206 967. 913. 111

professora Celso de J. V.

prof. Dr. Celso de J. V.

Rosinha

professora



DECLARAÇÃO

Declaramos para devidos fins que o projeto intitulado **“LEVANTAMENTO DA SITUAÇÃO SANITÁRIA DE CÃES E GATOS NO MUNICÍPIO DE BELAGUA COM VISTA À PROMOÇÃO DA SAÚDE HUMANA E ANIMAL”** foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal - CEEA do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, conforme protocolo nº 042/2019 aprovado em 07/11/2019, para o período de execução da pesquisa entre os meses de setembro/2019 a setembro/2020 pela equipe coordenada pela Profa. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira, e os membros executores Carla Fernanda do Carmo Silva e Andrea Teles dos Reis por atender as normas de Bem-Estar Animal da Resolução do CFMV nº 1000/2012 e a Lei 11.794/2003.

São Luís, 11 de novembro de 2019

Prof. Dra. Alana Lislea de Sousa
Presidente do CEEA/CMV/UEMA



CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Credenciamento Provisório - CONCEA/MCT
Processo 01200.002200/2015-06 - 19/06/2015

FORMULÁRIO DE PARECER

**DATA DA
ENTREGA DO
PROCESSO**

21/10/2019

**NÚMERO DO
PROCESSO**

042/2019

**NÚMERO DO
PARECER**

042/2019

**DATA DO
PARECER**

07/11/2019

1. TÍTULO DO PROJETO

LEVANTAMENTO DA SITUAÇÃO SANITÁRIA DE CÃES E GATOS NO MUNICÍPIO DE BELÁGUA COM VISTA À PROMOÇÃO DA SAÚDE HUMANA E ANIMAL

2. LOCAL DA EXECUÇÃO (IES/Laboratório)

Laboratório de Morfobiologia e patogenia de parasitos/Medicina Veterinária /UEMA/CCA

3. OBJETIVO

Geral: Realizar levantamento da situação sanitária de cães e gatos do município de Belágua com vista à promoção da saúde.

Específicos: Pesquisar *leishmania*, *trypanosoma*, *toxoplasma* em cães e gatos; Pesquisar helmintos gastrintestinais em cães com ênfase nos gêneros causadores de larva migrans cutânea e visceral; Pesquisar artrópodes (pulgas, piolhos e carrapatos) vetores de patógenos; Realizar levantamento nos postos de saúde e na secretaria municipal de saúde dos casos de patologias de caráter zoonótico; Palestras educativas para conscientização da população quanto aos cuidados higiênicos-sanitários na criação de cães e gatos; Elaboração de sumário executivo.

4. ESPÉCIE ANIMAL/RAÇA

Espécie Animal: Canino e felino

5. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA AUTORIZADA.

Especificar cada grupo: Não haverá formação de grupos, as amostras serão coletadas em machos e fêmeas.

6. PERÍODO DE EXECUÇÃO DA PESQUISA

Início: 19/09/2019 Término: 30/09/2020

7. PESQUISADOR RESPONSÁVEL/EXECUTOR

Executor da Pesquisa: Carla Fernanda do Carmo Silva e Andrea Teles dos Reis

Nome do Orientador: Prof.^a Dr.^a Rita de Maria Seabra Nogueira

8. EQUIPE/COLABORADORES

Andrea Teles dos Reis

Márcio Leandro dos Santos Rodrigues

Thais Bastos Rocha

Leandro Macedo Miranda

Thaliane França Costa

9. PARECER

Projeto aprovado na reunião do CEEA do dia 07/11/2019 por atender as normas de Bem-Estar Animal da resolução do CFMV nº 1000/2012 e a Lei 11.794/2008.



CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Credenciamento Provisório - CONCEA/MCT
Processo 01200.002200/2015-06 - 19/06/2015

11 / 11 / 20 19.

Parecerista

Alana

Presidente da Comissão

INQUÉRITO SORO – EPIDEMIOLÓGICO DE CÃES / MUNICÍPIO DE BELÁGUA – MA

Proprietário: _____ Telefone: _____

Endereço: _____ Bairro: _____

Coordenadas Geográficas: _____

MANEJO AMBIENTAL

Tipo de moradia: () Tijolo sem reboco () Tijolo rebocado () Madeira sem pintura () Madeira com pintura

Possui animais? () Sim () Não Quais? _____

Acúmulo de matéria orgânica? () Sim () Não Quais? _____

Insetos incômodos? () Sim () Não Período: () Amanhecer () Entardecer () Noite () Durante o dia () Não sabe

Proteção individual: () Nenhuma proteção () Tela nas janelas () Repelente () Inseticida na casa _____

Quais animais gatos já teve? _____ Morreram de que? _____

Utilização medidas controle: () Sim () Não - () Coleira repelente () Bisnaga repelente () Vacina LVA () Dedetização REGISTRO DO ANIMAL – CÃES – NOME: _____

Raça: () Com raça definida () Sem raça definida Idade: _____ Sexo: () F () M Tamanho: () P () M () G

Aquisição: () Comprou () Adotou () Cria de animais próprios () Ganhou Quando adquiriu o animal? _____

Motivação de posse: () Afeto () Guarda () Companhia () Presente () Não gosta () Não sabe explicar

Número de crias: _____ Número de filhotes: _____

Local onde o animal dorme: () Dentro de casa () Cama do proprietário () Fora de casa () Casinha () Preso na corrente () Preso na rua () Não sabe

Alimento: () Ração () Comida preparada pelo animal () Resto de comida () Não sabe

É vacinado? () Sim () Não () Não sabe Quais? () Raiva () Leishmania () Raiva+Leishmania _____

Vermífugo: () Sim () Não Higiene-Banho: () Sim () Não

Recolhe fezes: () Somente do quintal () Somente da rua () Quintal+Rua () Não recolhe () Não sabe

Restrição de movimento: () Não sai à rua () Sai com supervisão () Sai sem supervisão () Foge às vezes () Sai quando abre o portão () Não sabe

Esterilização? () Sim () Não Quando? _____

Reposição (se o animal foi adquirido para repor um eutanasiado por conta de LVA)? () Sim () Não

Situação: () Coletado () Recusou () Imóvel fechado () Entrega do cão () Fugiu () Morreu por causa desconhecida () Morreu por outra causa () Morreu por Leishmaniose

Sinais clínicos: _____

OBSERVAÇÕES:

DATA DA COLETA:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro, por meio deste termo, que concordei em ser entrevistado(a) e/ou participar na pesquisa de campo referente ao projeto/pesquisa intitulado(a) **“ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, ESPACIAL, MOLECULAR E SOROLÓGICO DE *Leishmania infantum* EM CÃES DOMÉSTICOS NO MUNICÍPIO DE BELÁGUA, CERRADO MARANHENSE”** desenvolvida(o) pela aluna do Mestrado em Ciência Animal – UEMA, **Andrea Teles dos Reis**. A pesquisa é orientada pela **Prof. Dr. Rita de Maria Seabra Nogueira**, a quem poderei contatar / consultar a qualquer momento que julgar necessário através do telefone **nº (98) 991879699** ou e-mail **grita62@hotmail.com**. Afirmo que aceitei participar por minha própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro ou ter qualquer ônus e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. Fui informado(a) dos objetivos estritamente acadêmicos do estudo, que, em linhas gerais é **realizar levantamento de parasitas em cães no município de Belágua**. Minha colaboração se fará de forma anônima, por meio de: **entrevista semi-estruturada e consentimento de coleta das amostras necessárias do animal**. O acesso e a análise dos dados coletados se farão apenas pelo(a) pesquisador(a) e/ou seu(s) orientador(es) / coordenador(es). Fui ainda informado(a) de que posso me retirar desse(a) estudo / pesquisa / programa a qualquer momento, sem prejuízo para meu acompanhamento ou sofrer quaisquer sanções ou constrangimentos.

Considerando, que fui informado (a) dos objetivos e da relevância do estudo proposto, de como será minha participação, dos procedimentos e riscos decorrentes deste estudo, declaro o meu consentimento em participar da pesquisa, como também concordo que os dados obtidos na investigação sejam utilizados para fins científicos (divulgação em eventos e publicações). Estou ciente que receberei uma via desse documento. São Luís, ____/____/____

Assinatura do (a) participante

Assinatura do(a) pesquisador(a) responsável

