

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

Wendel Coura-Vital

**Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos
infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* e
identificação de biomarcadores de infecção**

Belo Horizonte - MG

2011

Wendel Coura-Vital

Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* e identificação de biomarcadores de infecção

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Epidemiologia de Doença Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Prof^a Mariângela Carneiro

Co-orientador: Prof. Alexandre Barbosa Reis

Belo Horizonte - MG

2011

Orientadora: *Prof.^a Mariângela Carneiro*. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia. – Laboratório de Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Co-orientador: *Prof. Alexandre Barbosa Reis*. Universidade Federal de Ouro Preto. Departamento de Análises Clínicas da Escola de Farmácia. – Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Colaboradores:

Dra. Andréa Teixeira Carvalho (CPqRR/FIOCRUZ/MG)

Dr. Marcos José Marques (UNIFAL/MG)

Dr. Nelder Figueiredo Gontijo (UFMG/MG)

Dr. Olindo Assis Martins Filho (CPqRR/FIOCRUZ/MG)

Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti (UFOP/MG)

Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira (CPqRR/FIOCRUZ/MG)

Dra. Vanja Maria Veloso (UFOP/MG)

Instituições Parcerias:

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

Prefeitura Municipal de Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

Universidade Federal de Ouro Preto

Universidade Federal de Alfenas

Suporte Financeiro:

CNPq - Ed. Universal (472554/2007-7)

FAPEMIG - Ed. Universal (CBB - APQ-3073-4.01/07)

DECIT/MS/CNPq/BR/ - (576062/2008-1)

PPSUS/MS/CNPq/FAPEMIG/SES-MG - (CBB-APQ-00356-10)

FAPEMIG: Bolsa de doutorado

Coura-Vital, Wendel

Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* e identificação de biomarcadores de infecção. [manuscrito] / Wendel Coura-Vital. - 2011
169 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Mariângela Carneiro. Co-orientador: Alexandre Barbosa Reis.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia.

1. Leishmaniose visceral – Epidemiologia - Teses. 2. Cão – Doenças – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase - Teses. 4. Marcadores biológicos - Teses. 5. Parasitologia – Teses. 6. Resposta imune - Teses. 7. Polimorfismo de fragmento de restrição. I. Carneiro, Mariângela. II. Reis, Alexandre Barbosa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Parasitologia. IV. Título.

CDU: 616.993.161

Ao meu pai,
Ante as lembranças queridas,
nas quais tuas mãos guiaram-me sempre,
oferecendo apoio às minhas necessidades.

A minha mãe Wander, minha irmã Magally,
meu tio Nery, pelo total apoio em todos momentos
e a sobrinha Júlia, manancial de alegria em minha vida.

A Januária, por todo amor e carinho.

Agradecimentos

Inicialmente a Deus, pelo direcionamento à área de Epidemiologia; por colocar em meu caminho inúmeras pessoas que auxiliaram-me nesta empreitada e por conceder-me sabedoria para lidar com tantas adversidades enfrentadas ao longo destes quatro anos.

A orientadora Mariângela Carneiro, escrevo uma palavra - gratidão - ao acolhimento em seu laboratório e aos ensinamentos, que concederam-me a oportunidade de vislumbrar novos horizontes no âmbito da ciência e segui-los, ciente de que a sabedoria é a colheita do conhecimento. A sensibilidade, sempre tão bem exercida, iluminou-me o raciocínio, conduzindo-me a lições ocultas aos olhos comuns, inacessíveis a esta experiência. (...) "Isto é de crucial importância para o educador e, desta crença depende seu sono e seu despertar: o orientador trabalha com a palavra, eis aí seu maior instrumento. Todos os seus gestos são acompanhados de palavras e são elas que orientam as mãos e a mente."

Ao co-orientador Alexandre Barbosa Reis, por ter me direcionado a área da epidemiologia; que, com seu próprio olhar, imprimiu a cada descoberta uma claridade inefável, quando, a cada paradoxo encontrado, havia alguma esperança de progredir, quando toda grande e profunda dificuldade obrigava-nos a modificar o pensamento, a fim de encontrar nova resposta; quando toda sentença dita era entendida não como uma afirmação, mas como uma pergunta, uma vez que o método da ciência é, muitas vezes tão importante quanto suas descobertas.

A Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti, pela imensa ajuda durante a realização deste trabalho, principalmente pela preciosa colaboração no artigo, na realização das necropsias e xenodiagnóstico. Te admiro muito, e obrigado pelos conselhos, ensinamentos e troca de experiências.

A Dr^a Cláudia Martins Carneiro, por encontrar estratégias que viabilizaram a realização deste trabalho de forma mais harmônica, pelas críticas e sugestões. Minha admiração pela dedicação ao mundo científico e gratidão aos conselhos e ensinamentos.

A Dr^a Sandra Aparecida Lima de Moura, pelas críticas, sugestões e agradável convívio.

Ao Dr. Marcos José Marques, pela oportunidade de aprendizado da técnica de PCR-RFLP e preciosa colaboração na redação de nossos trabalhos. Aos seus alunos, na pessoa do Hebert, pelo auxílio na implementação da técnica de biologia molecular em nosso laboratório.

A Dr^a Vanja Maria Veloso, por todo ensinamento transmitido e ajuda na realização dos testes moleculares, além da agradável convivência e troca de experiências.

A Dr^a Andréia Teixeira, pelo inegável apoio em várias etapas deste trabalho, além do auxílio na confecção do artigo científico e análises de biomarcadores. Minha imensa admiração pela presteza e inata habilidade de auxiliar incondicionalmente.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira pelo apoio que sempre nos oferece, fundamental ao crescimento e amadurecimento de nossa linha de pesquisa.

Dr. Olindo Assis Martins Filho pela contribuição determinante para mantermos a qualidade de nossas publicações.

A Dr^a Elizabeth Castro Moreno, Dr^a Maria Arlene Fausto, Dr. Enrico Antônio Colosimo e ao mestrando Rodrigo, pelas sugestões nas análises de dados deste trabalho.

Ao Dr. Nelder Figueiredo Gontijo pela colaboração no fornecimento dos flebotômicos para a realização do xenodiagnóstico, que serão analisados em meu pós-doutoramento. Ao doutorando Sydney Magno da Silva por ensinar-me a técnica do xenodiagnóstico e ao César pela ajuda no preparo dos recipientes e captura dos vetores.

A Maria Helena, Francisca, Valdelaine, Letícia, Jailsa, Bruna, Thais e demais estudantes do Laboratório de Epidemiologia das Doenças Infecto Parasitárias, pelo agradável convívio.

Aos alunos do LIMP, pelas incontáveis atividades realizadas. Torna-se impossível a descrição minuciosa das atividades executadas por cada um de vocês. Agradeço ao Bruno, Rodrigo, Amanda, Juliana, Nádia e Paula que atuaram na técnica de imunofenotipagem e cultivo celular; Jamile e Fernando pelo auxílio nas leituras dos experimentos no citômetro de fluxo e alimentação dos flebotômicos; Henrique e Nívia Carolina pela realização dos hemogramas; Levi e Samuel, pela imensa ajuda nas extrações e realização das técnicas moleculares e indescritível auxílio em vários outros momentos; Gleisiane, pela ajuda durante os trabalhos de campo; Kelvinson, Thais, Sheler, Flávia, Caio, Caroline, Kátia, Lucilene, Micheline, Giselle, Luísa, Samantha, Lígia, Rory, Fábio, Larissa, João, Lorena e Liliane, pela atuação nas atividades diárias do LIMP durante o período de realização do trabalho de campo. Tânia, Maria e Phillipe, pela essencial ajuda dispensada. Agradeço a todos vocês principalmente pelo companheirismo e constante apoio. A realização deste feito seria impraticável sem um grupo coeso.

A todos colegas da Gerência de Controle de Zoonoses da Regional Noroeste de Belo Horizonte, ressaltando a ex-gerente, Maria Helena F. Morais, pela imensa disposição em auxiliar, disponibilizando todo apoio logístico para a realização deste trabalho. Ao atual gerente Varley A. de Almeida Gomes pela ajuda no trabalho de campo e georeferenciamento; A Lívia, Oton, Janice, Shirley e "Lobão" pela resolutividade perante os imprevistos. Ao Leonardo Henrique, por toda ajuda dispensada em várias etapas deste trabalho; a todos agentes de endemias, em nome de Ricardo, "Pastor", "Gordinho", "Rato" e "Brás", dentre outros, e a toda galera da leishmania pelo trabalho e dedicação a este projeto; a todos funcionários do Centro de Castração da Regional Noroestes (Canal), pelo acolhimento durante as etapas do projeto; a veterinária Ingrid pela ajuda no procedimento de anestesia dos animais para o xenodiagnóstico; a Dr^a Danielle Ferreira de Magalhães que, durante sua permanência na Regional, prestou imenso auxílio e dedicação na realização deste trabalho. A todos funcionários do CCZ, nas pessoas de Maria do Carmo e Adamastor, pelo empenho em nosso auxílio.

Aos motoristas, na pessoa de Cláudio, pelo auxílio no transporte das equipes para o campo e amostras biológicas diariamente para Ouro Preto.

Aos entrevistadores Ana, Rafaella, Kamila, Sílvia, Sílvia Regina, Marlúcia e Alexandra pelo comprometimento no desenvolvimento do trabalho;

Ao grande companheiro de doutorado Júlio César Rocha Costa, pelo convívio.

Ao meu pai (*in memoriam*), pelas constantes inspirações. "(...)A transição desta vida para outra dimensão não é um labirinto sem saída, mas uma avenida que se fecha no crepúsculo e volta a abrir na aurora." Busco tua essência para participar comigo, deste momento que também é teu.

A minha mãe Wander e a Júlia pela alegria (sem ela a vida se empobrece), pelo constante incentivo e palavras de apoio que, em diversos momentos, suavizaram esta travessia. Mãe, muito obrigado pelos exemplos de vida e pela imensa contribuição no meu processo de formação pessoal. A Magally pelo incentivo e apoio, além da ajuda na correção da ortografia deste trabalho.

À Januária, pela cumplicidade, companheirismo, incentivo nas dificuldades, paciência, carinhos e cuidados, me trazendo mais alegria e tornando-me imensamente mais feliz.

Ao tio Nery, um dos maiores responsáveis por embrenhar-me no campo da saúde coletiva, fonte de inspiração para a carreira acadêmica. Meus sinceros agradecimentos pelo constante incentivo, carinho e apoio incondicional ao longo dessa jornada.

Ao Dr. André Pereira Pinto, ex-diretor de Vigilância em Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de Ouro Preto, pela significativa colaboração através da viabilização de meus horários de trabalho no período inicial do doutorado. A Josilane D'Avila (*in memoriam*), grande parceira, pelo incentivo, amizade e apoio durante nossa convivência na Vigilância Sanitária.

A ex-chefe do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto Dr^a Vera de Miranda Guarda e a atual chefe de Departamento Dr^a Mônica Cristina Teixeira, pela colaboração ao condensar minhas aulas na Escola de Farmácia.

Ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, pelo acolhimento e oportunidade de, enquanto professor substituto, confirmar meu interesse em seguir a carreira acadêmica.

A Sumara e Sibebe, secretárias do departamento de Pós-graduação em Parasitologia pela atenção e habilidade em semear alegria neste ambiente. Sou muito grato a vocês por tudo que fizeram por mim. Um grande abraço!

Na pessoa do Prof. Dr. Marcos Horácio Pereira, agradeço ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas pelo conhecimento adquirido.

“O mecanismo do descobrimento não é lógico e intelectual
é uma iluminação subitânea, quase um êxtase.
Em seguida, é certo, a inteligência analisa
e a experiência confirma a intuição.”

Albert Einstein

Resumo

A leishmaniose visceral (LV), nas últimas três décadas, tem expandindo para os grandes centros urbanos no Brasil. Dentre os fatores que contribuem para esta urbanização, encontram-se as dificuldades na execução das medidas de controle, principalmente aquelas relacionadas ao reservatório doméstico (morosidade no diagnóstico e na eutanásia, contínua reposição de cães e métodos de diagnóstico utilizados) além da ineficiência no controle vetorial. Estudos em áreas endêmicas têm demonstrado que a prevalência de leishmaniose visceral canina (LVC) tem sido subestimada pela sorologia, quando comparada à detectada por técnicas moleculares. Baseado nesses fatos, o principal objetivo deste estudo foi identificar a prevalência, a incidência e os fatores de risco associados à infecção por *L. infantum* em cães soronegativos e PCR positivo em uma área de transmissão ativa de leishmaniose. Além disso, realizar uma análise do perfil de resposta imune humoral e celular, investigando detalhadamente a forma assintomática, buscando biomarcadores de resistência e susceptibilidade. Foram investigados 1.443 animais e identificados 230 (15,9%) cães sororreagentes. Pela técnica de PCR-RFLP, foram detectados 356 (24,7%) cães positivos para *L. infantum*. A partir de uma coorte de cães soro e PCR negativo, foi calculada a incidência de infecção (PCR-RFLP) por *L. infantum* e de sororreatividade. Os cães foram acompanhados por 26 meses e a incidência foi em média de 5,8/100 cães/mês pela PCR-RFLP e 1,2/100 cães/mês pela sorologia (ELISA). A partir dos resultados dos testes diagnóstico realizados durante o estudo transversal, os animais foram divididos em dois grupos: cães infectados soronegativo/PCR⁺ (296) e não infectados soronegativo/PCR⁻ (917). Estes animais foram comparados em relação às suas características, caracteres de seus proprietários e do ambiente onde estão inseridos, objetivando identificar fatores associados à infecção por *L. infantum*. Os fatores associados à infecção canina foram: renda familiar menor que um salário mínimo (OR: 4,1); proprietário ter visto previamente o vetor (OR: 1,9); maior tempo de permanência do cão no quintal, (OR: 2,3) e cão não ter realizado exame para leishmaniose anteriormente (OR: 1,6). O modelo Cox foi utilizado para analisar os fatores de risco durante a coorte. Foram identificados os seguintes fatores: presença de casos anteriores de LVC na residência (HR: 1,4), parede sem reboco (HR: 3,5), pelo curto (HR: 1,3) e fuga do cão para a rua (HR: 1,6). Em relação aos fatores de risco associados à sororreatividade, foram identificados: presença de entulho no quintal (HR: 2,8) e o cão ser de grande porte (HR: 2,8). No presente estudo, cães assintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* foram reclassificados pela sorologia e PCR em: cães assintomáticos I (CA-I) soronegativo/PCR⁺ e cães assintomáticos II (CA-II) cães soro e PCR positivo. Estes grupos de animais assintomáticos foram comparados a cães sintomáticos soro E PCR positivo (CS) e a cães controle soro e PCR negativo (CN), avaliando a resposta imune humoral (IgG, IgG1, IgG2, IgM, IgA e IgE), celular (CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺ e CD14⁺) e síntese intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Cães do grupo CA-I apresentam perfis de imunoglobulinas similares ao detectado em cães CN. Já o grupo CA-II comportou-se semelhante a CS, apresentando altos níveis de IgG, IgG2, IgM e IgA, além de elevado número de eosinófilos. Um aumento de

linfócitos T CD5⁺ foi observado nos grupos CA-I e CA-II, quando comparado ao grupo CS, sendo este principalmente devido a linfócitos T CD4⁺ no grupo CA-I e a T CD8⁺ no grupo CA-II. A análise de linfócitos B revelou um aumento desta célula em CA-II comparado com CS. A síntese intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ não foi capaz de demonstrar biomarcadores de resistência e susceptibilidade nos animais do grupo CA-I, sendo necessário avaliar outras citocinas neste grupo. Nossos resultados sugerem que a PCR possui maior acurácia que a sorologia na detecção inicial da infecção em cães assintomáticos, e sua aplicação em larga escala possibilitaria minimizar o número de resultados falso negativo encontrados pela sorologia. A identificação dos fatores de risco associados à LVC é importante para a definição de estratégias de controle da doença, possibilitando o direcionamento de medidas que possam ser adotadas pelas autoridades de saúde. Além disso, este trabalho demonstrou que cães assintomáticos tem um espectro dicotômico de infecção, que pode influenciar na resposta humoral e celular durante a LVC.

Palavras chave: Leishmaniose visceral canina; Incidência; Fatores de risco: PCR-RFLP; Biomarcadores; Cães assintomáticos; Resposta imune.

Abstract

Over the last three decades, visceral leishmaniasis has spread to a number of metropolitan areas in Brazil. Various factors contribute to the urbanization of the disease including the difficulties of implementing control measures relating to the domestic reservoir (delayed diagnosis and euthanasia, continuous replacement of dogs and lack of sensitivity of the methods of diagnosis used) and to the insect vector. Epidemiological studies using molecular techniques have previously indicated that the prevalence of canine visceral leishmaniasis (CVL) is significantly higher than that detected by serology. The aim of the present study was to determine the prevalence, incidence and the risk factors associated with *Leishmania infantum* infection among seronegative and polymerase chain reaction (PCR) positive dogs in the northwest sanitary district of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. In addition, this study was to perform a detailed analysis of the humoral and cellular immune response investigating in detail the canine asymptomatic infection compared with symptomatic dogs naturally infected by *L. infantum*, focussing on a possible biomarker that could be used to identify resistant and susceptible profiles during ongoing CVL. A total of 1,443 dogs were examined and 230 (15.9%) were seropositive in at least one of the enzyme-linked immunosorbent assays applied, whilst PCR amplicons submitted to restriction fragment length polymorphism (RFLP) revealed that 356 animals (24.7%) were positive for *L. infantum* DNA. A cohort study was carried out follow seronegative dogs to identify incidence of *L. infantum* infection. Dogs were followed during 26 months and the incidence rates were 5.8/100 dogs/months by PCR-RFLP and 1.2/100 dogs/months by ELISA. In order to identify the risk factors associated with the infection by *L. infantum*, only seronegative animals were evaluated in the cross-sectional study. Comparison of the two groups of dogs, PCR⁺ (296) and PCR⁻ (917) with respect to the characteristics of the animals and their owners indicated that the risk factors associated with infection were family income < one minimum salary (OR: 4.1), knowledge of the owner regarding the vector (OR: 1.9), regular permanence of dog in the backyard (OR: 2.3), and lack of examination for CVL (OR: 1.6). Cox models were used to analyse the cohort study. The risk factors associated with infection were: presence of cases of CVL sometime in the past (HR: 1.4), unplastered wall (HR: 3.5), short-haired dog (HR: 1.3), and dogs run way from home (HR: 1.6). Also, the risk factors for seroconversion were: presence of rubble in the backward (HR: 2.8) and large dogs (HR: 2.8). In this study, asymptomatic dogs naturally infected with *L. infantum* were re-classified by serological and molecular evaluation as follows: Asymptomatic Dogs I (AD-I) with negative serology and positive molecular results and Asymptomatic Dogs II (AD-II) with positive serology and molecular diagnosis for *L. infantum*. Analysis of humoral immune response (IgG, IgG1, IgG2, IgM, IgA and IgE); immunophenotyping of T-lymphocytes and their subsets, B-cells and monocytes; and synthesis of intracytoplasmic IFN- γ and IL-4 by CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets before and after antigen-specific stimulation *in vitro*; were performed in the AD-I and AD-II groups and compared with Symptomatic Dogs (SD) and Control Dogs (CD). AD-I presented immunophenotypic features similar to those detected in CD, including isotype profile and the number of monocytes cells.

Similar biomarkers were found in AD-II and SD, for example, higher levels of IgG, IgG2, IgM and IgA immunoglobulins and an elevated number of eosinophils. A high frequency of T-lymphocytes and CD4⁺ T-cells was observed in both AD-I and AD-II compared with SD, whereas CD8⁺ T-cells were higher only in AD-II compared with SD. Analysis of B-lymphocytes revealed an increased frequency of this cell type only in AD-II animals compared with SD. Synthesis of intracytoplasmic IFN- γ and IL-4 in T (CD4⁺ and CD8⁺) lymphocytes did not show biomarkers of both (resistance and susceptibility) to the animals in group AD-I. The results showed similar profile to the CN group over time. It will be necessary to evaluate a greater number of cytokines in the AD-I group to find out more markers of resistance and susceptibility. Overall, the results suggested that PCR is more accurate than serology in the early detection of infection among asymptomatic dogs, and its application on a large scale for the surveillance of leishmaniasis could minimise false-negative results. Identification of the risk factors associated with CVL is very important for the definition of strategies of disease control and for determining measures that can be adopted by health authorities and by individual dog owners, moreover asymptomatic dogs have a dichotomous infection spectrum that can influence the humoral and cellular immunological status during canine visceral leishmaniasis.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis; Incidence; Risk factor, PCR-RFLP; Biomarkers; Asymptomatic dogs; Immune response.

Sumário

Resumo.....	i
Abstract	iii
Índice de figuras.....	viii
Índice de tabelas.....	ix
Lista de abreviaturas e sigla	xi
1.0 Introdução	1
1.1 Leishmaniose visceral: uma doença emergente e re-emergente que se urbaniza no Brasil. 2	
2.0 Revisão da literatura.....	5
2.1 Aspectos gerais relacionados à <i>Leishmania</i> spp. e às leishmanioses	6
2.2 Epidemiologia da leishmaniose visceral.....	8
2.2.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral no Velho Mundo	8
2.2.2 Leishmaniose visceral no Novo Mundo	11
2.2.3 Epidemiologia da leishmaniose visceral no Brasil, Minas Gerais e Belo Horizonte.....	12
2.3 Importância do cão na epidemiologia da leishmaniose visceral.....	15
2.4 Aspectos clínicos e laboratoriais da LVC e implicações epidemiológicas.....	19
2.5 Biomarcadores de progressão clínica na LVC.....	20
2.6 Métodos diagnósticos da leishmaniose visceral canina.....	22
2.7 O emprego da biologia molecular para o diagnóstico da LVC.....	25
2.8 A era da epidemiologia molecular nos programas de controle da leishmaniose	26
3.0 Justificativa	28
3.1 Justificativa e relevância.....	29
4.0 Objetivos	30
4.1 Objetivo geral	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
5.0 Metodologia	32
5.1 Delineamento do estudo	33
5.2 Área de estudo	34
5.3 Cálculo da amostra e amostragem.....	34
5.4 Estudo Transversal	36
5.5 Estudo de Coorte	38
5.6 Avaliação clínica	39
5.7 Coleta das amostras	39
5.8 Hemograma	39

5.9 Obtenção do antígeno para a reação imunoenzimática anti- <i>Leishmania</i> e para ensaios de imunofenotipagem <i>in vitro</i>	40
5.10 Avaliação sorológica	40
5.11 Análise molecular - Reação de PCR.....	42
5.11.1 Extração do DNA	42
5.11.2 Controles.....	43
5.11.3 Análise do DNA	43
5.11.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	43
5.11.5 Análise dos produtos da PCR	43
5.11.6 PCR-RFLP mkDNA.....	44
5.12 Citometria de fluxo	44
5.12.1 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	44
5.12.2 Ensaio de imunofenotipagem celular em leucócitos do sangue periférico no contexto <i>ex vivo</i> utilizando tubos	45
5.12.3 Ensaio de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto <i>in vitro</i>	46
5.14 Análise estatística dos dados	48
5.14.1 Regressão logística de efeito misto.....	49
5.14.1.1 Análise univariada e seleção de variáveis para integrar os modelos.....	49
5.14.1.2 Construção de modelos logísticos hierárquicos mistos multivariados, por grupos de variáveis.....	49
5.14.1.3 Remoção sucessiva das variáveis e avaliação de seu efeito no modelo	50
5.14.1.4 Construção do modelo final.....	51
5.14.2 Análise de sobrevivência, Kaplan-Meier e modelo de Cox.....	51
5.14.3 Estimativas de incidência	52
5.15 Aspectos éticos	52
6.0 Resultados	53
6.1 Testes diagnóstico (Bloco I)	55
6.1.1 Estudo Transversal	55
6.1.1.1 Resultados sorológicos e molecular.....	55
6.1.1.2 Sensibilidade dos métodos diagnóstico.....	55
6.1.1.3 Reprodutibilidade dos métodos sorológicos e molecular	56
6.1.1.4 Concordância entre os métodos diagnóstico.....	57
6.1.2 Estudo de Coorte.....	58
6.1.2.1 Resultados sorológicos e molecular.....	60
6.1.2.2 Reprodutibilidade dos métodos sorológicos e molecular	60
6.1.2.3 Concordâncias entre os métodos diagnóstico.....	61
6.1.2.4 Índices de incidência.....	62
6.1.2.4.1 Incidência de infecção	62
6.1.2.4.2 Incidência de soroconversão.....	65
6.2 Entrevistas e análises dos fatores de risco (Bloco II)	66
6.2.1 Estudo Transversal	66
6.2.1.1 Entrevistas com os proprietários	66
6.2.1.2 Ficha dos cães	73
6.2.1.3 Análise dos fatores de risco para infecção canina	75
6.2.1.4 Análise multivariada e modelo final.....	78
6.2.2 Estudo de Coorte.....	79
6.2.2.1 Característica dos cães que compõe a coorte.....	79
6.2.2.2 Análise de sobrevivência	80
6.2.2.3 Análise de sobrevivência para infecção por <i>L. infantum</i>	80

6.2.2.4	Análise de sobrevida para soroconversão	83
6.3.	Análise de biomarcadores (Bloco III).....	86
6.3.1	Perfis de classes e subclasses de Imunoglobulinas	86
6.3.2	Parâmetros hematológicos.....	88
6.3.3	Perfil imunofenotípico de populações linfócitos T (CD5 ⁺) e suas subpopulações (CD4 ⁺ e CD8 ⁺) circulantes	89
6.3.4	Perfil imunofenotípico das células apresentadoras de antígeno circulantes: Linfócitos B (CD21 ⁺) e Monócitos (CD14 ⁺)	89
6.3.5	Síntese intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 por Linfócitos T CD4 ⁺ antes e após estimulação antígeno-específica <i>in vitro</i>	92
6.3.6	Síntese intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 por Linfócitos T CD8 ⁺ antes e após estimulação antígeno-específica <i>in vitro</i>	94
7.0	Discussão.....	96
7.1.	Diagnóstico, prevalência e incidência	97
7.2	Planejamento do estudo e entrevistas	105
7.2.1	Fatores de risco para infecção canina por <i>L. infantum</i> no estudo transversal	105
7.2.2	Fatores de risco para infecção canina por <i>L. infantum</i> durante a coorte	110
7.2.3	Fatores de risco para soroconversão ao longo da coorte em cães infectados.....	110
7.3	Biomarcadores: resposta humoral, celular e síntese de citocinas	113
7.3.1	Resposta humoral.....	114
7.3.2	Resposta celular	116
7.3.3	Síntese de citocinas.....	120
8.0	Conclusões	125
8.1	Conclusões.....	126
9.0	Perspectivas.....	128
9.1	Perspectivas	129
10.0	Apêndice	130
11.0	Anexos.....	140
12.0	Referências	145
12.1	Referências Bibliográficas.....	147

Índice de figuras

Figura 1: Mapa de <i>Kernel</i> (Hotspot) demonstrando a intensidade de infecção canina na Regional Noroeste de Belo Horizonte nos anos de 2006 a 2009.....	15
Figura 2: Biomarcadores de resistência e susceptibilidade na leishmaniose visceral canina.....	20
Figura 3: Delineamento do estudo transversal e coorte.	33
Figura 4: Localização de Belo Horizonte e suas regiões administrativas, mostrando a sororeatividade para leishmaniose em 2007.....	34
Figura 5: Mapa de Belo Horizonte-MG demonstrando parte da Regional Noroeste com as duas áreas de abrangência estudadas, Santos Anjos e Padre Eustáquio.	36
Figura 6: Representação esquemática da construção hierárquica do modelo de regressão logística de efeito misto.....	50
Figura 7: Delineamento de todo o estudo (transversal e coorte).	59
Figura 8: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier demonstrando o tempo decorrido até a infecção do cão por <i>L. infantum</i>	63
Figura 9: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier demonstrando a probabilidade de infecção (PCR-RFPL) e de soroconversão em cães PCR+.....	65
Figura 10: Gráficos de Kaplan-Meier das variáveis que compõe o modelo final de Cox para infecção canina.	82
Figura 11: Gráficos de Kaplan-Meier das variáveis que compõem o modelo final de Cox para soroconversão canina.	85
Figura 12: Reatividade de classes e subclasses de imunoglobulinas em cães naturalmente infectados e classificados de acordo com sua forma clínica e exames laboratoriais.....	87
Figura 13: Perfil imunofenotípico de linfócitos T do sangue periférico em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> categorizados por seu status clínico e resultados laboratoriais	90
Figura 14: Perfil imunofenotípico de células apresentadoras de antígeno do sangue periférico em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> categorizados por seu status clínico e resultados laboratoriais.....	91
Figura 15: Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ e T CD4 ⁺ IL-4 ⁺ e da razão T CD4 ⁺ IFN- γ /IL-4 em culturas controle (RPMI) e estimulada (ASLi) de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> categorizados por seu status clínico e resultados laboratoriais.	93
Figura 16: Percentual de linfócitos T CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ e T CD8 ⁺ IL-4 ⁺ e da razão T CD8 ⁺ IFN- γ /IL-4 em culturas controle (RPMI) e estimulada (ASLi) de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> categorizados por seu status clínico e resultados laboratoriais.	95

Índice de tabelas

Tabela 1: Painel de anticorpos utilizados na imunofenotipagem de leucócitos.	45
Tabela 2: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto <i>in vitro</i>	48
Tabela 3: Resultado sorológico por laboratório e molecular relativo ao estudo transversal.	55
Tabela 4: Sensibilidade e especificidade dos métodos diagnóstico	56
Tabela 5:Reprodutibilidade da técnica de ELISA realizada no LPC durante estudo transversal.	56
Tabela 6: Reprodutibilidade da reação de PCR.....	56
Tabela 7: Concordância entre as técnicas de PCR e ELISA realizadas no LPC e LZOON.....	57
Tabela 8: Resultados da técnica de PCR e sorologia realizadas durante o estudo transversal....	57
Tabela 9: Perdas de seguimento durante a coorte.	58
Tabela 10: Reprodutibilidade da sorologia (ELISA) realizada no LPC durante a coorte.	60
Tabela 11: Reprodutibilidade da PCR durante todas as etapas da coorte.	61
Tabela 12: Resultados de concordância entre a PCR e os testes sorológicos.	62
Tabela 13: Incidência de infecção por <i>L. infantum</i> detectada pela PCR durante a coorte.	62
Tabela 14: Resultados moleculares desde o tempo zero até o final do estudo nos animais que apresentaram resultado molecular negativo durante o estudo transversal.....	64
Tabela 15: Resultados moleculares desde o tempo zero até o final do estudo nos animais que apresentaram resultado molecular positivo durante o estudo transversal	64
Tabela 16: Incidência de soroconversão no grupo PCR ⁺	65
Tabela 17: Distribuição de frequências das variáveis relacionadas ao conhecimento do proprietário sobre a leishmaniose humana, Belo Horizonte, 2008.....	67
Tabela 18: Distribuição de frequências das variáveis relacionadas ao conhecimento do proprietário sobre o vetor da leishmaniose, Belo Horizonte 2008	68
Tabela 19:Distribuição de frequências das variáveis relacionadas ao conhecimento do proprietário quanto ao hospedeiro da leishmaniose, Belo Horizonte, 2008.....	69
Tabela 20: Distribuição de frequências das variáveis relacionadas às condições socioeconômicas e escolaridade, Belo Horizonte, 2008.....	71
Tabela 21: Distribuição de frequências das variáveis relacionadas ao peridomicílio.	72
Tabela 22:Características, comportamento dos animais e os cuidados do proprietário, Belo Horizonte, 2008.....	74

Tabela 23: Sinais clínicos sugestivos de LVC encontrados nos animais dos quais foram coletadas amostras biológicas durante o estudo transversal, Belo Horizonte, 2008.	75
Tabela 24: Distribuição das variáveis relacionadas à características socioeconômicas, domicílio, peridomicílio, conhecimento sobre o vetor e LVC.	76
Tabela 25: Distribuição das variáveis relacionadas com às características dos cães, selecionadas na análise univariada.	77
Tabela 26: Fatores de risco de infecção canina por <i>Leishmania infantum</i> de acordo com o modelo final.	78
Tabela 27: Características dos animais em acompanhamento no estudo de coorte, Belo Horizonte, 2009.....	79
Tabela 28: Análise univariada de Kaplan-Meier verificando o risco de infecção no tempo.....	81
Tabela 29: Modelo final de Cox para fatores de risco da infecção canina.....	82
Tabela 30: Análise univariada de Kaplan-Meier em cães PCR ⁺ verificando as variáveis que constituem fatores de risco para soroconversão.....	84
Tabela 31: Modelo Final para soroconversão de animais PCR positivo.....	85
Tabela 32: Avaliação dos parâmetros hematológicos de cães naturalmente infectados e não infectados.	88

Lista de abreviaturas e sigla

% - percentual	FL1 - Fluorescência do tipo 1 - Isoticianato de Fluroceína
°C - graus Celsius	FL2 - Fluorescência do tipo 2 - Ficoeritrina
Ac - Anticorpo	FITC - Isotiocianato de fluoresceína
Ag - Antígeno	FSC - <i>Forward Scatter</i> (Tamanho celular)
APC - Células apresentadoras de antígeno	GERCZO-NO - Gerência de controle de zoonoses noroeste
ASLi - Antígeno solúvel de <i>L. infantum</i>	GEREPI-NO - Gerência de epidemiologia e informação noroeste
CA-I - cães assintomáticos soronegativo/PCR ⁺	HR - <i>Hazard ratio</i>
CA-II - cães assintomáticos soropositivo/PCR ⁺	HRPO - <i>Horsedarish Peroxidase</i>
CCZ - Centro de controle de zoonoses	IC - Intervalo de confiança
CD- <i>Cluster differentiation</i>	IFN- γ - Interferon gama
CD14- Marcador de superfície de monócitos	Ig - Imunoglobulina
CD4- Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares/indutores	IgA - Imunoglobulina da classe E
CD5 - Marcador de superfície celular de linfócitos T	IgE - Imunoglobulina da classe E
CD8- Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos/supressores	IgG - Imunoglobulina da classe G
CD21- Marcador de superfície celular de linfócito B	IgG1 - Imunoglobulina da subclasse G1
CN - cão controle negativo	IgG2 - Imunoglobulina da subclasse G2
CPqRR - Centro de Pesquisa René Rachou	IgM - Imunoglobulina da classe M
CS - cão soropositivo/PCR ⁺ sintomático	IL-2 - Interleucina dois
DAT - <i>Direct Agglutination Test</i>	IL-4 - Interleucina quatro
DNA - Ácido desoxirribonucléico	IL-10 - Interleucina 10
EDTA - Anticoagulante quelante de cálcio (Ethylenediaminetetraacetic acid)	kDNA - Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto
ELISA- <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>	LIT - Liver Infusion Tryptose
FAST - <i>Fast agglutination screening teste</i>	LIMP - Laboratório de Imunopatologia
FACSDil - Solução diluente de anticorpos	LPC - Laboratório de Pesquisas Clínicas
	LV - Leishmaniose visceral
	LVA - Leishmaniose visceral americana
	LVC - Leishmaniose visceral canina
	LVZ - Leishmaniose visceral zoonótica
	LTA - Leishmaniose tegumentar americana
	LZOON - Laboratório de Zoonoses

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade (classe I e classe II)

OMS - Organização Mundial de Saúde

OR - *Odds ratio*

PBH - Prefeitura de Belo Horizonte

PBS - *Phosphate buffer saline*

PDCK - Leishmaniose dérmica pós “Kala-azar”

PCLV - Programa de controle da leishmaniose visceral

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

RFC - Reação de fixação do complemento

RFLP- *Restriction fragment length polymorphism*

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

rpm - Rotação por minuto

RPMI 1640 - *Roswell Park Memory Institute* (Meio de Cultivo Celular)

SSC - *Side Scatter* (Granulosidade celular)

SRD - Sem raça definida

SFB - Soro fetal bovino

SUCAM - Superintendência de Campanhas de Saúde Pública

SMF - Sistema mononuclear fagocitário

SMSA - Secretaria Municipal de Saúde

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

TA - Temperatura ambiente

THY-1 - Marcador de superfície celular de linfócitos T caninos

Th1 - Células T CD4⁺ secretoras de padrão 1 de citocinas (IL-2 e INF- γ)

Th2 - Células T CD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral tipo α

TRALd - Teste Rápido com anticorpo *Leishmania donovani*

U - unidade

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

UNIFAL - Universidade Federal de Alfenas

1.0 Introdução

1.1 Leishmaniose visceral: uma doença emergente e re-emergente que se urbaniza no Brasil

A Leishmaniose Visceral (LV) tornou-se conhecida após Dr. William Leishman, médico escocês que servia o exército britânico na Índia, diagnosticar, em 1901, os primeiros casos da doença, através da identificação de formas amastigotas do parasito nos tecidos de seus pacientes. Também denominada de Calazar (ou Kala-azar), já despertava atenção dos médicos ocidentais desde 1824 em Jessore, Índia (hoje Bangladesh), onde inicialmente acreditava ser uma forma clínica da malária. Calazar é um termo derivado de Kala, que significa negro em sânscrito (Assamês) e azar, sufixo de origem Persa para doença. O agente etiológico da doença foi isolado pela primeira vez na Índia por William Leishman e Charles Donovan que, trabalhando independentemente publicaram suas descobertas quase simultaneamente. Em homenagem, a espécie foi nomeada de *Leishmania donovani*. O gênero *Leishmania* foi oficialmente proposto em 1903 por Ross (Ross 1903).

No Novo Mundo a presença do parasito foi reconhecida com a designação de uma nova espécie de *Leishmania* que foi agrupada no complexo *Leishmania donovani*, denominada *Leishmania chagasi* (Cunha & Chagas 1937), enquanto no Velho Mundo era chamada *Leishmania infantum*. Hoje, apesar das diferenças no nome e origem geográfica, achados moleculares sugerem que *L. infantum* e *L. chagasi* são a mesma espécie (Mauricio et al. 2000; Lukes et al. 2007).

A leishmaniose visceral americana (LVA) foi inicialmente descrita como uma doença esporádica, de ambiente rural, que atingia seres humanos e cães que viviam em contato direto com ambientes silvestres. Posteriormente, a LVA foi caracterizada como sendo de ocorrência endêmica, com surtos ocasionais, em áreas rurais do Nordeste brasileiro (Deane & Deane 1962a). Neste ambiente, a doença foi descrita associada aos bolsões de pobreza característicos da região (de Oliveira & de Araujo 2003), em virtude das políticas econômicas e sociais que ocasionaram um quadro de exclusão social. A partir da década de 70, foi observado um processo de transição epidemiológica, com a mudança do perfil de morbimortalidade, característico do meio rural, para o ambiente urbano (Alves & Bevilacqua 2004). Dez anos depois, na década de 80, a doença tornou-se endêmica e epidêmica em várias áreas metropolitanas brasileiras (Werneck et al. 2008). Em Teresina, capital do estado do Piauí, foi identificada a primeira grande epidemia urbana de leishmaniose visceral (LV), com mais de 1.000 casos notificados de 1981 a 1986 (Costa et al. 1990). A partir de então, outros grandes centros urbanos

como: Boa Vista e Santarém (Norte); São Luiz, Natal e Aracaju (Nordeste); Montes Claros, Belo Horizonte, Araçuaí, Sabará, Perdões e Rio de Janeiro (Região Sudeste) e Cuiabá (Região Centro-Oeste) vivenciaram ou vivenciam epidemias da doença (Marzochi et al. 1985; Genaro et al. 1990; Jeronimo et al. 1994; da Silva et al. 1997; Franca-Silva et al. 2003). Este aumento do número de casos nas metrópoles deve-se, em parte, ao aperfeiçoamento dos métodos diagnóstico e notificação obrigatória da doença. Outros fatores também contribuíram e contribuem para expansão da LV em ambientes urbanos, a saber: desflorestamento, migração de áreas rurais endêmicas para os centros urbanos, precárias condições socioeconômicas em áreas de vilas e favelas além da articulação dessas áreas com o ambiente rural e desnutrição (Reithinger & Davies 2002b; Desjeux 2004). Além disso, fatores como a boa adaptação do vetor ao ambiente doméstico, limitação das campanhas de controle vetorial e do reservatório, presença de co-infecção em pacientes imunossuprimidos e a seleção de cepas resistentes a terapia, também contribuem para a disseminação e urbanização da LV, gerando um aumento considerável do número de casos (Reithinger & Davies 2002b; Desjeux 2004). Na década de 1980, com o aparecimento da AIDS e sua rápida pandemização, foi observada a presença de co-infecção entre o vírus e a *L. infantum*, o que propiciou a emergência da leishmaniose. Tem-se observado que a forma visceral é mais frequente nas co-infecções, apesar das formas cutâneas também já terem sido descritas (Lindoso et al. 2009; Lindoso & Lindoso 2009). Desde 1980 a co-infecção é observada em países do Mediterrâneo, havendo atualmente um aumento no número de casos, com manifestações clínicas diversas e resposta deficiente ao tratamento convencional com antimoniais (Alvar et al. 2008). No Brasil estima-se que 620.000 pessoas estejam infectadas pelo HIV, o que corresponde a um terço da infecção na América do Sul (Alvar et al. 2008). De 2001 a 2005 foram notificados 16.210 casos de LV no Brasil, sendo que 315 (2%) destes apresentavam co-infecção com HIV (Elkhoury et al. 2007). Um dos possíveis motivos desta elevada prevalência HIV/*Leishmania*, é a expansão simultânea da leishmaniose para o ambiente urbano e do HIV/AIDS para o meio rural, levando a uma sobreposição de áreas geográficas, favorecendo os casos de co-infecção (Alves & Bevilacqua 2004). Dessa forma, as leishmanioses vem ganhando importância como co-infecção entre pacientes infectados pelo HIV que vivem ou viveram em áreas consideradas endêmicas para este protozoário (Alvar et al. 2008).

Um dos principais fatores que contribuiu e contribui para a expansão da LV nos centros urbanos é a limitação do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

(PCLV) no quesito eliminação do reservatório doméstico, devido principalmente a questões logísticas como: demora no diagnóstico e eutanásia dos animais infectados (Braga et al. 1998; Vieira & Coelho 1998), reposição imediata de cães pela população (Dye 1996; Ashford et al. 1998; Braga et al. 1998; Andrade et al. 2007) e o método diagnóstico adotado como padrão-ouro (Reação de Inunofluorescência Indireta - RIFI), que é questionado quanto à sensibilidade e especificidade (Braga et al. 1998; Rosario et al. 2005). Diante disso, torna-se necessário o emprego de testes de diagnóstico com maior acurácia, capazes de identificar os cães infectados, reduzindo a taxa de infecção e transmissão pelos flebotomíneos (Courtenay et al. 2002b). Estudos têm demonstrado que até 21,3% dos animais assintomáticos possuem capacidade potencial de infectar os flebótomos (Molina et al. 1994; Guarga et al. 2000a; da Costa-Val et al. 2007). Percebe-se também que a aplicação da PCR, em conjunto com a sorologia, pode contribuir para determinar a real extensão da infecção subclínica da leishmaniose visceral canina (LVC) em áreas endêmicas (Solano-Gallego et al. 2001a; Baneth et al. 2008). Além disso, em trabalho recentemente publicado por pesquisadores de nosso grupo, foi demonstrado que 62% dos cães com diagnóstico sorológico e parasitológico negativo, apresentavam reação de PCR-RFLP positiva para *L. infantum* (de Andrade et al. 2006). Esses resultados reforçam a hipótese de que um número considerável de cães positivos não são detectados na sorologia convencional e permanecem como reservatórios, possivelmente limitando as campanhas de controle da LV. Diante disso, a compreensão da importância epidemiológica destes animais soronegativos/PCR⁺ é fundamental, uma vez que eles podem estar contribuindo em diversos aspectos da urbanização da LV e colocando em risco a efetividade do PCLV. Outra questão importante deste grupo de animais está relacionada ao seu perfil imunológico, sendo portanto, essencial investigar e identificar biomarcadores de evolução clínica. Assim, este trabalho buscou identificar e acompanhar uma coorte de animais assintomáticos, soronegativos e positivos na técnica de PCR-RFLP, com intuito de estabelecer biomarcadores de progressão clínica relacionados à resistência e suscetibilidade da infecção canina. Além disso, buscou compreender a importância destes animais na epidemiologia da LV em uma área urbana, atualmente considerada área de transmissão ativa da doença, que é o caso de Belo Horizonte, Minas Gerais/Brasil.

2.0 Revisão da literatura

2.1 Aspectos gerais relacionados à *Leishmania* spp. e às leishmanioses

O gênero *Leishmania* foi criado há mais de um século por Ross, (1903). Este parasito é definido como um protozoário digenético do filo Protozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Ross 1903; Lainson & Shaw 1979). O parasito apresenta-se nas formas promastigotas e paramastigotas, que se desenvolvem no tubo digestivo do inseto vetor, bem como nas formas amastigotas, que permanecem e multiplicam no Sistema Monocítico Fagocitário (SMF) do hospedeiro vertebrado. Sua multiplicação, seja ela no hospedeiro vertebrado ou invertebrado, ocorre por divisão binária (Bastien et al. 1992).

A leishmaniose é caracterizada por um conjunto de síndromes complexas e multifacetadas, causadas por espécies distintas do gênero *Leishmania*, sendo transmitida por hospedeiros invertebrados, capazes de infectar desde o homem até animais silvestres e domésticos (Desjeux 2004). Em função do caráter espectral das manifestações clínicas das leishmanioses, existem diversas propostas de classificação para as formas clínicas da doença. Entretanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divide e reconhece as leishmanioses em quatro grupos clínicos: (i) leishmaniose cutânea, (ii) cutânea difusa, (iii) mucocutânea e (iv) visceral. A leishmaniose cutânea é caracterizada pela formação de úlceras únicas ou múltiplas que geram estigmas esteticamente desfigurantes. A forma cutânea difusa é caracterizada por lesões difusas não ulceradas por toda a pele, acometendo principalmente indivíduos com deficiência na resposta celular. A gravidade desta forma deve-se a lesões disseminadas e dificuldade no tratamento. A leishmaniose cutaneomucosa é também conhecida como espúndia, por causar extensiva destruição da cavidade nasal-oral e faringiana com lesões desfigurantes. A forma mais grave é a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como “Kala-azar”, que é caracterizada por febre alta, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e anemia (Desjeux 2004; Murray et al. 2005; Piscopo & Mallia Azzopardi 2007). Neste contexto, a LV possui grande importância epidemiológica, devido a sua elevada taxa de mortalidade que ocorre principalmente em pacientes não tratados. Desta forma, a leishmaniose representa um sério problema de saúde pública em vários países do mundo (WHO 2010).

Em seu ciclo epidemiológico, a LV integra hospedeiros invertebrados que se limitam às espécies de flebotomíneos hematófagos (Diptera: *Psychodidae*, *Phlebotominae*) que pertencem ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e ao

Lutzomyia no Novo Mundo. A espécie *Lutzomyia longipalpis* tem sido considerada o principal vetor da *L. infantum* no Novo Mundo, embora já tenha sido demonstrado outras espécies de *Lutzomyia*, como a *Lu. evansi* e *Lu. cruzi*, estarem agindo como vetores (Travi et al. 1996; Galati et al. 1997). Nos países de clima temperado, os flebotomíneos encontram-se mais ativos durante os meses quentes do ano. Na América do Sul, esta atividade perdura durante todo o ano (Killick-Kendrick 1999; Sharma & Singh 2008), sendo intensificada em ocasiões de ausência de vento e chuva, alta umidade e temperaturas entre 15 e 28°C. As fêmeas adultas alimentam-se principalmente durante o período crepuscular e noturno e são atraídas às residências pelo fototropismo positivo (Killick-Kendrick 1999; Sharma & Singh 2008). Assim, é de essencial importância conhecer a flutuação sazonal da fauna de flebotomíneos em uma região, para que seja possível planejar medidas antivetoriais efetivas.

As fêmeas infectadas participam no ciclo biológico do parasito, pois as formas promastigotas metacíclicas infectantes são transmitidas para o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, realizado no momento da picada. Estes ciclos de transmissão da LV dividem-se em: (i) ciclo urbano zoonótico e por vezes antroponótico, no qual os cães comportam-se como reservatórios e fontes de infecção para os flebotomíneos e onde o homem ocasionalmente também pode comportar-se como reservatório; (ii) ciclo silvestre zoonótico, mantido entre animais silvestres (raposas e/ou gambás) e o flebotomíneo, eventualmente envolvendo o homem; e (iii) ciclo zoonótico rural e urbano, onde animais domésticos tornam-se infectados devido à proximidade com outros animais do ciclo zoonótico silvestre que servem como fonte de infecção para o vetor, presente no peridomicílio (Deane & Deane 1954; Ashford 1996). Neste contexto, o vetor da *L. infantum* encontra-se bem adaptado ao ambiente peridomiciliar, sendo frequentemente detectado em locais como galinheiros e currais (Deane 1956; Alexander et al. 2002; Reithinger et al. 2003a; Alvar et al. 2006). Ao contrário do que ocorre com a *L. donovani*, na transmissão da *L. infantum* o homem é uma fraca fonte de infecção para os flebotomíneos e a transmissão depende principalmente de cães infectados (Lainson & Shaw 1987). Costa et al. (2000) confirmaram a capacidade de transmissão de *L. infantum* do homem para o *Lu. longipalpis*, sugerindo que apenas pessoas com leishmaniose visceral ativa, residentes em regiões com alta densidade de flebotomíneos, seriam capazes de atuar como reservatórios. Indivíduos assintomáticos, entretanto, não demonstraram experimentalmente capacidade de infectar flebotomíneos (Costa et al. 2000).

Considerando o ciclo zoonótico rural e urbano, os hospedeiros vertebrados já reconhecidos estão limitados a um grupo específico de mamíferos, particularmente os pertencentes à família Canidae. No caso da *L. infantum*, o cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório doméstico do parasito, tanto em ambiente urbano quanto rural. No ciclo silvestre da *L. infantum*, a raposa (*Dusicyon vetulus*) no Nordeste do Brasil e o *Cerdocyon thous*, na Amazônia brasileira, são até o momento, os supostos hospedeiros. Neste contexto, o cão vem sendo apontado como o mais importante reservatório, devido ao grande número de casos de LVC e ao intenso parasitismo cutâneo destes animais (Deane & Deane 1962a; Keenan et al. 1984; Abranches et al. 1991; Costa et al. 1999; Gramiccia & Gradoni 2005; Giunchetti et al. 2006; de Queiroz et al. 2011). Assim, o cão representa uma considerável fonte de infecção para os vetores, o que demonstra a sua importância como elo na manutenção da transmissão da infecção, principalmente em áreas urbanas.

2.2 Epidemiologia da leishmaniose visceral

A LV possui característica endêmica em 88 países (Desjeux 2004) e cerca de 90% dos casos notificados no mundo ocorrem em Bangladesh, Índia, Nepal, Brasil e Sudão, sendo o Brasil responsável por 90% dos registros que ocorrem no continente americano (Desjeux 1996).

Estima-se que aproximadamente 350 a 400 milhões de pessoas no mundo, encontram-se em risco de contrair leishmaniose e 12 a 14 milhões estão infectadas. Neste contexto, sabe-se que 59.000 pessoas morrem anualmente de LV dentre as quais 35.000 são homens e 24.000, mulheres. É importante ressaltar que estes dados são subestimados, devido às limitações inerentes ao sistema de notificação de cada país (Desjeux 2004; WHO 2010). Estimativas indicam que a incidência de leishmaniose humana é de 1,6 milhões ao ano, sendo meio milhão da forma visceral e 1,1 milhão da forma cutânea. Apesar deste enorme número de casos, apenas 500 mil são notificados (WHO 2010). Em termos globais a leishmaniose é a terceira mais importante doença transmitida por vetor, depois da malária e filariose (Reithinger & Davies 2002a).

2.2.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral no Velho Mundo

No Velho Mundo encontram-se dois tipos epidemiológicos de LV, a zoonótica (LVZ) e a antroponótica. A LVZ ocorre principalmente nos países que margeiam o Mediterrâneo e na Ásia, onde a *L. infantum* é o agente etiológico e vários são os vetores

envolvidos no ciclo de transmissão. Já a leishmaniose visceral antroponótica é restrita no oeste da África, Bangladesh, Índia e Nepal e o parasito é a *L. donovani* que também possui vários vetores (Desjeux 2001).

Comparado com o restante do mundo, a Índia é o país mais afetado pela LV, juntamente com o Bangladesh e Nepal, sendo responsável por aproximadamente 300.000 casos/ano, o que corresponde a 60% de todos os casos notificados mundialmente. Além disso, 190 milhões de pessoas encontram-se em risco de infecção nesta área (Sundar et al. 2008). Em Bangladesh, Índia, Nepal e no leste da África, manifesta-se a leishmaniose visceral antroponótica, conhecida também como leishmaniose dérmica pós “Kala-azar” (PDCK), devido a presença de manifestações clínicas com lesões cutâneas após o tratamento. Os casos de LV antroponótica não tratados são os principais responsáveis pela disseminação do parasito nesta região (Desjeux 2001). Na LV antroponótica, a doença ocorre predominantemente entre a população mais pobre e a desnutrição constitui um fator de risco para as formas graves da doença (Alvar et al. 2006). A Etiópia encontra-se em segundo lugar no *ranking* de notificações, apresentando grande número de pacientes infectados, inclusive com co-infecção pelo vírus HIV (Berman 2006). No ano de 2005, os governos do Bangladesh, Índia e Nepal se uniram com a pretensão de reduzir a incidência abaixo de 1/10.000 na Índia até o ano de 2010 e em Bangladesh e Nepal, até 2015. No entanto, houve grande dificuldade no cumprimento desta meta, devido à falta de profissionais qualificados nas unidades de saúde, dificuldade na realização do controle vetorial e falta de recursos para diagnóstico e tratamento da população (Sundar et al. 2008). Em todas as partes do mundo, a droga recomendada para o tratamento da LV humana (LVH) são os antimoniais pentavalentes, exceção feita a Bihar, na Índia, onde 50-65% dos pacientes não respondem ao tratamento preconizado pela OMS (Sundar et al. 2000; Croft et al. 2006; Sundar et al. 2011). Isso ocorre em função do emprego de doses subterapêuticas e da não adesão ao tratamento, o que colabora para uma rápida expansão geográfica de cepas resistentes aos antimoniais na região e em países vizinhos (Sundar et al. 2001).

Na Europa a LV concentra-se principalmente nos países do Mar Mediterrâneo (Itália, França, Portugal e Espanha). Entretanto, encontra-se em rápida expansão para os países vizinhos Inglaterra e Alemanha (Schonian et al. 2008). Recentes trabalhos demonstram a expansão da doença para o norte da Europa, como mostrado pelos casos autóctones de LV no norte da Itália e sul da Alemanha (Bogdan et al. 2001; Maroli et al. 2008; Naucke et al. 2008). Esta expansão deve-se, em parte, à mudanças climáticas,

movimentos migratórios (por razões econômicas ou políticas) e presença de co-infecção com o vírus HIV (Dujardin et al. 2008; Naucke et al. 2008). Até 1983, todas as regiões do norte da Itália, além da Ligúria e alguns territórios da Emilia Romagna eram consideradas indenes para LV. Entretanto, nos últimos anos, têm ocorrido surtos de LVH e LVC na região norte da Itália, Veneto e Piemonte, onde também foi detectada a presença do vetor (Capelli et al. 2004).

Em alguns países da Europa há subnotificação dos casos de LVH, pelo fato de os registros muitas vezes não levarem em conta o local da infecção (Dujardin et al. 2008). Além disso, os indivíduos assintomáticos não são registrados e estes representam grande parcela da população, uma vez que para cada caso clínico de LV, pode haver 8-18 casos assintomáticos (Badaro et al. 1986; Evans et al. 1992; Costa et al. 2002). Estes sub-registros ocasionam transtornos nos bancos de sangue, visto que na Espanha foi demonstrado que 22,1% dos doadores foram PCR positivo para a leishmaniose (Riera et al. 2004).

Quanto a LVC, estudos realizados na Espanha, Portugal e região sul da França demonstraram uma soroprevalência de aproximadamente 20% em cães domésticos (Fisa et al. 1999; Cardoso et al. 2004; Sobrino et al. 2008; Marty et al. 2009).

Todos os países que margeiam o mediterrâneo, nas proximidades da Europa ou África, constituem áreas endêmicas para LV. A Turquia mostra diferentes condições ecológicas e climáticas, importantes na epidemiologia da leishmaniose. Nesta região são observados tanto casos de LV quanto de LC (Ok et al. 2002). No Estado de Israel a LV encontra-se limitada à região da Galiléia e norte de Israel (Jaffe et al. 2004). Em 1994, o primeiro caso de LV canina foi diagnosticado em Nataf, centro de Israel, situada 12 km a oeste de Jerusalém (Baneth et al. 1998). Desde então, LV canina já foi diagnosticada em 37 localidades na região central de Israel e mais de 90% dos casos de LVH deste país tem origem nessas regiões (Ya'ari et al. 2004).

A LV está presente na região central da Tunísia desde o início dos anos 1990 e vem se expandindo para outras regiões do país (Aoun et al. 2009). Em um trabalho realizado na Tunísia foram avaliados prontuários médicos de 1.096 casos de LV diagnosticados entre 1996 e 2006 por todo o país. O estudo revelou aumento na incidência da doença e sua expansão, da região Norte para a Central e até mesmo para o sul do país. Esta expansão deve-se provavelmente, ao desenvolvimento da irrigação e agricultura, que favoreceram a multiplicação dos vetores e expansão dos reservatórios (Aoun et al. 2009).

2.2.2 Leishmaniose visceral no Novo Mundo

Nas Américas, a leishmaniose visceral é encontrada desde o Canadá até o norte da Argentina, sendo causada pela *L. infantum* e transmitida principalmente pela *Lu. longipalpis*. Nos Estados Unidos, ocorrem surtos de LVC ocasionalmente, devido na sua maioria ao aporte de animais domésticos por famílias que regressam de áreas endêmicas no mediterrâneo (Enserink 2000; Petersen 2009; Petersen & Barr 2009). Entretanto, recentemente foi demonstrada a presença de casos autóctones de LVC nos EUA (Gaskin et al. 2002; Schantz et al. 2005; Duprey et al. 2006; Freeman et al. 2010). Tal fato foi também demonstrado por Rosypal et al. (2003), que realizaram o isolamento do parasito em cultura de linfonodo e medula óssea em três cães naturalmente infectados da região da Virgínia (Rosypal et al. 2003). É importante ressaltar que ainda não houve casos de LVH nos Estados Unidos e Canadá (Duprey et al. 2006).

A adaptação dos vetores da *Leishmania* em áreas onde não existiam anteriormente, tem contribuído para modificar a distribuição da doença na América Latina. Desta forma, destaca-se os países do Mercosul, antes considerados indenes para LV e cuja principal forma clínica era a leishmaniose tegumentar americana (LTA). Neste contexto, cita-se o cenário epidemiológico atual da Argentina, país em que os casos de LVH começaram a surgir em 2005 e vem aumentando nos últimos anos, com crescimento gradativo dos óbitos, comprovando a grande expansão e urbanização da doença (Salomon & Orellano 2005; Salomon et al. 2008; Salomon et al. 2009).

Os países Andinos, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia, são regiões endêmicas da leishmaniose cutânea (Davies et al. 2000) apresentando a Bolívia, a maior incidência de LTA da América Latina, com 33 casos por 100.000 habitantes em 2006 (Garcia et al. 2009). Já a LV é relativamente rara nestes países (Davies et al. 2000; Garcia et al. 2009). Na Venezuela, apesar de haver relatos de LVC em 12 estados, a incidência humana é baixa, com uma média anual de 0,2 casos por 100.000 habitantes, sendo a principal área de ocorrência a Ilha Margarita (Zerpa et al. 2002; Zerpa et al. 2003). Em Honduras (América Central) a *L. infantum* é quase completamente restrita à região sul da Costa do Pacífico. Entre 1974 e 1990, 210 casos de LV foram confirmados nessa região (Noyes et al. 1997).

2.2.3 Epidemiologia da leishmaniose visceral no Brasil, Minas Gerais e Belo Horizonte

No Brasil, até meados da década de 80, a LV ocorria principalmente em zonas rurais e em municípios menos desenvolvidos. Nas três últimas décadas, houve significativa modificação deste perfil epidemiológico a partir de sua expansão e urbanização, comprovada pela ocorrência de inúmeros casos em cidades de médio e grande porte (Brasil 2006). No contexto da urbanização da LVH, é importante destacar a presença da infecção assintomática, que muitas vezes ocasiona uma subestimação da infecção (Moreno et al. 2006). Em estudo transversal de base populacional, realizado em Sabará, região metropolitana de Belo Horizonte, foram encontradas taxas de prevalência da infecção assintomática entre 2,4% e 10,7%, variando de acordo com o teste sorológico empregado (Moreno et al. 2006).

No Brasil, até 2009, a transmissão autóctone da LV foi relatada em mais de 1.600 municípios em 21 das 27 Unidades da Federação, com incidência média anual de 1,9 casos/100.000 habitantes. A letalidade aumentou de 3,4%, em 1994, para 5,5%, em 2008, o que representou um incremento de 61,8%. A letalidade média nos últimos quatro anos foi 6,3% (Brasil 2009).

Anualmente são notificados no Brasil cerca de 2.000 a 3.000 casos de LVH (Vieira & Coelho 1998), e nos últimos anos tem-se observado um grande aumento neste número (Desjeux 2004). De 1980 a 2004, foram notificados 57.766 casos, com 2.911 mortes e quando foram avaliados intervalos de cinco anos: 1985-1989, 1990-1994, 1995-1999 e 2000-2004, Werneck et al. (2008) observaram um aumento anual das notificações, sendo de 1.601 a 2.264, 3.060 e 3.630, respectivamente (Werneck et al. 2008). Além disso, são registrados anualmente cerca de 200 a 300 óbitos de brasileiros por LV (Costa 2008).

Segundo o Ministério da Saúde, na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na região Nordeste. Na medida em que ocorre a expansão da doença para as outras regiões, essa situação vem se modificando completamente e, recentemente, o Nordeste representa 48% dos casos brasileiros (Brasil 2009). No município de Teresina, capital do Estado do Piauí, foi identificada a primeira grande epidemia de LV em meio urbano no Brasil (Costa et al. 1990). A ocupação rápida e desordenada da periferia da cidade tornou sua população exposta a extensas áreas de florestas tropicais e densa vegetação, o que provavelmente contribuiu para o

agravamento da situação (Werneck 2008; Cerbino Neto et al. 2009). A partir de 1998, tem-se observado, em Teresina, um incremento gradual na incidência da doença, que se encontra em um patamar próximo a 20 casos/100.000 habitantes/ano (Werneck et al. 2008). Outro Estado endêmico do nordeste brasileiro é Pernambuco, onde a LV encontra-se concentrada nos municípios do Sertão do Estado, sendo responsável por 64,8% dos casos da doença. A Região Metropolitana do Recife e a Zona da Mata também destacaram-se, com uma parcela de 33,5% dos casos. Atualmente tem sido descrito que 119 municípios do Estado registraram casos da doença, indicando a presença da LV em praticamente todo território pernambucano (Dantas-Torres et al. 2005; Dantas-Torres 2006; Dantas-Torres & Brandao-Filho 2006). No final da década de 70, a LV teve início no Maranhão e uma década depois começou a incidir em diversos bairros da cidade de São Luís, expandindo-se para outros municípios da Ilha (Mendes et al. 2002; Silva et al. 2008). O Estado da Bahia, no período de 1985 a 1998, foi responsável pela notificação do maior número de casos de LV do Brasil. Em 1995 houve uma epidemia no município de Feira do Santana que determinou a implantação do PCLV no local (de Oliveira & de Araujo 2003). Através da avaliação de tendências temporais e espaciais na distribuição geográfica de 12.413 casos de LV notificados na Bahia (1985-1999) Franke et al. (2002) observaram o surgimento de novos municípios endêmicos na região, demonstrando a expansão da doença. Nos anos de 1985, 1990 e 1996, a LV era endêmica no estado da Bahia em 7% (n = 31), 18% (n = 73) e 30% (n = 123) dos 415 municípios (Franke et al. 2002). A cidade de Fortaleza, Ceará além dos casos humanos, apresenta elevada taxa de infecção canina (21,4% - 26,2%), confirmando endemicidade da área e demonstrando o alto risco de infecção para a população (Rondon et al. 2008).

Na Região Sudeste, Minas Gerais é o Estado que mais se destaca e sofre com a doença, principalmente as regiões norte e nordeste do estado, onde várias cidades são endêmicas para LV, dentre elas os municípios de Montes Claros e Porteirinha, alvo de trabalhos de alguns pesquisadores. Nestas cidades há uma elevada prevalência de LVC e alta densidade do vetor *Lu. longipalpis* (Franca-Silva et al. 2003; Franca-Silva et al. 2005; Monteiro et al. 2005). Embora os pontos fundamentais da epidemiologia da LV, bem com as medidas de controle sejam bem conhecidos, tem-se observado uma crescente urbanização da doença, como ocorre em Belo Horizonte e outros municípios da região metropolitana da capital mineira (Luz et al. 2001; Silva et al. 2001a; Margonari et al. 2006; Saraiva et al. 2011). Em Minas Gerais, nos anos de 1989 a 1999,

houve grande crescimento da economia agrícola, o que ocasionou áreas de desflorestamento inclusive na região metropolitana de Belo Horizonte. O impacto ambiental do desflorestamento somado aos problemas socioeconômicos ocasionados pela migração desordenada, resultou em fatores que favoreceram a urbanização da leishmaniose no Estado (Silva et al. 2001a). A região do Vale do Rio Doce, sudeste de Minas Gerais, era considerada área endêmica, mas após a adoção de medidas de controle a região passou a ser considerada uma área controlada da doença (Mayrink et al. 1979; Magalhaes et al. 1980). No início da década de 1990, o PCLV foi interrompido na região do Vale do Rio Doce e a vigilância epidemiológica reduziu suas ações, com isso há sinais de uma re-emergência da doença na região com aparecimento de casos caninos e humanos (Malaquias et al. 2007).

Em Belo Horizonte, no período de 1994 a 2009 foram confirmados cerca de 1.197 casos da doença, e nos últimos quatro anos a mortalidade foi de 10,1% (Saraiva et al. 2011). Belo Horizonte apresenta alta densidade de *Lu. longipalpis*, além do elevado número de cães soropositivos (Margonari et al. 2006; Saraiva et al. 2011). Historicamente a LV em Belo Horizonte teve seus primeiros casos caninos diagnosticados em 1989, nos Distritos Sanitários Nordeste e Leste (Genaro et al. 1990; Luz et al. 2001; Lopes et al. 2010). Estes distritos fazem divisa com o município de Sabará, que provavelmente disseminou a doença a partir de um foco registrado no final da década de 80. Os primeiros casos de LVH surgiram em 1994, nos mesmos Distritos Sanitários precedidos pelos casos caninos (Luz et al. 2001; Alves & Bevilacqua 2004; Lopes et al. 2010). Este fato demandou da Secretaria Municipal de Saúde, imediata pesquisa soropidemiológica na região, intensificando as ações de controle. A partir daí é observado a cada ano, um aumento do número de casos de LVH (Luz et al. 2001; Lopes et al. 2010), o que ocorre em todo o município de maneira desigual. Além disso, a positividade canina tem aumentado variando entre 3,1 a 9,8% de 1998-2007 (Lopes et al. 2010). Na Regional Noroeste de Belo Horizonte, ao observar a progressão da doença nos anos de 2006 a 2009 através do mapa de *Kernel*, percebe-se a intensidade da distribuição da infecção canina que, na maioria das vezes, coincide com os locais de maior concentração de casos humanos (PBH, 2010) (Figura 1). Margonari et al. (2006) realizando uma análise espacial da distribuição de casos caninos e humanos em Belo Horizonte, observaram correlação entre o número de casos de LV canina e humana.

Andrade et al. (2006) demonstraram, em cães de Belo Horizonte, que animais com diagnóstico sorológico e parasitológico negativos apresentavam-se positivos em

métodos moleculares, indicando a presença de LVC assintomática por *L. infantum*. Portanto, os métodos diagnósticos utilizados em áreas endêmicas subestimam o número de cães infectados, reforçando a hipótese de que um número considerável de cães positivos não é detectado nos inquéritos sorológicos e permanecem como reservatórios, possivelmente interferindo no controle da LV em ambiente urbano.

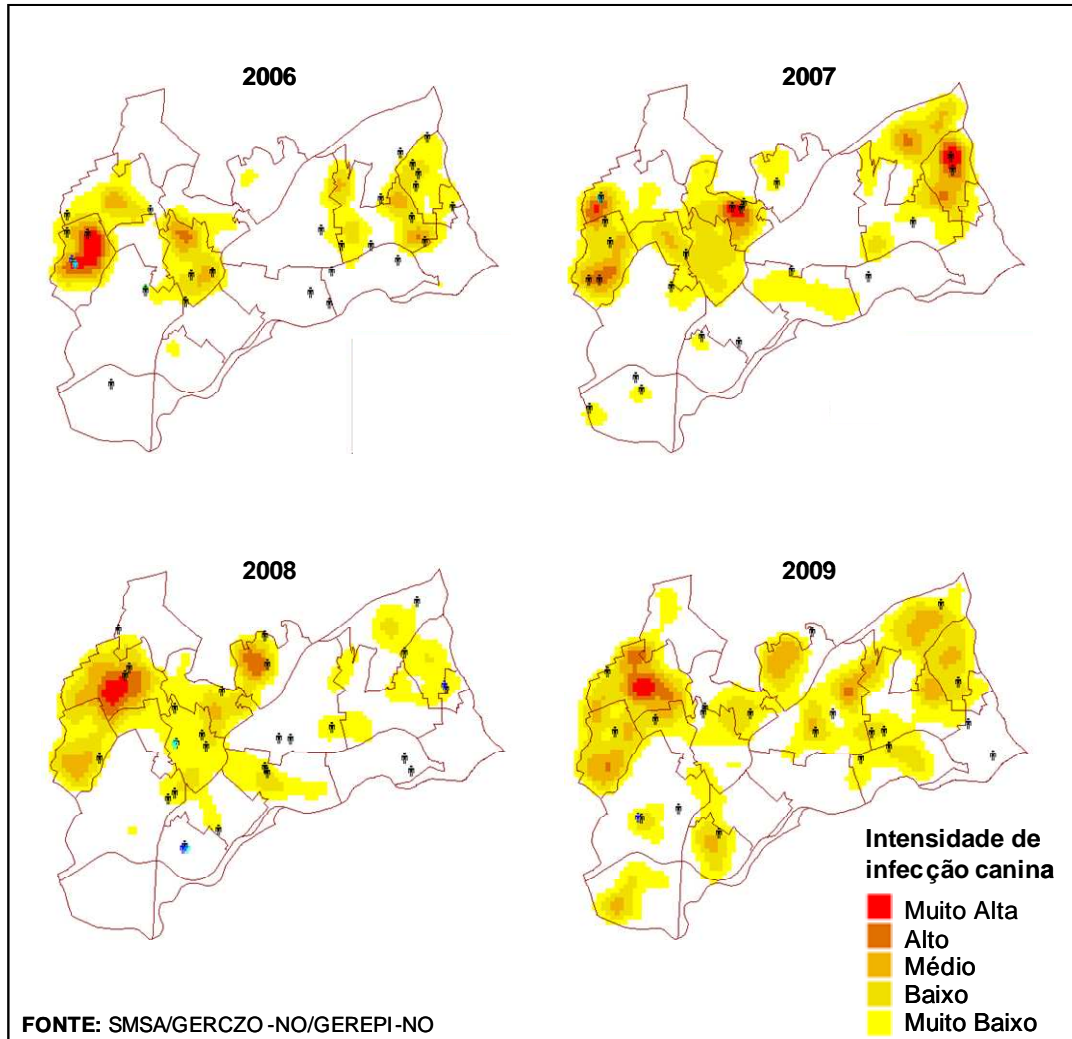


Figura 1: Mapa de *Kernel* (Hotspot) demonstrando a intensidade de infecção canina na Regional Noroeste de Belo Horizonte nos anos de 2006 a 2009. (♣) representa os casos humanos. Domicílios com mais de um caso estão representados por (♣) de mais de uma cor.

2.3 Importância do cão na epidemiologia da leishmaniose visceral

Os estudos da infecção canina por parasitos do gênero *Leishmania* abordam, em sua maioria, dois aspectos relevantes, a saber: o uso do cão como modelo experimental para o estudo da LVH e a investigação de aspectos inerentes à infecção canina como hospedeiro/reservatório, visando o desenvolvimento de estratégias de controle da LVH (Genaro 1993; Ashford et al. 1998; Santos-Gomes et al. 2000; Gupta 2011).

Um dos primeiros estudos epidemiológico realizados no Brasil data de 1938. Nessa época, Chagas, Ferreira, Deane & Guimarães realizaram um exaustivo inquérito epidemiológico na região de Abaeté, localizada no estado do Pará, e relataram uma incidência de 1,48% de infecção humana e 4,49% de infecção canina. Posteriormente, Deane (1956) e Deane & Deane (1962), contribuíram para o entendimento da epidemiologia da *L. infantum*, documentando a participação do cão como reservatório doméstico e da raposa (*Dusicyon vetulus*) como reservatório silvestre do parasito (Deane 1956; Deane & Deane 1962b). Além destes, recentemente tem sido demonstrada a participação de outros reservatórios da *L. infantum*, como equinos (Rolao et al. 2005), felinos (da Silva et al. 2010) e roedores (Ferreira et al. 2010).

As medidas para o controle da LV estabelecidas por Deane (1956) baseiam-se em um tripé de ações que preconiza o tratamento de pessoas doentes, aspersões de inseticida no domicílio e peridomicílio e a eutanásia de cães soropositivos. Considerando a relação homem-cão na sociedade, e tendo em vista que esses animais tem se transformado em verdadeiros “membros” da família, o sacrifício de cães com sorologia anti-*Leishmania* positiva, muitas vezes assintomáticos, torna-se cada vez mais inaceitável e de difícil execução. Entretanto, estudos mostram que a remoção de cães soropositivos reduz a incidência de LV humana e canina (Ashford et al. 1998; Nunes et al. 2010). Um trabalho recentemente realizado em Teresina, Estado do Piauí, demonstrou redução na incidência de infecção pela *L. infantum*, quando se realiza a eutanásia de cães infectados em conjunto com a borrifação intradomiciliar. Entretanto, a borrifação de anexos, associada ou não à eliminação canina, não adicionou efeito protetor significativo quando comparado ao induzido pela borrifação intradomiciliar (Costa et al. 2007). Em contrapartida, um estudo realizado no Espírito Santo, constatou que após a eliminação de cães soropositivos, a positividade humana aumentou na mesma proporção que na área onde não houve remoção dos cães. O papel do homem como um significativo reservatório para LV é proposto para explicar estes resultados (Dietze et al. 1997). Entretanto, outros estudos mostraram que as remoções e eutanásias, sendo rapidamente realizadas, reduzem consideravelmente a incidência de leishmaniose canina e humana, principalmente quando realizadas simultaneamente às medidas de controle vetoriais e o tratamento de casos humanos (Ashford et al. 1998; Braga et al. 1998).

Historicamente, a campanha de controle da LV foi criada em 1953, com o objetivo de estudar e combater a doença, tendo em vista o aumento de casos no país

(Silva 1957). Os estados do Ceará e Minas Gerais foram os principais alvos das atividades desenvolvidas no controle da doença. Durante os anos 1960 a 1980 foram interrompidas as campanhas de controle da LV, sendo que em 1982 a extinta Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) ao detectar grande aumento na incidência da doença retoma as atividades de controle e profilaxia (Lacerda 1994). As atividades nesta época consistiam da busca ativa dos casos humanos e caninos, educação sanitária e borrifação focal, com aplicação de inseticidas nos domicílios com casos humanos e/ou caninos suspeitos. O inquérito canino não era realizado de forma sistemática, devido à falta de laboratórios de apoio diagnóstico (MS 1985). Em algumas localidades, os inquéritos sorológicos eram realizados utilizando a Reação de Fixação de Complemento (RFC), mostrando a importância da adoção de testes sorológicos como medida confirmatória e de rastreamento de cães soropositivos (Flemmings et al. 1984; Hockmeyer et al. 1984). A partir do ano de 1986, o Programa de Controle da Leishmaniose passou por algumas alterações, tais como: implementação das atividades de vigilância entomológica, com aplicação de inseticidas; controle canino, através dos inquéritos sorológicos, com utilização da RIFI associada à eutanásia dos cães soropositivos; detecção ativa e passiva dos casos humanos suspeitos e tratamento dos doentes (MS 1996). A partir deste momento diversos laboratórios do país foram equipados com microscópios de imunofluorescência para atendimento da demanda do PCLV. Em fevereiro de 2001 foi suspensa a triagem sorológica e a eutanásia de cães como medida de controle da leishmaniose (Costa & Vieira 2001). Esta ação foi questionada por vários pesquisadores (Neto et al. 2001), sendo retomada após algum tempo. Atualmente, as estratégias de controle são centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos, redução da população de flebotomíneos, eliminação dos reservatórios e atividades de educação em saúde. Além disso, o PCLV busca uma melhor definição das áreas de transmissão e/ou de risco e propõe ações de vigilância para os municípios considerados silenciosos (Brasil 2006, 2009).

No contexto epidemiológico da LVC, entre os anos de 2002-2007, foram examinados mais de dois milhões de cães no Brasil, sendo que destes, mais de 160.000 foram eutanasiados por estarem infectados com *L. infantum*. Apesar disso, o Ministério da Saúde não tem conseguido reduzir a incidência humana a níveis aceitáveis (Lemos et al. 2008). Estes dados alarmantes apontam para a necessidade de reavaliação da política de controle canino no Brasil (Costa & Vieira 2001). Uma possível falha é o método diagnóstico adotado pelo Ministério da Saúde como padrão-ouro, a RIFI. Esta técnica é

realizada empregando eluato de sangue total em papel filtro e embora associada à técnica sorológica de ELISA, a aplicabilidade destes testes continua sendo questionada quanto à sensibilidade e especificidade (Braga et al. 1998; Moreira et al. 2004; Rosario et al. 2005). Outras supostas razões para a falha no controle é a demora (80 a 180 dias) entre a coleta da amostra biológica, sua análise e a eutanásia dos animais infectados (Braga et al. 1998; Vieira & Coelho 1998; Moreira et al. 2004). Além disso, após a eutanásia do cão soropositivo, ele é repostado pela população quase imediatamente, interferindo no controle, pois estes novos animais tornam-se infectados em aproximadamente dois meses, dificultando ainda mais o controle dos reservatórios (Dye 1996; Moreira et al. 2004). Neste contexto, para um melhor controle da LV é necessário o emprego de testes diagnóstico com maior acurácia e capazes de identificar todos os animais que são fonte de infecção para o vetor, particularmente aqueles que se encontram entre o período de infecção e o início da infecciosidade, reduzindo efetivamente a transmissão da doença pelos flebotomíneos (Courtenay et al. 2002b).

Estudos mostram que aproximadamente 94 dias após a infecção com *L. infantum* o cão apresenta resultado sorológico positivo (Quinnell et al. 1997; Courtenay et al. 2002a) tornando-se fonte de infecção para o flebótomo 105 dias após a soroconversão. Sendo assim, o cão torna-se fonte de infecção aproximadamente seis meses após ter sido picado por fêmeas de flebotomíneos infectadas (Courtenay et al. 2002b). Ao estudar cães de área endêmica, Silva et al. (2005) perceberam que animais com altos títulos sorológicos são potenciais fontes de infecção para flebotomíneos, pois além de disseminado parasitismo nos órgãos, possuem alta carga parasitária na pele. A taxa de infecção dos flebotomíneos a partir dos cães é de 8%-29% no caso de *Lu. longipalpis* (Sherlock et al. 1996; Travi et al. 2001; Courtenay et al. 2002b; Travi et al. 2002) e de 37%-70% para *Phlebotomus perniciosus* (Molina et al. 1994; Guarga et al. 2000a; Guarga et al. 2000b). Interessantemente, Courtenay et al. (2002) observaram correlação positiva entre a infectividade canina e os níveis de anticorpos, juntamente com a positividade da PCR. Além disso, foi observado que animais assintomáticos infectaram os flebótomos, o que tem sido também relatado em outros trabalhos (Molina et al. 1994; Guarga et al. 2000a; Courtenay et al. 2002). Diante disso, o cão é considerado elo essencial para disseminação e amplificação dos focos endêmicos, antecedendo, na maioria das vezes, o aparecimento de casos humanos (Falqueto et al. 1986; Nunes et al. 2010). Percebe-se também que a aplicação da PCR em conjunto com a sorologia pode ajudar a determinar a extensão da infecção subclínica na LVC em áreas endêmicas, bem

como estimar o número de cães que serão alvos das medidas de controle, como observado na Europa (Solano-Gallego et al. 2001a). Recentemente demonstrou-se que 62% dos cães com diagnóstico sorológico e parasitológico negativo apresentavam reação de PCR positiva para *L. infantum* (de Andrade et al. 2006). Esses resultados reforçam a hipótese de que os métodos diagnósticos utilizados em áreas endêmicas subestimam o número de cães infectados. Na verdade, um número considerável de cães positivos não é detectado na sorologia convencional (RIFI e ELISA) e permanecem como reservatórios, possivelmente interferindo no controle da doença.

2.4 Aspectos clínicos e laboratoriais da LVC e implicações epidemiológicas

A LVC é o protótipo de uma disfunção imunológica específica resultante do parasitismo do sistema mononuclear fagocitário pela *Leishmania*, produzindo um espectro amplo de manifestações clínicas e imunológicas nos cães. Diante disso, com base na sintomatologia, a LVC pode ser classificada em três formas clínicas: cães assintomáticos com ausência de sinais clínicos sugestivos de infecção por *Leishmania*; cães oligossintomáticos que apresentam alguns sinais clínicos como moderada perda de peso, lesões de pele e/ou pelo opaco; e cães sintomáticos apresentando vários sinais patognomônicos da doença, incluindo alopecia, eczema furfurácea, úlceras, hiperqueratose, onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores (Mancianti et al. 1988). Os sinais clínicos iniciais da LVC são: hipertrofia do linfonodo, dermatite periorbital e nasal, pelagem opaca, onicogribose e edema das patas. Outros sinais, como febre, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, perda de peso, hepatoesplenomegalia, ulceração cutânea (nariz, orelhas e cauda) e conjuntivite são frequentes, embora não necessariamente presentes em todos os animais (Almeida et al. 2005b; Baneth et al. 2008; Reis et al. 2009). Embora o parasito cause frequentemente uma doença sistêmica crônica, dependendo das propriedades biológicas e imunocompetência do hospedeiro a evolução pode ser aguda e grave, levando o animal a óbito em poucas semanas. Os sintomas geralmente tornam-se evidentes em um período que pode variar de três meses a vários anos (Ikeda-Garcia et al. 2007).

Quanto aos parâmetros bioquímicos, observam-se alterações nos níveis protéicos entre cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Observa-se também um aumento na concentração de globulina, além da redução de albumina e da razão A/G de acordo com a progressão clínica (Almeida et al. 2005b; Reis et al. 2006b). Avaliações de parâmetros hematológicos demonstram anemia grave em animais sintomáticos

seguida por leucopenia (monocitopenia, eosinopenia e linfopenia). Esta leucopenia, em animais sintomáticos, pode estar associada à disfunção medular com diminuição da hematopoiese devido ao intenso parasitismo na medula óssea. Tal fato pode ocasionar o redirecionamento da função medular, principalmente para linhagem agranulocítica, inicialmente para formar maior número de macrófagos que irão fatalmente hospedar novos parasitos dependendo da evolução do quadro clínico (Reis et al. 2006b). No contexto clínico-epidemiológico, observa-se que animais assintomáticos são fonte de infecção para flebotomíneos, ainda que apresentando baixa carga parasitária na derme (Molina et al. 1994; Manna et al. 2009; de Queiroz et al. 2011). Entretanto, esses animais são a maioria na população canina infectada, apresentando relevante importância na epidemiologia da doença. Desta forma, a avaliação dos animais assintomáticos é de fundamental importância em regiões endêmicas de LVC, uma vez que estes não são identificados no exame clínico e algumas vezes, indetectáveis pelos métodos sorológicos convencionais devido aos baixos títulos de anticorpos (Reis et al. 2006b; Cardoso et al. 2007).

2.5 Biomarcadores de progressão clínica na LVC

Durante a infecção por *Leishmania*, o organismo fica exposto a uma série de antígenos derivados do parasito, o hospedeiro responde a estes estímulos através de mecanismos múltiplos da imunidade celular e humoral. Visando uma melhor compreensão dos eventos imunológicos envolvidos em mecanismos imunoprotetores e imunopatológicos da LVC, alguns grupos de investigadores avaliam a resposta imune celular e humoral em cães portadores de diferentes formas clínicas da doença (Figura 2).



Figura 2: Biomarcadores de resistência e susceptibilidade na leishmaniose visceral canina. Adaptado de Reis et al. (2010).

Na LVC a ativação da resposta celular Tipo 1, inicialmente denominada (Th1), está associada a predomínio na síntese de IFN- γ , IL-2 e TNF- α , que têm demonstrado ser marcador de resistência (Pinelli et al. 1994; Pinelli et al. 1995). Já na resposta Tipo 2, inicialmente denominada (Th2), observa-se predomínio na produção de IL-4 e IL-10. Na LVC os padrões de resposta imune Tipo 1 e 2 ainda não estão bem definidos, pois são controversos os resultados encontrados sobre a produção de IL-10 e IFN- γ (Barbieri 2006; Lage et al. 2007; Strauss-Ayali et al. 2007). A forma sintomática da LVC tem sido associada com alterações celulares, incluindo: redução da resposta de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania* (Pinelli et al. 1994; Cardoso et al. 1998; Solano-Gallego et al. 2000), decréscimo no número de linfócitos T no sangue periférico (Pinelli et al. 1994; Martínez-Moreno et al. 1995; De Luna et al. 1999; Reis et al. 2006c) e redução, *in vitro*, da produção de IFN- γ e IL-2 por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) (Pinelli et al. 1995; Santos-Gomes et al. 2002).

Reis et al. (2006b) investigaram, em cães naturalmente infectados com *L. infantum*, portadores de diferentes formas clínicas, possíveis alterações fenotípicas em leucócitos do sangue periférico. Verificou-se uma série de alterações nas populações de linfócitos: cães assintomáticos apresentaram um aumento de linfócitos T circulantes (THY-1⁺ e CD5⁺), acompanhado de aumento nas subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺); cães oligossintomáticos apresentaram um aumento de linfócitos T circulantes (THY-1⁺ e CD5⁺) e cães sintomáticos apresentam queda de linfócitos T circulantes acompanhada de redução nas subpopulações (CD4⁺ e CD8⁺). Estes achados sugerem que o mecanismo de resistência está relacionado com linfócitos T citotóxicos, possivelmente influenciando na lise de macrófagos infectados (Pinelli et al. 1995). Cães oligossintomáticos e sintomáticos apresentaram queda de linfócitos B (CD21⁺) circulantes, enquanto uma diminuição de monócitos (CD14⁺) é observada apenas em cães sintomáticos. Observou-se também que cães assintomáticos apresentaram maior expressão de MHC-II em linfócitos totais circulantes (Reis et al. 2006b). Estes resultados apontam uma associação entre variações fenotípicas de leucócitos do sangue periférico em diferentes formas clínicas da LVC, tornando possível o estabelecimento de um prognóstico da infecção canina através da imunofenotipagem de células sanguíneas por citometria de fluxo (Reis et al. 2009; Reis et al., 2010).

No âmbito da resposta imune humoral, proposições clássicas sugerem que esta não desempenha papel imunoprotetor na LV, em função dos crescentes títulos de anticorpos associados à evolução clínica em humanos e cães. Assim, durante muitos

anos, a maioria dos trabalhos sobre os aspectos da resposta imune humoral na LVC, estava focalizada em avaliações soro-epidemiológicas e diagnósticas. Apesar de Abranches et al. (1991) não ter encontrado correlação entre a forma clínica da doença e títulos de anticorpos, foi observada uma tendência entre os níveis de anticorpos e o agravamento dos sinais clínicos. A partir dos estudos de Pinelli et al. (1994) e Deplazes et al. (1995), houve uma retomada nos trabalhos que buscavam associação entre resposta humoral e a clínica da LVC. Segundo Pinelli et al. (1994), três anos após infecção experimental, cães assintomáticos ou resistentes, ainda que apresentem uma resposta antígeno específica *in vivo* e *in vitro*, não apresentam anticorpos específicos detectáveis no soro. Por outro lado, os animais susceptíveis ou sintomáticos, embora falhem na habilidade em responder aos testes de imunidade celular *in vivo* e *in vitro*, apresentam altos títulos de anticorpos no soro. Outros autores também observaram que altos títulos de anticorpos não possuem caráter protetor, sendo mais encontrados em animais sintomáticos (Martinez-Moreno et al. 1995; Reis et al. 2006d). No trabalho de Deplazes et al. (1995), a análise da resposta humoral através da pesquisa de subclasses de IgG (IgG1 e IgG2), trouxe novo impacto para os estudos sorológicos na LVC. Alguns trabalhos demonstravam que cães infectados por *L. infantum*, portadores da forma clínica assintomática apresentam maiores níveis de IgG2 em relação a cães sintomáticos com maiores níveis de IgG1 (Deplazes et al. 1995; Nieto et al. 1999; Iniesta et al. 2005). Reis et al. (2006a) realizaram a avaliação da resposta imune humoral sob uma abordagem prognóstica em cães naturalmente infectados (*L. infantum*) portadores de diferentes formas clínicas. As evidências encontradas foram as seguintes: Há aumento dos níveis de IgG total de acordo com a evolução clínica da LVC; cães assintomáticos e oligossintomáticos apresentam maiores níveis de IgG1; a presença de IgG total, IgG2, IgA e IgE está correlacionada com a gravidade da doença, sendo mais evidente em cães sintomáticos. Resultados semelhantes foram observados por outros autores (Iniesta et al. 2005; Cardoso et al. 2007; Teixeira Neto et al. 2010).

2.6 Métodos diagnósticos da leishmaniose visceral canina

Até a década de 30, o diagnóstico canino era realizado por meio dos exames diretos, através da punção de fígado, baço e raspados de pele. Esses métodos, entretanto, apresentavam limitações, pois apesar da grande especificidade, possuíam baixa sensibilidade (Gontijo & Melo 2004). Outra técnica utilizada no diagnóstico era a punção de medula óssea; entretanto, por ser um procedimento invasivo, dificultou seu

emprego em larga escala. Além disto animais assintomáticos, devido ao baixo parasitismo, dificilmente são detectáveis (Moreira et al. 2007). Em 1957, pesquisadores brasileiros sugeriram a utilização da RFC em inquéritos caninos, devido a maior sensibilidade e especificidade comparada aos exames diretos (Alves & Bevilacqua 2004). A possibilidade de aplicação da RFC em eluato de sangue em papel filtro, tornou essa técnica amplamente difundida (Flemmings et al. 1984; Hockmeyer et al. 1984; Pappas et al. 1985).

A partir da década de 60, a RIFI começou a ser utilizada. Esta reação apresentava sensibilidade variando de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80%, devido a reações cruzadas com Doença de Chagas, leishmaniose cutânea, erliquiose, riquetsiose e toxoplasmose (el Amin et al. 1986; Andrade et al. 1987; da Costa et al. 1991; Barbosa-De-Deus et al. 2002; Porrozzi et al. 2007). Entretanto, trabalhos recentemente publicados demonstram que a RIFI apresenta baixa sensibilidade na detecção de animais assintomáticos (Mettler et al. 2005). A necessidade de uma técnica com alta sensibilidade e especificidade fez surgir, a partir da década de 70, vários trabalhos avaliando o teste de *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), assim como suas diversas variações metodológicas (Hommel et al. 1978; Pappas et al. 1983; Cabrera et al. 1999). A utilização de antígenos recombinantes (rA2, rK9, rK26 e rK39) e purificados de glicoproteínas de membranas (gp63, gp72 e gp70), otimizaram a sensibilidade e a especificidade da técnica de ELISA (Boarino et al. 2005; Porrozzi et al. 2007).

O *Direct Agglutination Test* (DAT), citado como um método alternativo para o diagnóstico da LV, foi descrito pela primeira vez em 1975 e adaptado para o diagnóstico da infecção canina no final da década de 80 (el Safi & Evans 1989). Em trabalhos comparativos entre ELISA, RIFI e DAT, este último demonstrou semelhante sensibilidade e especificidade quando comparado aos outros testes (Evans et al. 1990; da Silva et al. 2006).

O DAT apresenta algumas vantagens sobre os outros métodos, a saber: facilidade de execução em trabalhos de campo uma vez que requer pouca capacitação de seus executores, não sendo necessária a utilização de equipamentos, como microscópio e/ou leitoras de placa e freezer, ser de fácil armazenamento, além de sua execução permitir o emprego de amostras de sangue total, sendo também possível, o processamento de grande número de amostras em pouco tempo (Schallig et al. 2001).

Uma variação da DAT, o *Fast Agglutination Screening Test* (FAST), vem sendo testado na LVC, apresentando bons resultados (Babakhan et al. 2009).

O desempenho dos testes diagnósticos utilizados atualmente é muitas vezes limitada devido ao antígeno empregado na técnica (Gontijo & Melo 2004). De maneira geral, são utilizados parasitos totais ou lisados, o que interfere na especificidade do teste (Franca-Silva et al. 2003; Rosario et al. 2005). A identificação de antígenos recombinantes, que se caracteriza por induzir a formação de anticorpos específicos detectáveis nos testes sorológicos, tem contribuído para o desenvolvimento dos testes diagnósticos. O mais promissor antígeno sorológico é o rk39, que possui epítomos de alta densidade e excelente desempenho (Rosario et al. 2005). O rk39 foi utilizado em um teste imunocromatográfico conhecido como TRALd (Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani*), e vem apresentando bons resultados (de Lima et al. 2010). Pesquisadores brasileiros realizaram um estudo multicentro avaliando o desempenho do DAT e do teste rápido (IT-LEISH[®]) no intuito de cogitar sua possível implementação no serviço de saúde brasileiro, concluindo que ambos os testes imunocromatográficos poderiam ser empregados no diagnóstico da LVH, por apresentarem boa sensibilidade e especificidade (de Assis et al. 2011). Ainda não há achados na literatura, de trabalhos que demonstrem a utilização deste teste no diagnóstico da LVC, mas acredita-se que seu emprego contribuiria de forma significativa, trazendo grandes avanços.

As mais sofisticadas técnicas desenvolvidas para o diagnóstico da LVC são as moleculares, dentre elas destaca-se a PCR convencional, nested-PCR e PCR em tempo real (Gomes et al. 2008; Maia et al. 2009). Estas técnicas apresentaram grande sensibilidade e especificidade no diagnóstico da LVC e são capazes de identificar e ampliar seletivamente o DNA do parasito. É importante ressaltar que a detecção de DNA de *Leishmania* em um animal saudável, que vive em uma área endêmica, indica o prévio contato do cão com o parasito (Solano-Gallego et al. 2001), podendo, entretanto, não desenvolver a doença (Oliva et al. 2006). Desta forma, é de fundamental importância verificar o comportamento destes animais como reservatórios, bem como sua influência na epidemiologia da doença.

Apesar da grande variedade de testes já desenvolvidos, a RIFI e a ELISA ainda são os testes empregados em inquéritos epidemiológicos caninos, pelo fato de reunirem uma série de vantagens como: facilidade na execução, rapidez, baixo custo e adequadas sensibilidade e especificidade, quando comparados a outras técnicas (Maia et al. 2009).

2.7 O emprego da biologia molecular para o diagnóstico da LVC

A busca por um novo “padrão ouro” no diagnóstico da LVC tem sido estimulada pelo advento de métodos moleculares altamente sensíveis e específicos. Nas últimas décadas, a utilização da PCR para a detecção de DNA de *Leishmania*, tem demonstrado avanços no diagnóstico da doença. Tais avanços devem-se à melhor eficiência da técnica em comparação ao diagnóstico convencional (de Andrade et al. 2006; Solano-Gallego et al. 2001), além da possibilidade de empregar uma grande variedade de materiais biológicos como medula óssea, baço, linfonodo e pele. Uma opção menos invasiva para a realização da PCR é a utilização de sangue total; entretanto alguns trabalhos mostram menor sensibilidade da técnica quando se utiliza esse tipo de amostra (Reale et al. 1999; Silva et al. 2001b; Solano-Gallego et al. 2007; Quaresma et al. 2009) já outros trabalhos indicam boa sensibilidade neste tipo de amostra (Fisa et al. 2001; Lachaud et al. 2002b). A utilização de papa de leucócitos melhora o desempenho da metodologia em comparação ao sangue total (Strauss-Ayali et al. 2004). A técnica de PCR empregando *swab* conjuntival também tem demonstrado bom desempenho, com elevada sensibilidade e especificidade tanto na infecção experimental (Strauss-Ayali et al. 2004) quanto em cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Ferreira et al. 2008b).

A técnica de PCR apresenta ainda uma série de variáveis que afetam seu desempenho, tais como: quantidade de DNA a ser amplificado, método empregado na extração do DNA, protocolo de amplificação e a forma de detecção do material amplificado (Reithinger et al. 2000; Lachaud et al. 2002a; Cortes et al. 2004; Baneth & Aroch 2008). Parte desta variação pode ser explicada pela distribuição heterogênea do parasito pelos tecidos e órgãos e pela resposta imune local (Maia et al. 2007). Estes achados demonstram que a utilização de diferentes tecidos leva a uma grande variação nos resultados da técnica, o que corrobora a necessidade de uma melhor padronização deste tipo de teste diagnóstico.

Uma vantagem da PCR é a detecção de DNA do parasito antes da soroconversão, o que ocorre 45 dias após a infecção experimental (Strauss-Ayali et al. 2004). Desta forma, tem-se observado, em área endêmica, alta prevalência de animais assintomáticos soronegativos apresentando resultados moleculares positivos (Martin-Sanchez et al. 2001; Solano-Gallego et al. 2001a; Lachaud et al. 2002a). Embora a infecção pela *L. infantum* seja detectada pela PCR em um grande número de animais

soronegativos, há também cães soropositivos que são negativos pela PCR (Quinnell et al. 2001; Solano-Gallego et al. 2001), demonstrando a necessidade de um maior aprimoramento da técnica. No início da infecção, antes da soroconversão e/ou desenvolvimento de sintomas, a PCR mostra-se mais sensível que a sorologia; com a progressão da doença há uma elevação nos títulos de anticorpos e os testes sorológicos tem sua sensibilidade aumentada (Quinnell et al. 2001). Estes fatos sugerem a necessidade de testes mais confiáveis, capazes de identificar a infecção em todas as fases da doença, ou o emprego de uma associação de métodos diagnóstico.

2.8 A era da epidemiologia molecular nos programas de controle da leishmaniose

Epidemiologia molecular é um termo comumente utilizado em estudos moleculares que avaliam populações expostas a patógenos, contribuindo imensamente nos programas de controle das doenças (Schonian et al. 2008). Através da epidemiologia molecular torna-se possível a identificação de espécies durante um surto, a investigação da prevalência de infecção, o auxílio no diagnóstico clínico, a determinação da estrutura populacional e a extensão da migração de patógenos e/ou vetores, bem como o estudo do surgimento e a propagação de resistência aos medicamentos (Schonian et al. 2008).

No Brasil, os esquemas terapêuticos atuais baseados em antimonias pentavalentes, não são recomendados para o tratamento da LVC (Brasil 2008). Estudos demonstram que o tratamento medicamentoso em cães infectados não é capaz de alcançar a cura parasitológica, devido à permanência de infecção latente em algumas células (Baneth & Shaw 2002; Noli & Auxilia 2005). Este fato está relacionado à inabilidade dos antimoniais em promover cura parasitológica no cão, mantendo a transmissão do parasito para flebotomíneos devido a permanência do parasitismo dérmico mesmo após a terapêutica (Guarga et al. 2002). Desta forma, o cão possivelmente comporta-se como um reservatório do parasito favorecendo a seleção de cepas resistentes aos medicamentos. Neste contexto, a epidemiologia molecular pode ser crucial para a identificação das cepas responsáveis pela doença em determinada área, favorecendo a eficácia do tratamento, que pode variar devido a diferenças específicas na tolerância as drogas (Croft & Coombs 2003).

As técnicas moleculares têm sido amplamente empregadas no diagnóstico e na avaliação das taxas de prevalência da infecção em vários países (Berrahal et al. 1996;

Reale et al. 1999; Solano-Gallego et al. 2001a; Lachaud et al. 2002a). Um levantamento realizado pela técnica de PCR e immunoblotting constatou que a maioria dos cães que vivem no sul da França foram expostos a *Leishmania*, o que demonstra valores subestimados pela sorologia (Berrahal et al. 1996). Outros trabalhos demonstram que 37% dos cães assintomáticos, soronegativos são PCR positivo na pele e/ou conjuntiva, provavelmente estes cães apresentam uma imunidade celular capaz de controlar a propagação do parasito, vivendo em equilíbrio com ele (Solano-Gallego et al. 2001). É importante então saber se estes animais são resistentes ou imunes a infecção e se posteriormente desenvolverão a doença. Devido a estes fatos, é importante compreender o comportamento destes animais soronegativo/PCR⁺ face a epidemiologia da leishmaniose.

Para uma melhor compreensão sobre este grupo de animais foi realizado um estudo de coorte com cães assintomáticos soronegativos (ELISA/RIFI) e PCR positivo, a partir de um estudo transversal em cães da Regional Noroeste de Belo Horizonte. Este trabalho assumiu dimensões importantes, na medida em possibilitou esclarecer o comportamento destes animais assintomáticos na epidemiologia da LV.

Hipótese: Animais soronegativos e PCR positivos possuem importância na cadeia epidemiológica da leishmaniose visceral.

3.0 Justificativa

3.1 Justificativa e relevância

A leishmaniose visceral é uma zoonose considerada, dentre as doenças negligenciáveis, a que encontra-se em maior expansão, com grande impacto e prejuízo à saúde pública. Nos últimos anos a doença expandiu para diversas áreas urbanas do país. Neste contexto, o cão tem um papel importante na disseminação e ampliação dos focos endêmicos, antecedendo, na maioria das vezes, o aparecimento de casos humanos. A necessidade da eliminação dos cães infectados é corroborada pelo fato destes animais serem considerados os principais reservatórios domésticos da *L. infantum*. Maior gravidade encontra-se na possibilidade de cães, ainda assintomáticos, servirem de reservatório do parasito, colocando a saúde das pessoas próximas em situação de risco. Embora alguns testes sorológicos (RIFI e ELISA) sejam empregados na rotina de inquéritos epidemiológicos para LVC, estes continuam sendo questionáveis em relação à sensibilidade e especificidade. Recentemente, a técnica molecular (PCR) tem apresentado importância relevante no diagnóstico da LVC, uma vez que é capaz de detectar DNA de um único parasito com elevado grau de sensibilidade e especificidade. Estudos demonstraram que a PCR é capaz de detectar grande número de casos de LV em animais assintomáticos com sorologia convencional e exame parasitológico negativos. Pouco se sabe sobre estes animais, permanecendo ainda obscuros diversos questionamentos a seu respeito, a saber: (i) a incidência da infecção por *L. infantum* em animais soronegativo, (ii) fatores associados a infecção canina, (iii) taxa de soroconversão em animais soronegativo/PCR⁺, (iv) existência de biomarcadores capazes de auxiliar na identificação desses animais, (v) necessidade de eliminação deste grupo de cães soronegativos/PCR⁺ das áreas endêmicas e (vi) se esses animais constituem risco à saúde da população, sendo fonte de infecção para *Lu. longipalpis*.

Diante disso, apresentam relevância estudos que busquem estratégias para melhor compreender a importância destes animais na epidemiologia da leishmaniose visceral. O presente trabalho busca contribuir com novas abordagens de investigação diagnóstica, bem como em novos delineamentos para as medidas de controle que poderão ser utilizadas pelos órgãos sanitários competentes no controle canino.

4.0 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Estudar uma coorte de animais assintomáticos, soronegativos/PCR-RFLP⁺ para *L. infantum*, avaliando a importância deste grupo na cadeia epidemiológica da leishmaniose visceral e identificar biomarcadores de progressão clínica.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar inquérito soro-epidemiológico por meio da técnica de ELISA em uma amostra de cães do Distrito Sanitário Noroeste de Belo Horizonte, MG;
- Realizar diagnóstico molecular (PCR) nos animais soronegativos;
- Estimar a prevalência da infecção canina por *L. infantum* através da PCR-RFLP e a soroprevalência de LVC;
- Selecionar e acompanhar uma amostra de cães assintomáticos soronegativos/PCR⁺ por aproximadamente dois anos, avaliando aspectos clínicos, sorológicos e moleculares;
- Estimar a incidência da infecção por *L. infantum* em animais soronegativo/PCR⁻ através da PCR-RFLP;
- Estimar de incidência soroconversão em animais soronegativo/PCR⁺;
- Avaliar as características dos proprietários dos cães amostrados;
- Caracterizar os cães amostrados quanto ao perfil clínico e epidemiológico;
- Avaliar fatores associados à infecção canina durante o estudo transversal;
- Investigar fatores de risco para infecção canina por *L. infantum* e soroconversão, considerando o tempo até a ocorrência do evento;
- Identificar biomarcadores de resposta imune humoral avaliando classes e subclasses de imunoglobulinas: IgG (IgG1 e IgG2), IgM, IgA e IgE.
- Identificar biomarcadores hematológicos de evolução clínica;
- Identificar biomarcadores de resposta imune celular empregando a imunofenotipagem das populações de linfócitos T (CD5⁺), suas subpopulações (CD4⁺ e CD8⁺), linfócitos B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺) circulantes;
- Identificar biomarcadores de resistência e susceptibilidade da resposta imune celular empregando a imunofenotipagem de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) produtores de IFN- γ ⁺ e IL-4⁺.

5.0 Metodologia

5.1 Delineamento do estudo

O delineamento do estudo constou de duas etapas: estudo transversal e estudo de coorte corrente. O estudo transversal iniciou em junho de 2008 na Regional Noroeste de Belo Horizonte/MG com objetivo de identificar cães com sorologia negativa e PCR-RFLP positiva para *L. infantum*.

O estudo de coorte iniciou em abril de 2009, dez meses após o estudo transversal. Foram selecionados e acompanhados dois grupos de cães: soronegativo/PCR⁻ e soronegativo/PCR⁺. Estes grupos foram seguidos por um período de 26 meses, com retornos a cada seis meses aproximadamente (Figura 3).

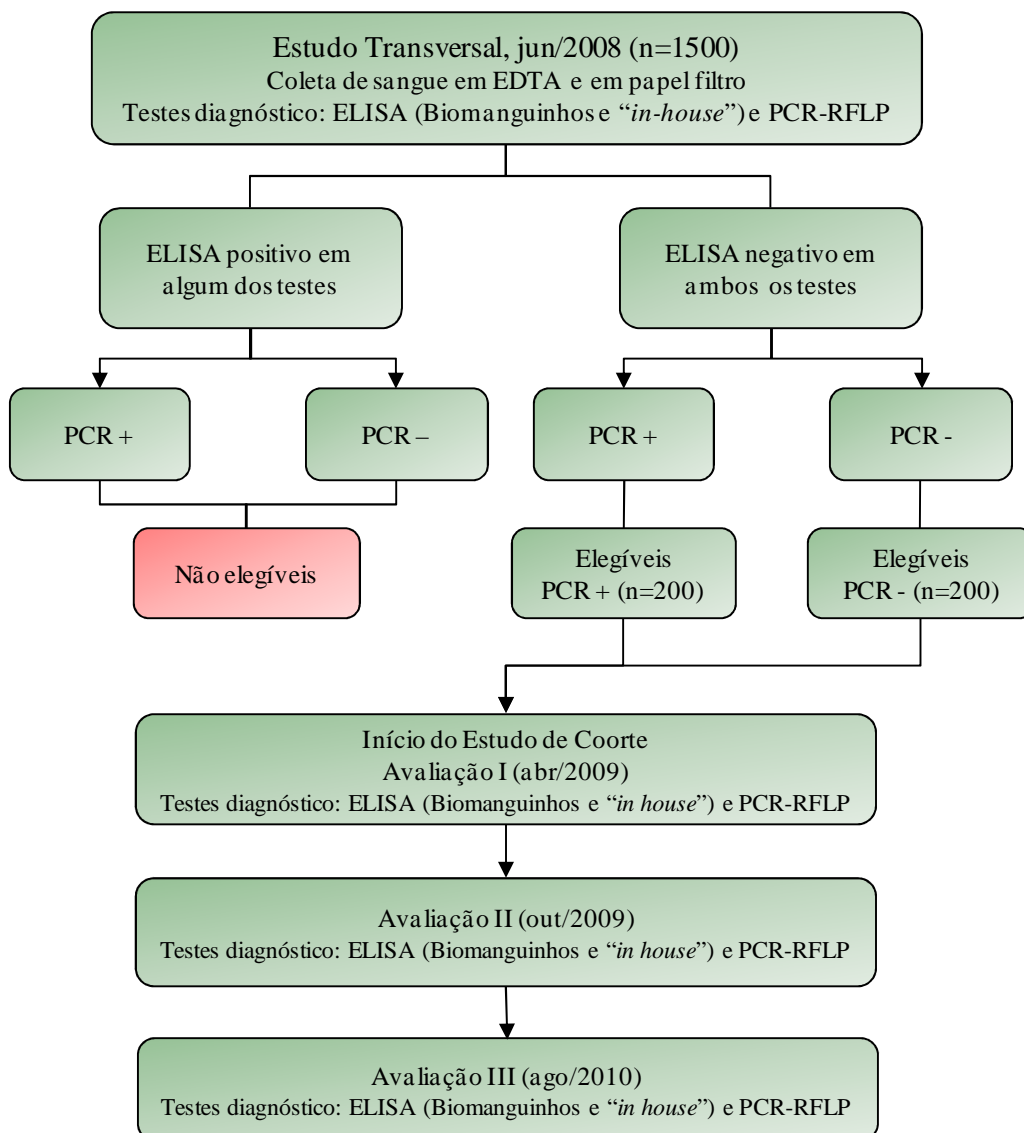


Figura 3: Delineamento do estudo transversal e coorte.

5.2 Área de estudo

A população de Belo Horizonte está estimada em 2.375.444 habitantes (IBGE, 2010) e encontra-se distribuída em nove Distritos Sanitários, dentre eles o Noroeste, que apresenta área geográfica de 36.874 Km² com aproximadamente 360.000 habitantes, segundo censo de 2000. Foram avaliadas duas áreas de abrangência da Regional Noroeste; área do Centro de Saúde Padre Eustáquio e área do Centro de Saúde Santos Anjos. Segundo a Gerência de Controle de Zoonoses do Distrito Noroeste, a população canina examinada na Regional em 2007 foi de 24.686 cães, sendo 2.320 sororreativos para leishmaniose, indicando uma prevalência de 9,4% (Figura 4).

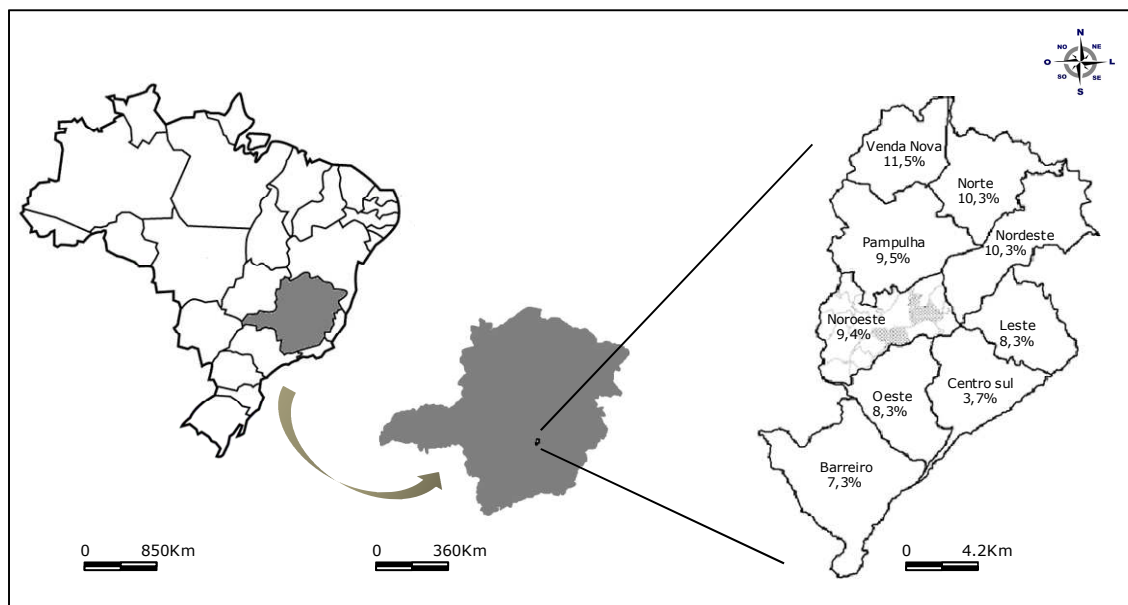


Figura 4: Localização de Belo Horizonte e suas regiões administrativas, mostrando a sororeatividade para leishmaniose em 2007. Em destaque, encontram-se hachuradas as duas áreas de abrangência trabalhadas na Regional Noroeste, Padre Eustáquio e Santos Anjos.

Fonte: GERCZO-NO/GEREPI-NO 2008.

5.3 Cálculo da amostra e amostragem

Devido à variação da prevalência de leishmaniose canina nas áreas de abrangência da Regional Noroeste, a amostra investigada foi calculada de acordo com os seguintes parâmetros: (1) prevalência esperada da infecção canina por *Leishmania* spp. entre 5 e 10%; (2) nível de confiança de 95%; (3) precisão na estimativa de 1,5%. Através destes parâmetros foi estabelecido que o tamanho da amostra no estudo transversal seria de 1.500 cães. Esta amostra forneceu dados suficientes para calcular a prevalência da infecção por *Leishmania* spp. e identificar, entre os animais

soronegativos, cães PCR positivo para compor a coorte. Considerou-se neste cálculo a maior sensibilidade da PCR e a perda de seguimento que ocorreria na população canina durante a coorte. Buscando operacionalizar as atividades, os animais foram amostrados durante as ações de rotina dos agentes de combate a endemias, em um inquérito canino domiciliar censitário. Durante as coletas de amostras foram realizadas as entrevistas com os proprietários e todos os cães existentes na residência foram amostrados.

Para o estudo de coorte, a amostra foi calculada de acordo com os seguintes parâmetros: (1) taxa de soroconversão nos animais PCR negativo de 10%; (2) poder do teste de 80%; (3) nível de confiança de 95%; (4) Risco Relativo de 2,0. A amostra estimada foi de aproximadamente 200 animais soronegativo/PCR⁺. Juntos a estes cães foram selecionados também 200 animais soronegativo/PCR⁻. Por razões operacionais os retornos da coorte foram realizados de maneira que fosse possível seguir a rotina dos agentes de combate de endemias, durante os inquéritos censitários que anualmente são realizados na região. Através dos mapas de georeferenciamento e das fichas contendo os endereços dos animais, os agentes localizavam os cães soronegativo/PCR⁺. Foram também acompanhados animais que apresentaram resultado sorológico e molecular negativo no estudo transversal, sendo estes selecionados de acordo com a proximidade aos cães soronegativos/PCR⁺. Os cães soronegativo/PCR⁻ das residências mais próximas as dos cães soronegativo/PCR⁺ foram incluídos no estudo como controle negativo de área. O georreferenciamento foi realizado através da associação ao sistema de coordenadas planas UTM (Universal Transversal de Mercator), projeção South American Datum (SAD 69). As bases tabuladas cedidas pela GERCZO-NO e GEREPI-NO apresentavam os códigos dos imóveis e logradouros, a geocodificação foi realizada para obtenção das coordenadas dos pontos em que os animais analisados se localizavam. O mapeamento de todas as bases de dados foi realizado através do Software MapInfo 8.5 para Windows (Figura 5).

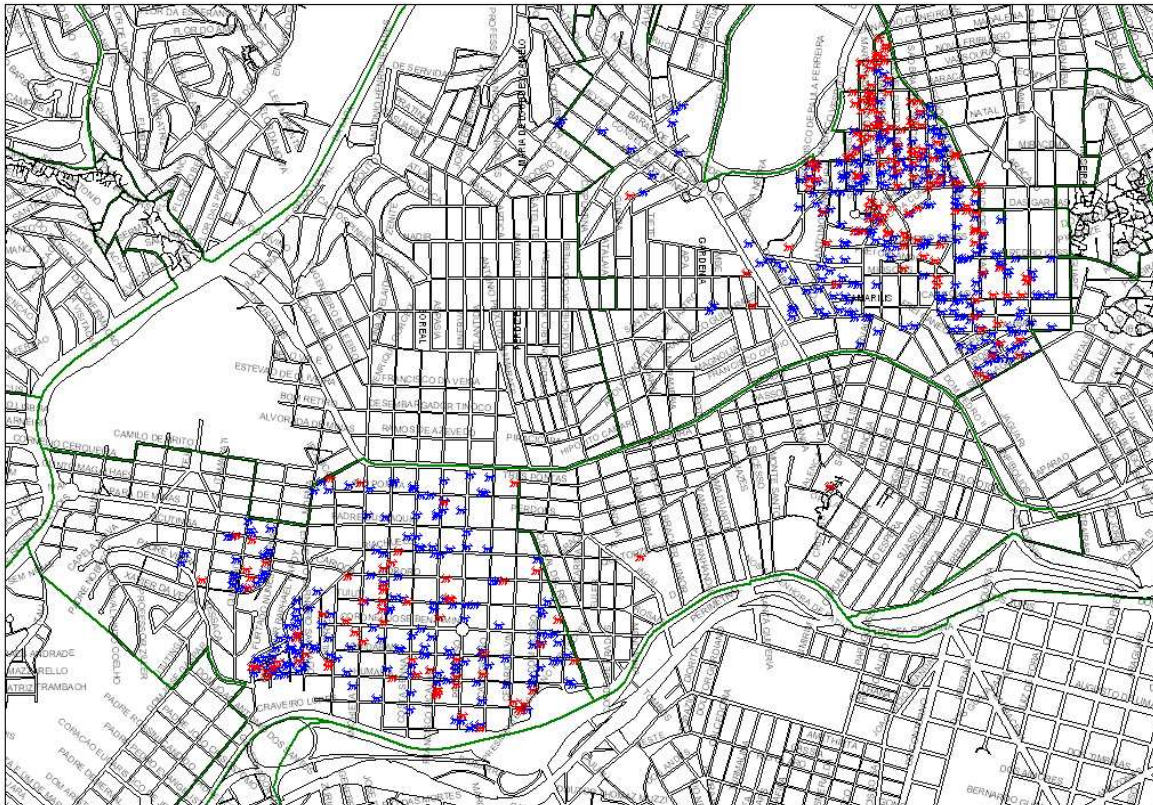


Figura 5: Mapa de Belo Horizonte-MG demonstrando parte da Regional Noroeste com as duas áreas de abrangência estudadas, Santos Anjos (parte superior do mapa) e Padre Eustáquio (parte inferior do mapa). Os animais amostrados no estudo transversal, subdivididos de acordo com seu resultado sorológico e molecular como: (🐕) cães soro e PCR negativo e (🐕) cães soronegativo/PCR⁺.

5.4 Estudo Transversal

O estudo transversal foi realizado de forma censitária nas áreas de abrangência do Santos Anjos e Padre Eustáquio. Durante as visitas domiciliares, os proprietários de cães foram informados sobre o projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Formulário I (Apêndice A), caso desejassem participar do trabalho. Após assinatura, a amostra de sangue foi coletada no cão. As coletas foram realizadas pelos agentes de combate de endemias, previamente treinados em punção venosa. Além desta equipe o trabalho contou com veterinários da Prefeitura, que ofereceram suporte clínico para qualquer eventualidade.

Durante o procedimento da coleta foi realizada entrevista com os proprietários, utilizando questionário epidemiológico previamente testado (Apêndice B). Neste questionário foi avaliado o conhecimento do proprietário sobre a doença, o vetor e o hospedeiro, além das condições socioeconômicas e de moradia, comportamento do cão e cuidados dos proprietários com o animal. Foi preenchida, junto ao questionário, uma ficha contendo as características e dados clínicos de cada cão da residência (Apêndice

C). Para evitar a introdução de vícios de informação, as entrevistas foram realizadas por uma equipe de entrevistadores treinados. No decorrer do estudo, foram realizadas reuniões de avaliação e padronização das condutas, sendo o trabalho acompanhado durante todo o tempo, garantindo que as instruções fossem seguidas. Os entrevistadores e agentes de zoonoses foram orientados a serem imparciais, evitando interpretar, aprovar ou desaprovar as respostas dos entrevistados. As entrevistas foram respondidas por um dos responsáveis pela família ou por maiores de 18 anos.

No estudo transversal foi coletado sangue em EDTA para: hemograma, separação de creme leucocitário e plasma. Além disso, foi coletado sangue total em papel filtro para sorologia. Uma amostra de papel filtro foi encaminhada para o Laboratório de Zoonoses de Belo Horizonte (LZOON) para sorologia (ELISA, Biomanguinhos, Fiocruz RJ). Nos casos de sorologia positiva na reação de ELISA, a técnica de imunofluorescência (RIFI) foi realizada pelo LZOON para confirmação do diagnóstico. Quando o animal apresentou resultados reativos em ambos os testes, o proprietário foi informado e teve o direito de realizar outro exame para contraprova. O animal que teve sua contraprova positiva foi então recolhido pela GERCZO-NO para realização da eutanásia no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), conforme determinações do manual de controle da LV do Ministério da Saúde (Brasil 2006).

Diariamente, após o término das coletas os papéis filtro e os tubos com sangue foram conferidos, verificando o código da coleta (zoonoses) antes de serem enviados para o Laboratório de Imunopatologia (LIMP) da UFOP, garantindo a correta codificação do material. Ao chegar ao LIMP as amostras eram recodificadas, sendo preenchida uma planilha com o código de coleta do serviço de zoonoses e um novo código era gerado no LIMP. Posteriormente foram realizados os seguintes procedimentos: confecção do filme sanguíneo e hemograma automatizado, separação do plasma e creme leucocitário. Do sangue total em papel filtro foi realizada outra sorologia utilizando antígeno solúvel de *L. infantum*. Nos casos de discordância entre os resultados sorológicos dos laboratórios, prevaleceu o emitido pelo LZOON. Foi adotada tal conduta devido à falta de registro do antígeno solúvel de *L. infantum* no Ministério da Agricultura, impossibilitando sua utilização como diagnóstico definitivo. Este antígeno encontra-se patenteado e em fase de testes para validação e desenvolvimento de um *Kit* diagnóstico (Reis et al. 2006a).

Durante o estudo transversal foi avaliada uma subamostra de sete cães controle (CN) soronegativo/PCR⁻; oito cães assintomáticos I (CA-I) soronegativo/PCR⁺; dez

cães assintomático II (CA-II) soro e PCR positivo; e dezesseis animais sintomáticos (CS) soro e PCR positivo. Nestes animais foram analisados parâmetros hematológicos, resposta humoral e celular, buscando biomarcadores de progressão clínica. A análise desta subamostra foi um estudo preliminar para observar o perfil de resposta nestes grupos de animais, que serão posteriormente estudados. O material biológico dos animais sintomáticos foi obtido no CCZ da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte em cães que seriam eutanasiados devido a reatividade nos exames sorológicos para LVC.

5.5 Estudo de Coorte

O estudo de coorte teve início após obtenção dos resultados sorológicos (ELISA) e moleculares (PCR-RFLP). A primeira coleta da coorte ocorreu dez meses após o início do estudo transversal e a segunda e terceira coletas da coorte, após depois 16 e 26 meses. O critério de inclusão do animal na coorte foi estar na forma clínica assintomática e apresentar sorologia negativa concordante nos laboratórios LPC e LZOON. Os proprietários dos cães soronegativo/PCR⁺ e dos cães soronegativo/PCR⁻ foram informados sobre a continuidade do projeto e os que tiveram interesse em continuar, assinaram outro Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Formulário II (Apêndice D) e/ou Formulário III (Apêndice E) de acordo com o diagnóstico molecular de seu animal. Durante todas etapas da coorte os agentes de controle de endemias da GERCZO-NO, realizaram as coletas de material biológico nos cães, sendo coletado sangue total em EDTA e sangue total em papel filtro. Além disso, em uma sub-amostra de 71 animais da primeira coorte, foi coletado sangue total em heparina para os experimentos de cultivo celular verificando a produção intracitoplasmática de IL-4 e IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Durante toda coorte, as amostras foram encaminhadas ao LIMP onde foram recodificadas e analisadas. Foi realizado então: imunofenotipagem, confecção do filme sanguíneo, hemograma, separação do creme leucocitário e do plasma.

Da mesma forma que no estudo transversal, amostras de sangue total em papel filtro foram encaminhadas ao LZOON, para a realização dos testes sorológicos (ELISA e RIFI). Os animais que soroconverteram foram então recolhidos e eutanasiados, conforme preconizado pelo PCLV (Brasil 2006).

5.6 Avaliação clínica

A avaliação clínica dos cães foi baseada na presença ou ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *L. infantum*, tais como: onicogrifose, atrofia muscular, lesões de pele, dermatite furfurácea, alopecia, ceratoconjuntivite, paralisia dos membros posteriores, emagrecimento, dentre outras, seguindo os critérios estabelecidos por Mancianti et al. (1988) e Reis et al. (2006a) que ao final possibilita subdividir os cães soropositivos em: cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Cabe ressaltar que o presente estudo propõe uma nova categorização clínica que considera subgrupos assintomáticos (assintomático soronegativo/PCR⁺ e assintomático sorologia e PCR positiva). A avaliação clínica foi realizada pelos agentes de saúde do Programa de Leishmaniose da GERCZO-NO, capacitados na identificação dos diversos sinais clínicos característicos da LVC. A coleta destes e outros dados foram realizadas por meio de um formulário preenchido na residência após a coleta do material biológico (Apêndice C e F).

5.7 Coleta das amostras

A veia braquio-radial foi escolhida preferencialmente para punção venosa, utilizando agulhas de diâmetro 25x8 e seringas estéreis de 5 mL. Após a punção, as amostras foram armazenadas em tubos contendo anticoagulante (EDTA). Aproximadamente 1mL do sangue total foi utilizado para confeccionar duas lâminas de papel filtro que foram empregadas pelo LZOON e LPC na sorologia.

O processamento do sangue ocorreu no mesmo dia da coleta, sendo realizado o hemograma, filme sanguíneo, separação de plasma e creme leucocitário. O material biológico gerado neste processamento foi recodificado e devidamente armazenado em freezers a -20°C (plasma) e - 80°C (papa de leucócitos).

5.8 Hemograma

As amostras de sangue periférico em EDTA foram analisadas no leitor hematológico veterinário 2800 Vet (Mindray® China). Paralelamente, filmes sanguíneos foram confeccionados e devidamente corados pela técnica de Giemsa para posterior análise hematológica das populações de leucócitos.

5.9 Obtenção do antígeno para a reação imunoenzimática anti-*Leishmania* e para ensaios de imunofenotipagem *in vitro*

Para os testes de ELISA, foi utilizado antígeno solúvel de promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46), cultivados por sete dias no meio LIT. Os parasitos foram lavados por três vezes em solução tampão fosfato pH 7,2 por centrifugação em 600 x g por 10 minutos. Em seguida, os parasitos foram rompidos com três ciclos durante um minuto a 40 Watts em ultra-som (Sonifier Cell Disruptor-Brason Sonic Power Co.,EUA) no banho de gelo. Posteriormente, o material sonificado foi centrifugado a 37.000 x g por uma hora e 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi dialisado contra PBS pH 7,2, durante 24 horas, a 4°C sob agitação. Por fim, o material remanescente na membrana de diálise foi filtrado em filtros estéreis descartáveis, de 0,22 µm (Millipore Co, Massachusetts, EUA), em condições estéreis e uma alíquota retirada para dosagem de proteína pelo método de Lowry, sendo ajustada a concentração para 1.000µg/mL (Lowry et al. 1951). Amostras do antígeno foram alíquotadas e congeladas em freezer à -80°C até o momento do uso.

5.10 Avaliação sorológica

Além dos testes de ELISA e RIFI (Biomanguinhos, Fiocruz RJ) conduzidos pelo LZON, foi realizada outra técnica de ELISA empregando antígeno solúvel de *L. infantum* no LPC da Universidade Federal de Ouro Preto. Foi realizado o teste para detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* spp. (Voller et al. 1976).

Placas de poliestireno de fundo chato (MaxiSorpTM Surface, Nunc-Immuno Plate, USA) foram sensibilizadas com 2µL/orifício de antígeno solúvel de *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) em tampão carbonato pH 9,6 com posterior permanência em geladeira por no mínimo 18 horas. O excesso de antígenos das placas foi removido através de quatro lavagens sucessivas com solução de lavagem (solução salina com Tween-20 a 0,05%) na lavadora Ultrawash Plul (Dynex[®] Technologies, VA, USA). As placas foram então saturadas com 200 µL/orifício de solução de PBS com 5% SFB e em seguida foram incubadas a 37°C por 45 minutos. Após este prazo procederam-se quatro lavagens com solução própria. Duplicatas dos eluatos de papel filtro foram aplicadas às placas e estas foram novamente incubadas em estufa a 37°C por 45 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas com 100 µL/orifício de conjugado anti-

IgG de cão por 45 minutos. Novamente as placas foram lavadas por quatro vezes com solução de lavagem e adicionou-se 100 µL/orifício da solução de substrato [5mg de o-fenilenodiamino (Tablete OPD- Sigma, USA) + 4µl de H₂O₂ a 30% + 10ml de tampão citrato-fosfato], mantendo-as no escuro à temperatura de 37°C por 10 minutos. Findado este tempo, 25µL/orifício de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4N foi adicionado para interromper a reação e proceder a leitura no espectrofotômetro. Para leitura da reação foi utilizado o leitor ELX800 (Biotek Instruments® VT, USA), a 492nm. Os resultados obtidos foram expressos em valores de densidade óptica (absorbância). Foi verificada a reprodutibilidade da sorologia em aproximadamente 10% dos cães examinados. Estes foram retestados de forma codificada e simultaneamente com as amostras. Para avaliação da sensibilidade e especificidade da técnica foram utilizados 20 animais parasitológico positivo em punção de medula, obtidos no Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte e 14 cães parasitológico negativo do canil da Universidade Federal de Ouro Preto.

A eluição do sangue presente no papel filtro foi realizada imergindo um confete de 6mm de diâmetro em 400 µL de tampão PBS. O confete ficou sob agitação durante uma hora, resultando em um eluato com concentração final equivalente a titulação de 1:80. Os papéis foram eluídos no dia em que a reação foi processada.

Como conjugado imunoenzimático foi utilizado uma anti-imunoglobulina de cão, fração IgG, obtido de soro imune de coelhos e marcada com peroxidase (Bethy Laboratories, USA). O painel de conjugados que foram utilizados nas reações de ELISA da sub-amostra foi constituído de anticorpo policlonal anti-IgG (Sheep anti-dog IgG-heavy and light chain HRPO conjugated), anti-IgG1 (Goat anti-dog IgG1-heavy chain specific HRPO conjugated), anti-IgG2 (Sheep anti-dog IgG2-heavy chain specific HRPO conjugated), anti-IgM (Goat anti-µ chain specific dog IgM-HRPO conjugated), anti-IgA (Goat anti-dog IgA-α chain specific HRPO conjugated) e anti-IgE (Goat anti-dog IgE-ε chain specific HRPO conjugated). Todos os anticorpos foram produzidos pela empresa (Bethyl laboratories, Inc Montgomery - Texas, EUA). A concentração de conjugado foi determinada por titulação com soros positivos e negativos. Para os conjugados anti-IgG1, IgM, IgA e IgE foi utilizada a diluição 1:1.000 e para IgG e IgG2 as diluições de 1:8.000 e 1:16.000 respectivamente.

5.11 Análise molecular - Reação de PCR

5.11.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada a partir das células mononucleares do sangue periférico dos cães investigados. Para obtenção destas células, o sangue total coletado em EDTA foi centrifugado a 1.500-1.800 x g por 20 minutos e a suspensão de creme leucocitário, removida e congelada a -80°C em tampão Tris-EDTA (T.E) na proporção de 1:1 v/v. Para obtenção do DNA foi utilizado o *kit* de extração WizardTM Genomic DNA Purification *Kit* (Promega, Madison, WI, USA) seguindo as recomendações do fabricante, conforme brevemente descrito a seguir.

As amostras de creme leucocitário armazenadas a -80°C foram descongeladas e uma alíquota de 200µL retirada. A este volume foi adicionado 700µL de solução de lise celular. Em seguida a amostra foi homogeneizada por 10 minutos e centrifugada a 15.000 x g por um minuto em microcentrífuga (Eppendorf[®] - Modelo 5418, NY, USA). Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o precipitado agitado com o auxílio de vórtex (Vision Scientific[®], Korea) por 15 segundos. Em seguida foi adicionado 200µL de solução de lise nuclear e 75µL de solução de precipitação protéica. Com o auxílio do vortex, a amostra foi homogeneizada por 30 segundos e centrifugada a 15.000 x g por três minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde se adicionou 200µL de isopropanol (Merck[®], Darmstad, Alemanha) e a amostra foi homogeneizada por aproximadamente 30 segundos. Em seguida a amostra foi centrifugada a 15.000 x g por um minuto, o sobrenadante descartado e o precipitado homogeneizado por 15 segundos. Foi acrescentado 200µL de etanol a 70% (Merck[®], Darmstad, Alemanha) sendo a amostra homogeneizada e centrifugada a 15.000 x g por um minuto. O sobrenadante foi desprezado e a amostra deixada por 35 a 45 minutos em temperatura ambiente (TA) até total evaporação do etanol. Finalmente, foi adicionado 100µL de solução de hidratação e as amostras foram mantidas por 24 horas a temperatura ambiente, sendo periodicamente homogeneizadas. Após este intervalo foram armazenadas em geladeira a 4°C até o momento da análise da qualidade do DNA extraído e início da reação de PCR.

Aproximadamente 10% das amostras foram extraídas duas vezes para testar a reprodutibilidade da técnica.

5.11.2 Controles

Foram usados como controle positivo DNAs padrões obtidos de cepas referência de *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46). Estas cepas são provenientes do criobanco do LIMP. Além destes foram utilizados como controle negativo, DNAs de cães negativos para leishmaniose do canil da UFOP.

5.11.3 Análise do DNA

Para investigar a qualidade da extração foram realizadas eletroforeses em gel de agarose 1% corados pelo brometo de etídio. A cuba para eletroforese utilizada foi a GNA100 (Pharmacia Biotech[®]) ligada ao alimentador de força Live Technologies Model 250 (Gibco BRL[®]) a uma voltagem de 66V e corrente de 40A por 45 minutos. Para visualização utilizou-se o transluminador de U.V. (UVP-Transilluminator; Modelo TM-36, USA).

5.11.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foi empregado o par de *primer* (150) 5'-GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA-3' e (152) 5'-(G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C-3', direcionados para amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* (Degraeve et al. 1994). A reação constituiu de: tampão 1X, 1,5mM de MgCl₂, 2,0μM de dNTP, 1,0 pmol de cada *primers* (150 e 152), 0,76 U Taq DNA polimerase (Fermentas - Sinapse[®]), 2,5 μL DNA e H₂O Milli Q totalizando 12,5 μL por poço da placa (MicroAmp[®] Fast Optical 96-Well, Applied Biosystems). As condições utilizadas na reação de PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por um minuto, seguida por 40 ciclos a 93°C por 30 segundos, 64°C por 1minuto, 72°C por um minuto e uma extensão final a 72°C por sete minutos. O equipamento utilizado foi o termociclador Verit Termal Cycler 96well (Applied Biosystems[®], Califórnia, USA).

5.11.5 Análise dos produtos da PCR

Após amplificação 5μL do produto obtido foram ressuspensos em um volume equivalente de tampão da amostra 2X (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e 15% de ficol) e aplicados em gel de poliacrilamida. A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida a 8%, a 40mA em TBE (Tris-base a 89mM pH 8,0; ácido

bórico a 89mM, EDTA a 2mM) em um sistema de cubas preparadas para 80 amostras. Foi utilizado como marcador de tamanho molecular o DNA do bacteriófago ϕ X 174 digerido pela enzima HaeIII (Pharmacia, San Francisco, CA, USA). Em seguida, os géis foram corados pelo nitrato de prata 0,2% (Santos et al. 1993).

5.11.6 PCR–RFLP mkDNA

Nos animais PCR positivo foi realizada a RFLP mkDNA (Volpini et al. 2004). Resumidamente, 5 μ L do produto da PCR foi digerido, após incubação durante 3 horas a 37°C, por 1 U da enzima HaeIII em seu tampão de uso 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e H₂O Milli Q totalizando 15 μ L por poço da placa (MicroAmp[®] Fast Optical 96-Well, Applied Biosystems). Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida a 10%, onde foi aplicado 5 μ L do produto restringido em um volume equivalente de tampão da amostra 2X (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e 15% de ficol). A corrida eletroforética foi realizada a 40mA em TBE (Tris-base a 89mM pH 8,0; ácido bórico a 89mM, EDTA a 2mM), em um sistema de cubas preparadas para 80 amostras. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 25pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, os géis foram corados pelo nitrato de prata 0,2% (Santos et al. 1993). Os fragmentos gerados foram comparados com cepas padrão presentes em nosso criobanco.

5.12 Citometria de fluxo

5.12.1 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Os ensaios de imunofenotipagem no contexto *ex vivo* das células obtidas a partir do sangue periférico, foram realizados empregando anticorpos monoclonais específicos anti-receptores de células caninas (Tabela 1). Para aquisição, armazenamento e análise dos dados referentes à resposta celular foi empregado o citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San Diego, EUA), equipado com um sistema de computador contendo o *software Cell Quest*, fornecido pelo fabricante do equipamento.

Tabela 1: Painel de anticorpos utilizados na imunofenotipagem de leucócitos.

Anticorpos Monoclonais	Hospedeiro	Clone	Isotipo	Fluorocromo	Diluição final	Célula alvo / atuação
Anti-CD5	Rato	YKIX322.3	IgG2a	FITC	1:400	Linfócitos T
Anti-CD4	Rato	YKIX302.9	IgG2a	FITC	1:1000	LT auxiliares
Anti-CD8	Rato	YCATE55.9	IgG1	FITC	1:80	LT citotóxicos
Anti-CD21	Camundongo	IOB1a	IgG1	FITC	1:100	Linfócitos B
Anti-CD14	Camundongo	M5E2	IgG2a	R-PE-Cy5	1:320	Monócitos

5.12.2 Ensaio de imunofenotipagem celular em leucócitos do sangue periférico no contexto *ex vivo* utilizando tubos

Esta segunda metodologia para fenotipagem celular foi realizada empregando-se um processo simples de marcação primária em cinco tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon[®] 2054, Becton Dickinson, San Diego, EUA), utilizando-se anticorpos monoclonais em quantidades e diluições descritas na Tabela 1. Os tubos foram preparados antes dos experimentos de fenotipagem e armazenados em freezer à -20°C. Em tubos contendo 50 µL de FACS dil (controle da suspensão celular), 50 µL dos anticorpos anti-CD5-FITC, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD21-FITC e de anti-CD14-PE-Cy5 foram adicionados 50 µL de sangue colhido em EDTA. As células foram, então, misturadas ao anticorpo com o auxílio de vórtex e incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz, em temperatura ambiente (TA). Para lise dos eritrócitos, foram adicionados 2 mL de solução de lise (Facs lysing solution - Becton Dickinson, San Jose, EUA) sob agitação no vórtex, incubando-se por 10 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Logo após esta etapa, foi adicionado 1 mL de PBS 1X/pH 7,2, sendo o material homogeneizado no vórtex e centrifugado a 450 x g por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado de uma só vez, vertendo-se o tubo, e o sedimento ressuspensionado manualmente, sendo adicionados 2 mL de PBS 1X/pH 7,2, seguindo-se homogeneização no vórtex e centrifugação a 450 x g por 10 minutos a TA. O sobrenadante foi desprezado como anteriormente e o sedimento ressuspensionado em 200 µL de solução fixadora (MaxFacsFix), para então, realizar-se a leitura no citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), com aquisição de 20.000 eventos/tubo.

5.12.3 Ensaio de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto *in vitro*

Nestes experimentos de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas foi utilizado sangue coletado em tubos estéreis contendo heparina sódica, em um volume final de sangue de 5 mL.

Os anticorpos monoclonais utilizados nesta parte do trabalho estão descritos na Tabela 2. Os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 foram diluídos em solução de PBS-W (0,015M de PBS 1X, 0,5% albumina sérica bovina - BSA e 0,1% de azida sódica); já os anticorpos anti-IFN- γ e anti-IL-4, em solução de PBS-P (PBS-W contendo 0,5% de saponina - Sigma), ambas acrescidas de 10% soro fetal bovino (SFB) e em diluições previamente estabelecidas na padronização do protocolo. Foi preparado inicialmente três tubos de polipropileno de 13 mL (Falcon[®] 2054, Becton Dickinson, San Diego, EUA) para cada animal analisado, a saber: tubo controle (1,0mL de RPMI e 1,0mL de sangue total em heparina) tubo estimulado com antígeno de *L. infantum* na concentração final de 25 $\mu\text{g/mL}$ (250 μL de ASLi, 750 μL de RPMI e 1,0mL de sangue total em heparina) e tubo contendo PMA (éster mirístico de forbol) como controle positivo da reação (inicialmente com 1,0mL de RPMI e 1,0mL de sangue total em heparina). Os tubos foram incubados por 12 horas e mantidos à 37°C em estufa incubadora (Forma Scientific, EUA) com 5% de CO₂. Após este período, os tubos PMA foram retirados e a eles adicionados 50 μL de PMA (25ng/mL) e 2 μL de ionomicina (1 $\mu\text{g/mL}$). Posteriormente foram retirados os outros tubos da estufa e adicionados 20 μL de brefeldina A (10 $\mu\text{g/mL}$), com posterior incubação por 4 horas. Os tubos foram mantidos à 37°C em estufa incubadora com 5% de CO₂. Utilizou-se a BFA para inibir a secreção da citocinas, mantendo-as no interior do complexo de Golgi. Ao término da incubação, as culturas foram tratadas com 200 μL ácido etilenodiamino tetracético - EDTA (Sigma), concentração final de 2mM, e incubadas por 10 minutos à TA. O EDTA bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados. Posteriormente ao tratamento com EDTA, as células foram lavadas com 6,0 mL de PBS-W e centrifugadas por 7 minutos a 400 x g, a 18°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C restando no tubo um volume final de 2,0 mL (sobrenadante e *pellet*) sendo posteriormente homogeneizado em vórtex. Ao abrigo da luz, foi retirado 500 μL do *pellet* e transferido para outros tubos de poliestireno, contendo os anticorpos monoclonais anti-moléculas de superfície (CD4⁺ e CD8⁺). Os

tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos à TA e ao abrigo da luz. Em seguida foi adicionado aos tubos, 3,0 mL de solução de lise (Facs lysing solution - Becton Dickinson, San Jose, EUA) sob agitação em vórtex, e incubados por 10 minutos à TA e ao abrigo da luz e posteriormente os tubos foram centrifugados por 7 minutos a 400 x g à 18°C. O sobrenadante foi então desprezado e o *pellet* homogeneizado em vórtex até a ressuspensão total das células. Foi adicionado 500 µL de PBS-W em cada tubo e estes foram homogeneizados. Em seguida foi adicionado 3,0 mL de PBS-P, os tubos foram homogeneizados e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 7 minutos a 400 x g à 18°C. O sobrenadante foi desprezado e o tubo homogeneizado até a ressuspensão total das células. Foi adicionado 2,0 mL de PBS-W com posterior agitação em vórtex. Em seguida o tubo foi centrifugado por 7 minutos a 400 x g, 18°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado para 200 µL. Após a ressuspensão das células, procedeu-se à marcação das citocinas intracitoplasmáticas em placas de 96 poços e fundo em “U”.

Para isso, alíquotas de 30µL das suspensões celulares foram incubadas por 30 minutos à TA e ao abrigo da luz na presença de 20µL da suspensão de anticorpos anti-citocinas conjugados com o fluorocromo PE (anti-IFN- γ e anti-IL-4, - Tabela 2). A placa foi homogeneizada e incubada por 30 minutos à TA e ao abrigo da luz sendo, em seguida, adicionado 100 µL/poço de PBS-P e a placa centrifugada por 7 minutos a 400 x g, 18°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* homogeneizado vagarosamente no vórtex. Posteriormente foi adicionado 200 µL/poço de PBS-W, centrifugado por 7 minutos a 400 x g, 18°C, o sobrenadante desprezado e o *pellet* novamente homogeneizado. Em seguida foi adicionado 200 µL/poço de solução fixadora (MaxFacsFix) e este conteúdo transferido para microtubos de 500 µL. Os microtubos foram mantidos em geladeira até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), avaliando-se pelo menos 30.000 eventos/tubo.

A análise das frequências de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ sintetizando citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ , IL-4) consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, em gráficos de distribuição pontual de tamanho (*forward scatter* - FSC) versus granulosidade (*side scatter* - SSC). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo Tamanho^{baixo} Granulosidade^{baixa}, foram construídos gráficos de distribuição pontual de fluorescência

CD4/FL1 ou CD8/FL1 versus IFN- γ / FL2 ou IL-4/FL2, para determinar o percentual de células IFN- γ^+ e IL-4 $^+$ dentro da população de linfócitos totais previamente selecionada em R1.

Tabela 2: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto *in vitro*.

Anticorpos monoclonais/ fluorocromo	Hospedeiro / clone	Diluição final	Funções principais
Anti-CD4 / FITC	Rato / YKIX322.3	1:400	Co-receptor para moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II. Expresso em subgrupos de timócitos, linfócitos T, monócitos e macrófagos
Anti-CD8 / FITC	Rato / YKIX302.9	1:1000	Co-receptor para MHC de classe I. Expresso em subgrupos de timócitos e linfócitos T citotóxicos
Anti-IFN- γ / R-PE	Camundongo/ CC302	1:80	Ativação de macrófagos, aumento da expressão de moléculas MHC e dos componentes do processamento de antígenos, mudança de classe de Ig, induz diferenciação em células do Tipo 1, supressão de resposta Tipo 2
Anti-IL-4 / R-PE	Camundongo/ CC303	1:480	Ativação de células B, mudança para IgE, induz diferenciação em células do Tipo 2, supressão de resposta Tipo 1.

5.14 Análise estatística dos dados

As informações coletadas foram codificadas e duplamente digitadas utilizando o programa EpiData (versão 3.2) no laboratório de Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. Os arquivos foram comparados e as divergências corrigidas. Para a análise dos dados foi utilizando o pacote estatístico STATA versão 10.0 (StataCorp, 2007).

As análises foram realizadas em diferentes etapas, iniciando pela exploratória, por meio da análise gráfica e medidas-resumo. Para as comparações entre os testes diagnósticos (medidas qualitativas), utilizou-se as proporções de concordâncias e a estatística *Kappa*. A interpretação de *Kappa* foi de acordo com a seguinte escala: 1,00-0,81 excelente; 0,80-0,61, bom; 0,61-0,40, moderado; 0,40-0,21, fraco; 0,20-0,0 ausência de concordância (Szklo & Nieto 2000).

A Curva ROC foi empregada para a definição do ponto de corte dos testes sorológicos. As estimativas de prevalência e intervalo de confiança foram calculados com 95%.

Os dados referentes à isotipos, imunofenotipagem, citocinas e hemograma foram analisados usando o software GraphPad Prism 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). O teste de Kolmogorov-Smirnoff foi empregado para avaliar a distribuição dos dados. Considerando que todos os dados não foram paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para investigar diferenças entre os grupos, acompanhado do teste de Dunns' para as comparações múltiplas. Em todos os casos, foram consideradas significativas as diferenças com valores de $p < 0,05$.

5.14.1 Regressão logística de efeito misto

5.14.1.1 Análise univariada e seleção de variáveis para integrar os modelos

No estudo transversal, a identificação dos possíveis fatores de risco envolvidos na infecção por *L. infantum* foi realizada comparando animais soronegativo/PCR⁺ com os soronegativo/PCR⁻. A existência de associação entre infecção e cada variável foi avaliada utilizando-se regressão logística de efeito misto. O nível de efeito avaliado no modelo foi a residência, pois no processo de amostragem todos os cães existentes no domicílio foram selecionados para o estudo. Este modelo assume dependência nas observações de um mesmo domicílio e independência entre os domicílios. Na análise univariada, foram comparadas todas as variáveis do estudo, entre animais infectados e não infectados. Foram selecionadas para compor os modelos iniciais as variáveis que apresentaram na análise univariada, associação estatística ($p < 0,25$) com a infecção (PCR⁺). Variáveis com mais de duas categorias foram transformadas em variáveis *dummies*. Variáveis significativas ($p < 0,25$), mas que apresentavam frequências muito baixas (inferior a 10% das observações ou frequência ≤ 3 em uma das células da tabela de contingência) foram excluídas dos modelos logísticos por resultarem em intervalos de confiança de grande amplitude nas estimativas da *odds ratio*. Excluíram-se também as variáveis que apresentaram colinearidade.

5.14.1.2 Construção de modelos logísticos hierárquicos mistos multivariados, por grupos de variáveis

Devido ao grande número de variáveis estudadas, inicialmente foram construídos modelos logísticos de efeito mistos multivariados, hierarquizados por blocos de variáveis. Nos determinantes distais ficaram as variáveis socioeconômicas,

domicílio e peridomicílio, conhecimento sobre o vetor e hospedeiro. No bloco proximal entraram as variáveis relacionadas diretamente com o cão, como suas características e comportamento, que atuam diretamente no desfecho (Figura 6).

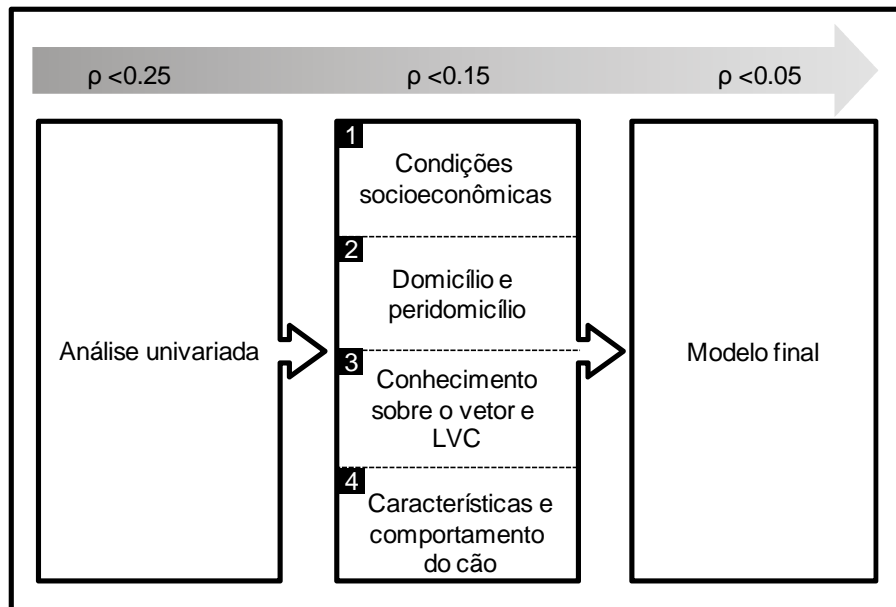


Figura 6: Representação esquemática da construção hierárquica do modelo de regressão logística de efeito misto.

5.14.1.3 Remoção sucessiva das variáveis e avaliação de seu efeito no modelo

Durante a modelagem hierarquizada, introduziu-se inicialmente todas as variáveis de cada bloco em modelos completos, posteriormente foi realizado o descarte sucessivo (passo a passo) das variáveis que não produziram mudanças significativas nas estimativas, ou seja, que não alteravam as odds relativas e intervalos de confiança (Hosmer & Lemeshow 1999). As variáveis foram avaliadas no nível de significância de 0,15 em cada um dos modelos. Para analisar a importância de cada variável no modelo, utilizou-se o teste da razão de verossimilhança. Através deste avaliou-se, passo a passo, se o modelo que incluía a variável em questão explicaria melhor a relação com a variável resposta do que sem ela. Se a diferença entre os dois modelos (sem a variável e com a variável) não fosse significativa ($p > 0,05$), a variável era excluída do modelo. Quando a retirada da variável altera o modelo modificando significativamente as estimativas, a variável é importante para a predição dos resultados não devendo neste caso ser excluída, retornando ao modelo. As variáveis que atingiram $p < 0,15$ em cada bloco, eram mantidas no bloco seguinte.

5.14.1.4 Construção do modelo final

Aquelas variáveis que permaneceram nos modelos intermediários com nível de significância de $p < 0,15$ foram reagrupadas em um modelo único e novamente avaliadas através do modelo completo com descarte sucessivo de variáveis. Foram realizadas novas estimativas de β , teste da razão de verossimilhança e OR com IC 95%. Nesta etapa, utilizou-se o nível de significância de 0,05, isto é, as variáveis que apresentaram $p > 0,05$ foram retiradas do modelo passo a passo. Em cada uma das etapas de avaliação do modelo, testou-se a colinearidade das variáveis, eliminando-se aquelas correlacionadas.

5.14.2 Análise de sobrevida, Kaplan-Meier e modelo de Cox

Foi realizada inicialmente, como análise exploratória dos dados, a análise univariada das curvas de sobrevida estimadas pelo método de Kaplan-Meier. Para testar a igualdade das funções de sobrevida foi utilizado o teste de Log-rank. Variáveis com valores de p menores que 0,25 no teste de Log-rank foram selecionadas para compor o modelo de Cox intermediário.

Utilizou-se a análise de sobrevida, pois a variável dependente de interesse foi o tempo decorrido até a detecção da infecção (PCR-RFLP⁺), em um modelo e soroconversão em outro. O modelo de regressão de Cox permite a análise de dados provenientes de estudos de tempo de vida, em que a resposta é o tempo até a ocorrência de um evento de interesse, ajustado por covariáveis (Colosimo & Giolo 2006). Este modelo fornece as estimativas das razões de risco. O tempo de sobrevivência foi contado a partir do estudo transversal, considerado tempo zero.

Devido ao agrupamento das observações (mais de um cão no mesmo domicílio) utilizou-se o modelo de fragilidade compartilhado, para tratar uma possível dependência entre as observações. A fragilidade representa, nesse caso, um efeito aleatório que descreve o risco comum, isto é, a fragilidade compartilhada por indivíduos de um mesmo grupo (Colosimo & Giolo 2006). O modelo de Cox foi então ajustado com fragilidade compartilhado, avaliando o parâmetro de variância da fragilidade ($H_0: \text{Var}(Z)=0$). Como a hipótese nula não foi rejeitada, a fragilidade foi retirada e o modelo de Cox convencional foi empregado.

Foram construídos dois modelos: o primeiro partindo de animais que apresentaram reação de PCR negativa durante o estudo transversal e o evento foi a

positividade da PCR em algum momento da coorte; o segundo modelo partiu de animais PCR⁺ e o evento foi a soroconversão. Com relação à censura, o momento da perda foi considerado como se o cão estivesse sido acompanhado até a metade do intervalo entre a última coleta e o momento da censura. Nos casos em que não houve o evento até o final da coorte (censura administrativa), a data da censura foi três meses após o término do estudo, pois o previsto seriam coletas a cada seis meses.

A modelagem foi realizada através da definição de um modelo completo, por grupo de variáveis, com todas as variáveis selecionadas durante a análise univariada de Kaplan-Meier. A partir deste modelo completo, foi realizado descarte sucessivo (passo a passo) onde as variáveis que apresentavam valores de p inferiores a 0,15 mantinham-se no modelo. Estas variáveis selecionadas no modelo intermediário foram então novamente analisadas e as que apresentaram valores de p inferiores a 0,05 compuseram o modelo final.

O modelo de regressão de Cox é bastante flexível devido à presença do componente não-paramétrico. Mesmo assim, ele não se ajusta a qualquer situação e requer o uso de técnicas para avaliar sua adequação (Colosimo & Giolo 2006). Para testar a adequação do modelo, foi realizado o teste de Schoenfeld (proporcionalidade dos riscos), onde se constatou que não houve rejeição da suposição de riscos proporcionais.

5.14.3 Estimativas de incidência

As taxas de incidência foram estimadas para cada momento de avaliação da coorte. Nos denominadores das taxas foram utilizados cão/tempo de acompanhamento e intervalo de confiança de 95%. Foram estimadas taxas de incidência para infecção por PCR-RFLP, no grupo soronegativo/PCR⁻, e de soroconversão grupo soronegativo/PCR⁺.

5.15 Aspectos éticos

Este trabalho, antes de ser iniciado, teve sua aprovação nos Comitês de Ética das seguintes Instituições: Universidade Federal de Minas Gerais (Parecer 020/2007 - Anexo A), Universidade Federal de Ouro Preto (Parecer 2007/83 - Anexo B) e Comitê de Ética da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte (Parecer 001/2008 - Anexo C).

6.0 Resultados

O conjunto de resultados obtidos no presente estudo foi organizado em três blocos, visando sua melhor compreensão. O primeiro deles refere-se , aos resultados dos testes diagnóstico (sorológicos e moleculares), subdivididos nas fases do estudo (transversal e coorte); o segundo, no qual são apresentados os resultados obtidos com as entrevistas e avaliação dos fatores de risco para infecção em ambas as fases do estudo (transversal e coorte) e o terceiro, onde são apresentados os resultados de biomarcadores.

Como o objetivo principal deste trabalho foi avaliar cães infectados por *L. infantum*, animais que apresentaram perfis de bandas na reação de PCR-RFLP não compatíveis com os desta espécie, não entraram nas análises nem foram seguidos na coorte. Foram encontrados três animais com perfil de bandas semelhante a *L. brasiliensis*, entretanto não foi realizada outra técnica molecular para confirmação do diagnóstico.

Os resultados dos métodos diagnóstico, bem como sua reprodutibilidade e concordância além das análises dos fatores de risco, encontram-se demonstrados em gráficos e tabelas divididos de acordo com cada fase do trabalho. No estudo transversal foram realizadas entrevistas com os proprietários e foi preenchida também, uma ficha individual de cada cão da residência. Para uma melhor visualização dos resultados obtidos nas entrevistas e fichas dos cães, estes foram separados em tabelas abordando cada tópico destes questionários. Nas tabelas referentes às análises univariadas e multivariadas, as variáveis também encontram-se subdivididas.

Por fim, são apresentados os resultados de biomarcadores, avaliando a resposta humoral, celular e produção intracitoplasmática de citocinas.

6.1 Testes diagnóstico (Bloco I)

6.1.1 Estudo Transversal

6.1.1.1 Resultados sorológicos e molecular

Durante o estudo transversal foi coletado material biológico em papel filtro que foi avaliado nos laboratórios LPC e LZOON. No LPC a reação de ELISA foi realizada utilizando antígeno solúvel de *L. infantum* produzido "in house" e no LZOON, empregando o *Kit* de Biomanguinhos. A realização dos dois testes de ELISA em paralelo permitiu o aumento da sensibilidade diagnóstica, evitando que animais com sorologia positiva compusessem a coorte.

Entre os 1443 cães, 230 animais (15,9%, IC95% 14,1-17,9) foram sororreativos em pelo menos um dos laboratórios (LPC e/ou LZOON), através da técnica de ELISA. A estimativa de prevalência por laboratório, foi 12,0% (IC95% 10,4-13,7) no LPC (173 cães) e 9,4% (IC95% 7,9-10,9) no LZOON (135 cães). Já pela PCR-RFLP, dos 1443 cães analisados, 356 (24,7%; IC95% 22,5-26,9) foram positivos para *L. infantum* e 1087 negativos (Tabela 3).

Tabela 3: Resultado sorológico por laboratório e molecular relativo ao estudo transversal.

Teste diagnóstico	Resultado		Total	Positividade % / IC95%
	Positivo (%)	Negativo (%)		
LPC/ELISA	173	1270	1443	12,0 (10,4-13,7)
LZOON/ELISA	135	1303	1443	9,4 (7,9-10,9)
PCR	356	1087	1443	24,7 (22,5-26,9)

6.1.1.2 Sensibilidade dos métodos diagnóstico

Para determinar a sensibilidade dos métodos diagnóstico, estes foram testados em 20 cães parasitológico positivos em isolamento de medula, obtidos no CCZ-BH, e 14 cães negativos do Canil da UFOP. Foram observadas sensibilidade e especificidade de 100% na sorologia (ELISA) realizada no LPC, sendo na PCR, observadas sensibilidade de 75% e especificidade de 100% (Tabela 4).

Tabela 4: Sensibilidade e especificidade dos métodos diagnóstico

Teste	Resultado	Parasitológico		Total	Sensibilidade (IC95%)	Especificidade (IC95%)
		Positivo	Negativo			
ELISA/ LPC	Positivo	20	0	20	100% (84-100)	100% (78-100)
	Negativo	0	14	14		
PCR	Positivo	15	0	15	75% (53-89)	100 (79-100)
	Negativo	5	14	19		
Total		20	14	34		

6.1.1.3 Reprodutibilidade dos métodos sorológicos e molecular

Durante a realização da sorologia no LPC foi testada a reprodutibilidade do teste em 12,5% das amostras, observando-se excelente concordância na reação de ELISA ($Kappa = 0,82$). (Tabela 5).

Tabela 5: Reprodutibilidade da técnica de ELISA realizada no LPC durante estudo transversal.

Sorologia		ELISA - LPC		Total	Kappa (IC95%)
		Positivo (%)	Negativo (%)		
ELISA - LPC	Positivo	16 (84,2)	3 (1,8)	19	0,8 (0,7-1,0)
	Negativo	3 (15,8)	165 (98,2)	168	
Total		19	168	187	

Para testar a reprodutibilidade da PCR foi realizada de maneira aleatória, a extração de 12,5% das amostras biológicas em duplicata e o DNA extraído foi amplificado e revelado de maneira mascarada. Foi observada baixa reprodutibilidade do teste molecular ($Kappa = 0,22$) (Tabela 6).

Tabela 6: Reprodutibilidade da reação de PCR

Teste diagnóstico		PCR		Total	Kappa (IC95%)
		Positivo (%)	Negativo (%)		
PCR	Positivo	16 (41,1)	29 (19,3)	45	0,22 (0,06-0,34)
	Negativo	23 (59,0)	121 (80,7)	144	
	Total	39	150	189	

6.1.1.4 Concordância entre os métodos diagnóstico

Quando os resultados moleculares e sorológicos foram comparados, observou-se ausência de concordância entre os métodos diagnóstico. Foi observado, entre a PCR e a sorologia, um valor de *Kappa* de 0,02 e 0,07 em relação à sorologia realizada nos Laboratórios LPC e LZOON respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7: Concordância entre as técnicas de PCR e ELISA realizadas no LPC e LZOON.

Teste diagnóstico		PCR		Kappa (IC95%)
		Positivo (%)	Negativo (%)	
ELISA/LPC	Positivo	46 (12,9)	127 (11,7)	173
	Negativo	310 (87,1)	960 (88,3)	1270
	Total	356	1087	1443
ELISA/LZOON	Positivo	49 (13,8)	86 (7,9)	135
	Negativo	307 (86,2)	1001 (92,1)	1308
	Total	356	1087	1443

Entre os 356 cães positivos na PCR, 296 (83,1%) eram soronegativos e 60 (18,8%) soropositivos. Entre os negativos na PCR, 170 foram reativos em pelo menos uma das sorologias, confirmando a baixa concordância entre os métodos diagnóstico. (Tabela 8).

Tabela 8: Resultados da técnica de PCR e sorologia realizadas durante o estudo transversal.

Sorologia	PCR		Total
	Positivo (%)	Negativo (%)	
LPC (-) LZOON (-)	296 (24,4)	917 (75,6)	1213
LPC (+) LZOON (+)	35 (44,9)	43 (55,1)	78
LPC (-) LZOON (+)	14 (24,6)	43 (75,4)	57
LPC (+) LZOON (-)	11 (11,6)	84 (88,4)	95
Total	356	1087	1443

6.1.2 Estudo de Coorte

Após dez meses subsequentes à primeira coleta, iniciou-se o estudo de coorte em uma amostra dos animais soronegativos selecionados durante o estudo transversal. Inicialmente foi calculada e planejada a coleta em 400 animais, sendo 200 de cada grupo (soronegativo/PCR⁺ e soronegativo/PCR⁻). Foram obtidas, na primeira coleta da coorte, 457 amostras em cães de 336 proprietários das quais 173 eram animais assintomáticos soronegativo/PCR-RFLP⁺ para *L. infantum* e 284 cães assintomáticos soronegativo/PCR⁻. Houve então, perda de 27 cães no grupo soronegativo/PCR⁺ e acréscimo de 84 animais no grupo soronegativo/PCR⁻. Este acréscimo teve a finalidade de aumentar o "n" do grupo que possibilita calcular a incidência de infecção pela PCR-RFLP. Para obtenção dos 457 cães que compõe a coorte foram visitadas 513 residências. Em 177 domicílios (183 cães; 68 PCR⁺ e 115 PCR⁻) não foram coletadas amostras, devido aos seguintes motivos: mudança de endereço (58 cães), morte do animal (41 cães), recusa pelo proprietário (13 cães), casa fechada durante três visitas (50 cães), fuga do animal (12 cães), endereço não encontrado (5 cães) e dificuldade na coleta (4 cães). A segunda coleta foi realizada 16 meses após o início do estudo transversal, sendo obtidas 370 amostras (317 soronegativo/PCR⁺ e 53 soronegativo/PCR⁻) com perda de 86 animais durante o seguimento. A terceira e última coleta da coorte foi realizada 26 meses após o estudo transversal e foram obtidas 282 amostras (242 soronegativo/PCR⁺ e 40 soronegativo/PCR⁻), com perda de 88 cães no seguimento (Figura 7). Os motivos das perdas durante o acompanhamento, bem como os grupos em que ocorreram, encontram-se detalhados na tabela 9. As residências consideradas fechadas foram visitadas três vezes antes de serem consideradas perda de seguimento. Para verificar se houve tendência nas perdas durante a coorte, foram avaliadas as variáveis sexo, porte e tipo de pelo. Foi constatado que os animais censurados não diferem dos que mantiveram-se no estudo (dados não mostrados).

Tabela 9: Perdas de seguimento durante a coorte.

Motivo	2ª Coleta Coorte			3ª Coleta Coorte		
	PCR +	PCR -	Total	PCR +	PCR -	Total
Eutanasiado (soropositivo)	8	10	18	6	0	6
Morreu	6	10	16	24	6	30
Mudou de endereço	7	20	27	9	2	11
Casa fechada	4	12	16	22	0	22
Recusa	2	4	6	15	1	16
Fugiu	2	1	3	2	1	3
Total	29	57	86	78	10	88

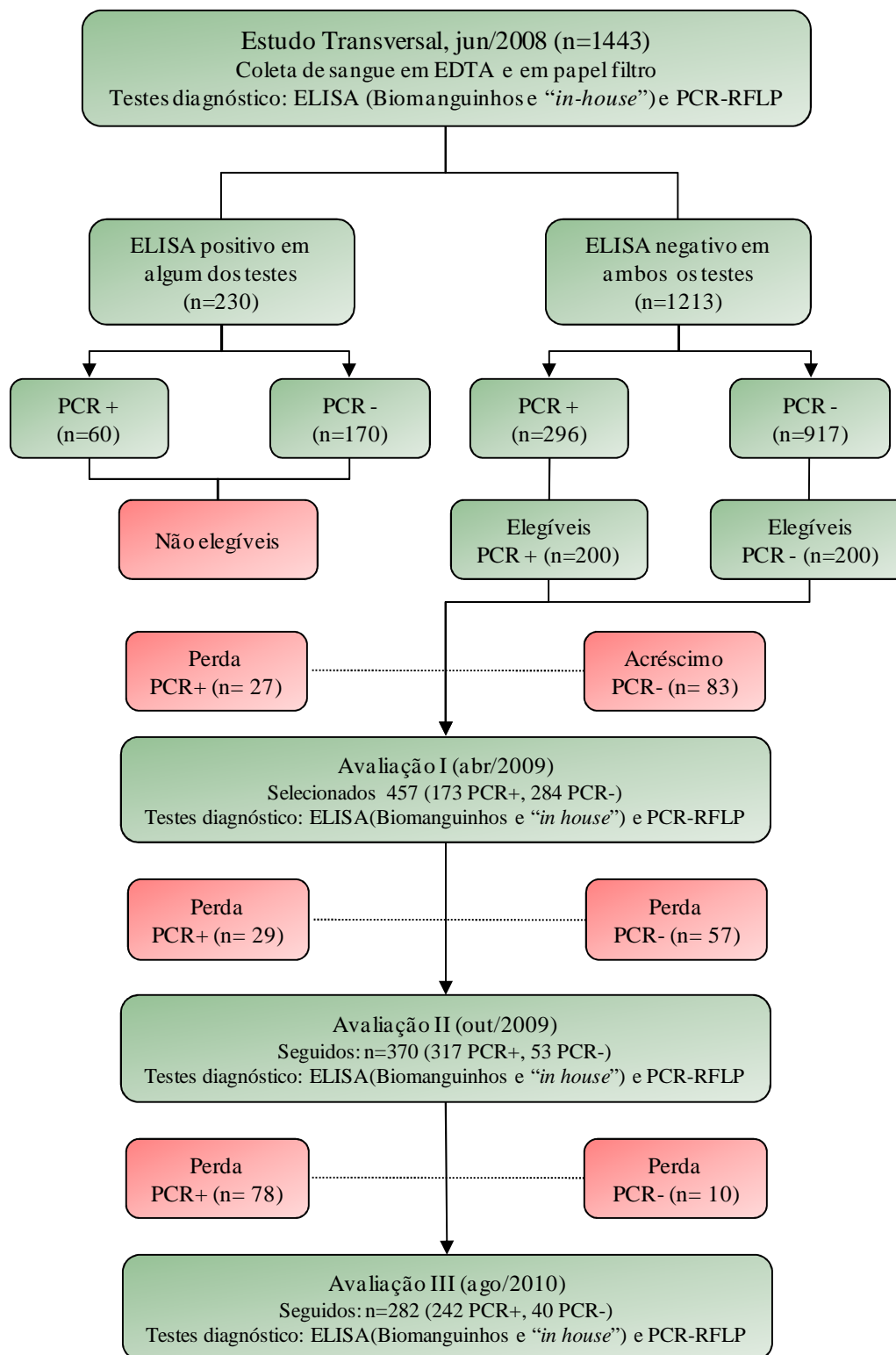


Figura 7: Delineamento de todo o estudo (transversal e coorte).

6.1.2.1 Resultados sorológicos e molecular

Analogamente ao estudo transversal, foram realizados os testes sorológicos e moleculares em todas coletas da coorte. Dentre os 457 animais da primeira coorte, 21 (4,6%) e 34 (7,6%) foram soropositivos na reação de ELISA do LPC e LZOON respectivamente. Dez dos animais avaliados não tiveram a sorologia realizada pelo LZOON. Através da PCR-RFLP foi observado que 182 (39,8%) animais apresentaram resultado molecular positivo para *L. infantum*.

Na segunda coleta, foram avaliados 370 animais sendo 23 (6,2%) e 22 (5,9%) soropositivos no LPC e LZOON respectivamente, e pela PCR-RFLP 317 (85,7%) cães foram positivos para *L. infantum*. Na terceira coleta, dos 282 animais avaliados, 78 (27,7%) e 29 (10,3%) soropositivos por ELISA nos laboratórios LPC e LZOON respectivamente. Pela técnica molecular, 242 (85,8%) cães apresentaram resultado positivo para *L. infantum*.

6.1.2.2 Reprodutibilidade dos métodos sorológicos e molecular

Durante todas coletas foi testado, no LPC, a reprodutibilidade da sorologia (ELISA) e da PCR em aproximadamente 10% das amostras. Foi observado na sorologia da primeira coleta da coorte, em um total de 45 amostras, excelente concordância ($Kappa = 1,0$); na segunda coorte, em 40 amostras testadas, observou-se fraca concordância ($Kappa = 0,38$) e na terceira coleta, ao testar 38 amostras, observou-se boa concordância ($Kappa = 0,73$) (Tabela 10).

Tabela 10: Reprodutibilidade da sorologia (ELISA) realizada no LPC durante a coorte.

		ELISA/LPC		total	Kappa (IC95%)
		Positivo (%)	Negativo (%)		
ELISA/LPC Coorte I	positivo	3 (100)	0 (0)	3	1,00 (0,71 - 1,29)
	negativo	0 (0)	42 (100)	42	
	total	3	42	45	
ELISA/LPC Coorte II	positivo	1 (25)	0 (0)	1	0,38 (0,13 - 0,62)
	negativo	3 (75)	36 (100)	39	
	total	4	36	40	
ELISA/LPC Coorte III	positivo	8 (100)	4 (13)	12	0,73 (0,43 - 1,04)
	negativo	0 (0)	26 (87)	26	
	total	8	30	38	

Para fins de análise da reprodutibilidade da PCR na primeira coleta da coorte, foi realizada uma segunda extração de maneira aleatória em 54 amostras (11,8%). Além de testar a reprodutibilidade com a mesma amostra, extraída em duplicata, foi também realizada aleatoriamente, duplicatas de 67 amostras (14,7%). Após a análise dos resultados, foi observada uma fraca concordância entre as replicatas ($Kappa = 0,28$) e moderada ($Kappa = 0,49$) entre a duplicatas (dados não mostrados). Durante as outras coletas da coorte, também foi testada a reprodutibilidade observando fraca concordância ($Kappa = 0,27$) e ausência de concordância ($Kappa = 0,09$) na segunda e terceira coletas respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11: Reprodutibilidade da PCR durante todas as etapas da coorte.

		PCR		total	Kappa (IC95%)
		Positivo (%)	Negativo (%)		
PCR Coorte I	positivo	9 (56,3)	10 (26,3)	19	0,28 (0,20 - 0,55)
	negativo	7 (43,7)	28 (76,7)	35	
	total	16	38	54	
PCR Coorte II	positivo	34 (94,4)	10 (71,4)	44	0,27 (0,04 - 0,52)
	negativo	2 (5,6)	4 (28,6)	6	
	total	36	14	50	
PCR Coorte III	positivo	19 (79,2)	2 (66,7)	21	0,09 (-0,26- 0,43)
	negativo	5 (20,8)	1 (33,3)	6	
	total	24	3	27	

6.1.2.3 Concordâncias entre os métodos diagnóstico

Foi avaliada a concordância entre os testes sorológicos (ELISA) dos laboratórios LPC e LZOON e a PCR em todas as etapas da coorte. Foi observada ausência de concordância entre a PCR e a sorologia em todas as etapas da coorte, sendo este achado, independente do laboratório onde foram realizados os testes. (Tabela 12).

Tabela 12: Resultados de concordância entre a PCR e os testes sorológicos.

Etapa	Teste/ Laborat.	PCR		Total	Kappa (IC95%)	
		Positivo (%)	Negativo (%)			
Coorte I	ELISA/ LPC	Positivo	11 (6,0)	10 (3,7)	21	0,03 (- 0,02 - 0,07)
		Negativo	171 (94,0)	265 (96,3)	436	
		Total	182	275	457	
	ELISA/ LZOON	Positivo	14 (7,8)	20 (7,6)	34	0,00 (-0,06 - 0,07)
		Negativo	166 (92,2)	247 (92,4)	413	
		Total	180	267	447	
Coorte II	ELISA/ LPC	Positivo	21 (6,7)	2 (3,8)	23	0,00 (-0,01- 0,03)
		Negativo	295 (93,3)	51 (96,2)	346	
		Total	316	53	369	
	ELISA/ LZOON	Positivo	17 (5,4)	5 (9,8)	22	-0,01 (-0,03- 0,01)
		Negativo	299 (94,6)	47 (90,2)	346	
		Total	316	52	368	
Coorte III	ELISA/ LPC	Positivo	68 (28,1)	10 (25,0)	78	0,01(-0,04 - 0,07)
		Negativo	174 (71,9)	30 (75,0)	204	
		Total	242	40	282	
	ELISA/ LZOON	Positivo	24 (9,9%)	5 (12,5%)	29	-0,01(-0,04 - 0,02)
		Negativo	218 (90,1%)	35 (87,5%)	253	
		Total	242	40	282	

6.1.2.4 Índices de incidência

6.1.2.4.1 Incidência de infecção

Avaliando os 284 cães PCR negativos selecionados para compor a coorte, foi estimada a incidência de infecção por *L. infantum*, sendo esta de 3,06/100 cães/mês, no início do acompanhamento (0 a 14 meses). Na segunda coleta (15 a 22 meses) a incidência de infecção aumentou para 25,7/100 cães/mês, e na última coleta (24 a 27 meses) a incidência foi de 19,2/100 cães/mês. A incidência geral, observada durante o estudo, foi de 5,8/100 cães/mês. (Tabela 13).

Tabela 13: Incidência de infecção por *L. infantum* detectada pela PCR-RFLP durante a coorte.

Tempo (meses)	Tempo em risco (cão/mês)	Evento: positivar PCR	Incidência x100/mês	IC 95%
0 - 14	3557,0	109	3,1	2,5 - 3,7
15 - 22	436,0	112	25,7	21,4 - 30,9
23 - 29	67,7	13	19,2	11,2 - 33,1
Total	4060,7	234	5,8	5,1 - 6,6

Através do gráfico de Kaplan-Meier, podemos perceber que a probabilidade de o cão não se infectar após 10 meses de acompanhamento é de aproximadamente 53%. Após um período de 16 e 26 meses, dentre os animais que permanecem no estudo, apenas 5% e 1% não apresentaram infecção por *L.infantum* (Figura 8). Isso significa que em pouco mais de dois anos um animal sem infecção da regional Nordeste de Belo Horizonte tem elevada probabilidade de tornar-se infectado, de acordo com a PCR-RFLP.

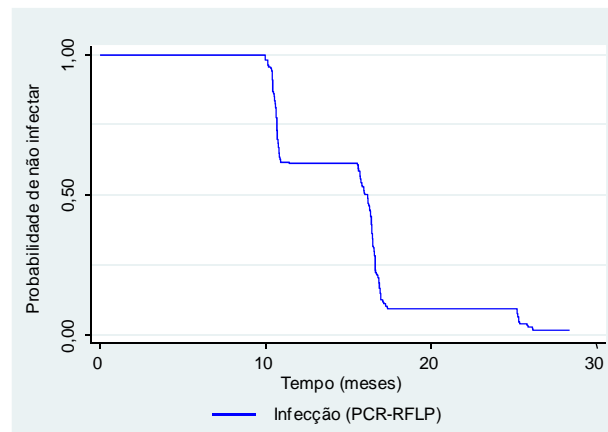


Figura 8: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier demonstrando o tempo decorrido até a infecção do cão por *L. infantum*.

Na tabela 14 estão representados os animais não infectados que compuseram a coorte, podendo-se observar que 197 (69,4%) dos animais se infetaram em algum momento da coorte e mantiveram o diagnóstico molecular positivo até o final do estudo ou até sua censura. Apenas 45 (15,9%) cães não se infectaram durante todo o estudo. Além disso, 42 (14,8%) dos cães não infectados apresentaram oscilações no resultado de PCR ao longo da coorte, sendo positivos durante uma coleta e negativos na coleta subsequente (Tabela 14).

Tabela 14: Resultados moleculares desde o tempo zero até o final do estudo nos animais que apresentaram resultado molecular negativo durante o estudo transversal. Estão representados por: (+) cães com resultado molecular positivo (-) cães com resultado molecular negativo e (x) cães censurados.

Transversal	Resultados PCR			N	%
	Coorte I	Coorte II	Coorte III		
-	+	+	+	48	16,9
-	+	+	x	24	8,5
-	+	x	x	16	5,6
-	-	+	+	77	27,1
-	-	+	x	19	6,7
-	-	-	+	13	4,6
-	-	-	-	3	1,1
-	-	-	x	3	1,1
-	-	x	x	39	13,7
-	+/-	+/-	+/- ou x	42	14,8
Total				284	100,0

Entre os animais infectados, observou-se que 59 (34,1%) deles mantiveram o diagnóstico molecular positivo até o final do estudo ou até sua censura. Interessantemente, 30 (17,4%) cães negativaram o teste molecular ao longo da coorte ou até sua censura. Além disso, 84 (48,6%) dos cães infectados apresentaram oscilações do resultado de PCR ao longo da coorte, sendo positivos durante uma coleta e negativos na coleta subsequente (tabela 15).

Tabela 15: Resultados moleculares desde o tempo zero até o final do estudo nos animais que apresentaram resultado molecular positivo durante o estudo transversal. Estão representados por: (+) cães com resultado molecular positivo (-) cães com resultado molecular negativo e (x) cães censurados.

Transversal	Resultados PCR			N	%
	Coorte I	Coorte II	Coorte III		
+	+	+	+	36	20,8
+	+	+	x	12	6,9
+	+	x	x	11	6,4
+	+	+	-	4	2,3
+	+	-	-	1	0,6
+	+	-	x	2	1,2
+	-	-	-	1	0,6
+	-	-	x	4	2,3
+	-	x	x	18	10,4
+	+/-	+/-	+/- ou x	84	48,6
Total				173	100,0

6.1.2.4.2 Incidência de soroconversão

Foi avaliada a incidência de soroconversão no grupo PCR⁺ e os resultados obtidos em cada momento da coorte estão apresentados na tabela 16. O parâmetro para soroconversão foi algum dos testes de ELISA (LPC e/ou LZOON) apresentar resultado reativo. Foi observado que a incidência de soroconversão aumenta no decorrer do estudo, sendo esta de 0,7/100 cães/mês na primeira coleta (0 - 14 meses) e 0,9/100 cães/mês e 4,4 cães/mês na segunda e terceira coleta respectivamente (Tabela 16). Torna-se importante ressaltar que os animais incluídos no grupo PCR⁺ são aqueles que apresentaram resultado molecular positivo durante o estudo transversal. Desta forma, não entraram para a análise de incidência os cães PCR negativo que positivaram o teste molecular e posteriormente soroconverteram.

Tabela 16: Incidência de soroconversão no grupo PCR⁺

	Tempo (meses)	Tempo em risco (cão/mês)	Evento: soroconversão	Incidência x100/mês	IC 95%
PCR ⁺	0 - 14	2345,8	17	0,7	0,5 - 1,2
	15 - 22	999,2	9	0,9	0,5 - 1,7
	23 - 29	497,5	22	4,4	2,9 - 6,7
	Total	3842,5	48	1,2	0,9 - 1,7

Ao sobrepor as probabilidades de infecção (PCR-RFLP) e soroconversão, percebe-se que os animais soronegativo/PCR⁻, positivam rapidamente no teste molecular (linha azul) e a soroconversão ocorre mais lentamente (linha vermelha). Este fato pode ser observado na figura 9, demonstrando que o animal inicialmente positiva a PCR e posteriormente soroconverte.

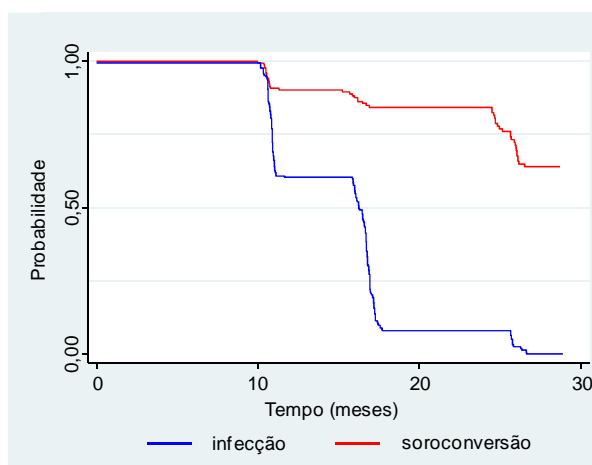


Figura 9: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier demonstrando a probabilidade de infecção (PCR-RFPL) e de soroconversão em cães PCR⁺

6.2 Entrevistas e análises dos fatores de risco (Bloco II)

6.2.1 Estudo Transversal

6.2.1.1 Entrevistas com os proprietários

Durante o estudo transversal, foram entrevistados 918 proprietários de 1443 cães. Nas entrevistas foram abordados os seguintes assuntos: conhecimento sobre a leishmaniose (doença, vetor e hospedeiro), condições socioeconômicas, domicílio e peridomicílio. Foi observado que a maioria das pessoas (98,4%) já ouviu falar da leishmaniose, sendo que 59,0% afirmam ser a transmissão por um inseto vetor. Entre os entrevistados, 99,7% e 99,0% não tiveram leishmaniose nem casos da doença na família, respectivamente. Observou-se que apenas 21,9% dos indivíduos conhecem os sinais clínicos da LV sendo os mais conhecidos febre (65,2%), dor no corpo (36,8%), emagrecimento (21,4%) e fraqueza (18,4%) (Tabela 17).

Tabela 17: Distribuição de frequências das variáveis relacionadas ao conhecimento do proprietário sobre a leishmaniose humana, Belo Horizonte, 2008

Variáveis*	N	%
Já ouviu falar da leishmaniose		
sim	903	98,4
não	15	1,6
Conhece a forma de transmissão		
flebotomíneo	533	59,0
não conhece	305	33,8
contato com o cão	42	4,7
urina de rato	13	1,4
mordida do cão	7	0,8
outros	3	0,3
Já teve leishmaniose		
não	914	99,7
sim	3	0,3
Alguém da família		
não	906	99,0
sim	9	1,0
Conhece os sintomas no homem		
não	716	78,1
sim	201	21,9
Quais sintomas são conhecidos		
febre	131	65,2
dor no corpo	74	36,8
fraqueza	43	21,4
feridas	37	18,4
emagrecimento	33	16,4
hepatoesplenomegalia	30	14,9
mal estar	24	11,9
falta de apetite	18	9,0
cansaço	15	7,5
anemia	12	6,0
diarréia	9	4,5
dangramento	7	3,5
sono	2	1,0
tosse	1	0,5
prisão de ventre	1	0,5
outros	13	6,5

* excluindo “Não Respondeu”

Foi observado que a maioria das pessoas não conhece o vetor da leishmaniose (88,8%). Dos 11,2% que afirmam conhecê-lo, 92,2% foram capazes de distingui-lo do *Aedes*, quando ambos foram mostrados ao entrevistado. Quando os entrevistadores mostravam o flebotomíneo aos entrevistados, 96,0% responderam nunca terem visto o

inseto na residência e entre os que viram, relatam como locais de maior ocorrência do vetor o quintal (48,6%) e dentro de casa (37,8%). Foi observado também que a maioria das pessoas não sabe como ocorre a picada do flebótomo (83,3%) (Tabela 18).

Tabela 18: Distribuição de frequências das variáveis relacionadas ao conhecimento do proprietário sobre o vetor da leishmaniose, Belo Horizonte 2008

Variáveis*	N	%
Conhece o vetor da leishmaniose		
não	815	88,8
sim	103	11,2
Confirma conhecer ao ver o vetor		
sim	95	92,2
não	8	7,8
Você já viu o flebotomo na residência?		
não	881	96,0
sim	37	4,0
Em qual local		
quintal	18	48,6
dentro de casa	14	37,8
outros	7	18,9
galinheiro	1	2,7
Sabe como é a picada		
não	195	83,3
sim	39	16,7

* excluindo “Não Respondeu”

Na Tabela 19 são apresentadas as variáveis relacionadas ao conhecimento do proprietário quanto ao reservatório doméstico (cão). Foi observado que 35,7% dos entrevistados sabem da importância do cão na LV e aproximadamente a metade da população (45,4%) conhece os sinais clínicos da LVC, sendo os mais conhecidos: onicogribose (47,2%), feridas pelo corpo (44,4%), perda de apetite (37,9%) e peladeira (33,3%). Ao avaliar as proximidades da residência, observou-se que há grande frequência de casos de LVC em regiões circunvizinhas (50,5%). Foi observado também que a prefeitura já havia realizado o exame para leishmaniose em 78,1% das residências avaliadas. A maior parte dos entrevistados não teve cão com LVC (77,2%) e, na maioria daqueles que tiveram, esta ocorrência situa-se em anos anteriores a 2008, tendo sido 77,0% dos cães sacrificados e 17,7% tratados. A maioria da população respondeu que permitiria a eutanásia do cão caso o mesmo estivesse com LVC e destes, 59,1% realizariam o procedimento através do CCZ/PBH e 16,0% em clínicas veterinárias particulares (Tabela 19).

Tabela 19: Distribuição de frequências das variáveis relacionadas ao conhecimento do proprietário quanto ao hospedeiro da leishmaniose, Belo Horizonte, 2008

Variáveis*	N	%
Sabe a importância do cão na doença		
não	590	64,3
sim	328	35,7
Conhece os sinais clínicos da LVC		
não	501	54,6
sim	417	45,4
Sinais clínicos conhecidos		
onicogrifose	197	47,2
feridas	185	44,4
perda de apetite	158	37,9
peladeira	139	33,3
desânimo	118	28,3
emagrecimento	65	15,6
paralisia dos membros	39	9,4
vômito	33	7,9
pelo opaco	24	5,8
diarréia	24	5,8
opacificação da córnea	23	5,5
coriza	14	3,4
hepatoesplenomegalia	9	2,2
edema dos membros	7	1,7
defeca sangue	7	1,7
Houve casos de LVC na vizinhança		
não	463	50,5
sim	455	49,5
A PBH já fez exame de seus cães?		
sim	708	78,1
não	199	21,9
Já teve algum cão com LVC		
não	708	77,2
sim	209	22,8
Quando		
anos anteriores	193	92,3
este ano	16	7,7
O que você fez?		
sacrificou	162	77,0
tratou	37	17,7
não sacrificou nem tratou	10	5,3
Caso este cão esteja com LVC o que fará		
entregará à prefeitura	541	59,1
sacrificará em clínica veterinária	146	16,0
tratará	107	11,7
tem dúvida	57	6,2
outros	57	6,2
não entregará à prefeitura	5	0,6
mandará o animal para outro local	2	0,2

* excluindo “Não Respondeu”

Com relação às condições socioeconômicas, observou-se que o responsável pela família, na maioria da população (67,5%), recebe entre um e três salários mínimos. Quanto à renda familiar 62,5% recebem acima de três salários mínimos. Torna-se importante ressaltar que 25,1% e 25,3% dos entrevistados não responderam sobre renda do responsável e familiar, respectivamente. Observou-se também que 41,1% dos responsáveis pela residência possuem segundo grau completo (Tabela 20).

Quanto às condições de moradia, observou-se que a maioria da população reside em casas independentes (61,3%) e as características predominantes dos imóveis foram: paredes rebocadas (95,7%), telhado com laje e telha (59,9%), piso de cerâmica ou madeira (82,6%), banheiro completo (99,2%) e esgoto ligado à rede da prefeitura (99,8%). As residências avaliadas possuem em média 7,2 (DP: 2,8) cômodos/imóvel; 2,7 (DP: 1,0) quartos/imóvel; 3,8 (DP:1,8) pessoas/imóvel e 1,6 (DP: 0,9) pessoas/quarto (Tabela 20).

A maioria das casas (82,1%) possui quintal, sendo 81,4% cimentado, além disso, em 51,0% e 39,9% das residências há canteiro e árvores no quintal respectivamente. Observou-se que mais da metade (69,5%) das casas avaliadas já foram dedetizadas pela prefeitura.

Os animais mais frequentemente presentes no domicílio, são os pássaros (18,9%). Quanto ao peridomicílio, foi observado que 94,2% dos imóveis têm o lixo recolhido pelo serviço municipal, sendo este serviço realizado três ou mais vezes por semana. Além disso, 69,0% dos domicílios apresentaram, em sua vizinhança, casas com quintal (Tabela 21).

Tabela 20: Distribuição de frequências das variáveis relacionadas às condições socioeconômicas e escolaridade, Belo Horizonte, 2008.

Variáveis*	N	%
Renda do responsável		
> 3 salários	197	29,2
de 1 a 3	454	67,5
< 1 salário	22	3,3
Renda Familiar		
> 3 salários	416	62,5
de 1 a 3	242	36,3
< 1 salário	8	1,2
Escolaridade do responsável		
3º grau	224	23,5
2º grau	393	41,1
1º grau	331	34,7
Analfabeto	7	0,7
Tipo de moradia		
casa independente	563	61,3
núcleo familiar	226	24,6
apartamento	78	8,5
casa geminada	24	2,6
outro	18	2,0
comércio	9	1,0
Paredes com reboco		
sim	873	95,7
não	39	4,3
Telhado		
laje com telha	548	59,9
laje ou tenha	367	40,1
Piso		
cerâmica/ madeira	755	82,6
outros	159	17,4
Banheiro		
completo (vaso, chuveiro)	907	99,2
incompleto	7	0,8
Como é a rede de esgoto		
ligado a rede da prefeitura	909	99,8
ligado à fossa	1	0,1
ligado ao córrego	1	0,1
Número de cômodos		7,2 ± 2,8
Número de quartos		2,7 ± 1,0
Número de pessoas residem		3,8 ± 1,8
Número de pessoas por quarto		1,6 ± 0,9

*Retirados “Não Respondeu”

Tabela 21: Distribuição de frequências das variáveis relacionadas ao peridomicílio.

Variáveis*	N	%
Há quintal na residência		
sim	754	82,1
não	164	17,0
Como é o quintal		
cimentado	614	81,4
terra	140	18,6
Há no quintal/residência		
canteiro de plantas ou horta	468	51,0
árvores	366	39,9
entulhos (madeira, telhas, tijolos)	177	19,3
monte de folhas, frutos e troncos	87	9,5
bananeiras	62	6,8
lixo exposto	58	6,3
esterco	23	2,5
A residência já foi dedetizada?		
sim	627	69,5
não	275	30,5
Quais animais há na residência		
passarinhos	173	18,9
outros	58	6,3
galinhas	56	6,1
gatos	46	5,0
porcos	1	0,1
Destino do Lixo		
recolhido pelo serviço municipal	909	99,0
coloca na caçamba	3	0,4
joga perto de casa	3	0,4
enterra / queima	2	0,2
Quantas vezes é recolhido por semana		
≥ 3 vezes	860	94,2
< 3 vezes	53	5,8
Vizinhança		
casas com quintal	633	69,0
casas	212	23,1
outros	47	5,1
terreno baldio	24	2,6
vegetação natural	2	0,2

*Retirados “Não Respondeu”

6.2.1.2 Ficha dos cães

Simultaneamente à entrevista foram coletadas informações sobre 1443 cães de 47 raças distintas, dentre eles, 45,3% sem raça definida (SRD). Na ficha do cão foram obtidas informações sobre as características do animal, seu comportamento, cuidados do proprietário e possíveis sinais clínicos sugestivos de LVC.

A idade média dos cães avaliados foi de 3,6 anos (DP: 2,4). Dos animais avaliados, 54,1% são fêmeas de porte médio (52,0%) e pelo curto (55,1%). A maior parte dos proprietários (52,0%) adquiriu seu animal em outro bairro ou cidade. Em relação ao comportamento dos cães, 83,1% permanecem a maior parte do tempo no quintal, inclusive pernoitando no local (77,3%) e 90,7% não fogem para a rua (Tabela 22).

Foi observado que 58,9% da população tem o hábito de levar o cão ao veterinário. A maioria dos animais (74,8%) já havia sido submetido a outro exame para LVC, realizado principalmente pela prefeitura (88,7%) com resultados negativos, na sua maioria (99,3%). Quanto à vacinação para leishmaniose empregando as duas vacinas comercialmente disponíveis em clínicas veterinárias (Leishmune ou Leish-Tec), 96,6% dos cães não foram vacinados e 99,6% não receberam ou recebem tratamento para a doença (Tabela 22).

Sobre a sintomatologia, 46 (3,2%) animais apresentaram sinais sugestivos de LVC, sendo os mais frequentes: onicogrifose (41,3%), emagrecimento (37,0%) e opacificação da córnea (28,3%) (Tabela 23).

Tabela 22: Características, comportamento dos animais e os cuidados do proprietário, Belo Horizonte, 2008.

Variáveis	N	%
Sexo		
fêmea	780	54,1
macho	663	45,9
Porte		
pequeno	375	26,0
médio	751	52,0
grande	317	22,0
Pelo		
curto	795	55,1
longo	648	44,9
Adquirido		
bairro atual	715	52,0
outro bairro	661	48,0
Fica maioria do tempo		
no quintal	1145	83,1
dentro de casa	232	16,9
Dorme		
no quintal	1064	77,3
dentro de casa	313	22,7
O cão foge de casa		
não	1267	77,3
sim	130	22,7
É levado ao veterinário		
sim	809	58,9
não	564	41,1
Fez exame para LVC		
sim	1004	74,8
não	339	25,2
Resultado		
negativo	991	99,3
positivo	7	0,7
Laboratório		
prefeitura	902	88,7
ambos	60	5,9
particular	55	5,4
Vacinado para LVC		
não	1292	96,6
sim	46	3,4
Tratamento para LVC		
não	1384	99,6
sim	5	0,4

Tabela 23: Sinais clínicos sugestivos de LVC encontrados nos animais dos quais foram coletadas amostras biológicas durante o estudo transversal, Belo Horizonte, 2008.

Variável	N	%
Sintomático		
não	1395	96,8
sim	46	3,2
Sinais clínicos		
onicogrifose	19	41,3
emagrecimento	17	37,0
ferimentos	17	37,0
opacificação da córnea	13	28,3
apatia	11	23,9
perda de pelo	11	23,9
pelagem opaca	7	15,2
perda do apetite	5	10,9
paralisia dos membros	4	8,7
coriza	2	4,3
edema dos membros inferiores	2	4,3
vômito	2	4,3
diarréia	2	4,3

6.2.1.3 Análise dos fatores de risco para infecção canina

Para a identificação dos fatores de risco relacionados à infecção por *L. infantum* foram avaliados somente os cães que apresentaram sorologia negativa nos dois laboratórios (n=1213). Destes, 296 (24,4%) foram PCR-RFLP positivo para *L. infantum* e 917 (75,6%) negativos.

A análise univariada foi realizada comparando animais infectados (296) e não infectados (917), sendo empregada a regressão logística de efeito misto. As variáveis utilizadas foram coletadas na entrevista e registradas na ficha do cão. Foram selecionadas inicialmente as que tiveram nível de significância ($p < 0,25$) e incluídas em um modelo logístico de efeito misto intermediário, por grupo de variáveis. As Tabelas 24 e 25 apresentam somente as variáveis que apresentaram nível de significância $p < 0,25$ e aquelas consideradas importantes na transmissão da LVC. Não foram incluídas no modelo as variáveis relacionadas ao conhecimento do proprietário sobre a doença humana e canina.

Tabela 24: Distribuição das variáveis relacionadas à características socioeconômicas, domicílio, peridomicílio, conhecimento sobre o vetor e LVC.

Grupo/variável	PCR-RFLP		Univariada OR (IC95%)	P
	Positivo (%)	Negativo (%)		
Condições socioeconômicas				
Renda responsável				
> 3 salários	44 (31,9)	132 (28,7)		
de 1 a 3	88 (63,8)	313 (68,0)	1,0 (0,6-1,5)	0,90
< 1 salário	6 (4,3)	15 (3,3)	1,8 (0,7-4,6)	0,20
Renda familiar				
> 3 salários	75 (54,8)	293 (64,3)		
de 1 a 3	58 (42,3)	159 (35,0)	1,4 (1,0-2,1)	0,07
< 1 salário	4 (2,9)	3 (0,7)	4,4 (1,0-18,3)	0,04
Escolaridade				
3º grau	49 (24,5)	134 (21,2)		
2º grau	70 (35,0)	278 (44,0)	0,6 (0,4-0,9)	0,03
1º grau	78 (39,0)	217 (34,3)	0,9 (0,6-1,4)	0,71
analfabeto	3 (1,5)	3 (0,5)	4,5 (0,8-25,9)	0,09
Domicílio e Peridomicílio				
Parede com reboco				
sim	174 (95,6)	594 (96,1)		
não	8 (4,4)	24 (3,9)	1,8 (0,9-3,9)	0,12
Piso				
cerâmica/ madeira	144 (78,3)	521 (84,3)		
outros	40 (21,7)	97 (15,7)	1,4 (1,0-2,2)	0,07
Residência dedetizada				
sim	134 (73,6)	425 (69,7)		
não	48 (26,4)	185 (30,3)	1,4 (0,9-2,0)	0,10
Entulho no quintal				
sim	39 (21,2)	123 (19,8)		
não	145 (78,8)	497 (80,2)	1,3 (0,9-1,9)	0,20
Vizinhança				
casas	51 (27,7)	131 (21,1)		
casas com quintal	118 (64,1)	439 (70,8)	0,6 (0,4-0,9)	0,02
vegetação	15 (8,2)	50 (8,1)	0,6 (0,3-1,2)	0,14
Conhecimento sobre vetor e LVC				
Conhece o vetor				
sim	24 (13,0)	68 (11,0)		
não	160 (87,0)	552 (89,0)	1,4 (0,9-2,2)	0,18
Sabe porque o cão doente é recolhido				
sim	150 (81,5)	462 (74,4)		
não	34 (18,5)	159 (25,6)	1,6 (1,0-2,4)	0,03
Fez exame dos cães				
sim	132 (72,1)	488 (80,0)		
não	51 (27,9)	122 (20,0)	0,7 (0,5-1,1)	0,11

Tabela 25: Distribuição das variáveis relacionadas com às características dos cães, selecionadas na análise univariada.

Característica dos cães avaliados	PCR-RFLP		Univariada OR (IC95%)	P
	Positivo (%)	Negativo (%)		
Sexo				
macho	140 (47,3)	422 (46,0)		
fêmea	156 (52,7)	495 (54,0)	1,0 (0,8-1,4)	0,80
Porte				
pequeno	81 (27,3)	245 (26,7)		
médio	159 (53,7)	475 (51,8)	1,0 (0,7-1,4)	0,98
grande	56 (19,0)	197 (21,5)	0,8 (0,5-1,3)	0,44
Pelo				
curto	173 (58,5)	491 (53,5)		
longo	123 (41,5)	426 (46,5)	1,2 (0,9-1,7)	0,17
É levado ao veterinário				
sim	151 (55,3)	527 (59,4)		
não	122 (44,7)	360 (40,6)	0,8 (0,6-1,1)	0,25
Vacinado para LVC				
sim	11 (4,3)	29 (3,3)		
não	248 (95,7)	840 (96,7)	1,3 (0,6-3,1)	0,50
Sintomático				
sim	4 (1,4)	25 (2,7)		
não	292 (98,6)	890 (97,3)	0,4 (0,1-1,5)	0,20
Adquirido				
bairro atual	154 (56,2)	459 (51,6)		
outro bairro	120 (43,8)	431 (48,4)	0,8 (0,6-1,1)	0,16
Fica maioria do tempo				
dentro de casa	36 (13,1)	153 (17,2)		
no quintal	238 (86,9)	737 (82,8)	1,4 (0,9-2,3)	0,10
Dorme				
dentro de casa	51 (18,6)	208 (23,4)		
no quintal	223 (81,4)	682 (76,6)	1,4 (1,0-2,1)	0,08
Fez exame para LVC				
sim	183 (68,8)	662 (76,1)		
não	83 (31,2)	208 (23,9)	1,5 (1,1-2,2)	0,02

6.2.1.4 Análise multivariada e modelo final

A partir das análises por grupo de variáveis, aquelas que apresentaram nível de significância menor que 0,15 foram selecionadas para o modelo final, sendo elas: renda familiar (< 1 salário; versus 1 a 3 salários; > 3 salários); residência ter sido dedetizada (sim versus não); piso da residência (cerâmica/madeira versus outros); vizinhança (casas versus casas com quintal; terrenos/vegetação); conhecer o vetor (sim versus não); conhecer a picada do vetor (sim versus não); onde o cão foi adquirido (bairro atual versus outro bairro); local que o cão permanece mais tempo (quintal versus dentro de casa) e o cão ter realizado exame para leishmaniose anteriormente (não versus sim).

O modelo final para o critério de infecção por *L.infantum* foi (i) renda familiar menor que um salário mínimo (OR: 4,1; IC95% 1,0-17,5); (ii) proprietário ter visto o vetor (OR: 1,9; IC95% 1,1-3,4); (iii) maior tempo de permanência do cão no quintal (OR: 2,3; IC95% 1,2-4,4) e (iv) cão não ter realizado exame para leishmaniose anteriormente (OR: 1,6; IC95% 1,0-2,4) (Tabela 26). Por ter ocorrido muitas "não resposta" na variável "renda familiar", ao incluí-la no modelo, houve uma redução do número de proprietários e animais avaliados. Com a variável incluída, foram analisados 578 proprietários e 844 animais e ao remover a variável foram avaliados 782 proprietários e 1134 animais.

Tabela 26: Fatores de risco de infecção canina por *Leishmania infantum* de acordo com o modelo final.

Variável	Odds Relativa Bruta (IC 95%)	Odds Relativa Ajustada (IC 95%)
Renda familiar (< 1 salário versus > 3 salários)	4,3 (1,0-18,0)	4,1 (1,0-17,5)
Conhecer o vetor (sim versus não)	1,4 (0,9-2,2)	1,9 (1,1-3,4)
Local que o cão permanece mais tempo (quintal versus dentro de casa)	1,4 (0,9-2,3)	2,3 (1,2-4,4)
Cão ter realizado exame para LVC (não versus sim)	1,5 (1,1-2,2)	1,6 (1,0-2,4)

6.2.2 Estudo de Coorte

6.2.2.1 Característica dos cães que compõe a coorte

Nesta etapa do trabalho, foi novamente preenchida a ficha do cão abordando detalhes sobre os cuidados do proprietário com o animal e possíveis sinais clínicos de LVC. Os animais selecionados (457 cães) são de 24 raças, sendo que 52,3% destes sem raça definida e 18,6% poodles (dados não mostrados). A maioria dos cães da coorte são fêmeas (52,9%) de porte médio (52,7%) e pelo curto (58%). Com relação ao exame para leishmaniose, 95,4% dos cães não realizaram outro teste antes de nosso retorno. Foi observado que 98,9% dos cães avaliados não foram vacinados para leishmaniose e nenhum recebeu ou recebe tratamento para a doença (Tabela 27).

Tabela 27: Características dos animais em acompanhamento no estudo de coorte, Belo Horizonte, 2009

Variáveis	N	%
Sexo		
fêmea	242	52,9
macho	215	47,1
Porte		
pequeno	122	26,7
médio	241	52,7
grande	94	20,6
Pelo		
curto	265	58,0
longo	192	42,0
Fez outro exame para LVC antes do retorno		
não	433	95,4
sim	21	4,6
Resultado		
negativo	21	100
Laboratório		
particular	14	66,7
prefeitura	7	33,3
Vacinado para LVC		
não	448	98,9
sim	5	1,1

6.2.2.2 Análise de sobrevida

Com o objetivo de analisar os dados, considerando o tempo desde a ocorrência da infecção até a soroconversão, foi utilizado o modelo de Cox. Foram propostos dois modelos: o primeiro com o grupo dos animais que apresentaram reação sorológica e molecular (PCR) negativa durante o estudo transversal sendo considerado como evento a positividade da PCR-RFLP em alguma das três coletas da coorte; o segundo modelo incluiu os animais PCR⁺ sendo a soroconversão, o evento considerado.

Inicialmente fez-se uma análise univariada através do teste de Kaplan-Meier e a igualdade das funções de sobrevida foi testada pelo teste de Log-rank. Variáveis com valores de p inferiores a 0,25 no teste de Log-rank foram selecionadas para um modelo intermediário. Através do modelo de Cox, foi construído um modelo intermediário, por grupo de variáveis, onde aquelas que apresentavam valores de p inferiores a 0,15 mantiveram-se no modelo. Estas variáveis selecionadas no modelo intermediário foram novamente analisadas e as que apresentaram valores de p inferiores a 0,05 compuseram o modelo final.

6.2.2.3 Análise de sobrevida para infecção por *L. infantum*

Para investigar o risco de infecção pelo modelo de Cox, foram analisados 284 cães que apresentaram resultados negativos na sorologia e na PCR, durante o estudo transversal. O evento avaliado, nestes animais, foi a infecção por *L. infantum*, detectada pela PCR-RFLP. As variáveis selecionadas na análise univariada de Kaplan-Meier, bem como a razão de risco, intervalo de confiança, o número de eventos e cães avaliados, além do tempo de risco, incidência cão/mês e valor de p para cada variável, encontram-se na Tabela 28.

Tabela 28: Análise univariada de Kaplan-Meier verificando o risco de infecção no tempo.

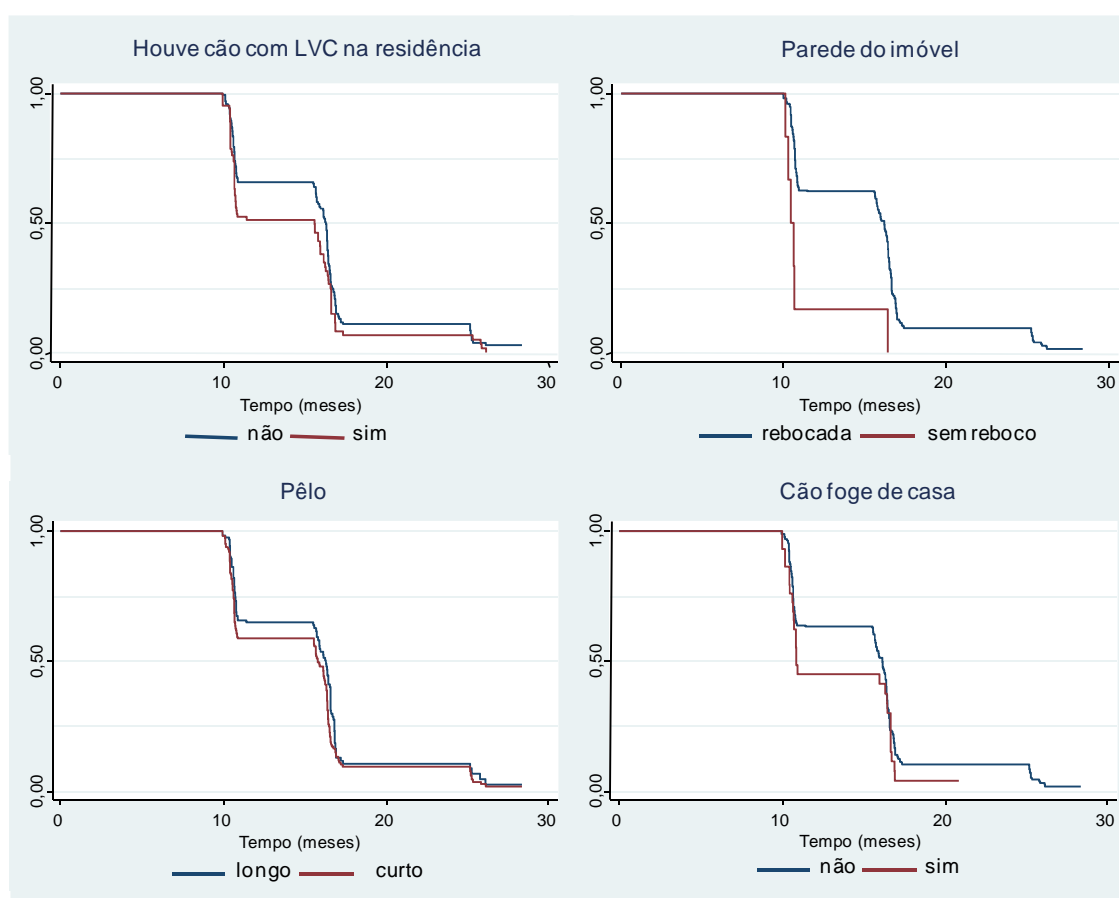
Variáveis	Razão de riscos	IC 95%	n° eventos	n° cães avaliados	Tempo em risco	Incid./100 cão/mês	p
Vetor e reservatório							
Viu o vetor							
não	1		220	268	3852,46	5,7	
sim	1,41	0,85 - 2,55	14	15	208,23	6,7	0,16
Teve cão com LVC							
não	1		162	199	2921,16	5,5	
sim	1,38	1,04 - 1,82	72	84	1139,54	6,3	0,02
Domicílio e Peridomicílio							
Parede							
com reboco	1		228	277	3991,97	5,7	
sem reboco	3,38	1,50 - 7,67	6	6	68,73	8,7	0,00
Lixo recolhido							
3x ou mais	1		216	258	3676,99	5,8	
menos que 3x	0,64	0,38 - 1,09	15	22	339,80	4,4	0,10
Porco no quintal							
não	1		233	282	4050,05	5,7	
sim	4,07	0,56 - 29,40	1	1	10,64	9,4	0,16
Árvores							
não	1		122	153	2241,75	5,4	
sim	1,19	0,92 - 1,54	112	130	1818	6,1	0,17
Característica do cão							
Pelo							
longo	1		95	122	1757,55	5,4	
curto	1,24	0,96 - 1,62	140	162	2313,26	6,1	0,10
Fica maior parte do tempo							
dentro de casa	1		27	35	540,13	5,0	
quintal	1,40	0,93 - 2,08	207	248	3520,46	5,9	0,10
Foge							
não	1		207	254	3677,16	5,6	
sim	1,38	0,92 - 2,07	27	29	383,54	7,0	0,11
Exame prévio de LVC							
sim	1		179	218	3159,77	5,6	
não	1,41	1,03 - 1,95	48	55	748,07	6,4	0,03

Após a análise univariada de Kaplan-Meier e a multivariada intermediária de Cox, foi obtido o modelo final, demonstrando os fatores de risco para infecção canina por *L. infantum* ao longo do tempo. Constituem fatores de risco: ter ocorrido caso de LVC na residência (HR: 1,44; IC95% 1,09 - 1,92), parede do imóvel não ser rebocada (HR: 3,47; IC95% 1,53 - 7,87), cão ser de pelo curto (HR: 1,33; IC95% 1,01 - 1,74) e o animal fugir do domicílio (HR: 1,56; IC95% 1,03 - 2,36) (Tabela 29 e Figura 10).

Para testar a adequação do modelo foi realizado o teste de proporcionalidade dos riscos, onde se constatou que não houve rejeição da suposição de riscos proporcionais, constatando que todas as variáveis poderiam ser mantidas no modelo final.

Tabela 29: Modelo final de Cox para fatores de risco da infecção canina.

Variável	Razão de risco bruta (IC 95%)	Razão de risco ajustado (IC 95%)
Já houve caso de LVC na residência (sim versus não)	1,38 (1,04 - 1,82)	1,44 (1,09 - 1,92)
Parede (sem reboco versus com reboco)	3,38 (1,50 - 7,67)	3,47 (1,53 - 7,87)
Pêlo (curto versus longo)	1,24 (0,96 - 1,62)	1,33 (1,01 - 1,74)
O cão foge (sim versus não)	1,38 (0,92 - 2,07)	1,56 (1,03 - 2,36)

**Figura 10:** Gráficos de Kaplan-Meier das variáveis que compõe o modelo final de Cox para infecção canina.

6.2.2.4 Análise de sobrevida para soroconversão

Para avaliar os fatores de risco relacionados à soroconversão durante a coorte, foram analisados 173 cães soronegativo/PCR⁺ no estudo transversal. O evento avaliado foi a soroconversão em algum ou ambos laboratórios (LPC e/ou LZOON). A tabela 30 demonstra as variáveis selecionadas na análise univariada de Kaplan-Meier, bem como a razão de risco, intervalo de confiança, número de eventos e cães avaliados, além do tempo de risco, incidência cão/mês e valor de p para cada variável.

Tabela 30: Análise univariada de Kaplan-Meier em cães PCR⁺ verificando as variáveis que constituem fatores de risco para soroconversão.

Variáveis	Razão de riscos	IC 95%	n° eventos	n° cães avaliados	Tempo em risco	Incidênc./100 cão-mês	p
Escolaridade, Domicílio e peridomicílio							
Escolaridade							
3°G e pós-graduação	1		9	44	991,47	0,9	
2° Grau	1,45	0,63 - 3,31	15	53	1177,97	1,2	0,38
1° Grau e analfabeto	1,63	0,75 - 3,53	23	74	1618,95	1,4	0,21
Piso							
cerâmica/ madeira	1		29	125	2744,69	1,1	
outros	1,71	0,92 - 3,20	15	37	835,97	1,8	0,09
Lixo recolhido							
3x ou mais	1		43	151	3316,82	1,3	
menos que 3x	0,25	0,03 - 1,80	1	11	263,83	0,4	0,17
Quintal na residência							
não	1		4	26	608,95	0,7	
sim	2,11	0,75 - 5,89	40	136	2971,70	1,3	0,16
Quintal							
cimentado	1		26	104	2316,05	1,1	
terra/barranco	2,11	1,10 - 4,05	14	32	655,64	2,1	0,03
Pássaro (s)							
não	1		37	120	2628,72	1,4	
sim	0,48	0,21 - 1,08	7	42	951,93	0,7	0,08
Entulho							
não	1		25	120	2732,79	0,9	
sim	2,73	1,50 - 4,98	19	42	847,87	2,2	0,00
Folhas							
não	1		36	146	3273,80	1,1	
sim	2,83	1,31 - 6,14	8	16	306,85	2,6	0,00
Árvores							
não	1		20	87	1981,11	1,0	
sim	1,54	0,85 - 2,79	24	85	1599,54	1,5	0,15
Esterco							
não	1		42	160	3559,27	1,2	
sim	15,50	3,40 - 70,71	2	2	21,38	9,3	0,00
Característica do cão							
Porte							
grande	1		8	41	959,51	0,8	
médio	1,63	0,74 - 3,58	28	99	2171,80	1,3	0,22
pequeno	2,11	0,86 - 5,17	12	33	711,21	1,7	0,10
Fica maior parte do tempo							
dentro de casa	1		3	24	538,98	0,6	
quintal	2,38	0,74 - 7,71	41	138	3041,67	1,3	0,15
Dorme							
dentro de casa	1		5	30	677,87	0,7	
quintal	1,73	0,69 - 4,48	39	132	2902,79	1,3	0,23
Foge							
não	1		37	147	3282,19	1,1	
sim	2,22	1,00 - 5,00	7	15	298,46	2,3	0,05
Veterinário							
sim	1		27	72	1586,72	1,7	
não	0,5	0,27 - 0,92	17	90	1993,93	0,8	0,02

Após a análise univariada de Kaplan-Meier e a multivariada intermediária de Cox, foi obtido o modelo final demonstrando os fatores de risco para soroconversão. São eles: entulho no quintal da residência (HR: 2,87; IC95% 1,57 - 5,26) e cão ser de grande porte (HR: 1,61; IC95% 1,00 - 2,58) (Tabela 31 e Figura 11).

Da mesma forma que no modelo anterior, foi testada a adequação do modelo, através do teste de proporcionalidade dos riscos, onde se constatou que não houve rejeição da suposição de riscos proporcionais, constatando assim, que todas as variáveis do modelo final devem ser mantidas.

Tabela 31: Modelo Final para soroconversão de animais PCR positivo.

Variável	Razão de risco (IC 95%)	Razão de risco ajustado (IC 95%)
Entulho no quintal (não versus sim)	2,73 (1,50 - 4,98)	2,87(1,57 - 5,26)
Porte do cão (pequeno versus grande)	2,11 (0,86 - 5,17)	1,61 (1,00 - 2,58)

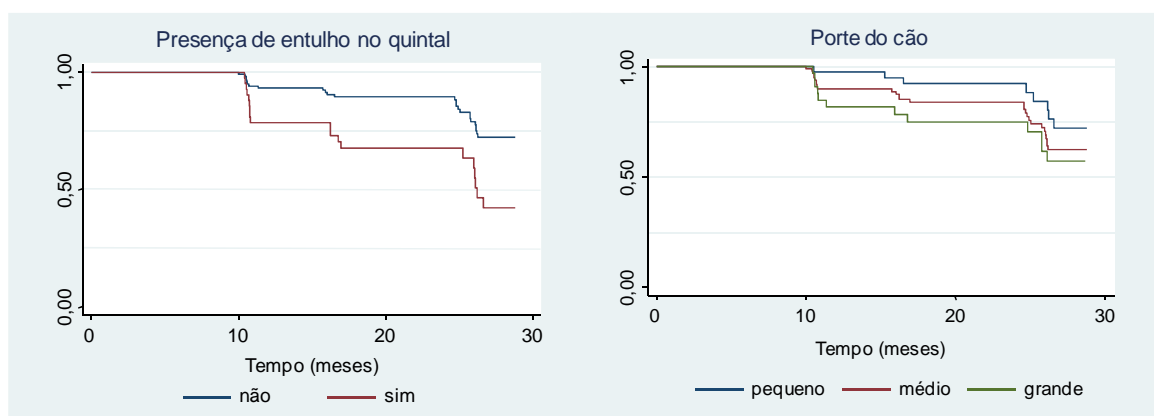


Figura 11: Gráficos de Kaplan-Meier das variáveis que compõem o modelo final de Cox para soroconversão canina.

6.3. Análise de biomarcadores (Bloco III)

Foi realizada nesta etapa uma análise dos perfis de imunoglobulinas, parâmetros hematológicos, perfil imunofenotípico de linfócitos T e de células apresentadoras de antígeno dos diversos grupos clínicos: controle – CN (soronegativo/PCR⁻, n=7), assintomático – CA-I (soronegativo/PCR⁺, n=8), assintomático – CA-II (soro e PCR positivo, n=10) e sintomático – CS (soro e PCR positivo, n=16). Foram considerados animais sintomáticos, cães que apresentaram vários sinais clínicos típicos da LVC (Mancianti et al. 1988; Reis et al. 2009). Estes resultados geraram um artigo publicado no *The Veterinary Journal* (Coura-Vital et al. 2011).

Durante a coorte foi coletada, em uma subamostra, material biológico para a realização de imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo e os dados obtidos encontram-se armazenados em mídia apropriada para serem posteriormente avaliados. Neste grupo de cães também foi coletado material para avaliação da síntese intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no contexto da resposta imune *in vitro*. No atual trabalho serão apresentados os resultados obtidos durante a primeira coleta da coorte, na qual foram avaliados: 27 cães controle CN (soro e PCR negativos) e 31 cães assintomáticos CA-I (soronegativo/PCR⁺) e além destes, 20 cães assintomáticos CA-II (soro e PCR positivo) e 19 cães sintomáticos (soro e PCR positivo). O material biológico dos animais soropositivos foi coletado no Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte - Minas Gerais.

6.3.1 Perfis de classes e subclasses de Imunoglobulinas

A reatividade sérica de imunoglobulinas específicas anti-*L. infantum* foi avaliada nos grupos CA-I, CA-II e CS. Foi utilizado como grupo controle, animais saudáveis com diagnóstico sorológico e molecular negativo. Foram avaliadas as classes IgG, IgM, IgA e IgE e subclasses IgG1 e IgG2. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o grupo CA-I apresentou níveis similares ao grupo CN para todas imunoglobulinas avaliadas. Foi observado aumento significativo nos níveis de IgG, IgG2, IgM e IgA nos grupos CA-II e CS em comparação aos grupos CN e CA-I. Além disso, observou-se aumento significativo nos níveis de IgE no grupo CS quando comparado ao grupo CA-I. Nenhuma alteração nos níveis de IgG1 foi observada entre os grupos avaliados (Figura 12).

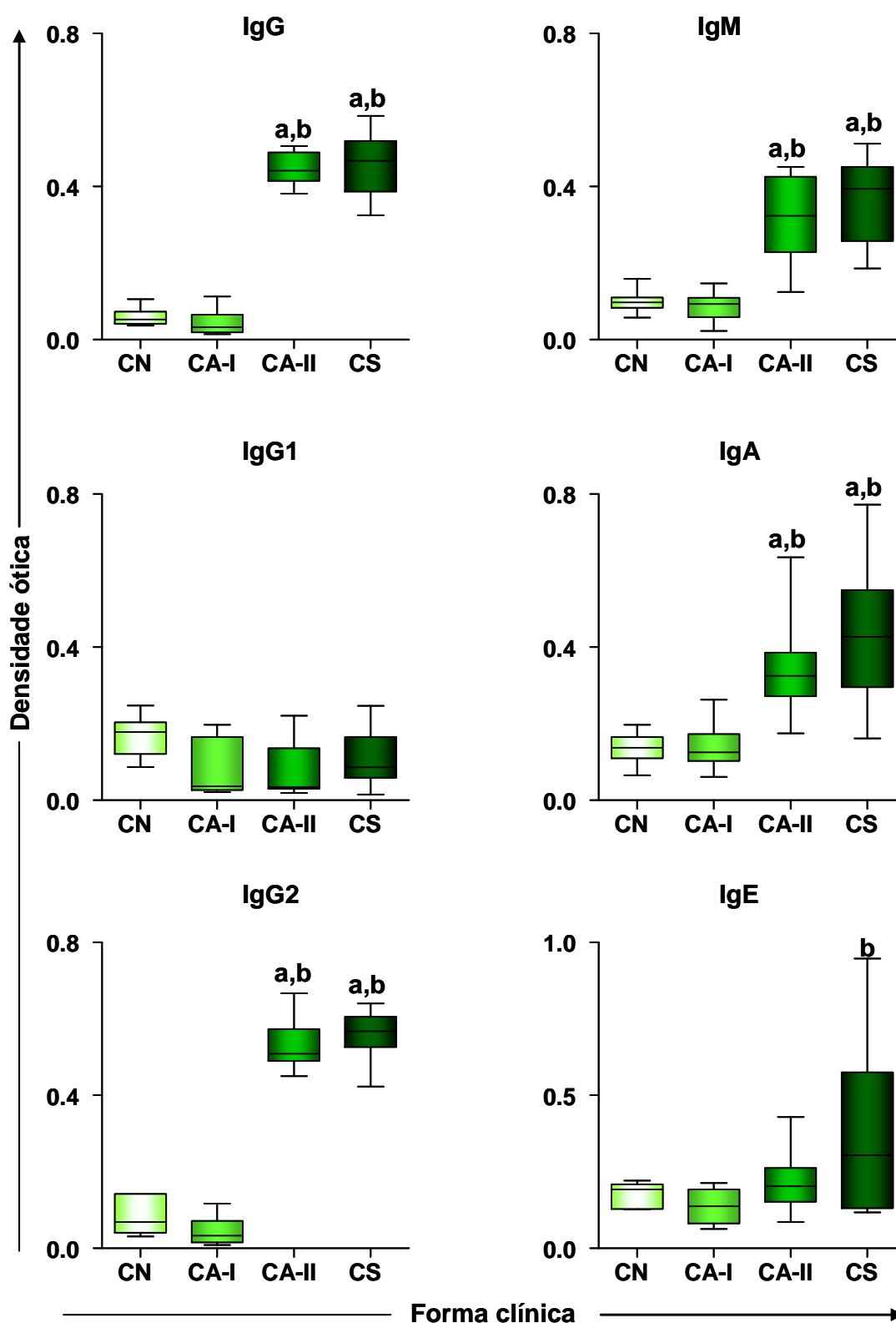


Figura 12: Reatividade de classes e subclasses de imunoglobulinas em cães naturalmente infectados e classificados de acordo com sua forma clínica e exames laboratoriais em: assintomático-I (CA-I= ■), assintomático-II (CA-II= ■), sintomático (CS= ■). Cães não infectados foram usados como controle (CN= ■). Os resultados estão expressos em valores de densidade ótica em gráficos de *box-plot* demonstrando a mediana, valores máximos e mínimos. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras “a” e “b” representando os grupos CN e CA-I respectivamente.

6.3.2 Parâmetros hematológicos

As análises estatísticas evidenciaram que os grupos CN e CA-I apresentam maior número de monócitos em comparação ao grupo CS. Uma significativa redução de eosinófilos também foi percebida nos grupos CS e CA-II quando comparados aos grupos CN e CA-I. Além disso, o grupo CS apresenta uma redução significativa nos linfócitos quando comparado ao grupo CA-II. Anemia grave foi demonstrada nos animais sintomáticos, com uma redução ($p < 0,05$) no número de eritrócitos e hematócrito quando comparados aos grupos CN e CA-I. Além disso, o grupo CS apresenta redução ($p < 0,05$) de hemoglobina em relação aos grupos CN, CA-I e CA-II (Tabela 32).

Tabela 32: Avaliação dos parâmetros hematológicos de cães naturalmente infectados e não infectados. As letras ‘a’, ‘b’ e ‘c’ representam diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (CN), assintomático-I (CA-I) e assintomático-II (CA-II) respectivamente. Encontra-se demonstrado o valor da mediana e entre parênteses o primeiro (Q1) e terceiro quartil (Q3) de cada grupo.

Parâmetros hematológicos	Grupos clínicos			
	CN	CA-I	CA-II	CS
Eritrócitos – $10^6/\text{mm}^3$	6,8 (6,6-7,0)	6,9 (6,0-7,4)	6,1 (5,2-6,2)	4,1(3,7-5,0) ^{a,b}
Hemoglobina – g %	16,9 (16,7-17,1)	15,7 (14,2-16,3)	14,8 (13,9-15,6)	10,4(8,4-11,4) ^{a,b,c}
Hematócrito - %	49,3 (48,5-49,9)	45,9 (40,4-49,1)	42,1 (38,2-42,7)	29,3(20,0-33,9) ^{a,b}
Leucócitos – $10^3/\text{mm}^3$	11,4 (11,1-16,4)	12,5 (11,4-13,9)	12,8 (9,9-15,5)	10,8 (6,3-13,0)
Granulócitos	8,7 (7,3-12,6)	9,1 (6,0-10,2)	8,0 (4,7-9,8)	8,5 (4,8-10,8)
Neutrófilos	7,4 (5,1 -10,6)	7,3 (3,8-8,7)	6,3 (4,6-8,6)	7,8 (4,5-9,1)
Eosinófilos	2,1 (1,5-2,5)	1,6 (1,3-1,9)	0,4 (0,2-0,7) ^{a,b}	0,2 (0,1-0,6) ^{a,b}
Linfócitos	2,4 (1,4- 2,7)	2,4 (1,8-3,4)	3,6 (3,2-4,4)	1,4 (1,0-2,0) ^c
Monócitos	1,3 (0,7 -1,4)	1,0 (0,8-1,2)	1,0 (0,6-1,3)	0,5 (0,3-0,7) ^{a,b}

6.3.3 Perfil imunofenotípico de populações linfócitos T (CD5⁺) e suas subpopulações (CD4⁺ e CD8⁺) circulantes

A avaliação dos perfis imunofenotípicos de linfócitos T presentes no sangue periférico de cães naturalmente infectados por *L. infantum* foi realizada a partir da contagem absoluta (mm³) de linfócitos T (CD5⁺) e de suas subpopulações (CD4⁺ e CD8⁺). As características imunofenotípicas destas células foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que cães do grupo CA-I e CA-II apresentaram aumento de linfócitos T (CD5⁺) em comparação ao grupo CS. Este encontra-se relacionado ao aumento das subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) nestes grupos. Neste contexto, CA-I e CA-II apresentaram alta contagem (p<0,05) de linfócitos T (CD4⁺) em relação ao grupo CS. Além disso, o grupo CA-II apresenta aumento na contagem de linfócitos T (CD8⁺) quando comparado aos grupos CN e CS. Para melhor investigar a relação entre as subpopulações de linfócitos, foi avaliada a razão CD4⁺/CD8⁺ que demonstrou um declínio nos grupos CA-II e CS em comparação ao grupo controle (Figura 13).

6.3.4 Perfil imunofenotípico das células apresentadoras de antígeno circulantes: Linfócitos B (CD21⁺) e Monócitos (CD14⁺)

Para expressar os resultados do perfil imunofenotípico de células apresentadoras de antígeno, linfócitos B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺) circulantes no sangue periférico em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, foram empregados cálculos da contagem absoluta de células do sangue periférico (mm³) obtidos pelo hemograma. As características imunofenotípicas das células foram avaliadas por citometria de fluxo. Foi observado queda no número de linfócitos B (CD21⁺) circulantes no grupo CS, em comparação aos grupos CN e CA-II. Além disso, nossos resultados revelaram um decréscimo nos valores absolutos de monócitos (CD14⁺) circulantes nos grupos CA-II e CS quando comparados ao grupo CN e CA-I (Figura 14).

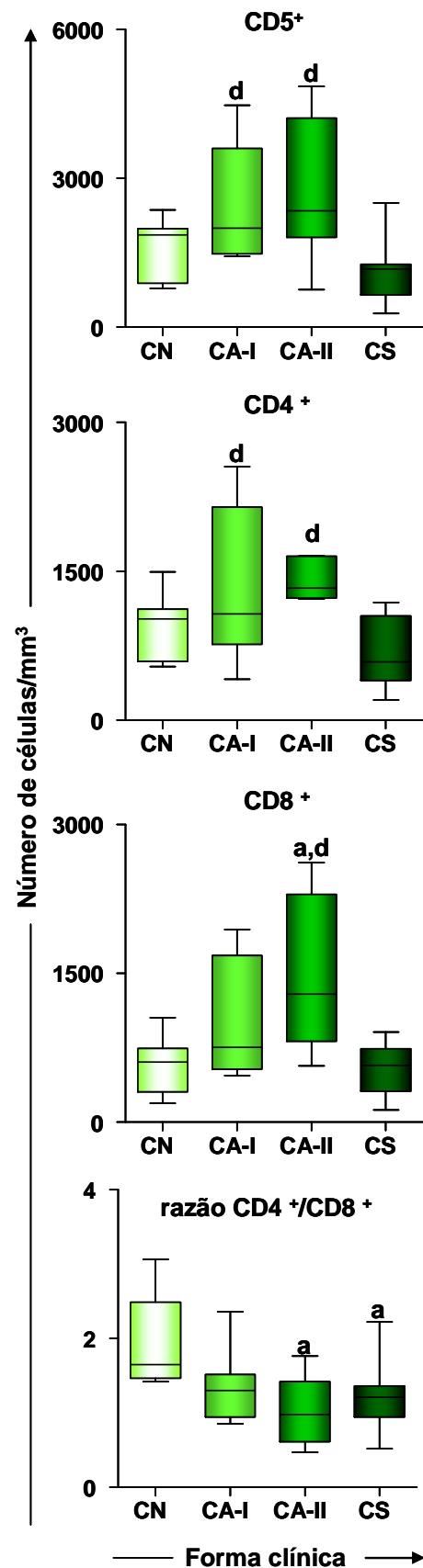


Figura 13: Perfil imunofenotípico de linfócitos T do sangue periférico em cães naturalmente infectados por *L. infantum* categorizados por seu status clínico e resultados laboratoriais como: assintomático-I (CA-I= ■), assintomático-II (CA-II= ■) e sintomático (CS= ■). Os cães não infectados foram utilizados como controle (CN= ■). Os resultados estão expressos em contagem absoluta de células e razão, sendo demonstrados em gráficos de *box-plot*. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras “a”, “b”, “c” e “d” em relação aos grupos CN, CA-I, CA-II e CS, respectivamente.

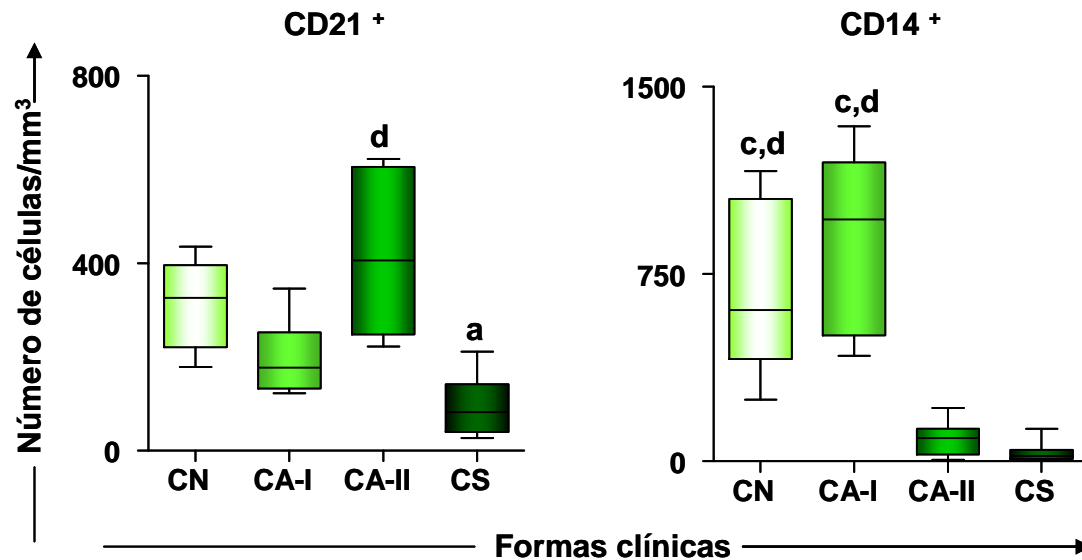


Figura 14: Perfil imunofenotípico de células apresentadoras de antígeno do sangue periférico em cães naturalmente infectados por *L. infantum* categorizados por seu status clínico e resultados laboratoriais como: assintomático-I (CA-I=■), assintomático-II (CA-II=■) e sintomático (CS=■). Os cães não infectados foram utilizados como controle (CN=■). Os resultados estão expressos em contagem absoluta de células em gráficos de *box-plot* onde a mediana, valores máximos e mínimos são expressos. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras “a”, “b”, “c” e “d” em relação aos grupos CN, CA-I, CA-II e CS, respectivamente.

6.3.5 Síntese intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 por Linfócitos T CD4⁺ antes e após estimulação antígeno-específica *in vitro*

Na figura 15 está representado o percentual de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺, T CD4⁺IL-4⁺ e a razão entre esses dois parâmetros, em cultura curta duração (18 horas) de sangue total, na ausência (RPMI) e presença de estimulação antígeno-específica (ASLi) *in vitro*.

Foi observado nas culturas controle (não estimulada), que animais dos grupos CA-II e CS apresentam aumento no percentual de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ e T CD4⁺IL-4⁺ em comparação aos grupos CN e CA-I. Já a razão T CD4⁺IFN- γ /IL-4 não apresentou alteração ($p < 0,05$) entre os grupos. Nas culturas que foram estimuladas com antígeno específico, verificou-se aumento no percentual de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ nos grupos CA-II e CS, quando comparados a CN, sendo este também observado no grupo CS em relação a CA-I. Foi observado aumento ($p < 0,05$) no percentual de linfócitos T CD4⁺IL-4⁺, no grupo CA-II, quando comparado ao grupo CN. Quando foi avaliada a razão T CD4⁺IFN- γ /IL-4, detectou-se aumento ($p < 0,05$) no grupo CS em comparação a todos os outros grupos, já em CA-II este foi em relação a CA-I.

Ao avaliar o impacto da estimulação antígeno específica, foi observado que o percentual de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ e T CD4⁺IL-4⁺ diminuíram nos grupos CA-II e CS em comparação às culturas controles nos mesmos grupos. A razão T CD4⁺IFN- γ /IL-4 não apresentou alteração entre as culturas controle e estimulada nos diferentes grupos avaliados.

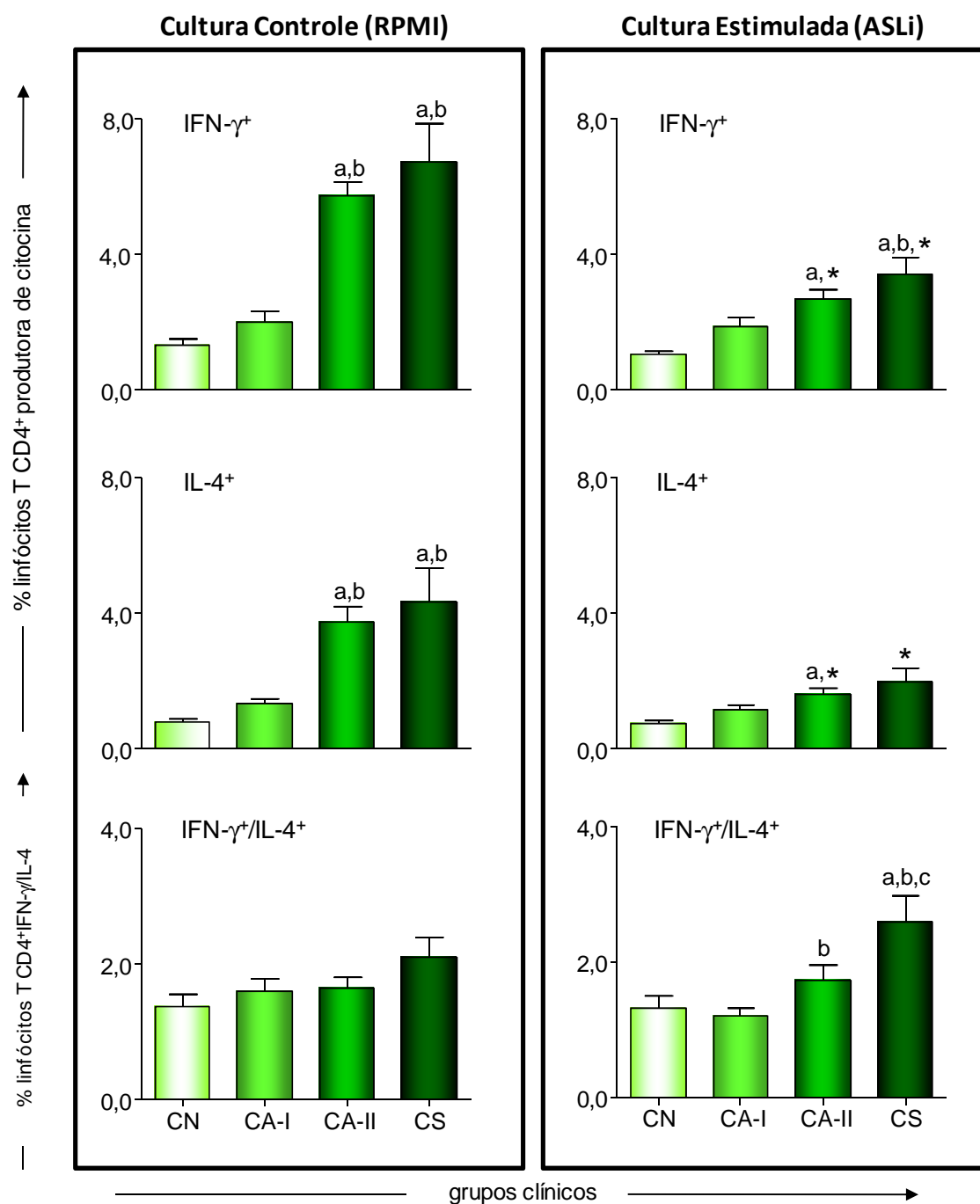


Figura 15: Percentual de linfócitos T CD4 $^+$ IFN- γ^+ e T CD4 $^+$ IL-4 $^+$ e da razão T CD4 $^+$ IFN- γ /IL-4 em culturas controle (RPMI) e estimulada (ASLi) de cães naturalmente infectados com *L. infantum* categorizados por seu status clínico e resultados laboratoriais como: assintomático-I (CA-I= ■), assintomático-II (CA-II= ■) e sintomático (CS= ■). Os cães não infectados foram utilizados como controles (CN= ■). Os resultados estão expressos em porcentagem de células que sintetizam a citocina. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras “a”, “b” e “c” em relação aos grupos CN, CA-I e CA-II respectivamente.

6.3.6 Síntese intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 por Linfócitos T CD8⁺ antes e após estimulação antígeno-específica *in vitro*

A figura 16 representa, de acordo com os grupos clínicos avaliados, o percentual de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺, T CD8⁺IL-4⁺ e razão entre esses dois parâmetros em cultura curta duração (18 horas) de sangue total, na ausência (RPMI) e presença de estimulação antígeno-específica (ASLi) *in vitro*.

Nas culturas controle (não estimulada), foi observado aumento no percentual de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ no grupo CS em comparação a CN. Já o percentual de linfócitos T CD8⁺IL-4⁺ foi maior no grupo CS em relação a todos os outros grupos. A razão T CD8⁺IFN- γ /IL-4 demonstrou redução ($p < 0,05$) no grupo CS, em comparação a CN e CA-II e aumento em CA-II em relação a CA-I.

As culturas estimuladas com antígeno específico apresentaram aumento ($p < 0,05$) no percentual de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ e T CD8⁺IL-4⁺ no grupo CS em comparação aos grupos CN e CA-I. O grupo CA-I também apresentou aumento ($p < 0,05$) da razão T CD8⁺IFN- γ /IL-4 em relação ao grupo CN.

Avaliando o impacto da estimulação antígeno específica, foi observado que houve aumento do percentual de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ nos grupos CA-II e CS e de T CD8⁺IL-4⁺ no grupo CA-II. Além disso, o estímulo antigênico proporcionou aumento na razão T CD8⁺IFN- γ /IL-4 no grupo CS.

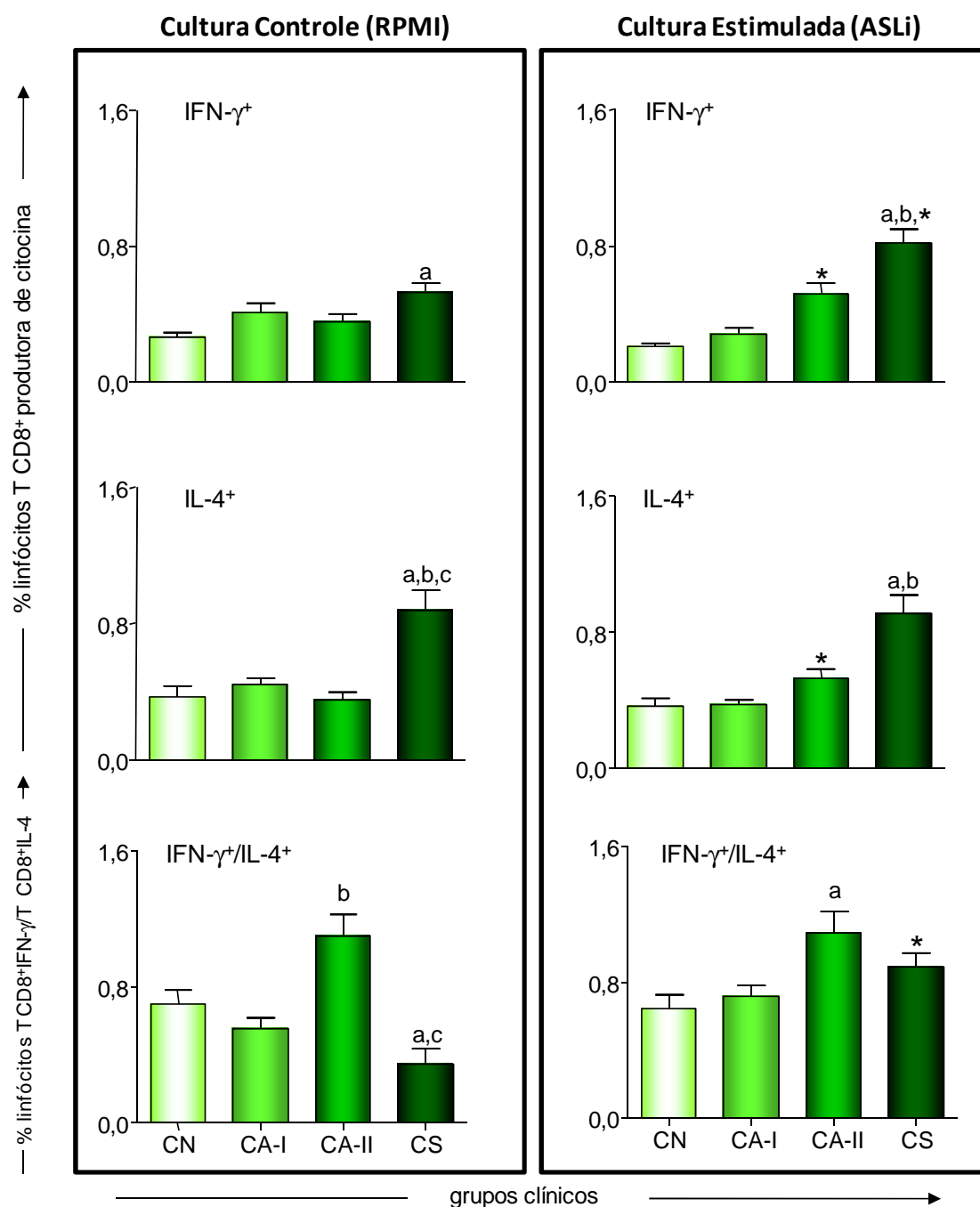


Figura 16: Percentual de linfócitos T CD8 $^+$ IFN- γ^+ e T CD8 $^+$ IL-4 $^+$ e da razão T CD8 $^+$ IFN- γ /IL-4 em culturas controle (RPMI) e estimulada (ASLi) de cães naturalmente infectados com *L. infantum* categorizados por seu status clínico e resultados laboratoriais como: assintomático-I (CA-I= ■), assintomático-II (CA-II= ■) e sintomático (CS= ■). Os cães não infectados foram utilizados como controles (CN= ■). Os resultados estão expressos em porcentagem de células que sintetizam a citocina. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras “a”, “b” e “c” em relação aos grupos CN, CA-I e CA-II respectivamente.

7.0 Discussão

7.1. Diagnóstico, prevalência e incidência

Nos últimos anos, apesar de terem sido eliminados milhares de cães com leishmaniose, não se tem conseguido reduzir a incidência da doença humana a níveis aceitáveis (Romero & Boelaert 2010). Este trabalho tem concentrado esforços na investigação de um problema de saúde pública atual, a elevada prevalência da LVC, geralmente subestimada na população canina em áreas endêmicas devido à baixa sensibilidade dos testes sorológicos empregados no diagnóstico. Neste contexto, o presente estudo estimou por PCR-RFLP, a prevalência e incidência de infecção canina por *L. infantum*. O trabalho se destaca, não apenas por realizar esta avaliação em um grande número de cães, mas também pelo fato de ser conduzido em área urbana onde a LV encontra-se em expansão (Oliveira et al. 2001; Margonari et al. 2006; Lopes et al. 2010). Destaca-se ainda, por utilizar em larga escala, os testes moleculares (PCR e RFLP) para o diagnóstico da LVC.

Para a avaliação diagnóstica, foi empregada a técnica de ELISA em papel filtro e a PCR-RFLP em creme leucocitário, sendo uma parte do material processada no LIMP e os testes diagnóstico, realizados no Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) da UFOP. As pessoas envolvidas na realização dos testes diagnóstico desconheciam qualquer informação sobre o animal. Durante a realização de todos os métodos, foram incluídos controles seguramente positivos e negativos. Para evitar possíveis tendências, os testes foram realizados de forma independente e os resultados foram comparados após o término de todos os métodos, assegurando a imparcialidade na avaliação.

No LPC foi realizado o teste sorológico de ELISA empregando antígeno solúvel de *L. infantum*, previamente testado e utilizado em outros trabalhos do grupo (Rosario et al. 2005; Reis et al. 2006d; Giunchetti et al. 2008a; Teixeira Neto et al. 2010). Foi observada elevada sensibilidade e especificidade no teste sorológico, conforme já observado em outro trabalho (Rosario et al. 2005). Para verificação da reprodutibilidade do teste, aproximadamente 10% das amostras foram retestadas concomitantemente, em ensaios mascarados, sendo detectada excelente reprodutibilidade da técnica. Conforme realizado na sorologia, foi avaliada a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade da PCR, abordagem discutida ao longo desta sessão.

Um grande problema de saúde pública, principalmente em áreas urbanas, é a ocorrência de elevado percentual de cães infectados com *L. infantum* convivendo com indivíduos susceptíveis. Tem-se demonstrado que um elevado percentual dos cães

assintomáticos são infectados (Solano-Gallego et al. 2001a; Otranto et al. 2009; Paradies et al. 2010), sendo a prevalência da doença (forma sintomática) em regiões endêmicas, inferior a 10% (Solano-Gallego et al. 2009). Também já foi demonstrado que animais assintomáticos são fonte de infecção para os flebotômíneos e contribuem na manutenção dos níveis endêmicos de LVC (Molina et al. 1994; da Costa-Val et al. 2007; Michalsky et al. 2007; Soares et al. 2011). Além disso, estes animais podem permanecer assintomáticos por um curto período de tempo ou mesmo nunca desenvolverem os sinais clínicos da leishmaniose (Dantas-Torres 2007).

Animais assintomáticos possuem uma resposta humoral com reduzidos níveis de anticorpos, o que limita sua detecção nos testes sorológicos (Reis et al. 2006d; Cardoso et al. 2007). Estes testes devem ser avaliados com cautela no contexto epidemiológico da região avaliada, visto que cães assintomáticos podem não soroconverter logo após a infecção, ocasionando resultados sorológicos falso negativos (Otranto et al. 2009).

Os resultados encontrados a partir dos testes diagnósticos durante o estudo transversal, mostraram que a taxa de infecção canina por *Leishmania* diagnosticada pela metodologia molecular (PCR), foi maior que a detectada na técnica sorológica (ELISA). A soropositividade em papel filtro foi 15,9% e os resultados obtidos nos laboratórios foram 12,0% e 9,4%, (LPC e LZOON respectivamente). Na PCR seguida da RFLP, a prevalência da infecção por *L. infantum* foi de 24,7%. Estes resultados demonstram que a taxa de infecção canina em uma área urbana de expansão da LV, sob intervenção do PCLV, é subestimada em pelo menos 50%. Estudos em áreas endêmicas também encontraram elevada prevalência de infecção (60-80%) pela PCR, sendo esta superior à sorologia (<30,0%) (Solano-Gallego et al. 2001a; Lachaud et al. 2002a; Leontides et al. 2002; Fernandez-Bellon et al. 2008). O emprego da PCR tem demonstrado elevada prevalência de infecção canina por *Leishmania* sendo a identificação da espécie, de fundamental importância, principalmente em áreas de ocorrência simultânea das formas visceral e cutânea, uma vez que o cão pode ser hospedeiro de ambos os parasitos (Quaresma et al. 2009; Silva et al. 2011). Por este motivo, o presente estudo empregou a técnica molecular de PCR seguida da RFLP, tendo em vista o fato de já ter sido detectada a presença de cães com *L. braziliensis* em Belo Horizonte (Quaresma et al. 2009).

Nossos resultados demonstram que durante o estudo transversal, aproximadamente 1/4 dos cães soronegativos encontram-se infectados por *L. infantum* (PCR-RFLP). Durante o estudo de coorte procurou-se realizar os retornos a cada seis

meses para avaliação deste grupo de animais (soronegativo/PCR⁺), pois é recomendável que os mesmos sejam monitorados clínica e sorologicamente em intervalos de seis meses a um ano, objetivando avaliar uma possível soroconversão e desenvolvimento da doença (Solano-Gallego et al. 2009). Durante o seguimento da coorte foi observada uma elevada incidência de infecção, e ao final do estudo praticamente todos animais encontravam-se infectados. Na primeira coleta foi observada menor taxa de incidência, devido ao longo intervalo entre o estudo transversal e o início da coorte e ao maior número de cães negativos em seguimento. Considerando-se a alta incidência e a manutenção dos cães infectados (PCR-RFLP⁺) na coorte, observou-se uma elevação no percentual de cães infectados, variando de 39,8% na primeira avaliação para 85,7% e 85,8% na segunda e terceira avaliações respectivamente. Em um estudo de coorte conduzido no sul da Itália, também foi percebido a subestimação do número de cães infectados, sendo a incidência pela n-PCR maior que a detectada na sorologia. Neste trabalho foram seguidos 43 cães da raça Beagle e ao final do estudo, após 32 meses de acompanhamento, 97,3% dos cães encontravam-se infectados (n-PCR positivo) (Oliva et al. 2006). Durante este trabalho, Oliva et al. (2006) observaram que a maioria dos animais que compunham a coorte positivaram na PCR meses antes de soroconverter. Existem pelo menos duas hipóteses que podem explicar o atraso ou a não soroconversão destes animais infectados (PCR⁺): (i) o período denominado “janela imunológica”, durante o qual há incapacidade de promover a ativação policlonal de linfócitos B, não produzindo, conseqüentemente, anticorpos detectáveis pelos métodos sorológicos (Oliveira et al. 1993); (ii) possivelmente alguns animais assintomáticos PCR⁺ não soroconvertem por possuírem uma resposta celular efetiva, capaz de controlar a replicação, disseminação e visceralização do parasito (Solano-Gallego et al. 2001a) com carga parasitária tecidual tão baixa, a ponto da apresentação de antígenos ser insuficiente para acionar a conexão T-B.

Durante infecção experimental por via intradérmica, é observado que alguns cães permanecem assintomáticos soronegativos/PCR⁺ por um longo período, podendo não desenvolver a doença (Hommel et al. 1995; Paranhos-Silva et al. 2003). Strauss-Ayali et al. (2004) observaram, em infecção experimental, que após 45 dias 83% dos cães encontravam-se infectados, apresentando resultado molecular positivo pela PCR e negativo pela sorologia. Desta forma, a PCR auxilia na detecção precoce de animais infectados antes de tornarem-se potenciais reservatórios, visto que a capacidade de infectar os flebotomíneos ocorre aproximadamente 105 dias após sua soroconversão

(Quinnell et al. 2001a; Courtenay et al. 2002b). Segundo Quinnell et al (1997) é estimado que a soroconversão ocorra em média 94 dias após a infecção, sendo o tempo decorrido entre a infecção e a infecciosidade do cão de aproximadamente 199 dias. Foi observado também que 43% dos cães infectados tornam-se capazes de infectar o vetor (Courtenay et al. 2002b). A interpretação de um resultado positivo pela PCR em animais soronegativos também deve ser realizada com cautela, uma vez que não é sabido se estes cães representam fonte de infecção para o vetor. Com base nos trabalhos anteriormente expostos, possivelmente o cão soronegativo/PCR⁺ não é capaz de infectar o flebotomíneo, sendo necessários estudos que avaliem a real possibilidade deste grupo de animais comportarem-se como reservatório. Este questionamento vem sendo investigado por pesquisadores de nosso grupo, através da realização de xenodiagnóstico em uma amostra destes animais. Além disso, é importante mencionar que em países onde é preconizado o tratamento da LVC, a decisão de tratar cães assintomáticos com medicação anti-*Leishmania* baseando-se apenas na positividade da PCR, não é recomendada (Solano-Gallego et al. 2009).

Na comparação entre a incidência da infecção e a soroconversão, foi constatado que a maioria dos animais positiva a PCR antes de soroconverter. Durante a avaliação de uma coorte, Oliva et al. (2006) observaram que em grande parte dos animais acompanhados ocorria situação semelhante. No atual trabalho foi observada elevada incidência de infecção no início da coorte quando comparada à incidência da soroconversão, podendo esta afirmação ser observada nas curvas de sobrevivência. Na última avaliação restavam poucos cães não infectados, entretanto a soroconversão ainda não havia ocorrido em um elevado percentual destes animais. Durante um estudo de coorte realizado na ilha de Marajó, estado do Pará, Brasil, Quinnell et al. (1997) observaram incidências de soroconversão variando entre 1,86 a $6,79 \times 10^{-3}$ cães/dia, de acordo com a variação sazonal local. Durante o estudo, Quinnell et al. (1997) realizaram coletas a intervalos de aproximadamente dois meses, o que possibilitou esta abordagem, inviabilizada no presente trabalho pelo fato de os intervalos entre as coletas terem sido longos. Em trabalho recentemente publicado sobre a flutuação de *Lu. longipalpis* na região metropolitana de Belo Horizonte, foi observado ao longo do ano maior concentração do vetor nos meses de maio a junho e de setembro a novembro. Os autores mostraram também que não houve associação entre as variáveis climáticas e a população de vetores avaliados (Carvalho et al. 2010).

Estudos demonstram que cães de área endêmica podem ser picados por centenas de flebótomos durante a noite, entretanto uma pequena proporção (0,5 a 3,0%) encontra-se infectado (Gomez-Saladin et al. 2005). Uma das formas de avaliar a exposição do cão ao flebotomíneo é a dosagem de anticorpos contra proteínas salivares do vetor, o que vem sendo amplamente estudado nos últimos anos (Bahia et al. 2007; Hostomska et al. 2008; Teixeira et al. 2010). O desenvolvimento da doença no cão pode ocorrer pela infecção por uma cepa mais virulenta ou pela exposição contínua ao vetor, uma vez que o parasito é continuamente reintroduzido em seu organismo (Solano-Gallego et al. 2009). Com base nestes fatos, é provável que no início da coorte os animais soronegativo/PCR⁺ tenham sido expostos ao parasito, mas não desenvolveram a doença. Ao longo da coorte possivelmente ocorreram inúmeras exposições do cão ao vetor infectado o que pode ter favorecido, juntamente com a infecção prévia, a soroconversão de uma parcela destes animais. Este aumento foi detectado através dos percentuais de sororeatividade, sendo na primeira coleta da coorte de 4,6 e 7,6%, na segunda 6,2 e 5,9% e na terceira 27,7 e 10,3%, nos laboratórios LPC e LZOON respectivamente. Em um trabalho realizado no Rio de Janeiro em uma coorte de cães, foi observado no início do estudo 41,7% de animais assintomáticos soropositivos pela RIFI, ao final de um ano 50% de cães tornaram-se soropositivos, revelando uma incidência de 8,3% (da Silva et al. 2009). Além disto, alguns trabalhos têm demonstrado que a prevalência de infecção canina (PCR) por *L. infantum* é mais alta que a soroprevalência e a prevalência da doença (Baneth et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2009).

Apesar de uma parcela dos cães PCR positivo soroconverter ao longo da coorte, percebe-se uma grande instabilidade nos resultados da PCR durante o acompanhamento. Um pequeno grupo de cães soronegativo/PCR⁺ negativaram a PCR, mantendo este perfil até o final do estudo. É possível que o percentual de cães que negativaram seja representativo do percentual de animais assintomáticos que evoluem para autocura ou autorresolução da LVC em condições naturais. Entretanto, 48,6% dos animais soronegativo/PCR⁺ e 14,8% soro e PCR negativo apresentaram oscilação dos resultados de PCR, evidenciando resultados positivos em uma avaliação e negativando em avaliações posteriores. Oliva et al (2006), empregando PCR em medula óssea, encontrou uma parcela de cães com este comportamento e sugeriu que após a infecção a carga parasitária na medula óssea diminui, permanecendo indetectável por um período de tempo variável até que aumente novamente. Esse "silenciamento do parasito", pode

atribuir-se a uma sensibilidade limitada do teste diagnóstico, o que tem sido relatado na leishmaniose canina experimental (Paranhos-Silva et al. 2003). Outra sugestão é o controle da infecção pelo animal, que posteriormente se infecta novamente (Oliva et al. 2006). Outros estudos de coorte também observaram que animais PCR⁺ podem tornar-se negativos em análise posterior, sugerindo o desenvolvimento, nestes animais, de uma resposta imune protetora capaz de controlar o parasito (Otranto et al. 2009; Paradies et al. 2010). Para uma melhor investigação desta resposta imune possivelmente diferenciada nesses animais, propusemos uma reclassificação dos cães assintomáticos em dois subgrupos: assintomático soronegativo/PCR⁺ (CA-I) e assintomático soropositivo e PCR⁺. Nestes subgrupos realizamos a busca de biomarcadores, conforme abordado no tópico seguinte. Além dessas possibilidades, outra explicação para a variação nos resultados moleculares ao longo da coorte é a baixa reprodutibilidade da técnica de PCR, observada durante todo o estudo.

Foi observado também que animais soropositivos podem apresentar resultados negativos pela PCR. Uma possível explicação seria a limitação da PCR na detecção de animais que oscilam a carga parasitária, repercutindo no DNA circulante, exercendo controle sobre a infecção sem reduzir os níveis de anticorpos. Outra possibilidade é a baixa especificidade da sorologia, que apresenta reações cruzadas com *T. cruzi* e *Leishmania (V.) braziliensis*, além de erliquiose, rickettsiose, leptospirose e toxoplasmose (el Amin et al. 1986; Harith et al. 1987; Barbosa-De-Deus et al. 2002; Ferreira Ede et al. 2007; Porrozzini et al. 2007). Estes resultados mostram que nenhuma técnica diagnóstica ainda é capaz de identificar 100% os animais infectados. A sensibilidade das técnicas diagnósticas varia durante o curso da infecção, sendo a PCR geralmente mais sensível no início da doença, cuja progressão eleva os títulos de anticorpos, aumentando também a sensibilidade dos métodos sorológicos (Quinnell et al. 2001a; Courtenay et al. 2002b). Estes fatos podem estar relacionados à resposta celular que, uma vez ativa, ocasiona redução da replicação e carga parasitária, afetando consequentemente a sensibilidade da PCR. Além disto, é possível que parte destes cães esteja evoluindo para autocura, eliminando o parasito do organismo. A presença de DNA de *Leishmania* no sangue por determinado período pode estar associada ao trânsito e migração de macrófagos infectados. Logo após esta fase, ocorre diminuição deste trânsito a níveis indetectáveis por um intervalo de tempo variável até que o número de macrófagos infectados circulantes aumente novamente. Este fenômeno pode

limitar a sensibilidade do teste diagnóstico molecular em amostras de creme leucocitário.

No presente trabalho, a sensibilidade da PCR foi de 75% (IC95% 53 - 89) e especificidade de 100% (IC95%: 79 - 100), semelhante ao observado em outros trabalhos (Lachaud et al. 2002a; Lachaud et al. 2002b; Reithinger et al. 2003b). A concordância entre PCR e as sorologias foi baixa em todos os momentos deste estudo. Em outro trabalho envolvendo animais soropositivos foi demonstrado que as concordâncias entre a sorologia e PCR no creme leucocitário variam de 35% a 100% dependendo do iniciador utilizado (Lachaud et al. 2002b). No trabalho realizado por Andrade et al., (2006) foi observada baixa concordância entre as técnicas de RIFI e PCR ($Kappa < 0,4$) em um pequeno número de animais avaliados (n=55), o que demonstra a incapacidade das técnicas convencionais, sorológica ou molecular, na detecção de todos os animais infectados.

Os resultados obtidos deixam claro que não há um "padrão ouro" para a detecção de animais assintomáticos infectados, sendo evidente a necessidade de associação entre metodologias, a fim de ampliar a cobertura do PCLV na detecção de cães infectados. Em trabalho recentemente publicado, foi demonstrada a necessidade de melhorar a detecção de cães infectados por *L. infantum*, visto que 59% (91/155) dos cães eutanasiados no Rio de Janeiro em 2008 ao serem reavaliados, apresentavam-se negativos nos testes parasitológico de cultura, RIFI, ELISA e PCR (Silva et al. 2011). Adicionalmente, outro problema enfrentado pelos CCZs é a comercialização de vacinas que induzem a positividade nos testes sorológicos convencionais (Andrade et al. 2009). Tal fato inutiliza os resultados da sorologia convencional no controle de cães vacinados. Nesse contexto, a PCR torna-se uma alternativa diagnóstica importante, visto que é capaz de detectar o DNA do parasito ao invés de anticorpos. De fato, o presente estudo evidenciou que a sorologia não é um bom indicador de infecção, devido ao grande intervalo entre a detecção do patógeno (infecção) e a sorocovisão. É importante ressaltar que nenhum teste de diagnóstico sorológico ou molecular pode prever se o animal assintomático permanecerá nesta forma clínica ou se irá progredir para uma forma sintomática da doença (Otranto et al. 2009).

Apesar da PCR fornecer melhores estimativas de prevalência da infecção por *Leishmania*, a técnica de PCR apresenta uma série de variáveis que afetam seu desempenho, como a quantidade de DNA a ser amplificado, o método empregado na extração, o protocolo de amplificação e a forma de detecção do material amplificado

(Reithinger et al. 2000; Lachaud et al. 2002a; Ferreira et al. 2008a). Neste contexto, a PCR em creme leucocitário de cães tem demonstrado melhor desempenho quando a extração do DNA é realizada com *Kit* comercial ao invés do fenol-clorofórmio (Ferreira et al. 2008b). Os iniciadores que tem como alvo o DNA do cinetoplasto tem apresentado melhor desempenho na sensibilidade/especificidade quando comparados aos direcionados ao DNA genômico (Lachaud et al. 2002b). Além disso, alguns trabalhos avaliando a efetividade da PCR em diferentes tecidos como medula óssea, linfonodo, baço e pele, tem demonstrado boa sensibilidade da técnica neste tipo de amostra (Lachaud et al. 2002a; Maia et al. 2009; Quaresma et al. 2009). Segundo alguns autores, a PCR de sangue, creme leucocitário e urina tem se mostrado menos sensível (Solano-Gallego et al. 2007; Ferreira et al. 2008b), enquanto outros têm mostrado melhor desempenho da PCR em amostras de sangue total (Fisa et al. 2002; Lachaud et al. 2002b). O creme leucocitário obtido do sangue periférico de cães é a melhor amostra para trabalho de campo, pois permite a realização simultânea da PCR e a sorologia, permitindo determinar a extensão da infecção subclínica, além de estimar o número de cães que devem ser alvo das medidas de controle (Solano-Gallego et al. 2001a; Courtenay et al. 2002b). Além disso, quando comparado ao sangue total, o creme leucocitário tem demonstrado melhor desempenho diagnóstico (Strauss-Ayali et al. 2004). Ferreira et al. (2008) observaram um melhor desempenho na PCR convencional ao utilizarem amostras colhidas com *swab* conjuntival em comparação ao creme leucocitário e sangue total embebido em papel filtro, sendo que o penúltimo apresentou a segunda melhor performance. A pele é um dos tecidos onde se encontra o parasito com maior frequência nos cães e a PCR de biópsia deste tecido tem demonstrado excelentes resultados (Solano-Gallego et al. 2001a). Entretanto, a utilização deste material biológico é mais complexa, pelo fato do proprietário muitas vezes não consentir com o procedimento de coleta, que demanda anestesia. O aspirado de linfonodo apresenta excelente sensibilidade e especificidade (Lachaud et al. 2002a; Oliva et al. 2006), mas pelo fato de ser um procedimento de difícil execução, além de invasivo, torna-se impraticável na rotina dos serviços de controle de zoonoses; fato semelhante ocorre com a coleta de medula óssea, que além de invasiva, não demonstra boa sensibilidade pela PCR (Solano-Gallego et al. 2001a).

Atualmente, além da PCR convencional, há variações da técnica como a nested-PCR e a PCR em tempo real (Gomes et al. 2008; Maia & Campino 2008; Miro et al. 2008), sendo a PCR em tempo real o maior avanço técnico, por ser uma ferramenta que

permite a automação, além de possibilitar a quantificação da carga parasitária e possuir maior sensibilidade que a PCR convencional (Francino et al. 2006).

Até o momento não é sabido se animais soronegativos e PCR positivos são resistentes imunologicamente a *Leishmania* ou se desenvolverão a doença, podendo-se afirmar apenas que tiveram contato prévio com o parasito. Os resultados obtidos neste trabalho são relevantes, pois entre as estratégias do PCVL a priorização das áreas a serem trabalhadas e a avaliação dos resultados alcançados, considera a positividade canina como um dos indicadores analisados.

7.2 Planejamento do estudo e entrevistas

O atual trabalho, por ser realizado em animais domiciliados, possibilitou a obtenção de informações que permitiram uma análise detalhada dos fatores de risco relacionados à infecção canina por *L. infantum*.

Algumas considerações metodológicas que foram empregadas para minimizar possíveis erros sistemáticos serão comentadas. Estes erros denominam-se bias (viés ou vício) e são introduzidos em qualquer estágio do estudo (desenho, condução e análise) tendendo a produzir resultados que se afastam sistematicamente dos valores verdadeiros (Last 2007).

Neste estudo uma possibilidade de erro é o decorrente de vício de seleção, uma vez que o trabalho foi conduzido em duas áreas e não houve sorteio dos domicílios amostrados. As áreas investigadas são representativas da Regional Noroeste com relação à presença de casas, prédios de apartamentos e vilas ou favelas. No entanto, este estudo não teve como pretensão estudar uma amostra representativa da cidade de Belo Horizonte, e sim avaliar a prevalência da infecção por PCR-RFLP em cães soronegativos e estudar fatores de risco relacionados à infecção. Os fatores de risco identificados, assim como os resultados encontrados quanto à infecção canina detectada por método molecular ou sorológico, provavelmente podem ser extrapolados para outras áreas de Belo Horizonte. Além disso, os resultados de reatividade canina encontrados no teste de ELISA pelo LZON durante o trabalho são semelhantes aos reportados em outras áreas da Regional Noroeste, bem como em outras Regionais de Belo Horizonte (dados não mostrados).

A conduta para seleção da amostra foi adotada, devido à logística necessária para a execução deste trabalho. A Gerência de Zoonoses da Regional Noroeste de Belo Horizonte disponibilizou apoio pessoal e logístico, cedendo agentes de combate a

endemias do PCLV para a realização das coletas de material biológico, além de transporte para o trabalho de campo. Sendo assim, os objetivos propostos no projeto de pesquisa foram conciliados às atividades dos agentes e o trabalho foi realizado na área de abrangência que naquele momento estava iniciando o inquérito canino censitário. É importante ressaltar que a presença dos agentes da PBH facilitou o acesso às residências, reduzindo possíveis recusas.

A realização da entrevista foi planejada e registrada em questionário previamente testado e codificado. Na fase de elaboração, foi considerada a importância da utilização de questionários como instrumentos de obtenção de informações. Para evitar a introdução de bias durante sua aplicação, os entrevistadores receberam treinamento prévio, para que as entrevistas fossem realizadas de maneira idêntica e padronizada. Com o objetivo de evitar bias temporal ou de memória, as entrevistas foram estruturadas excluindo perguntas subjetivas, que pudessem gerar confusão ou falhas de memória e o questionário, estruturado com linguagem simples, evitando dificuldades de entendimento por parte dos entrevistados. Ao final de cada dia de trabalho foram discutidas e sanadas as dúvidas apresentadas naquele momento. Além disso, para verificar a forma de condução das entrevistas, houve monitoramento dos entrevistadores, verificando e garantindo que as instruções recebidas fossem adequadamente seguidas. Os questionários foram conferidos diariamente para identificar possíveis incoerências nas respostas.

Durante o estudo transversal, o primeiro contato com a população fez com que alguns entrevistados aceitassem participar sem a exata compreensão dos reais objetivos do projeto, sendo necessárias novas explicações. À medida que estas questões foram detectadas, a entrevista sofreu alterações visando maior esclarecimento não somente dos objetivos propostos, mas também da maneira como seria conduzida, deixando claro aos proprietários, fatos como a autonomia na participação da pesquisa, bem como o direito à recusa ou desistência, em qualquer momento do trabalho. É importante ressaltar que o questionário utilizado não foi modificado no decorrer da investigação, garantindo uma padronização na conduta das entrevistas.

Informações a respeito de aspectos clínico-epidemiológicos e socioeconômicos, além de outros elementos importantes para o entendimento da epidemiologia da LVH e LVC no ambiente urbano foram abordados no questionário. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que a maior parte da população conhece a LV. Entretanto, quando questionada sobre outros aspectos da doença observou-se um

limitado conhecimento dos sinais e sintomas clínicos, como o fato de poucas pessoas mencionarem hepatoesplenomegalia. O sintoma clínico mais mencionado foi febre., Silva et al. (2001a) observaram que a febre é o sintoma mais comum da LVH, presente em praticamente todos os pacientes, seguido da hepatoesplenomegalia (Silva et al. 2001a). Borges et al. (2008) demonstraram, através de um estudo caso-controle, que metade dos casos desconhecia completamente a LV antes de adquirir a infecção e apenas 3,7% conheciam os sintomas da doença. Já entre os controles, a doença era desconhecida para 30,5%, e 4,3% conheciam os sinais e sintomas clínicos. Estes dados indicam que os materiais educativos, distribuídos pelo serviço de saúde pública, não têm surtido o efeito esperado na informação da população, conforme já demonstrado anteriormente (Luz et al. 2005). Neste trabalho foi observado um baixo nível de conhecimento sobre a LVH entre estudantes e usuários do serviço de saúde de Belo Horizonte, Minas Gerais/Brasil (Luz et al. 2005). Já em localidades que apresentam uma elevada incidência de casos humanos observa-se maior conhecimento acerca dos sinais e sintomas (Gama et al. 1998).

O conhecimento das pessoas em relação ao vetor da leishmaniose foi restrito no presente estudo. Resultados semelhantes foram encontrados por Borges et al. (2008) em um estudo caso-controle, onde foi observado que apenas 1,2% dos casos e 3% dos controles conheciam o vetor.

Sobre a sintomatologia no cão, principal reservatório doméstico, quase a metade dos entrevistados foram capazes de citar sinais clínicos da LVC, principalmente onicogribose e feridas pelo corpo, que são os sinais mais frequentes da doença (Reis et al. 2009; Teixeira Neto et al. 2010). Estes dados mostram que uma parcela da população da área é capaz de reconhecer cães naturalmente infectados que manifestam sinais clínicos da LVC. Uma possível explicação para este fato é a elevada prevalência de cães doentes, significativamente maior que o número de casos humanos, sofrendo estes animais ação direta do PCLV, o que tornou a LVC mais compreendida que a LVH. De forma interessante, foi observado o entendimento dos proprietários quanto à necessidade de permitir a eutanásia do animal diante do exame sorológico positivo. Este achado aponta para uma repercussão positiva, nesse aspecto, dos trabalhos educativos de saúde pública sobre a população. Entretanto, é importante atentar para a possibilidade de alguns dos entrevistados terem afirmado entregar o animal à zoonoses devido a presença dos agentes no momento da entrevista.

7.2.1 Fatores de risco para infecção canina por *L. infantum* no estudo transversal

A identificação de fatores de risco associados à infecção canina e humana é uma importante ferramenta epidemiológica que permite uma melhor compreensão da expansão e urbanização da LV. O conhecimento desses fatores, determinantes para a infecção canina, é essencial à saúde pública, uma vez que possibilitam o planejamento de estratégias que visam a redução do número de casos de LVC e conseqüentemente, LVH. Devido à relevância do cão neste contexto, o estudo de fatores de risco para LVC pode auxiliar nas ações do PCLV no Brasil.

Vários autores identificaram fatores de risco da infecção por *Leishmania* em humanos (Costa et al. 2005; Moreno et al. 2005; Oliveira et al. 2006; Borges et al. 2008; Borges et al. 2009). Nesse contexto, inúmeros trabalhos têm demonstrado que precárias condições socioeconômicas e de moradia, desnutrição, movimentos migratórios, presença do vetor e do reservatório no ambiente doméstico favorecem a LVH (Bern et al. 2000; Desjeux 2001; Costa et al. 2005; Moreno et al. 2005; Oliveira et al. 2006; Borges et al. 2008; Kolaczinski et al. 2008; Bashaye et al. 2009; Boelaert et al. 2009; Borges et al. 2009). Entretanto, pouco se sabe sobre os fatores de risco para a infecção no cão, principal reservatório doméstico da LV. Alguns estudos avaliam a soroprevalência da LVC abordando questões de susceptibilidade à infecção relacionadas à raça, porte, pelo e idade (Sideris et al. 1996; Franca-Silva et al. 2003; Moreira et al. 2003; Mohebbali et al. 2005); entretanto, poucos analisam as variáveis relacionadas ao ambiente onde o cão está inserido e seu comportamento (Cabrera et al. 2003; Almeida et al. 2009; Galvez et al. 2010). Até o momento, raros estudos investigaram potenciais fatores associados à infecção canina por *L. infantum*. Características relacionadas ao domicílio e peridomicílio, nível socioeconômico, cuidados do proprietário com o cão e comportamento do animal devem ser melhor investigados, visando compreender a importância deste hospedeiro na manutenção da LV no ambiente urbano.

Buscando uma melhor compreensão desses fatores, o presente trabalho comparou, em um primeiro momento, cães soronegativos/PCR-RFLP⁺ para *L. infantum* (infectados) com cães soronegativo/PCR⁻ (não infectados). Posteriormente foram avaliados os fatores relacionados à infecção e soroconversão durante o estudo de coorte. Constatou-se que as condições socioeconômicas, o peridomicílio, a presença do vetor no domicílio, as características e o comportamento do cão estão associados à infecção.

Através do modelo de regressão logística multivariada de efeito misto constatou-se que renda familiar inferior a um salário mínimo, proprietário conhecer o vetor, cão permanecer mais tempo no quintal e não ter realizado exame para LVC anteriormente, constituem fatores de risco para a infecção canina.

Observou-se que cães pertencentes à famílias com renda inferior a 1 salário mínimo apresentam até quatro vezes mais chance de se infectarem quando comparados aos animais que pertencem a famílias com renda superior a cinco salários mínimos. A renda familiar é uma variável *proxy* do status socioeconômico e provavelmente relaciona-se à estrutura dos domicílios mais vulneráveis. Entretanto, é importante registrar que a variável renda apresentou alto percentual de não resposta, principalmente entre os entrevistados que apresentaram alta escolaridade. Estudo conduzido por Oliveira et al. (2006) na Região Metropolitana de Belo Horizonte mostrou associação entre doença humana e baixa renda familiar. Estes dados também são compatíveis com a literatura que afirma ser a LVH mais incidente em áreas de baixo nível socioeconômico (Alvar et al. 2006; Boelaert et al. 2009). Análises espaciais evidenciaram relação entre condições socioeconômicas e a emergência da LV em centros urbanos, demonstrando que a manutenção/expansão da doença está intimamente relacionada à organização urbana, ocupação de suas áreas periféricas e regiões menos favorecidas (Werneck et al. 2002; Margonari et al. 2006).

Foi observado pouco conhecimento da população sobre o flebotomíneo. Apesar disso, observou-se ainda que cães de proprietários que conhecem o vetor têm aproximadamente duas vezes mais chance de se infectar, quando comparados a cães de proprietários que desconhecem os flebótomos. Esta associação também foi observada por Moreno et al. (2005) na Região Metropolitana de Belo Horizonte, onde pessoas que conhecem o vetor apresentam até seis vezes mais chances de adquirir a infecção comparado aos que não o conhecem. Já Borges et al. (2008) demonstraram que conhecer o vetor diminui o risco de infecção em 0,79 vezes. A região trabalhada no presente estudo apresenta alta densidade de *Lu. longipalpis* segundo trabalho sobre distribuição vetorial conduzido por Margonari et al. (2006). Portanto, estes resultados sugerem que os entrevistados viram o vetor em suas residências ou nas proximidades.

A variável “onde o cão permanece maior parte do tempo” demonstrou que os animais que permanecem no quintal têm duas vezes mais chance de adquirir a infecção quando comparados aos que ficam mais tempo dentro da casa. Resultado semelhante foi obtido por Gálvez et al. (2010) que observaram uma OR de 3,38 ao avaliar esta variável.

Em relação ao local de maior exposição canina à infecção, Cabrera et al. (2003) e Moreira et al (2003), verificaram que o confinamento dos cães não pareceu influenciar a infecção pela *L. infantum*, ou seja, o risco de infecção na residência não difere do risco de frequentar a rua ou a mata, demonstrando que o cão também é infectado sem sair dos quintais das residências. Outro trabalho também demonstrou que a soroprevalência de LVC é maior em cães que ficam grande parte do tempo no quintal de sua residência, inclusive dormindo neste local, devido à elevada densidade vetorial encontrada neste ambiente (Martin-Sanchez et al. 2009). Algumas medidas preventivas podem ser utilizadas para reduzir o risco de infecção canina como: (i) manter o cão em canis fechados durante o período de maior atividade do vetor; (ii) reduzir os microambientes que favorecem a adaptação do flebótomo próximo aos locais de permanência do cão e (iii) usar inseticidas e coleiras com repelente (Alexander & Maroli 2003; Solano-Gallego et al. 2009). Entretanto, para que estas medidas sejam adotadas é necessário que a população tenha maior conhecimento da doença. Foi observado que somente 35,5% dos entrevistados afirmaram saber da importância dos cães na transmissão da leishmaniose e 45,5% conhecem os sintomas da doença no cão, apesar de 22,8% dos proprietários relatarem a ocorrência de casos anteriores de LVC no domicílio.

Os animais que não realizaram exame sorológico têm mais chances de estarem infectados do que os cães que realizaram sucessivos exames sorológicos durante os inquéritos caninos do PCLV. Isto demonstra que os exames de rotina vem detectando parte dos animais infectados, e os cães que permanecem negativos em testes sorológicos sucessivos têm menos chance de estarem infectados. Além disso, a reposição de cães na área é grande e estes animais são mais susceptíveis à infecção por *L. infantum*. (Dye 1996; Ashford et al. 1998; Palatnik-de-Sousa et al. 2001).

7.2.2 Fatores de risco para infecção canina por *L. infantum* durante a coorte

Em estudos de coorte, é comum a ocorrência de bias devido à perda de seguimento; entretanto, no presente trabalho os cães que saíram do estudo não diferiram dos que se mantiveram em seguimento na comparação de algumas características.

Quando as variáveis foram avaliadas no modelo de Cox, observou-se que as residências com parede sem reboco e as que apresentam casos prévios de LVC oferecem maior risco de infecção para o cão, além disto cães que fogem para a rua e possuem pelo curto também se encontram em maior risco. A variável "parede"

demonstra a condição de moradia e socioeconômica da família proprietária do animal. Casas com parede sem reboco geralmente apresentam pior infraestrutura, o que pode favorecer o aparecimento e proliferação do vetor. Em um estudo caso-controle conduzido no Nepal foi observado que rachaduras nas paredes da casa constituem fator de risco para leishmaniose humana (Bern et al. 2000). Costa et al. (2005), em um estudo caso-controle realizado em Teresina, Piauí, não observaram associação entre parede, teto, piso e suprimento de água com o risco de contrair infecção por *L. infantum* nesta localidade; entretanto, observou que as casas com coleta irregular de lixo e inadequado sistema de esgoto constituem fatores de risco para a LVH, demonstrando assim que serviços públicos básicos são importantes no controle da disseminação da doença (Costa et al. 2005). No atual estudo, quase todos os domicílios avaliados possuem rede de esgoto e serviço de coleta de lixo, impossibilitando a detecção da influência desses fatores na infecção canina. Acreditamos que a variável "parede" esteja mais relacionada com as condições socioeconômicas e de infraestrutura; entretanto, segundo Deane & Deane, (1962) as paredes sem reboco podem oferecer esconderijos para os flebotomíneos através de frestas, já que a ocorrência de *Lu. longipalpis* em fendas e rachaduras das paredes internas em casas de adobe foi relatado por estes autores em áreas endêmicas do nordeste brasileiro. A presença dessas frestas poderia então, estar facilitando o contato dos vetores com os cães.

Foi observado que os domicílios onde já houve caso de LVC constituem risco de infecção para o cão. Este achado deve-se ao fato desta residência provavelmente possuir ambiente propício ao desenvolvimento do vetor, tornando o local favorável a novos casos. Borges et al. (2009), ao avaliar a associação entre LVC e LVH, observou que residências com histórico de casos caninos são mais propensas ao surgimento de casos humanos.

Cães que fogem para a rua apresentaram maior risco de se infectar quando comparados a animais que não fogem. Os cães que fogem geralmente ficam mais expostos ao vetor, uma vez que podem frequentar regiões de mata e terrenos baldios com vegetação abundante, o que propicia sua infecção (Rondon et al. 2008). Estes ambientes geralmente apresentam grande quantidade de matéria orgânica em decomposição, o que favorece o desenvolvimento e proliferação do vetor (Brasil 2006). Outros trabalhos demonstram que o acesso à rua constitui fator de risco para LVC (de Oliveira & de Araujo 2003; Naveda et al. 2006); outros autores, entretanto, não encontraram esta associação (Cabrera et al. 2003; Almeida et al. 2009).

Foi observado que cães de pelo curto tem mais chance de se infectar, quando comparado aos de pelo longo. Possivelmente o pelo curto torna o cão mais vulnerável às picadas do flebotomíneo e conseqüentemente, à infecção por leishmaniose. Moreira et al. (2003) aventaram a possibilidade de o animal de pelo curto atrair mais facilmente o vetor, uma vez que o calor irradiado da sua pele seria mais facilmente percebido pelo vetor. Em estudo realizado em Montes Claros, estado de Minas Gerais, Fañça-Silva et al. (2003) constataram que a soroprevalência de LVC é maior em cães de pelo curto quando comparada a observada em cães de pelo longo. Durante um estudo conduzido na Grécia, Sideris et al (1996) avaliaram cães com suspeita de LVC e constataram que cães da raça Collie são menos susceptíveis a infecção que Dobermann, sugerindo que o pelo protege o cão da picada do flebotomíneo (Sideris et al. 1996). Outros trabalhos também sustentam este resultado (Moreira et al. 2003; Oliveira et al. 2010).

7.2.3 Fatores de risco para soroconversão ao longo da coorte em cães infectados

Ao avaliar, através do modelo de Cox, os fatores de risco para soroconversão do cão infectado, foram observados que fatores como: presença de entulho no quintal e porte do animal estão associados ao risco de soroconversão.

A variável entulho no quintal representa as condições do peridomicílio. Com base nos outros fatores de risco anteriormente discutidos, observamos que animais que passam a maior parte do tempo no quintal têm maior risco de se infectar. Possivelmente isto ocorre devido às precárias condições de higiene neste microambiente, o que pode favorecer a proliferação do vetor. Tal fato demonstra a necessidade de maior esclarecimento da população quanto à manutenção da limpeza no quintal, conservando o local livre de entulhos e matéria orgânica, que tornam o ambiente propício ao flebotomíneo.

Cães de grande porte possuem duas vezes mais risco de soroconverter que animais de pequeno porte. Este achado pode ser atribuído à maior superfície corporal do cão exposta ao vetor. Além disso, cães de grande porte geralmente permanecem mais tempo no quintal das residências e dormem neste local, o que constitui um fator de risco conforme discutido anteriormente. Tem-se demonstrado que cães de área endêmica expostos podem ser picados por centenas de flebótomos durante a noite (Gomez-Saladin et al. 2005). Esta exposição contínua pode favorecer a soroconversão e o desenvolvimento da doença, visto que o parasito é continuamente reintroduzido (Solano-Gallego et al. 2009). Durante avaliações epidemiológicas nas regiões sudeste e

sul da Espanha, observou-se que a soroprevalência de LVC aumenta gradualmente com o porte do animal sendo esta característica, um fator de risco para a doença (Martinez-Sanchez et al. 2009; Galvez et al. 2010), fato que sustenta nossos resultados.

A leishmaniose surgiu em Belo Horizonte no final da década de 80. Nessa época, a doença coexistiu em áreas caracterizadas por precárias condições socioeconômicas (Borges et al. 2009). Atualmente o município encontra-se em processo de transmissão ativa, sendo a LV encontrada em todas as regiões da cidade (Margonari et al. 2006). O Brasil enfrenta nova realidade no padrão epidemiológico da leishmaniose visceral, advinda do processo de urbanização da doença. Neste trabalho buscamos características dos domicílios que pudessem identificar aqueles com maior vulnerabilidade à presença do vetor e à transmissão da LVC. Diferenças intraurbanas, principalmente em uma cidade de grande porte como Belo Horizonte, propiciam a integração e interação de vários cenários com características epidemiológicas distintas.

A identificação dos fatores de risco à infecção canina são de grande importância, uma vez que o cão é o principal reservatório urbano e apresenta intenso parasitismo cutâneo, comportando-se como fonte de infecção para os vetores (Abranches et al. 1991; Gramiccia & Gradoni 2005; Giunchetti et al. 2006). Dessa forma, o conhecimento de fatores associados à infecção pode orientar os proprietários e serviços de saúde na adoção de medidas que reduzam o risco de infecção canina, contribuindo para um maior controle da doença.

7.3 Biomarcadores: resposta humoral, celular e síntese de citocinas

De modo geral, em leishmaniose visceral observa-se que as manifestações clínicas e o desenvolvimento da infecção por *L. infantum*, seja no homem ou no cão, é atribuída a uma grande rede de interações entre a genética do parasito e a resposta imune do hospedeiro. Nesse contexto, a LVC apresenta um espectro clínico semelhante à infecção humana, podendo apresentar variado quadro de manifestações, desde uma infecção assintomática que pode evoluir para um estágio intermediário com poucos sinais clínicos (oligosintomática), ou para uma forma sintomática de curso agudo ou crônico (Reis et al. 2009). A história natural da LVH e LVC tem sido correlacionada com supressão da resposta celular, dependente de células T, exacerbação da resposta humoral em consequência de uma intensa atividade policlonal de linfócitos B, incapacidade de macrófagos em eliminar os parasitos e balanço de citocinas que tendem

para uma resposta Tipo 2 com forte participação de IL-10 durante a evolução da doença (Santos-Gomes et al. 2002; Carvalho et al. 2005; Peters & Sacks 2006; Reis et al. 2009).

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível propor uma nova classificação clínica a partir da anterior, proposta por Mancianti et al. (1988) e revista por Reis et al. (2010). O emprego do diagnóstico molecular associado a sorologia permitiu reclassificar os cães assintomáticos, que representam em média 70% dos animais de uma área endêmica, de acordo com seus resultados. Assim, recategorizamos a forma assintomática da LVC em: cães assintomáticos I (CA-I) cães soronegativos/PCR⁺ e cães assintomáticos II (CA-II) animais com sorologia e PCR positiva. Neste cenário, foi investigada a resposta imune humoral através de um estudo detalhado de classes e subclasses de imunoglobulinas (IgG, IgG1, IgG2, IgM, IgA e IgE); a resposta imune celular por meio da imunofenotipagem de leucócitos circulantes por citometria de fluxo (linfócitos T-CD5⁺, T-CD4⁺, T-CD8⁺, B-CD21⁺ e monócitos CD14⁺), além de parâmetros hematológicos. Posteriormente, em uma subamostra selecionada da coorte ampliamos a busca por biomarcadores imunológicos, através da investigação da produção de citocinas IFN- γ e IL-4 pelas subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺). Tais avaliações buscaram a identificação de biomarcadores de resistência e susceptibilidade, além da melhor compreensão da história natural da doença, no contexto desta nova recategorização das formas clínicas. Essa abordagem permitiu melhor compreensão destes biomarcadores em cães assintomáticos.

7.3.1 Resposta humoral

Os resultados de resposta imune humoral observados neste trabalho enfatizam que a progressão da LVC é de fato caracterizada pelo aumento de determinadas classes e subclasses de imunoglobulinas, tais como IgG, IgG2, IgM e IgA, que podem contribuir para o agravamento do status clínico-patológico da infecção, conforme já descrito por outros autores (Reis et al. 2006d; Rodriguez et al. 2006; Rodriguez-Cortes et al. 2007). No presente trabalho ficou evidenciado, conforme esperado, que o grupo CA-I (soronegativo/PCR⁺) apresenta perfil similar de imunoglobulinas quando comparado ao grupo controle (CN) e cães CA-II (soro e PCR positivo) apresentavam níveis elevados de IgG, IgG2, IgM e IgA similares aos grupo de cães sintomáticos (CS). Estes resultados sugerem que animais do grupo CA-II estão apresentando LVC ativa, em evolução progressiva, devido à intensa atividade policlonal de células B, o que

dificulta o controle da infecção e ao mesmo tempo favorece o agravamento do quadro clínico (Reis et al. 2006d; Teixeira Neto et al. 2010). Por outro lado, cães do grupo CA-I possivelmente apresentam baixa carga parasitária e parecem conseguir controlar o parasito, sendo o mesmo detectado apenas por métodos moleculares. O controle da replicação do parasito nos tecidos impediria a produção de IgG específica anti-*Leishmania*, impossibilitando sua detecção pela sorologia convencional. Adicionalmente, nossos resultados indicam que os cães do grupo CA-I tem um forte perfil imunológico de resistência, fato que carece de ampla investigação. A averiguação desta hipótese permitirá melhor compreensão dos mecanismos envolvidos durante esta fase da infecção, capazes de conferir imunidade protetora contra *L. infantum*. Torna-se importante então, atentar para os perfis imunes observados nos grupos de cães assintomáticos (CA-I e CA-II), uma vez que estes apresentam comportamento distinto durante a história natural da doença.

Tem sido proposto por alguns autores que IgG2 apresenta associação com infecção sintomática (Bourdoiseau et al. 1997; Cavaliero et al. 1999; Boceta et al. 2000; Leandro et al. 2001; Solano-Gallego et al. 2001b; Fernandez-Perez et al. 2003; Cardoso et al. 2007), enquanto IgG1 apresenta associação direta com a forma assintomática da LVC (Reis et al. 2006d). Outros autores acreditam que a IgG1 esteja mais associada à forma sintomática na doença (Bourdoiseau et al. 1997; Cavaliero et al. 1999; Leandro et al. 2001; Fernandez-Perez et al. 2003; Cardoso et al. 2007).

Estudos prévios mostram que cães assintomáticos podem produzir não somente IgG específica, mas também IgA e IgM. Estes isotipos têm sido detectados em altas concentrações durante a forma sintomática da LVC (Reis et al. 2006d; Rodriguez et al. 2006; Rodriguez-Cortes et al. 2007). Embora IgM seja usualmente considerada uma imunoglobulina de fase aguda, tem sido demonstrada a sua detecção também durante a fase crônica da doença (Reis et al. 2006d; Rodriguez et al. 2006). A IgA é o principal anticorpo responsável pela imunidade nas mucosas, podendo sua produção iniciar quando a *Leishmania* se espalha por diferentes órgãos, incluindo as mucosas (Rodriguez-Cortes et al. 2007). Desta forma, Reis et al. (2006c) sugerem que a reatividade de IgA seja um marcador de parasitismo tecidual na LVC que encontra-se elevada após marcante disseminação do parasito em diversos órgãos linfóides e sua consequente replicação nestes sítios. Observou-se no presente estudo, o achado de altos níveis de IgE grupo CS quando comparados a CA-I, podendo a explicação para este fato ser a associação observada entre níveis elevados de IgE e grave sintomatologia da LVC.

Adicionalmente, estes cães apresentam forte associação com aumento da carga parasitária e perfil de resposta imune Tipo 2 (Almeida et al. 2005a; Iniesta et al. 2005; Reis et al. 2006d; Guerra et al. 2009). Com base nos dados de resposta humoral, torna-se possível sugerir o emprego destes biomarcadores no monitoramento da progressão clínica da LVC, como ferramenta prognóstica para avaliar a evolução natural da doença. Além disto, estes biomarcadores permitem predizer o grau de comprometimento sistêmico ocasionado pela disseminação do parasito, que é seguido de elevada atividade policlonal de linfócito B repercutindo no agravamento do quadro imunopatológico do animal, e até mesmo em sua evolução para óbito (Reis et al. 2009; Reis et al. 2010).

Certamente a manutenção da forma assintomática ou a evolução para formas graves durante a LVC estão associadas a uma rede de interações imunológicas multifatoriais, não apenas relacionados à intensa produção de anticorpos, que a priori pouco influenciam na proteção do hospedeiro. Este fato é coerente, pois durante a evolução da doença observa-se elevados níveis de anticorpos associados de um modo geral, à elevadas cargas parasitárias e à diversas manifestações clinico-patológicas da LVH e LVC, tais como insuficiência renal, pneumonites intersticiais, edemas de membros inferiores, dentre outros (Murray et al. 2005; Reis et al. 2009; Reis et al. 2010).

7.3.2 Resposta celular

No presente estudo, também incluímos alguns parâmetros da resposta imune celular, através da avaliação do hemograma convencional e da técnica de imunofenotipagem, detalhando os principais fenótipos celulares por citometria de fluxo. Embora estudos prévios sobre parâmetros hematológicos tenham encontrado como única alteração da série branca, a linfocitose em cães assintomáticos soropositivos (Reis et al. 2006b), no presente trabalho foi demonstrado uma diminuição no número de eosinófilos em CA-II e CS quando comparados aos grupos CA-I e CN. Desta forma é possível supor que após soroconversão os cães já manifestam uma eosinopenia que é mantida até a forma sintomática grave, conforme evidenciado anteriormente por Reis et al. (2006a). O decréscimo de eosinófilos em cães infectados com *Leishmania* tem sido associado não apenas à doença sintomática (Reis et al. 2006b), mas também à densidades parasitárias teciduais médias e altas no baço e pele, respectivamente (Guerra et al. 2009). De forma semelhante ao observado por Reis et al. (2006a) foi detectado,

linfocitose no grupo CA-II e linfopenia no grupo sintomáticos (CS). Estes dados são interessantes, pois demonstram uma população maior de linfócitos B e/ou T em CA-II, sendo que estes animais sofrem uma supressão pan- linfocitária T e B ao evoluírem para a forma grave (Reis et al. 2009; Reis et al. 2010). Esta explicação poderá ser melhor compreendida durante a abordagem referente a avaliação fenotípica das populações e subpopulações de linfócitos, por citometria de fluxo, discutida a seguir.

Para uma melhor compreensão da resposta imune celular, o presente estudo avaliou diferentes biomarcadores, com foco na fase assintomática da LVC. Uma análise do perfil imunofenotípico foi realizada em leucócitos circulantes por citometria de fluxo, caracterizando a resposta imune nos subgrupos de cães assintomáticos (CA-I e CA-II) em comparação a cães sintomáticos (CS), naturalmente infectados por *L. infantum* e cães não infectados (CN). Foi demonstrado, pela primeira vez na literatura, que cães dos grupos CA-I e CA-II apresentam valores absolutos de linfócitos T CD5⁺ (marcador de linfócitos T em cães) similares entre si e superiores em relação ao grupo CS (Coura-Vital et al. 2011). O aumento de células T CD5⁺ foi anteriormente demonstrado por outros autores na forma assintomática da LVC (equivalente ao CA-II deste estudo), bem como em cães com baixa carga parasitária na medula óssea (Reis et al. 2006c). Estes autores também demonstraram queda no número absoluto destas células na forma sintomática da LVC. Uma vez confirmados alguns achados sobre o linfócito T (CD5⁺), investigou-se a contribuição das subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) nos diferentes grupos clínicos aqui propostos.

Observou-se que estas subpopulações comportam-se de forma distinta entre os subgrupos de cães assintomáticos. Interessantemente, no grupo de cães CA-I, a principal subpopulação que contribui para o aumento de T (CD5⁺) é a de linfócitos T CD4⁺, enquanto em CA-II é a de linfócitos T CD8⁺. Estes novos achados podem auxiliar na compreensão dos eventos envolvidos na resposta imune adaptativa face a infecção canina por *L. infantum*. Considerando que os cães do grupo CA-I apresentam aumento de linfócitos T CD4⁺ circulantes e que estes animais possuem uma infecção com característica subpatente, sendo detectados apenas pela PCR, podemos sugerir que eles apresentam um perfil de resposta imune relacionado à resistência (Coura-Vital et al. 2011). Nesse sentido, provavelmente os linfócitos T CD4⁺ participam ativamente na manutenção do equilíbrio parasito/hospedeiro, e até mesmo em seu controle, sem excluir a importância dos linfócitos T CD8⁺ e de outros elementos deste processo. Os linfócitos T CD8⁺ possivelmente são ativados quando se inicia a produção e circulação

de anticorpos, mantendo o cão ainda na forma assintomática (CA-II) e com baixa carga parasitária, entretanto já é possível sua detecção e quantificação à microscopia, conforme demonstrado por alguns autores (Reis et al. 2006c; Giunchetti et al. 2008b; Giunchetti et al. 2008c; Guerra et al. 2009; Reis et al. 2009; Reis et al. 2010). A subpopulação de linfócitos T CD8⁺ parece exercer atividade citolítica em macrófagos infectados por *L. infantum* (Pinelli et al. 1995), evitando assim a progressão clínica da doença. Considerando o fato dos cães do grupo CA-II apresentarem concomitantemente elevado número de linfócitos T CD8⁺, eosinopenia e anticorpos circulantes, é possível especular uma provável contribuição de mecanismos relacionados à citotoxicidade celular mediada por anticorpo. Estes mecanismos são alvo de estudos que estão sendo realizados em nosso grupo, não apenas avaliando o envolvimento destas células, como também células NK caninas.

A redução na razão CD4⁺/CD8⁺ nos grupos CA-II e CS sugere uma distinta resposta imune celular após a soroconversão e progressão da doença. Este fato pode estar associado ao aumento do parasitismo tecidual, que promove aumento de linfócitos T CD8⁺ e ativação policlonal de imunoglobulinas, resultando na elevação nos níveis de IgG. Estes achados, associados ao grupo CA-II, parecem ser críticos na inibição da replicação parasitária e garantia da estabilidade na forma clínica assintomática. Já os cães sintomáticos, que apresentam níveis basais de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e redução da razão CD4⁺/CD8⁺, demonstram um padrão de suscetibilidade durante esta fase clínica da LVC. Este fato pode estar fortemente associado com a supressão da imunidade mediada por células na progressão da LVC (Pinelli et al. 1994; Reis et al. 2009; Reis et al. 2010).

A análise dos dados apontou aumento no número de linfócitos B CD21⁺, após a soroconversão, no grupo CA-II e decréscimo com a progressão da doença para a forma sintomática (CS). A análise de órgãos linfóides, em cães naturalmente infectados com *L. infantum*, revela áreas com aumento de células B, principalmente plasmócitos, que estão associados com uma expansão da produção de anticorpos anti-*Leishmania* (Martinez-Moreno et al. 1993). Estes achados sugerem uma migração preferencial de linfócitos B, presentes no sangue periférico, para os tecidos linfóides durante a evolução clínica para a forma ativa da LVC (CA-II e CS). Dessa forma, ocorre a ativação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, que conseqüentemente promovem uma ativação policlonal, repercutindo em aumento de anticorpos circulantes anti-

Leishmania. Condizente com esta hipótese, cães sintomáticos revelam redução nos valores absolutos de linfócitos B estando este fato, associado à migração preferencial desta população celular para os órgãos linfóides (Reis et al. 2006b; Reis et al. 2006c; Giunchetti et al. 2008b; Guerra et al. 2009; Reis et al. 2009). Por outro lado, no presente estudo evidenciamos que os linfócitos B CD21⁺ circulantes expandem-se na fase assintomática (CA-II), quando inicia o aumento nos níveis de anticorpos e posteriormente estas células migram para os órgãos linfóides, quando então ocorre a progressão clínica da doença (CS). Esta migração também pode estar envolvida com o papel que estas células exercem como células apresentadoras de antígenos (APC), promovendo a conexão T-B nestes compartimentos teciduais que se encontram amplamente parasitados (Giunchetti et al. 2008b; Giunchetti et al. 2008c).

No contexto das APC, destaca-se obviamente a participação de monócitos e macrófagos, pois não somente esta é a principal célula hospedeira do parasito como também a responsável por eliminá-lo através de mecanismos microbicidas, quando ativadas para esta finalidade. Em nosso estudo, um dado interessante foi observado em relação à população de monócitos CD14⁺ circulantes, onde CA-I apresentou-se em níveis aumentados quando comparado a CA-II, havendo além disso, queda nos níveis destas células em CA-II e CS em comparação aos grupos CN e CA-I. Nossos dados sugerem que os altos níveis de CD14⁺ no grupo CA-I podem ser fundamentais para o controle da disseminação e replicação parasitária tecidual. Além disto, estas células podem favorecer o estabelecimento de mecanismos de resistência durante a LVC. Os baixos níveis de CD14⁺ observados no grupo CA-II e CS sugerem uma migração destas células para os órgãos linfóides, na tentativa de conter a expansão dos parasitos nestes locais (Reis et al. 2009). Um atual questionamento que nosso grupo busca esclarecer está relacionado à capacidade diferencial de monócitos CD14⁺ em exercerem ação microbicida frente à infecção com promastigotas de *L. infantum in vitro*, quando co-cultivados com linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺). Estes estudos permitirão responder se os monócitos CD14⁺ circulantes de cães CA-I possuem capacidade microbicida semelhante ou distinta da observada em cães CA-II e CS, podendo ou não confirmar as hipóteses aqui explanadas.

Diante do exposto, percebemos que cães assintomáticos apresentam um espectro clínico dicotômico, capaz de influenciar a resposta imune humoral e celular. Neste contexto, foi possível evidenciar que os principais biomarcadores de cães do grupo CA-I são os monócitos CD14⁺ e linfócitos T CD4⁺, que encontram-se aumentados neste

grupo. Por outro lado, cães CA-II apresentam aumento no número de linfócitos T, principalmente T CD8⁺, acompanhado por decréscimo na razão T CD4⁺/CD8⁺. Além disso, cães do grupo CA-II apresentam aumento de linfócitos B CD21⁺ e decréscimo de monócitos CD14⁺ circulantes. Estes resultados podem explicar parcialmente a incapacidade de cães CA-II em controlar o parasitismo dérmico, comportando-se como fontes de amastigotas para o vetor. Entretanto esta hipótese requer maior investigação através do emprego de xenodiagnóstico nestes grupos clínicos. Estes resultados também mostram a existência de dois subgrupos na forma clínica assintomática da LVC, com biomarcadores capazes de distingui-los. Observou-se então que cães do grupo CA-I apresentam um fenótipo de resistência, enquanto os animais do grupo CA-II estão relacionados com fenótipo de suscetibilidade.

7.3.3 Síntese de citocinas

Diante do que foi exposto anteriormente, torna-se ainda mais evidente que a história natural da leishmaniose visceral canina é dependente de vários fatores tais como: carga parasitária, imunidade mediada por células, resposta humoral e produção de diversos mediadores imunológicos, destacando-se as citocinas. O amplo espectro clínico encontrado na LVC deve-se aos diferentes balanços estabelecidos entre estes fatores, sendo encontrados desde animais assintomáticos até cães que apresentam vários sinais clínicos (Reis et al. 2009). Fatores como o aumento da carga parasitária e da expressão de IL-10 e TGF- β , além da imunossupressão celular antígeno específica e um forte aumento nos níveis de IgG, IgM, IgA e IgE anti-*Leishmania* estão relacionados com a progressão clínica da doença. Por outro lado, aumento na expressão de IFN- γ e TNF- α e das subpopulações de células T (CD4⁺ e CD8⁺), além da proliferação celular após estimulação antígeno específica e teste intradérmico positivo, são fatores frequentemente relacionados com a resistência à infecção (Reis et al. 2010). Entretanto, alguns trabalhos demonstram que não há dados conclusivos, capazes de determinar os mecanismos imunológicos relacionados à resistência e suscetibilidade, devido a resultados conflitantes, principalmente aqueles relacionados ao perfil de citocinas (Lage et al. 2007; Alves et al. 2009; Carrillo & Moreno 2009; Panaro et al. 2009).

Estudos de infecção por *Leishmania major* em modelo murino, têm demonstrado que a resposta imune protetora contra leishmaniose é mediada por células T e citocinas (Wilson et al. 2005). As citocinas são produzidas em resposta a estímulos de patógenos

em função da ativação de células T e macrófagos influenciando a diferenciação das células T e promovendo o recrutamento de células efetoras para o local da inflamação (Strauss-Ayali et al. 2007). O mecanismo de resistência à infecção por *Leishmania* spp. é promovido por expansão de células Tipo 1, produtoras de IL-12, IL-18, IFN- γ e TNF- α , enquanto a suscetibilidade está associada à resposta do Tipo 2 com produção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Scott et al. 1989; Strauss-Ayali et al. 2007). Entretanto, na LVH e LVC esta dicotomia Tipo 1/Tipo 2 não é tão evidente, sendo mais comumente observado um perfil misto de citocinas Tipos 1 e 2 (Strauss-Ayali et al. 2007). Panaro et al. (2009), avaliando a expressão de citocinas em CMSP (Células Mononucleares do Sangue Periférico) de cultura em cães naturalmente infectados, sugere que a infecção por *L. infantum* induz uma resposta mista, Tipo 1/Tipo 2 em animais assintomáticos e sintomáticos, sendo que o último grupo de animais apresenta expressão maior de citocinas. Outros trabalhos envolvendo cães naturalmente infectados, ao analisarem a expressão de citocinas por PCR em tempo real, também sugeriram uma resposta mista durante o desenvolvimento das diferentes formas clínicas da LVC (Lage et al. 2007; Menezes-Souza et al. 2010). O mesmo foi observado por Santos-Gomes et al. (2002) em cães experimentalmente infectados.

O tipo de abordagem utilizada durante o estudo, empregando amostras de sangue total e a metodologia de estimulação curta *in vitro*, permite traçar rapidamente um perfil da resposta imune dos grupos estudados, possibilitando a análise simultânea de todas as populações de leucócitos presentes no sangue periférico, assim como a identificação das populações celulares produtoras das citocinas a serem pesquisadas. A utilização do sangue total incluindo o plasma, durante as estimulações, garante a avaliação da resposta específica frente a antígenos na presença de componentes autólogos solúveis. Tais componentes como anticorpos, receptores solúveis, citocinas, quimiocinas e outros elementos podem ser relevantes fisiologicamente, além de poderem estar contribuindo diretamente ou indiretamente para o tipo de resposta imune induzida pela *L. infantum*. Essa possibilidade é interessante uma vez que, em sua maioria, as técnicas de estimulação *in vitro* convencionais não permitem este tipo de avaliação. Dessa forma, trabalhando-se em um sistema com características mais próximas aquelas presentes *in vivo*, é possível a obtenção de informações mais detalhadas e precisas em relação à avaliação da resposta imune de um determinado hospedeiro frente a uma infecção (Sewell et al. 1997; Suni et al. 1998).

É relevante considerar, tendo em vista a participação de citocinas na regulação da resposta imune, que a capacidade de detecção de sua síntese por um determinado tipo celular é fundamental para que se possa obter simultaneamente, informações precisas sobre a frequência e as características fenotípicas de uma célula responsiva a um estímulo específico. A avaliação de citocinas produzidas por diferentes populações celulares contribui para o conhecimento da participação dos componentes do sistema imune em mecanismos imunopatológicos durante as infecções.

No presente estudo foi observado a priori, nos grupos CA-II e CS, a ocorrência de uma possível modulação na síntese intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 em linfócitos T CD4⁺ na presença de antígeno solúvel de *L. infantum*. Por outro lado, em linfócitos T CD8⁺ a presença de antígeno solúvel de *L. infantum* induz aumento da síntese de IFN- γ e IL-4 nos animais soropositivos (CA-II e CS). Recentemente Boggiatto et al. (2010) demonstraram que cães de caça (Foxhounds) naturalmente infectados por *L. infantum*, apresentam perfis imunológicos distintos, capazes de diferenciar infecção versus doença clínica. Estes autores observaram aumento de IgG e elevação progressiva na proliferação *in vitro* antígeno específica de CMSP com produção de IFN- γ em cães sintomáticos. Por outro lado, os cães sintomáticos deste estudo também apresentaram aumento na produção de IL-10, acompanhado por aumento progressivo na detecção de DNA do parasito em sangue total (Boggiatto et al. 2010). Estes autores concluem que a progressão da LVC esta relacionada ao aumento de IgG e IL-10, conforme observado anteriormente por pesquisadores de nosso grupo (Lage et al., 2007, Menezes-Souza et al., 2010).

Apesar da coincidência parcial entre o estudo anterior e os nossos resultados, até então não existe na literatura achados semelhantes em relação à imunomodulação de linfócitos T CD4⁺ sob ação de antígenos solúveis em culturas de curta duração; entretanto, admitimos que uma análise mais detalhada empregando a abordagem de células totais produtoras de citocinas possibilitaria evidenciar achados distintos daqueles observados pela análise percentual destas células. Tais achados sofreriam influência do número absoluto de cada subpopulação de linfócitos que foi adicionada no ambiente de cultura. Além disto, é importante ressaltar a necessidade de se avaliar a participação de outras citocinas importantes como IL-10, IL-12, TNF- α e TGF- β visando compreender melhor a imunidade celular do grupo de animais CA-I em relação ao grupo CS, sendo possível então, a verificação de outros marcadores de resistência e suscetibilidade.

Apesar do estímulo antigênico parecer imunomodular linfócitos T CD4⁺ e estimular os T CD8⁺ a produzir citocinas, percebemos que a principal fonte responsável pela síntese de ambas as citocinas (IFN- γ e IL-4) são os linfócitos T CD4⁺. Resultados semelhantes foram obtidos por Araújo et al. (2009), ao avaliar por citometria de fluxo, células produtoras destas citocinas em cultura de longa duração de cães vacinados com Leishmume[®] e Leishvaccin (Araujo et al. 2009).

Ao avaliarmos a síntese de IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺, observamos que não houve diferença na síntese desta citocina entre animais CA-II e CS, demonstrando que a priori, o IFN- γ não deve ser um indicador apropriado de resistência, quando avaliado por esta abordagem metodológica. Conclusões semelhantes foram sugeridas por outros pesquisadores, uma vez que cães assintomáticos e sintomáticos apresentam níveis similares desta citocina na medula óssea, baço e fígado (Quinnell et al. 2001b; Correa et al. 2007). Alguns trabalhos mostram uma correlação positiva entre IFN- γ e progressão clínica da infecção em culturas de CMSP (Poot et al. 2006; Sanchez-Robert et al. 2008; Panaro et al. 2009) no baço (Lage et al. 2007) e medula óssea (Quinnell et al. 2001b) de cães com alta carga parasitária. Outros trabalhos que investigaram a produção de IFN- γ em CMSP relacionaram a citocina como um fator de proteção, sendo expressa principalmente em animais assintomáticos (Chamizo et al. 2005; Strauss-Ayali et al. 2005; Carrillo et al. 2007; Alves et al. 2009). Menezes-Souza et al. (2010) observaram aumento na expressão de RNA mensageiro de IFN- γ e da razão INF- γ /IL-4 na pele de animais assintomáticos, quando comparados aos grupos controle e sintomático.

Avaliando a síntese de IL-4 pelos linfócitos T CD4⁺, foi notado um aumento na síntese desta interleucina após soroconversão, não tendo sido observado entretanto, diferença entre os grupos assintomático (CA-II) e sintomático (CS). Quinnell et al. (2001) demonstraram que IL-4 está associada à severidade da doença. Há relato de que a expressão inicial de IL-4 em células do baço tem importante papel na manutenção do parasito, mesmo na presença concomitante de IFN- γ (Strauss-Ayali et al. 2007). Em trabalho recentemente publicado, no qual foi acompanhado um grupo de cães experimentalmente infectados, observou-se que animais com baixo parasitismo quase não expressam IL-4 e cães com elevado parasitismo apresentam alta expressão. Baseado nesses fatos, os autores observaram que baixos níveis de IL-4 após a infecção pode ser um fator protetor contra a replicação do parasito (Sanchez-Robert et al. 2008). Com base nesses achados e em nossos resultados, podemos sugerir que animais do grupo

CA-I apresentam baixo parasitismo havendo por isso, pequena estimulação para síntese de IL-4 por linfócitos T, podendo ser esse um fator de proteção para este grupo. Santos-Gomes et al. (2002) observaram, durante a infecção canina experimental, baixa expressão de IFN- γ , IL-2 e IL-10 em CMSP nos primeiros meses de infecção.

De posse do conjunto de dados obtidos no presente estudo, que procurou avaliar a síntese intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, não foi possível evidenciar biomarcadores de resistência e suscetibilidade para os animais do grupo CA-I, considerando que estes animais apresentaram perfil semelhante ao do grupo CN. Entretanto, foi possível observar aumento da síntese de IFN- γ e IL-4 com a progressão clínica da doença, resultando em uma resposta mista Tipo 1 e 2.

Nesse sentido, pretendemos avançar com esta abordagem avaliando, através do estudo de coorte, as populações celulares avaliadas neste trabalho (CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺ e CD14⁺), bem como a expressão intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, no grupo CA-I. Esta abordagem possibilitará uma melhor investigação e identificação dos biomarcadores de evolução clínica para a LVC, permitindo maior compreensão dos mecanismos de resistência e suscetibilidade ou mesmo a proposição de biomarcadores de prognóstico, que terão grande impacto em estudos imunológicos para obtenção de vacinas.

8.0 Conclusões

8.1 Conclusões

Com base no conjunto de dados obtidos no presente estudo foi possível concluir:

- As técnicas sorológicas convencionais (ELISA e RIFI) subestimam o número de cães infectados. É recomendável análises de viabilidade para uma possível inclusão de técnicas moleculares no PCLV do Brasil.
- Um grande número de cães assintomáticos infectados (PCR⁺) têm se mantido nas áreas de transmissão, refletindo diretamente na não redução da soroprevalência canina.
- Há elevadas taxas de incidência de infecção canina em Belo Horizonte, indicando a necessidade de ampliar as investigações diagnósticas da LVC empregando técnicas moleculares.
- As técnicas moleculares são mais acuradas na identificação da LVC assintomática. Entretanto, é necessária otimização destas técnicas, para que possam ser empregadas em larga escala.
- O conhecimento da LVC sobrepuja o da doença humana (LVH). O conhecimento de fatores associados à infecção pode orientar proprietários e serviços de saúde na adoção de medidas que reduzam o risco de infecção canina.
- A maioria dos cães presentes em uma área de transmissão ativa de leishmaniose que encontra-se sob intervenção do PCLV é assintomática.
- Condições socioeconômicas, presença do vetor no domicílio, comportamento e características físicas do cão, estão associados à infecção.
- Cães de grande porte infectados (PCR⁺) e residentes em domicílios com precárias condições de higiene no peridomicílio possuem maior risco de soroconversão.

- Os cães assintomáticos (CA-I e CA-II) apresentam perfis distintos da resposta imunológica (humoral e celular), capazes de influenciar no controle da infecção com diferentes níveis de replicação, disseminação e visceralização do parasito.
- Não há ativação policlonal de linfócitos B durante a fase inicial da infecção, pois CA-I e CN apresentam perfis de resposta humoral semelhantes. Já em CA-II, há elevada atividade de células B com elevada produção de Ig(s), semelhante aos animais do grupo CS.
- Animais CA-I apresentam um perfil de resistência marcado por elevação de linfócitos T CD4⁺, monócitos CD14⁺ e ausência de anticorpos.
- O grupo CA-II apresenta um balanço entre o fenótipos de resistência e de suscetibilidade, pois observa-se aumento de linfócitos T CD8⁺, concomitantemente ao aumento de linfócitos B CD21⁺ e queda de monócitos CD14⁺ circulantes.
- Cães sintomáticos apresentam elevados níveis de Ig(s), além de marcada supressão de linfócitos T (CD4⁺, CD8⁺), linfócitos B CD21⁺ e monócitos CD14⁺ circulantes.
- Animais do grupo CA-I não diferem de animais CN na síntese intracelular de IL-4 e IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ neste contexto de avaliação.

9.0 Perspectivas

9.1 Perspectivas

Como perspectivas deste estudo temos o propósito de verificar, por meio do xenodiagnóstico, a capacidade de cães soronegativo/PCR-RFLP⁺ para *L. infantum* em infectar flebotomíneos. Esta abordagem assume importância, na medida em que haverá a oportunidade de investigar a importância dos animais assintomáticos soronegativos/PCR⁺ na cadeia epidemiológica da doença.

Além disso, propomos avaliar o perfil fenotípico de linfócitos T e suas subpopulações (CD4⁺ e CD8⁺), além de linfócitos B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺) em uma subamostra de animais soronegativos/PCR-RFLP⁺ para *L. infantum*, durante o estudo de coorte prospectivo. Será também avaliada a produção de citocinas nas subpopulações de linfócitos T em números absolutos, neste grupo de animais e em outros soropositivos. Tais abordagens possibilitarão investigar e identificar biomarcadores de progressão clínica na LVC, permitindo melhor compreensão dos perfis de resistência e suscetibilidade e até mesmo a proposição de futuros biomarcadores de prognóstico.

Análises estatísticas utilizando modelos de regressão multivariada para medidas repetidas serão realizados. Estes modelos permitirão avaliar ao longo do tempo, o efeito de covariáveis relacionadas ao cão (resposta imune, exames laboratoriais e comportamento dos cães) na infecção e soroconversão.

10.0 Apêndice



CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (FORMULÁRIO I)



“Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por Leishmania (Leishmania) infantum e identificação de biomarcadores de progressão clínica”

Informação ao Voluntário

Você está sendo convidado a participar da pesquisa que deseja conhecer a importância dos cães assintomáticos que apresentam infecção pelo agente causador da leishmaniose visceral. Para isto será necessário examinar e acompanhar os animais que não apresentarem exames sorológicos positivos por um período de aproximadamente dois anos em intervalos de seis meses. É nosso objetivo saber a relação de algumas situações e atitudes da população quanto a doença. Este trabalho está sendo desenvolvido em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte e para que ele aconteça precisamos que você possa nos receber em seu domicílio. Você responderá algumas perguntas e coletaremos amostras de sangue de seu(s) cão(es). Este estudo também quer saber de seu conhecimento a respeito da doença, do vetor (mosquito) e do cão. Pedimos que você colabore respondendo um questionário.

Caso o exame de leishmaniose dê resultado positivo, a Gerência de Zoonoses entrará em contato com o senhor (a) para o recolhimento do animal, pois segundo o Ministério da Saúde, estes casos representam risco à saúde pública.

Ninguém poderá obrigá-lo a participar do estudo, mas contamos com a sua compreensão já que essas informações serão de extrema importância para auxiliar as ações de controle da leishmaniose visceral em toda Belo Horizonte, inclusive em seu bairro. O seu nome e seu endereço não aparecerão em nenhum momento da pesquisa. Você poderá fazer quantas perguntas quiser, sendo um prazer para nós respondê-las. É importante ressaltar que o senhor (a) tem a completa liberdade de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer momento da pesquisa.

Se você estiver de acordo em participar e contribuir com o desenvolvimento desta pesquisa, assine ou marque com sua digital no espaço abaixo. Desde já agradecemos a sua participação.

Nome completo: _____

Assinatura: _____ Belo Horizonte, ____/____/2008



“Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por Leishmania (Leishmania) infantum e identificação de biomarcadores de progressão clínica”

Este trabalho faz parte do doutorado em Parasitologia do aluno Wendel Coura Vital (matrícula 2007662285), área de concentração, Epidemiologia de Doenças Infecto Parasitárias, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG orientado pela Professora Mariângela Carneiro.

Para qualquer informação ou reclamação sobre o estudo entre em contato conosco:

Wendel Coura Vital e/ou Mariângela Carneiro: fone: (31) 3409-2839 ou (31) 3559-1694;

Endereço: Instituto de Ciências Biológicas - Av. Antônio Carlos n°:6.627- Campus Pampulha.

Correio eletrônico: wendelcoura@nupeb.ufop.br

Comitê de ética da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte: fone: (31)3277-5309 ;

Endereço: Av. Afonso Pena, n° 2336, 9º andar , cep.30130-007, BH/MG.

Comitê de Ética em Experimentação Animal: Endereço: Avenida Presidente Carlos Luz, n° 6627, Unidade Administrativa II, 2º Andar, Sala 2005 Tel/fax: (31) 3409-4516; Cep: 31270-901 BH/MG email: cetea@prpq.ufmg.br.



**Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por
Leishmania (Leishmania) infantum e
identificação de biomarcadores de progressão clínica**



Entrevista individual

Entrevista

() Completa () Incompleta

IDENTIFICAÇÃO:		CODIFICAÇÃO		
1. DATA: ____/____/____				
2. QUES: (Questionário) _____ 3. COD: (Códigos amostras) _____,		2. QUES _____		
_____, _____, _____, _____,		3. COD _____		
4. IDNUM: Nome: _____ 5. TEL: _____				
6. END: Rua (Av): _____				
nº _____ Comp _____ Bairro: _____ QT _____ AA _____				
DOENÇA				
7. DOENÇA (Você já ouviu falar de leishmaniose?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR		7. DOENÇA <input type="checkbox"/>		
8. CPEGA (Você sabe como a pessoa pega leishmaniose?) 1 () Mosquito 4 () Urina de rato 7 () Outros _____ 2 () Contato com o cão 5 () Nasce com a doença 8 () NA 3 () Animais do mato 6 () Mordida de cão 10 () Não		8. CPEGA <input type="checkbox"/>		
9. TEVLEIS (Você já teve Leishmaniose?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR 0 () NS Quando? _____ anos		9. TEVLEIS <input type="checkbox"/>		
10. FAMTEV (Alguma pessoa da sua casa já teve leishmaniose?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR 0 () NS		10. FAMTEV <input type="checkbox"/>		
11. VSSINT (Você sabe o que a pessoa sente quando está com a doença?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR		11. VSSINT <input type="checkbox"/>		
12. SINH (Fale para mim algumas coisas que a pessoa sente.) Obs: Marque com X os sintomas que a pessoa respondeu. <table border="1" style="width: 100%; margin: 5px 0;"> <tr> <td align="center" colspan="2">A 9 () NR</td> </tr> </table>		A 9 () NR		
A 9 () NR				
a) SINHA () Anemia	i) SINHC () Cansaço	12a. SINHAP <input type="checkbox"/>		
b) SINHDIA () Diarréia	j) SINHDC () Dor no corpo	12b. SINHDIA <input type="checkbox"/>		
c) SINHEM () Emagrecimento	l) SINHFA () Falta de apetite	12c. SINHEM <input type="checkbox"/>		
d) SINHFR () Fraqueza	m) SINHFE () Ferida	12d. SINHFR <input type="checkbox"/>		
e) SINHIB () Inchaço da barriga	n) SINHME () Mal estar	12e. SINHIB <input type="checkbox"/>		
f) SINHPV () Prisão de ventre	o) SINHSG () Sangramento	12f. SINHPV <input type="checkbox"/>		
g) SINHSN () Sono	p) SINHTO () Tosse	12g. SINHSN <input type="checkbox"/>		
h) SINHFE () Febre	q) SINHOT () Outros _____	12h. SINHFE <input type="checkbox"/>		
		12i. SINHC <input type="checkbox"/>		
		12j. SINHDC <input type="checkbox"/>		
		12l. SINHFA <input type="checkbox"/>		
		12m. SINHFE <input type="checkbox"/>		
		12n. SINHME <input type="checkbox"/>		
		12o. SINHSG <input type="checkbox"/>		
		12p. SINHTO <input type="checkbox"/>		
		12q. SINHOT <input type="checkbox"/>		

TRANSMISSOR			
13 MOSQUIT (Você conhece o mosquito que transmite a Leishmaniose?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR		13. MOSQUIT <input type="checkbox"/>	
13a APONTMO (Caso a pessoa diga sim mostrar o MOSTRUÁRIO e perguntar se a pessoa sabe qual é o mosquito.) 1 () Sim 2 () Não 8 () N.A 9 () NR		13a APONTMO <input type="checkbox"/>	
14 VERMOSQ (Vocês viram por aqui este mosquito?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR		14. VERMOSQ <input type="checkbox"/>	
15. MOS. (Onde você já viu este mosquito?) Obs: Marque com X os locais que a pessoa respondeu. <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">1 Sim 2 Não 8 () NA 9 () NR</td> </tr> </table> a) MOSDC () Dentro de casa d) MOSQ () Quintal b) MOSG () Galinheiro e) MOSC () Curral c) MOSCC () Casinha do cachorro f) MOSCH () Chiqueiro g) MOSOT () Outros: _____	1 Sim 2 Não 8 () NA 9 () NR		15a. MOSDC <input type="checkbox"/> 15b. MOSG <input type="checkbox"/> 15c. MOSCC <input type="checkbox"/> 15d. MOSQ <input type="checkbox"/> 15e. MOSC <input type="checkbox"/> 15f. MOSCH <input type="checkbox"/> 15g. MOSOT <input type="checkbox"/>
1 Sim 2 Não 8 () NA 9 () NR			
16. NOM (Você sabe o nome popular do mosquito que transmite a leishmaniose?) Obs: Marque com X os nomes que a pessoa respondeu. <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">1 Sim 2 Não 9 () NR</td> </tr> </table> a) NOMFLE () Flebotomo d) NOMMOS () Mosquitinho b) NOMMA () Maruin e) NOMMP () Mosquito palha c) NOMAB () Asa branca f) NOMAED () Aedes g) NOMOT () Outro: _____	1 Sim 2 Não 9 () NR		16a. NOMFLE <input type="checkbox"/> 16b. NOMMA <input type="checkbox"/> 16c. NOMAB <input type="checkbox"/> 16d. NOMMOS <input type="checkbox"/> 16e. NOMMP <input type="checkbox"/> 16f. NOMAED <input type="checkbox"/> 16g. NOMOT <input type="checkbox"/>
1 Sim 2 Não 9 () NR			
17. PICADA (Você sabe como é a picada deste mosquito?) 1 () Sem dor 3 () Pequenos pontinhos vermelhos /queima /arde/coça 2 () Queima/arde/coça 8 () NA 9 () NR 10 () Não		17. PICADA <input type="checkbox"/>	
CÃO			
18. IMPCAO (Você sabe por que o cão é importante na leishmaniose?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR		18. IMPCAO <input type="checkbox"/>	
19. SINTCAO (Você conhece os sintomas da leishmaniose no cão?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR		19. SINTCAO <input type="checkbox"/>	
20. QSINT (Quais sintomas você conhece no cão?) Obs: Marque com X os sintomas que a pessoa respondeu. <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">1 Sim 2 Não 8 () NA 9 () NR</td> </tr> </table> a) QSINTPL () Peladeira j) QSINTVT () visão turva b) QSINTMP () Machucado na pele k) QSINTAP () Apatia c) QSINTUN () aumento da unha l) QSINTIP () Inchaço das patas d) QSINTMA () machucado: orelhas, focinho e articulações e) QSINTPO () Pêlo opaco m) QSINTCP () come pouco f) QSINTCO () coriza n) QSINTVO () Vômito g) QSINTAB () aumento da barriga o) QSINTDS () defeca sangue h) QSINTNA () Não anda direito p) QSINTDI () Diarréia i) QSINTDM () Dermatites q) QSINTDE () Desânimo	1 Sim 2 Não 8 () NA 9 () NR		20a. QSINTPL <input type="checkbox"/> 20b. QSINTMP <input type="checkbox"/> 20c. QSINTUN <input type="checkbox"/> 20d. QSINTMA <input type="checkbox"/> 20e. QSINTPO <input type="checkbox"/> 20f. QSINTCO <input type="checkbox"/> 20g. QSINTAB <input type="checkbox"/> 20h. QSINTNA <input type="checkbox"/> 20i. QSINTDM <input type="checkbox"/> 20j. QSINTVT <input type="checkbox"/> 20k. QSINTAP <input type="checkbox"/> 20l. QSINTIP <input type="checkbox"/> 20m. QSINTCP <input type="checkbox"/> 20n. QSINTVO <input type="checkbox"/> 20o. QSINTDS <input type="checkbox"/> 20p. QSINTDI <input type="checkbox"/> 20q. QSINTDE <input type="checkbox"/>
1 Sim 2 Não 8 () NA 9 () NR			

21. SCOMPLC (Se seu animal estiver com leishmaniose o que você faria?) 1 () Entregaria para a Prefeitura 4 () Não entregaria à Prefeitura 2 () Sacrificaria 5 () Trataria 7 () Outros: _____ 3 () Mandaria o animal para outro local 6 () Tem dúvida 9 () NR	21. SCOMPLC <input type="checkbox"/>
22. OUVCP (Você já ouviu falar de cães com leishmanioses na vizinhança?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR	22. OUVCP <input type="checkbox"/>
23. EXAMEC (A PBH já fez exame dos seus cães?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR 0 () NS	23. EXAMEC <input type="checkbox"/>
24. RECBEX (Você recebeu resultado?) 1 () Sim 2 () Não 8 () NA 9 () NR	24. RECBEX <input type="checkbox"/>
25. CAOLVC (Você já teve algum cachorro com leishmaniose?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR	25. CAOLVC <input type="checkbox"/>
26. CAOLVCQ (Quando foi?) 1 () Este ano 2 () Anos anteriores 8 () NA	26. CAOLVCQ <input type="checkbox"/>
27. TRATLVC (Você já tratou algum cão que estava com Leishmanioses?) 1 () Sim 2 () Não 8 () NA 9 () NR	27. TRATLVC <input type="checkbox"/>
28. CONHECP (Você sabe porque o animal doente é recolhido?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR	28. CONHECP <input type="checkbox"/>
29. DEIXSAC (Vocês deixaram que os cães fossem sacrificados?) 1 () Sim 2 () Não 8 () NA 9 () NR	29. DEIXASAC <input type="checkbox"/>
RESIDÊNCIA/CONDIÇÕES SOCIO ECONÔMICAS:	
30. RENDA (Renda do pai ou mãe ou responsável) 1. () menos que 1 salário 5. () de 3 a 5 salários 2. () 1 salário 6. () acima de 5 salários 3. () entre 1 a 2 salários 0. () NS 4. () de 2 a 3 salários 9. () NR	30. RENDA <input type="checkbox"/>
31. RENDA (Renda da familiar) 1. () menos que 1 salário 5. () de 3 a 5 salários 2. () 1 salário 6. () acima de 5 salários 3. () entre 1 a 2 salários 0. () NS 4. () de 2 a 3 salários 9. () NR	31. RENDAF <input type="checkbox"/>
32. ESCOLRE (Escolaridade do responsável): 1 () nunca freqüentou escola 6 () 2º grau completo 2 () primário 7 () 3º grau incompleto 3 () 1º grau incompleto 8 () 3º grau completo 4 () 1º grau completo 9 () pós-graduação 5 () 2º grau incompleto	32. ESCOLRE <input type="checkbox"/>
33. TEMPPO: (Há quanto tempo você mora neste domicílio?) _____ anos	33. TEMPPO
34. BORRIF (Esta casa já foi detetizada com inseticida pela prefeitura?) 1 () Sim 2 () Não 0 () NS 9 () NR	34. BORRIF <input type="checkbox"/>
34a. TEMPBOR (Quanto tempo?) _____ anos	34a. TEMPBOR _____
35. MORAD (Tipo de moradia): 1 () Casa independente 4 () Núcleo familiar 2 () Comércio 5 () Apartamento 3 () Casa geminada 6 () Outro: _____	35. MORAD <input type="checkbox"/>
36. PAREDE (Como são as paredes internas?) 1 () Predomínio de tijolo sem reboco 5 () Mista 2 () Predomínio de tijolo com reboco 0 () NS 3 () Material reaproveitado 9 () NR	36. PAREDE <input type="checkbox"/>

37. TETO (Tipo de teto) 1 () Laje e telha de barro 4 () Telha de barro 2 () Laje e telha de amianto 5 () Telha de amianto 3 () Só laje 6 () Outro: _____ 4 () Misto 9 () NR	37. TETO <input type="checkbox"/>
38. PISO (Tipo de piso) 1 () Cerâmica/ardósia/granito 4 () Terra batida 2 () Cimento 5 () Misto: _____ 3 () Madeira (taco, tábuas corridas) 6 () Outro: _____ 9 () NR	38. PISO <input type="checkbox"/>
39. NCOMODO (Número de cômodos) _____	39. NCOMODO. <input type="checkbox"/>
40. NQUARTO (Número de quartos) _____	40. NQUARTO <input type="checkbox"/>
41. NPESSE (Número de pessoas que residem) _____	41. NPESSE <input type="checkbox"/>
42. BANHER (Como é o banheiro da casa?) 0 () NS 1 () completo (vaso, chuveiro) 8 () NA 2 () incompleto (sem um dos itens acima relacionados) 9 () NR	42. BANHER <input type="checkbox"/>
43. ESGOT (A casa possui rede de esgoto?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR 0 () NS	43. ESGOT <input type="checkbox"/>
44. ESGLIG (Como é o esgoto?) 1 () Ligado a rede da prefeitura 3 () Ligado ao córrego 2 () Ligado à fossa 8 () NA 9 () NR 0 () NS	44. ESGLIG <input type="checkbox"/>
45. LIXO (Destino do lixo) 1 () Recolhido pelo serviço municipal 3 () Coloca na caçamba 2 () Enterra / Queima 4 () Joga perto de casa	45. LIXO <input type="checkbox"/>
46. QVLIXO (Quantas vezes por semana o lixo é recolhido?) 1 () Diariamente 4 () 3 vezes por semana 2 () 1 vez por semana 5 () mensalmente 3 () 2 vezes por semana 6 () nunca 0 () NS	46. QVLIXO <input type="checkbox"/>
47. QUINTAL (Há quintal na residência?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR	47. QUINTAL <input type="checkbox"/>
48. CQUINT (Como é o quintal?) 1 () Cimentado 2 () Terra 3 () Barranco 8 () NA	48. CQUINT <input type="checkbox"/>
49. ANIQ (Quais e quantos animais você tem no quintal?) Obs: Marque com X os sintomas que a pessoa respondeu. 1 Sim 2 Não 8 () NA 9 () NR a) ANIQG () Galinhas _____ e) ANIQCH () Cachorro _____ b) ANIQP () Porcos _____ f) ANIQPS () Passarinhos _____ c) ANIQCG () Cavalos/gado _____ g) ANIQOT () outros. Quais? e quantos _____ d) ANIQCB () Cabritos _____	49a. ANIQG <input type="checkbox"/> 49b. ANIQP <input type="checkbox"/> 49c. ANIQCG <input type="checkbox"/> 49d. ANIQCB <input type="checkbox"/> 49e. ANIQCH <input type="checkbox"/> 49f. ANIQPS <input type="checkbox"/> 49g. ANIQOT <input type="checkbox"/>
50. HAQ (O que há no quintal da residência?) Obs: Marque com X os sintomas que a pessoa respondeu. 1 Sim 2 Não 8 () NA 9 () NR a) HAQCP () Canteiro de plantas ou horta f) HAQAR () árvores b) HAQBA () Bananeiras g) HAQES () Esterco c) HAQLX () Lixo exposto d) HAQET () Entulhos (Monte de madeira, telhas, tijolos) e) HAQMO () Monte de folhas, frutos caídos e tronco pobre no quintal	50a. HAQCP <input type="checkbox"/> 50b. HAQBA <input type="checkbox"/> 50c. HAQLX <input type="checkbox"/> 50d. HAQET <input type="checkbox"/> 50e. HAQMO <input type="checkbox"/> 50f. HAQAR <input type="checkbox"/> 50g. HAQES <input type="checkbox"/>
51. AMBIENT (Ambiente próximo a casa) Obs: Vizinhos do lado. 1 () Vegetação natural 2 () casas 3 () casas com quintal 4 () Terreno baldio 5 () Outros: _____	51. AMBIENT <input type="checkbox"/>

FICHA INDIVIDUAL DOS CÃES		2. QUES _____	
2. QUES: (Questionário) _____ 3. COD: (Código amostra) _____		3. COD _____	
Nome do Proprietário: _____		52. IDCAO _____	
52. IDCAO Nome do cão: _____ 53. IDADE: _____		53. IDADE _____	
54. SEXOCAO 1 () Macho 2 () Fêmea 55. COR: _____		54. SEXOCAO <input type="checkbox"/>	
56. PORTE: 1 () Pequeno 2 () Médio 3 () Grande		56. PORTE <input type="checkbox"/>	
57. PELO (Tipo de pelo) 1. () Curto 2. () Longo		57. PELO <input type="checkbox"/>	
58. ADQUIR (Onde ele foi adquirido(s) ?) 1 () no domicílio atual 3 () no bairro do domicílio atual 2 () em outra localidade 4 () outro _____		58. ADQUIR <input type="checkbox"/>	
59. RACA (Qual a raça do animal?) _____		59. RACA _____	
60. ONDFIC (Onde ele fica a maior parte do tempo?) 5 () Dentro de casa 1 () No quintal 3 () Na varanda 6 () Outro: _____ 2 () No canil 4 () Na rua 9 () NR 0 () NS		60. ONDFIC <input type="checkbox"/>	
61. ONDDORM (Onde o cachorro dorme?) 5 () Na rua 1 () Dentro de casa 3 () No quintal 6 () Outro: _____ 2 () No canil 4 () Na varanda 9 () NR 0 () NS		61. ONDDORM <input type="checkbox"/>	
62. CFOGE (O cachorro foge muito de casa?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR 0 () NS		62. CFOGE <input type="checkbox"/>	
63. QTCMOR (A quanto tempo o cão esta morando com a família nesta residência?) 1 () Meses: _____ 2 () anos: _____ 9 () NR 0 () NS		63. QTCMOR <input type="checkbox"/>	
64. VETER (Você leva este cão ao veterinário?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR 0 () NS		64. VETER <input type="checkbox"/>	
65. FREQ (Quantas vezes ao ano?) _____		65. FREQ <input type="checkbox"/>	
66. EXAMLVC (Este cão já fez exames de sangue de leishmaniose?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR 0 () NS		66. EXAMLVC <input type="checkbox"/>	
67. QUANTVZ (Se sim, quantas vezes?) _____		67. QUANTVZ <input type="checkbox"/>	
68. RESULT (Resultado?) 1 () Positivo 2 () Negativo 0 () NS		68. RESULT <input type="checkbox"/>	
69. LABORAT (Qual laboratório?) 1 () Prefeitura 2 () Particular 9 () NR 0 () NS		69. LABORAT <input type="checkbox"/>	
70. VACINAD (O cão foi vacinado contra LVC?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR 0 () NS		70. VACINAD <input type="checkbox"/>	
71. TRATCAO (O cão está recebendo tratamento para leishmaniose?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR 0 () NS		71. TRATCAO <input type="checkbox"/>	
72. APSINT Presença de sintomas. 1 () Sim 2 () Não		72. APSINT <input type="checkbox"/>	
73. QSINT (Quais sintomas?) Obs: Marque com X os sintomas que você está percebendo no cachorro. <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">1 Sim 2 Não 8 () NA</td> </tr> </table>		1 Sim 2 Não 8 () NA	73a. QSINTPL <input type="checkbox"/>
1 Sim 2 Não 8 () NA			
a) QSINTPL () Peladeira		73. QSINTMP <input type="checkbox"/>	
b) QSINTMP () Machucado na pele		73c. QSINTUN <input type="checkbox"/>	
c) QSINTUN () aumento da unha		73d. QSINTMA <input type="checkbox"/>	
d) QSINTMA () machucado: orelhas, focinho e articulações		73e. QSINTPO <input type="checkbox"/>	
e) QSINTPO () Pêlo opaco		73f. QSINTCO <input type="checkbox"/>	
f) QSINTCO () coriza		73g. QSINTAB <input type="checkbox"/>	
g) QSINTAB () aumento da barriga		73h. QSINTNA <input type="checkbox"/>	
h) QSINTNA () Não anda direito		73i. QSINTVT <input type="checkbox"/>	
i) QSINTVT () visão turva		73j. QSINTDM <input type="checkbox"/>	
j) QSINTDM () desanimo		73k. QSINTIP <input type="checkbox"/>	
k) QSINTIP () Inchaço das patas		73l. QSINTCP <input type="checkbox"/>	
l) QSINTCP () come pouco		73m. QSINTVO <input type="checkbox"/>	
m) QSINTVO () Vômito		73n. QSINTDS <input type="checkbox"/>	
n) QSINTDS () defeca sangue		73o. QSINTDI <input type="checkbox"/>	
o) QSINTDI () Diarréia		73p. QSINTEM <input type="checkbox"/>	
p) QSINTEM () Emagrecimento			
NOME DO ENTREVISTADOR: _____ NÚMERO: _____			



CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (FORMULÁRIO II)

“Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por

Leishmania (Leishmania) infantum e identificação de biomarcadores de progressão clínica”



Informação ao Voluntário

Você está sendo convidado a participar da pesquisa que deseja conhecer a importância dos cães assintomáticos que apresentam infecção pelo agente causador da leishmaniose visceral. Seu animal apresentou resultados sorológicos negativos e resultados moleculares positivos por este motivo desejamos acompanhá-lo por um período de aproximadamente dois anos em intervalos de seis meses. Este trabalho está sendo desenvolvido em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte e para que ele aconteça precisamos que você possa nos receber em seu domicílio para coletarmos amostras de sangue dos seu(s) cão(es) que apresentaram tal resultado. Em alguns animais iremos também realizar o xenodiagnóstico, colocando alguns mosquitos para picar seu cão verificando se ele está ou não infectando tais mosquitos.

Caso o (s) cão (es) se tornem positivos na sorologia, durante este período, a Gerência de Zoonoses entrará em contato com o senhor (a) para o recolhimento do animal, pois segundo o Ministério da Saúde, estes casos representam risco à saúde pública.

Ninguém poderá obrigá-lo a participar do estudo, mas contamos com a sua compreensão já que essas informações serão de extrema importância para auxiliar as ações de controle da leishmaniose visceral em toda Belo Horizonte, inclusive em seu bairro. O seu nome e seu endereço não aparecerão em nenhum momento da pesquisa. Você poderá fazer quantas perguntas quiser, sendo um prazer para nós respondê-las. É importante ressaltar que o senhor (a) tem a completa liberdade de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer momento da pesquisa.

Se você estiver de acordo em participar e contribuir com o desenvolvimento desta pesquisa, assine ou marque com sua digital no espaço abaixo.

Nome completo: _____

Assinatura: _____ Belo Horizonte, ____/____/2008



“Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por

Leishmania (Leishmania) infantum e identificação de biomarcadores de progressão clínica”

Este trabalho faz parte do doutorado em Parasitologia do aluno Wendel Coura Vital (matrícula 2007662285), área de concentração, Epidemiologia de Doenças Infecto Parasitárias, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG orientado pela Professora Mariângela Carneiro.

Para qualquer informação ou reclamação sobre o estudo entre em contato conosco:

Wendel Coura Vital e/ou Mariângela Carneiro: fone: (31) 3409-2839 ou (31) 3559-1694;

Endereço: Instituto de Ciências Biológicas - Av. Antônio Carlos nº:6.627- Campus Pampulha.

Correio eletrônico: wendelcoura@nupeb.ufop.br

Comitê de ética da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte: fone: (31)3277-5309 ;

Endereço: Av. Afonso Pena, nº 2336, 9º andar , cep.30130-007, BH/MG.

Comitê de Ética em Experimentação Animal: Endereço: Avenida Presidente Carlos Luz, nº 6627, Unidade Administrativa II, 2º Andar, Sala 2005 Tel/fax: (31) 3409-4516; Cep: 31270-901 BH/MG email: cetea@prpq.ufmg.br.



CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (FORMULÁRIO III)

“Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por

Leishmania (Leishmania) infantum e identificação de biomarcadores de progressão clínica”



Informação ao Voluntário

Você já participou do estudo anteriormente e estamos convidando-o a continuar participando dessa pesquisa, pois seu animal apresentou exames laboratoriais não reativos para leishmaniose visceral canina e resultado molecular negativo. Por este motivo desejamos acompanhar seu cão por um período de aproximadamente dois anos em intervalos de seis meses.

Este trabalho está sendo desenvolvido em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte e para que ele aconteça precisamos que você possa nos receber em seu domicílio para coletarmos amostras de sangue dos seu(s) cão(es) que apresentaram tal resultado.

Caso o (s) cão (es) se tornem reativos na sorologia, durante este período, a Gerência de Zoonoses entrará em contato com o senhor (a) para o recolhimento do animal, pois segundo o Ministério da Saúde, estes casos representam risco à saúde pública.

Ninguém poderá obrigá-lo a participar do estudo, mas contamos com a sua compreensão já que essas informações serão de extrema importância para auxiliar as ações de controle da leishmaniose visceral em toda Belo Horizonte, inclusive em seu bairro. O seu nome e seu endereço não aparecerão em nenhum momento da pesquisa. Você poderá fazer quantas perguntas quiser, sendo um prazer para nós respondê-las. É importante ressaltar que o senhor (a) tem a completa liberdade de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer momento da pesquisa.

Se você estiver de acordo em participar e contribuir com o desenvolvimento desta pesquisa, assine ou escolha uma testemunha para assinar por você.

Nome completo: _____

Assinatura: _____ Belo Horizonte, ____/____/2008



“Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por

Leishmania (Leishmania) infantum e identificação de biomarcadores de progressão clínica”

Este trabalho faz parte do doutorado em Parasitologia do aluno Wendel Coura Vital (matrícula 2007662285), área de concentração, Epidemiologia de Doenças Infecto Parasitárias, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG orientado pela Professora Mariângela Carneiro.

Para qualquer informação ou reclamação sobre o estudo entre em contato conosco:

Wendel Coura Vital e/ou Mariângela Carneiro: fone: (31) 3409-2839 ou (31) 3559-1694;

Endereço: Instituto de Ciências Biológicas - Av. Antônio Carlos n°:6.627- Campus Pampulha.

Correio eletrônico: wendelcoura@nupeb.ufop.br

Comitê de ética da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte: fone: (31)3277-5309 ;

Endereço: Av. Afonso Pena, n° 2336, 9° andar , cep.30130-007, BH/MG.

Comitê de Ética em Experimentação Animal: Endereço: Avenida Presidente Carlos Luz, n° 6627, Unidade Administrativa II, 2° Andar, Sala 2005 Tel/fax: (31) 3409-4516; Cep: 31270-901 BH/MG email: cetea@prpq.ufmg.br.

FICHA INDIVIDUAL DOS CÃES – COORTE II	
ENDEREÇO/DADOS DO CÃO:	
1. Data da segunda coleta: ___/___/_____	
2. CODPBH (Código do cão na segunda coleta): _____	
3. IDNUM: Proprietário: _____	4. TEL: _____
5. END: Rua (Av): nº Comp Bairro: QT AA	
6. IDCORT: Nome do cão: _____	7. IDADE: _____
8. COR: _____	
9. SEXOCAO: 1 () Macho 2 () Fêmea	
10. PORTE: 1 () Pequeno 2 () Médio 3 () Grande	
11. PELO 1 () Curto 2 () Longo	
12. RACA: Raça do animal: _____	OBS: _____
INFORMAÇÕES ATUAIS (2ª INTERVENÇÃO COORTE)	
13. DATA2: (Data do retorno) ___/___/_____	
14. CODCORT2: (Código amostra PBH) _____	
15. SITCOR2 (O cão foi encontrado?) 1 () Sim 2 () Não	15. SITCOR2 <input type="checkbox"/>
16. MOTCOR2 (Caso o cão NÃO tenha sido encontrado, qual o motivo.) 1 () Mudou de endereço 2 () Morreu _____ 3 () Recusa 4 () Casa fechada 5 () Fugiu 6 () Outro _____ 8 () N.A	16. MOTCOR2 <input type="checkbox"/>
17. RECCOR2 (Caso o proprietário tenha recusado a continuar o estudo, qual o motivo da recusa?) _____	
18. EXCOR2 (Este cão fez OUTRO exames de sangue para leishmaniose?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR 0 () NS	18. EXCOR2 <input type="checkbox"/>
19. RESCOR2 (Resultado?) 1 () Positivo 2 () Negativo 8 () NA 0 () NS	19. RESCOR2 <input type="checkbox"/>
20. LABCOR2 (Qual laboratório?) 1 () Prefeitura 2 () Particular () 8 NA 9 () NR 0 () NS	20. LABCOR2 <input type="checkbox"/>
21. VACCOR2 (O cão foi vacinado contra leishmaniose?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR 0 () NS	21. VACCOR2 <input type="checkbox"/>
22. TRATCOR2 (O cão está recebendo tratamento para leishmaniose?) 1 () Sim 2 () Não 9 () NR 0 () NS	22. TRATCOR2 <input type="checkbox"/>
23. SINTCOR2 (O cão está apresentando algum sintoma de leishmaniose?) 1 () Sim 2 () Não	23. SINTCOR2 <input type="checkbox"/>
24. QSINCOR2 (Se estiver apresentando sintomas marque com X os que você está percebendo no cachorro.) <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 8 () NA	24a. QSPLCOR2 <input type="checkbox"/>
a) QSPLCOR2 () Peladeira	24b. QSMPCOR2 <input type="checkbox"/>
b) QSMPCOR2 () Machucado na pele	24c. QSUNCOR2 <input type="checkbox"/>
c) QSUNCOR2 () aumento da unha	24d. QSMACOR2 <input type="checkbox"/>
d) QSMACOR2 () machucado: orelhas, focinho e articulações	24e. QSPOCOR2 <input type="checkbox"/>
e) QSPOCOR2 () Pêlo opaco	24f. QSCOCOR2 <input type="checkbox"/>
f) QSCOCOR2 () coriza	24g. QSABCOR2 <input type="checkbox"/>
g) QSABCOR2 () aumento da barriga	24h. QSNACOR2 <input type="checkbox"/>
h) QSNACOR2 () Não anda direito	24i. QSVTCOR2 <input type="checkbox"/>
i) QSVTCOR2 () visão turva	24j. QSDMCOR2 <input type="checkbox"/>
j) QSDMCOR2 () desanimado	24k. QSIPCOR2 <input type="checkbox"/>
k) QSIPCOR2 () Inchaço das patas	24l. QSCPCOR2 <input type="checkbox"/>
l) QSCPCOR2 () come pouco	24m. QSVOCOR2 <input type="checkbox"/>
m) QSVOCOR2 () Vômito	24n. QSDSCOR2 <input type="checkbox"/>
n) QSDSCOR2 () defeca sangue	24o. QSDICOR2 <input type="checkbox"/>
o) QSDICOR2 () Diarréia	24p. QSEMCOR2 <input type="checkbox"/>
p) QSEMCOR2 () Emagrecimento	
NOME DO AGENTE: _____	
OBS: _____	

11.0 Anexos



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 20/2007**, relativo ao projeto intitulado "*Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi e identificação do biomarcadores de progressão clínica*", que tem como responsável **Mariângela Carneiro**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **6/ 06/2007**.

Este certificado expira-se em **6/ 06 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 20/2007**, related to the project entitled "*Epidemiological prospective study in asymptomatic dogs infected by Leishmania (Leishmania) chagasi and identifying biomarks of clinical progress*", under the supervision of **Mariângela Carneiro**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 6, 2007**.

This certificate expires in **June 6, 2012**.

Belo Horizonte, 11 de Junho de 2007.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar. Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@proq.ufmg.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370



OFÍCIO CEP Nº 032/2007, de 28 de março de 2007.

Ilmº. Sr.

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis

NUPEB/ICEB

Senhor Professor,

É com prazer que comunicamos a **aprovação**, por este Comitê, de seu **Projeto nº 2007/83** – “Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por *Leishmania Leishmania chagasi* e identificação de biomarcadores de progressão clínica” e aproveitamos para sugerir que seja incluído um termo de consentimento para que o dono do cão pesquisado assine.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa/UFOP



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE
BELO HORIZONTE (CEP-SMSA/PBH)

Avaliação de projeto de pesquisa – **Protocolo 001/2008**

Projeto: “Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por *Leishmania Leishmania chagasi* e identificação de biomarcadores de progressão clínica”

Pesquisadores: Dra. Mariângela Carneiro
Dr. Alexandre Barbosa Reis
Ms. Wendel Coura Vital
Dr. Olindo Assis Martins Filho
Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira
Dr. Nelder Figueiredo Gontijo
Dr. Marcos José Marques
Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti

Mérito: Trata-se de projeto de pesquisa para obtenção de título de Doutor em Parasitologia, área de concentração em Epidemiologia de Doenças Infecto Parasitárias do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG. Parte do financiamento já foi aprovado pela FAPEMIG e o restante do orçamento necessário será de responsabilidade do coordenador e da equipe de pesquisadores.

Objetivos: Tem como objetivo geral identificar e acompanhar uma coorte de animais soronegativos na reação de ELISA e positivos na técnica de PCR com intuito de estabelecer marcadores biomoleculares de evolução clínica e avaliar a importância destes animais na cadeia epidemiológica de transmissão da leishmaniose visceral (LV) em uma área urbana.

Como objetivos específicos:

- 1) Realizar um inquérito soro-epidemiológico através da técnica de ELISA em cães da região noroeste de Belo Horizonte, MG;
- 2) Avaliar clinicamente os cães amostrados;
- 3) Realizar diagnóstico parasitológico e molecular (PCR) nos animais soro negativos e selecionar uma amostra de cães PCR positivos.;
- 4) Estimar a prevalência da infecção canina por *L. chagasi* utilizando métodos sorológicos e moleculares;
- 5) Selecionar uma amostra de cães PCR positivos e soronegativos na técnica de ELISA e acompanhá-los através de avaliação clínica, sorológica e parasitológica por 12 meses;

- 6) Comparar a capacidade diagnóstica de técnicas convencionais (ELISA) e não convencionais (anticorpo anti-Promastigotas Fixadas) por Citometria de Fluxo em soro e eluato de papel filtro de cães soronegativos na ELISA e positivos na PCR.;
- 7) Estabelecer marcadores biomoleculares por citometria de fluxo das populações de linfócitos T (CD5+ e Thy-1+) e subpopulações de linfócitos T (CD4+ e T CD8+) produtores de INF- γ + e IL-10+ nos cães soronegativos e PCR positivo a cada 6 meses do acompanhamento longitudinal; 8) Avaliar o potencial de infecção por xenodiagnóstico em uma amostra de cães soro negativos e PCR positivos em relação aos cães sintomáticos.

Método: O estudo será desenvolvido na Regional Noroeste de Belo Horizonte, partindo de um inquérito sorológico de cães. A amostra será de 1.500 cães. Na primeira fase do estudo será aplicado um questionário aos proprietários para coleta de informações sobre o conhecimento dos mesmos acerca da doença, do vetor, das condições de moradia e sobre os cães, após assinatura do TCLE. Será ainda realizada coleta de material biológico dos cães para a realização de exames. Os cães positivos para LV no inquérito sorológico serão eutanasiados, conforme rotina do Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte (SMSA-PBH), após informação e autorização do proprietário do mesmo. Serão coletados, antes de serem eutanasiados, sangue total, plasma, pele de orelha e punção de medula de 40 animais, que serão os controles positivos da área. Serão compostos grupos com as seguintes características: sorologia positiva e PCR positiva (n=20); sorologia positiva e PCR negativa (n=20) e além destes será coletado material biológico de 20 animais sorologia negativa e PCR negativa. Estes grupos caracterizam os controles positivos e negativos da área endêmica e deles serão realizados a sorologia não convencional, hemograma, imunofenotipagem e exame parasitológico. Os animais com sorologia negativa e PCR positiva serão acompanhados por um período de aproximadamente 12 meses. Nesta fase serão realizados, a cada seis meses, exame clínico e nova coleta de material biológico destes animais para avaliação prognóstica e busca de biomarcadores laboratoriais. Como na primeira fase o Laboratório de Zoonoses realizará o teste sorológico (ELISA) e caso ocorra a soroconversão do animal este será eutanasiado pelo Centro de Controle de Zoonoses da SMSA-PBH.

Serão utilizados os softwares EpiData (versão 3.2) para a entrada dos dados e o EpiInfo 2002 e STATA versão 9.0 para a análise de dados. Na fase inicial será realizada a análise exploratória dos dados por meio da análise gráfica e da obtenção de medidas-resumo. Para as variáveis contínuas serão calculadas as médias e medianas. A comparação das médias será realizada utilizando-se o teste t de Student e das medianas o teste de Wilcoxon (Mann-Whitney) e Kruskal-Wallis. Para identificar fatores de risco associados a infecção canina por *L. chagasi* será utilizado modelos de regressão logística multivariado. A força da associação será medida através da Odds Relativa (OR), com intervalo de confiança de 95%. Para definição do modelo final será utilizado o teste da razão da verossimilhança (Hosmer & Lemeshow, 1989). Para determinação da associação da resposta imune e variáveis independentes com a progressão da doença será utilizando o Modelo de Cox.

Parecer:

O estudo é relevante e contribuirá na compreensão da cadeia epidemiológica da transmissão da LV. Traz toda a documentação necessária inclusive o modelo do questionário que será

utilizado para a entrevista com o proprietário. Foi avaliado em reunião deste CEP e todas as pendências identificadas em primeira avaliação foram solucionadas pelos pesquisadores.

O projeto acima referido cumpriu os requisitos da resolução 196/96 da CONEP, tendo sido aprovado na reunião do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao CEP um ano após início do projeto ou ao final deste, se em prazo inferior a um ano.



Celeste de Souza Rodrigues
Coordenadora do CEP-SMSA/PBH

Belo Horizonte, 23 de abril de 2008.

12.0 Referências

12.1 Referências Bibliográficas

- Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceicao-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *The Journal of parasitology* 77: 557-561.
- Alexander B, de Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH 2002. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis* 8: 1480-1485.
- Alexander B, Maroli M 2003. Control of phlebotomine sandflies. *Medical and veterinary entomology* 17: 1-18.
- Almeida AB, Faria RP, Pimentel MF, Dahroug MA, Turbino NC, Sousa VR 2009. [Seroepidemiological survey of canine leishmaniasis in endemic areas of Cuiaba, State of Mato Grosso]. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 156-159.
- Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM 2005a. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 106: 151-158.
- Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM 2005b. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol* 127: 227-232.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, Lopez-Velez R, Moreno J 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 21: 334-359, table of contents.
- Alvar J, Yactayo S, Bern C 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 22: 552-557.
- Alves CF, de Amorim IF, Moura EP, Ribeiro RR, Michalick MS, Kalapothakis E, Bruna-Romero O, Tafuri WL, Teixeira MM, Melo MN 2009. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 349-358.
- Alves WA, Bevilacqua PD 2004. [Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997]. *Cad Saude Publica* 20: 259-265.
- Andrade AM, Queiroz LH, Nunes GR, Perri SH, Nunes CM 2007. [Dog replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 594-595.
- Andrade CR, Silva OA, Andrade PP, Kolk AH, Harith AE 1987. A direct agglutination test discriminative toward Chagas' disease for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil: preliminary results. *Ann Inst Pasteur Immunol* 138: 457-459.
- Andrade RA, Silva Araujo MS, Reis AB, Gontijo CM, Vianna LR, Mayrink W, Martins-Filho OA 2009. Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 79-86.
- Aoun K, Jeddi F, Amri F, Ghrab J, Bouratbine A 2009. [Current epidemiological data on visceral leishmaniasis in Tunisia]. *Med Mal Infect* 39: 775-779.

- Araujo MS, de Andrade RA, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Andrade MC, Vianna LR, Mayrink W, Reis AB, Malaquias LC, Mello MN, Martins-Filho OA 2009. T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-Leishmania (Leishmania) chagasi IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune. *Vaccine* 27: 1008-1017.
- Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MC, Sampaio DP, Badaro R 1998. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 59: 53-57.
- Ashford RW 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* 14: 523-532.
- Babakhan L, Mohebbali M, Akhoundi B, Edrissian GH, Keshavarz H 2009. Rapid detection of Leishmania infantum infection in dogs: a comparative study using fast agglutination screening test (FAST) and direct agglutination test (DAT) in Iran. *Parasitol Res* 105: 717-720.
- Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson WD, Jr. 1986. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 154: 1003-1011.
- Bahia D, Gontijo NF, Leon IR, Perales J, Pereira MH, Oliveira G, Correa-Oliveira R, Reis AB 2007. Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of Lutzomyia longipalpis. *Parasitol Res* 100: 449-454.
- Baneth G, Aroch I 2008. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet J* 175: 14-15.
- Baneth G, Dank G, Keren-Kornblatt E, Sekeles E, Adini I, Eisenberger CL, Schnur LF, King R, Jaffe CL 1998. Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. *Am J Trop Med Hyg* 59: 722-725.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L 2008. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 24: 324-330.
- Baneth G, Shaw SE 2002. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 106: 315-324.
- Barbieri CL 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 28: 329-337.
- Barbosa-De-Deus R, Dos Mares-Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, Mayrink W, Genaro O, Tavares CA 2002. Leishmania major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 1361-1366.
- Bashaye S, Nombela N, Argaw D, Mulugeta A, Herrero M, Nieto J, Chicharro C, Canavate C, Aparicio P, Velez ID, Alvar J, Bern C 2009. Risk factors for visceral leishmaniasis in a new epidemic site in Amhara Region, Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg* 81: 34-39.
- Bastien P, Blaineau C, Pages M 1992. Leishmaniasis: sex, lies and karyotype. *Parasitol. Today* 8: 174-176.

- Berman J 2006. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. *Indian J Med Res* 123: 289-294.
- Bern C, Joshi AB, Jha SN, Das ML, Hightower A, Thakur GD, Bista MB 2000. Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed-net use is strongly protective. *Am J Trop Med Hyg* 63: 184-188.
- Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 55: 273-277.
- Boarino A, Scalone A, Gradoni L, Ferroglio E, Vitale F, Zanatta R, Giuffrida MG, Rosati S 2005. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 647-653.
- Boceta C, Alonso C, Jimenez-Ruiz A 2000. Leucine rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 22: 55-62.
- Boelaert M, Meheus F, Sanchez A, Singh SP, Vanlerberghe V, Picado A, Meessen B, Sundar S 2009. The poorest of the poor: a poverty appraisal of households affected by visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Trop Med Int Health* 14: 639-644.
- Bogdan C, Schonian G, Banuls AL, Hide M, Pratlong F, Lorenz E, Rollinghoff M, Mertens R 2001. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis* 32: 302-306.
- Boggiatto PM, Ramer-Tait AE, Metz K, Kramer EE, Gibson-Corley K, Mullin K, Hostetter JM, Gallup JM, Jones DE, Petersen CA 2010. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clin Vaccine Immunol* 17: 267-273.
- Borges BK, Silva JA, Haddad JP, Moreira EC, Magalhaes DF, Ribeiro LM, Fiuza Vde O 2008. [Assessment of knowledge and preventive attitudes concerning visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil]. *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica* 24: 777-784.
- Borges BKA, Silva JA, Haddad JPA, Moreira EC, Magalhães DF, Ribeiro LML, Fiúza VOP 2009. 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* 61: 1035-1043.
- Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L 1997. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 59: 21-30.
- Braga MD, Coelho IC, Pompeu MM, Evans TG, MacAulliffe IT, Teixeira MJ, Lima JW 1998. [Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence]. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 419-424.

- Brasil 2006. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, 1th ed. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília. Available at: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf Accessed December 8.
- Brasil 2008. Portaria Interministerial. Diário Oficial da União, n.1.426, seção 1. 2008 p. 133.
- Brasil 2009. Guia de vigilância epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde. In, 7 ed., Brasília, p. 816.
- Cabrera GP, Da Silva VO, Da Costa RT, Reis AB, Mayrink W, Genaro O, Palatnik-de-Sousa CB 1999. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 61: 296-301.
- Cabrera MA, Paula AA, Camacho LA, Marzochi MC, Xavier SC, da Silva AV, Jansen AM 2003. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 45: 79-83.
- Capelli G, Baldelli R, Ferroglio E, Genchi C, Gradoni L, Gramiccia M, Maroli M, Mortarino M, Pietrobelli M, Rossi L, Ruggiero M 2004. [Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network]. *Parassitologia* 46: 193-197.
- Cardoso L, Neto F, Sousa JC, Rodrigues M, Cabral M 1998. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine Leishmania-specific cellular immunity. *Vet Parasitol* 79: 213-220.
- Cardoso L, Schallig HD, Cordeiro-da-Silva A, Cabral M, Alunda JM, Rodrigues M 2007. Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 117: 35-41.
- Cardoso L, Schallig HD, Neto F, Kroon N, Rodrigues M 2004. Serological survey of Leishmania infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop* 91: 95-100.
- Carrillo E, Ahmed S, Goldsmith-Pestana K, Nieto J, Osorio Y, Travi B, Moreno J, McMahon-Pratt D 2007. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 25: 1534-1543.
- Carrillo E, Moreno J 2009. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 67-70.
- Carvalho GM, Gontijo CM, Falcao AL, Andrade Filho JD 2010. Study of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) collected in a Leishmania-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. *J Med Entomol* 47: 972-976.
- Carvalho LP, Passos S, Dutra WO, Soto M, Alonso C, Gollob KJ, Carvalho EM, Ribeiro de Jesus A 2005. Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scand J Immunol* 61: 337-342.
- Cavaliero T, Arnold P, Mathis A, Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P 1999. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with Leishmania infantum. *J Vet Intern Med* 13: 330-334.

- Cerbino Neto J, Werneck GL, Costa CH 2009. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. *Cad Saude Publica* 25: 1543-1551.
- Chamizo C, Moreno J, Alvar J 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 103: 67-75.
- Colosimo EA, Giolo SR 2006. Análise de Sobrevivência Aplicada. 1 ed., Edgard Blücher, São Paulo, 369 pp.
- Correa AP, Dossi AC, de Oliveira Vasconcelos R, Munari DP, de Lima VM 2007. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Parasitol* 143: 267-274.
- Cortes S, Rolao N, Ramada J, Campino L 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 12-17.
- Costa CH 2008. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* 24: 2959-2963.
- Costa CH, Gomes RB, Silva MR, Garcez LM, Ramos PK, Santos RS, Shaw JJ, David JR, Maguire JH 2000. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis* 182: 997-1000.
- Costa CH, Pereira HF, Araujo MV 1990. [Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986]. *Rev Saude Publica* 24: 361-372.
- Costa CH, Pereira HF, Pereira FC, Tavares JP, Araujo MV, Goncalves MJ 1999. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 464.
- Costa CH, Stewart JM, Gomes RB, Garcez LM, Ramos PK, Bozza M, Satoskar A, Dissanayake S, Santos RS, Silva MR, Shaw JJ, David JR, Maguire JH 2002. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 66: 334-337.
- Costa CH, Tapety CM, Werneck GL 2007. [Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial]. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 415-419.
- Costa CH, Vieira JB 2001. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 223-228.
- Costa CH, Werneck GL, Rodrigues L, Jr., Santos MV, Araujo IB, Moura LS, Moreira S, Gomes RB, Lima SS 2005. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. *Annals of tropical medicine and parasitology* 99: 229-236.
- Coura-Vital W, Marques MJ, Giunchetti RC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho O de A, Moreira ND, Vitoriano-Souza J, Vieira PM, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Carneiro M, Reis AB 2011. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. *The Veterinary Journal* in press.

- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Dye C 2002a. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology* 125: 407-414.
- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C 2002b. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 186: 1314-1320.
- Croft SL, Coombs GH 2003. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 19: 502-508.
- Croft SL, Seifert K, Yardley V 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123: 399-410.
- Cunha AM, Chagas E 1937. Estudos sobre o parasito. In: Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 32: 329-337.
- da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, de Figueiredo Gontijo N, Michalick MS, Alexander B, Williams P, Melo MN 2007. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. *Vet J* 174: 636-643.
- da Costa CA, Genaro O, de Lana M, Magalhaes PA, Dias M, Michalick MS, Melo MN, da Costa RT, Magalhaes-Rocha NM, Mayrink W 1991. [Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies]. *Rev Soc Bras Med Trop* 24: 21-25.
- da Silva AR, Viana GM, Varonil C, Pires B, Nascimento Mdo D, Costa JM 1997. [Visceral leishmaniasis (kala-azar) on Ilha de Sao Luis, Maranhao, Brazil: its evolution and outlook]. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 359-368.
- da Silva AV, de Paula AA, de Pita Pereira D, Brazil RP, Carreira JC 2009. Canine leishmaniasis in Brazil: serological follow-up of a dog population in an endemic area of American visceral leishmaniasis. *J Parasitol Res* 2009.
- da Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM, Schallig HD, Brazil RP 2006. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet Res Commun* 30: 637-643.
- da Silva SM, Rabelo PF, Gontijo Nde F, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, Michalick MS 2010. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet Parasitol* 174: 150-154.
- Dantas-Torres F 2006. [Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil]. *Rev Saude Publica* 40: 537-541.
- Dantas-Torres F 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Vet Parasitol* 149: 139-146.
- Dantas-Torres F, Brandao-Filho SP 2006. [Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco]. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 352-356.

- Dantas-Torres F, Faustino MA, Lima OC, Acioli RV 2005. Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 444-445.
- Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N 2000. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad Saude Publica* 16: 925-950.
- de Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ 2006. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol* 140: 231-238.
- de Assis TS, Braga AS, Pedras MJ, Oliveira E, Barral A, de Siqueira IC, Costa CH, Costa DL, Holanda TA, Soares VY, Bia M, Caldas Ade J, Romero GA, Rabello A 2011. Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 81-85.
- de Lima VM, Fattori KR, Michelin Ade F, da Silveira Neto L, Vasconcelos Rde O 2010. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 173: 330-333.
- De Luna R, Vuotto ML, Ielpo MT, Ambrosio R, Piantedosi D, Moscatiello V, Ciaramella P, Scalone A, Gradoni L, Mancino D 1999. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 70: 95-103.
- de Oliveira SS, de Araujo TM 2003. [Evaluation of control measures for visceral leishmaniasis (kala azar) in an endemic area in Bahia, Brazil (1995-2000)]. *Cad Saude Publica* 19: 1681-1690.
- de Queiroz NM, da Silveira RC, de Noronha AC, Jr., Oliveira TM, Machado RZ, Starke-Buzetti WA 2011. Detection of *Leishmania* (*L.*) *chagasi* in canine skin. *Vet Parasitol*.
- Deane LM 1956. *Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará*, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 162 pp.
- Deane LM, Deane MP 1954. [Dogs naturally infected by *Leishmania donovani* in Ceara.]. *Hospital (Rio J)* 45: 703-707.
- Deane LM, Deane MP 1962a. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 4: 198-212.
- Deane LM, Deane MP 1962b. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 4: 198-212.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 89: 463-469.
- Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol* 17: 451-458.

- Desjeux P 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol* 14: 417-423.
- Desjeux P 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 239-243.
- Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.
- Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R 1997. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis* 25: 1240-1242.
- Dujardin JC, Campino L, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbek Y, Boelaert M 2008. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis* 14: 1013-1018.
- Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM 2006. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis* 12: 440-446.
- Dye C 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg* 55: 125-130.
- el Amin ER, Wright EP, Abdel Rahman AM, Kolk A, Laarman JJ, Pondman KW 1986. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA--immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 271-274.
- el Safi SH, Evans DA 1989. A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 334-337.
- Elkhoury A, Sousa M, Lucena F, Alves W, Sena J, Paz L 2007. Co-infecção leishmaniose visceral e AIDS no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 124.
- Enserink M 2000. Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science* 290: 1881-1883.
- Evans TG, Teixeira MJ, McAulliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa Ade A, Lima JW, Pearson RD 1992. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis* 166: 1124-1132.
- Evans TG, Vasconcelos IA, Lima JW, Teixeira JM, McAulliffe IT, Lopes UG, Pearson RD, Vasconcelos AW 1990. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 42: 118-123.
- Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi Filho G, Sessa PA, Carias VR, de Jesus AC, de Alencar JT 1986. [Participation of the dog in the cycle of transmission of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Viana, State of Espírito Santo, Brazil]. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 155-163.
- Fernandez-Bellon H, Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Ferrer L, Gallego M, Alberola J, Ramis A 2008. Little evidence of seasonal variation of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs in Spain. *Vet Parasitol* 155: 32-36.

- Fernandez-Perez FJ, Gomez-Munoz MT, Mendez S, Alunda JM 2003. Leishmania-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop* 86: 83-91.
- Ferreira A, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade AS 2008a. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary parasitology* 152: 257-263.
- Ferreira EC, Gontijo CM, Cruz I, Melo MN, Silva AM 2010. Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 895-898.
- Ferreira Ede C, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, da Silva ES, Schallig H, Gontijo CM 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 146: 235-241.
- Ferreira S, A., Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade AS 2008b. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 152: 257-263.
- Fisa R, Gallego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrio J, Gallego J, Portus M 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 83: 87-97.
- Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portus M 2001. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol* 99: 105-111.
- Fisa R, Riera C, Ribera E, Gallego M, Portus M 2002. A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 Suppl 1: S191-194.
- Flemmings BJ, Pappas MG, Keenan CM, Hockmeyer WT 1984. Immune complex decomplexation of canine sera for use in a complement-fixation test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 33: 553-559.
- Franca-Silva JC, Barata RA, Costa RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GL, Vieira EP, Prata A, Mayrink W, Nascimento E, Fortes-Dias CL, da Silva JC, Dias ES 2005. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 131: 213-220.
- Franca-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E 2003. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary parasitology* 111: 161-173.
- Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sanchez A, Roura X 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 137: 214-221.

- Franke CR, Staubach C, Ziller M, Schluter H 2002. Trends in the temporal and spatial distribution of visceral and cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, from 1985 to 1999. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 236-241.
- Freeman KS, Miller MD, Breitschwerdt EB, Lappin MR 2010. Leishmaniasis in a dog native to Colorado. *J Am Vet Med Assoc* 237: 1288-1291.
- Galati EA, Nunes VL, Rego Junior Fde A, Oshiro ET, Chang MR 1997. [Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil]. *Rev Saude Publica* 31: 378-390.
- Galvez R, Miro G, Descalzo MA, Nieto J, Dado D, Martin O, Cubero E, Molina R 2010. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol* 169: 327-334.
- Gama MEA, Barbosa JS, Pires B, Cunha AKB, Freitas AR, Ribeiro IR, Costa JML 1998. Evaluation of the level of knowledge about visceral leishmaniasis in endemic areas of Maranhao, Brazil. *Cad Saude Publica* 14: 381-390.
- Garcia AL, Parrado R, Rojas E, Delgado R, Dujardin JC, Reithinger R 2009. Leishmaniasis in Bolivia: comprehensive review and current status. *Am J Trop Med Hyg* 80: 704-711.
- Gaskin AA, Schantz P, Jackson J, Birkenheuer A, Tomlinson L, Gramiccia M, Levy M, Steurer F, Kollmar E, Hegarty BC, Ahn A, Breitschwerdt EB 2002. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *J Vet Intern Med* 16: 34-44.
- Genaro O 1993. *Leishmaniose visceral canina experimental*. Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 202 pp.
- Genaro O, da Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL, Mayrink W 1990. [Occurrence of kala-azar in the urban area of Grande Belo Horizonte, Minas Gerais]. *Rev Soc Bras Med Trop* 23: 121.
- Giunchetti RC, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Coura-Vital W, de Abreu RT, Malaquias LC, Gontijo NF, Brodskyn C, de Oliveira CI, Costa DJ, de Lana M, Reis AB 2008a. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine* 26: 623-638.
- Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Carneiro CM, Mayrink W, Marques MJ, Tafuri WL, Correa-Oliveira R, Reis AB 2008b. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 121: 23-33.
- Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB 2008c. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 84: 269-277.
- Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB 2006. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol* 135: 100-107.

- Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J* 175: 45-52.
- Gomez-Saladin E, Doud CW, Maroli M 2005. Short report: surveillance of *Leishmania* sp. among sand flies in Sicily (Italy) using a fluorogenic real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 72: 138-141.
- Gontijo CMF, Melo MN 2004. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Rev Bras Epidemiol* 7: 338-349.
- Gramiccia M, Gradoni L 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35: 1169-1180.
- Guarga JL, Lucientes J, Peribanez MA, Molina R, Gracia MJ, Castillo JA 2000a. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Trop* 77: 203-207.
- Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribanez MA, Alvar J, Castillo JA 2000b. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res Vet Sci* 69: 249-253.
- Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribanez MA, Castillo JA 2002. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 88: 13-20.
- Guerra LL, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Reis AB, Correa-Oliveira R 2009. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 104: 611-622.
- Gupta S 2011. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. *Indian J Med Res* 133: 27-39.
- Harith AE, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Faber FJ, Muigai R, Kiugu S, Laarman JJ 1987. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 603-606.
- Hockmeyer WT, Wellde BT, Sabwa CL, Smith DH, Rees PH, Kager PA 1984. A complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen I. *Ann Trop Med Parasitol* 78: 489-493.
- Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol* 89 Suppl 1: 55-73.
- Hommel M, Peters W, Ranque J, Quilici M, Lanotte G 1978. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 72: 213-218.
- Hosmer DWJ, Lemeshow S 1999. Applied Logistic Regression. John Wiley & Sons, Inc., New York, 386 pp.

- Hostomska J, Rohousova I, Volfova V, Stanneck D, Mencke N, Volf P 2008. Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8: 443-450.
- Ikeda-Garcia FA, Lopes RS, Marques FJ, de Lima VM, Morinishi CK, Bonello FL, Zanette MF, Perri SH, Feitosa MM 2007. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol* 143: 254-259.
- Iniesta L, Gallego M, Portus M 2005. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 103: 77-81.
- Jaffe CL, Baneth G, Abdeen ZA, Schlein Y, Warburg A 2004. Leishmaniasis in Israel and the Palestinian Authority. *Trends Parasitol* 20: 328-332.
- Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, Luz KG, Fernandes MZ, Jernigan J, Pearson RD 1994. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 386-388.
- Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK, Johnson AJ 1984. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet Pathol* 21: 74-79.
- Killick-Kendrick R 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* 17: 279-289.
- Kolaczinski JH, Reithinger R, Worku DT, Ocheng A, Kasimiro J, Kabatereine N, Brooker S 2008. Risk factors of visceral leishmaniasis in East Africa: a case-control study in Pokot territory of Kenya and Uganda. *Int J Epidemiol* 37: 344-352.
- Lacerda MM 1994. The Brazilian Leishmaniasis Control Program. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 489-495.
- Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, Bastien P 2002a. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 125: 197-207.
- Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P 2002b. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 40: 210-215.
- Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Correa-Oliveira R, Reis AB 2007. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 115: 135-145.
- Lainson L, Shaw JJ 1979. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In *Biology of the Kinetoplastida. London and New York: Academic Press*. 2.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In *The Leishmaniases in Biology and Medicine*,. In, W. Peters & R. Killick-Kendrick ed., London : Academic Press, p. 120.
- Last JM 2007. *Dictionary of Epidemiology*. New York: Oxford University Press, 2007. 141p.

- Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romao P, Cortes S, Rolao N, Gomes-Pereira S, Rica Capela MJ, Abranches P 2001. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol* 79: 273-284.
- Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MA, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S, Dietze R 2008. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop* 107: 205-207.
- Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, Mylonakis ME 2002. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol* 109: 19-27.
- Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS, Goto H 2009. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol* 160: 311-318.
- Lindoso JA, Lindoso AA 2009. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51: 247-253.
- Lopes EGP, Magalhães DF, Silva JA, Haddad JPA, Moreira EC 2010. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte-MG, 1993 a 2007 [Temporal and spatial distribution of leishmaniasis in humans and dogs from Belo Horizonte-MG, 1993-2007]. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62: 1062-1071.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirku M, Chocholova E, Haralambous C, Pralong F, Obornik M, Horak A, Ayala FJ, Miles MA 2007. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 9375-9380.
- Luz ZM, Schall V, Rabello A 2005. Evaluation of a pamphlet on visceral leishmaniasis as a tool for providing disease information to healthcare professionals and laypersons. *Cad Saude Publica* 21: 606-621.
- Luz ZPM, Pimenta DN, Cabral AL, Fiuza VO, Rabello A 2001. [Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte]. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 249-254.
- Magalhaes PA, Mayrink W, da Costa CA, Melo MN, Dias M, Batista SM, Michalick MS, Williams P 1980. [Kala-azar in the Rio Doce, Minas Gerais area. Results of prophylactic measures]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 22: 197-202.
- Maia C, Campino L 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158: 274-287.
- Maia C, Ramada J, Cristovao JM, Goncalves L, Campino L 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 179: 142-144.

- Maia C, Rolao N, Nunes M, Goncalves L, Campino L 2007. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. *Acta Trop* 103: 150-155.
- Malaquias LC, do Carmo Romualdo R, do Anjos JB, Jr., Giunchetti RC, Correa-Oliveira R, Reis AB 2007. Serological screening confirms the re-emergence of canine leishmaniasis in urban and rural areas in Governador Valadares, Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil. *Parasitol Res* 100: 233-239.
- Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 566-567.
- Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE 2009. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci* 87: 76-78.
- Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura AC, Timbo M, Gripp AH, Pessanha JE, Dias ES 2006. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 31-38.
- Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M, Gradoni L 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health* 13: 256-264.
- Martin-Sanchez J, Lopez-Lopez MC, Acedo-Sanchez C, Castro-Fajardo JJ, Pineda JA, Morillas-Marquez F 2001. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. *Parasitology* 122: 607-615.
- Martin-Sanchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sanchez C, Baron S, Diaz V, Morillas-Marquez F 2009. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerg Infect Dis* 15: 795-798.
- Martinez-Moreno A, Martinez-Cruz MS, Blanco A, Hernandez-Rodriguez S 1993. Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 51: 49-59.
- Martinez-Moreno A, Moreno T, Martinez-Moreno FJ, Acosta I, Hernandez S 1995. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 48: 209-220.
- Marty P, Pomares-Estran C, Housseine L, Delaunay P, Haas H, Rosenthal E 2009. [Leishmaniasis in France: an update]. *Arch Pediatr* 16 Suppl 2: S96-100.
- Marzochi MC, Coutinho SG, De Souza WJ, De Toledo LM, Grimaldi Junior G, Momen H, Pacheco Rda S, Sabroza PC, De Souza MA, Rangel Junior FB, et al. 1985. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutic and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80: 349-357.
- Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16: 188-189.
- Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhaes PA, Da Costa CA, Falcao AR, Melo MN, Falcao AL 1979. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 73: 123-137.

- Mendes W, S., Silva AA, Trovao Jde R, Silva AR, Costa JM 2002. [Space expansion of the American visceral leishmaniasis in Sao Luis, Maranhao, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 227-231.
- Menezes-Souza D, Correa-Oliveira R, Guerra-Sa R, Giunchetti RC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Oliveira GC, Reis AB 2010. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. *Vet Parasitol*.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 43: 5515-5519.
- Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, Franca-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias CL, Dias ES 2007. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol* 147: 67-76.
- Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G 2008. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* 24: 371-377.
- Mohebbali M, Hajjarian H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, Akhoundi B, Naeini KM, Avizeh R, Fakhari M 2005. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol* 129: 243-251.
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andres M, Gonzalez F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 491-493.
- Monteiro EM, da Silva JC, da Costa RT, Costa DC, Barata RA, de Paula EV, Machado-Coelho GL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES 2005. [Visceral leishmaniasis: a study on phlebotomine sand flies and canine infection in Montes Claros, State of Minas Gerais]. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 147-152.
- Moreira ED, Jr., de Souza VM, Sreenivasan M, Lopes NL, Barreto RB, de Carvalho LP 2003. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 69: 393-397.
- Moreira ED, Jr., Mendes de Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG, Pontes de Carvalho L 2004. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol* 122: 245-252.
- Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD 2007. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 145: 245-252.
- Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade AS, Antunes CM, Carneiro M 2005. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38: 456-463.
- Moreno EC, Melo MN, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade AS, Antunes CM, Genaro O, Carneiro M 2006. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban

- area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 421-427.
- MS 1985. Relatório Anual da Campanha contra as Leishmiasioses, Diretoria Regional da Bahia, Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. In, Salvador.
- MS 1996. Controle, Diagnóstico e Tratamento de Leishmaniose Visceral (Calazar) – Normas Técnicas, Fundação Nacional de Saúde, . In, Brasília.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577.
- Naucke TJ, Menn B, Massberg D, Lorentz S 2008. Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res* 103 Suppl 1: S65-68.
- Naveda LAB, Moreira EC, Machado JG, Moraes JRC, Marcelino AP 2006. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 58: 988-993.
- Neto AN, Leite AP, Oliveira AR, Dias ES, Lopes EG, Veloso I, Silva JC, Pecanha JE, Santiago MR, Cunha MC, Ramos MC, Genaro O, Brazil R, Leite RC, Resende SM, Luz VW 2001. [Program for the control of visceral leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 495.
- Nieto CG, Garcia-Alonso M, Requena JM, Miron C, Soto M, Alonso C, Navarrete I 1999. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 67: 117-130.
- Noli C, Auxilia ST 2005. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol* 16: 213-232.
- Noyes H, Chance M, Ponce C, Ponce E, Maingon R 1997. *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. *Exp Parasitol* 85: 264-273.
- Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Goncalves Filho J, Perri SH 2010. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol* 170: 131-133.
- Ok UZ, Balcioglu IC, Taylan Ozkan A, Ozensoy S, Ozbel Y 2002. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Trop* 84: 43-48.
- Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L 2006. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol* 44: 1318-1322.
- Oliveira CD, Assuncao RM, Reis IA, Proietti FA 2001. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica* 17: 1231-1239.
- Oliveira CD, Diez-Roux A, Cesar CC, Proietti FA 2006. A case-control study of microenvironmental risk factors for urban visceral leishmaniasis in a large city in

- Brazil, 1999-2000. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health* 20: 369-376.
- Oliveira GG, Santoro F, Sadigursky M 1993. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 88: 243-248.
- Oliveira LC, Araujo RR, Alves CR, Mouta-Confort E, Lopez JA, Mendonca-Lima FW 2010. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Avila, State of Bahia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 400-404.
- Otranto D, Paradies P, de Caprariis D, Stanneck D, Testini G, Grimm F, Deplazes P, Capelli G 2009. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clin Vaccine Immunol* 16: 337-343.
- Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, Franca-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O 2001. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 65: 510-517.
- Panaro MA, Brandonisio O, Cianciulli A, Cavallo P, Lacasella V, Paradies P, Testini G, De Caprariis D, Mitolo V, Otranto D 2009. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Parasitology* 136: 823-831.
- Pappas MG, Cannon LT, Sr., Hockmeyer WT, Smith DH 1985. Evaluation of complement fixation procedures for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 79: 147-151.
- Pappas MG, Hajkowski R, Diggs CL, Hockmeyer WT 1983. Development of an antigen conservative enzyme immunoassay (Dot-ELISA) for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 425-426.
- Paradies P, Sasanelli M, de Caprariis D, Testini G, Traversa D, Lia RP, Dantas-Torres F, Otranto D 2010. Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J* 186: 370-373.
- Paranhos-Silva M, Oliveira GG, Reis EA, de Menezes RM, Fernandes O, Sherlock I, Gomes RB, Pontes-de-Carvalho LC, dos-Santos WL 2003. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Vet Parasitol* 114: 97-111.
- Peters N, Sacks D 2006. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev* 213: 159-179.
- Petersen CA 2009. New means of canine leishmaniasis transmission in north america: the possibility of transmission to humans still unknown. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009: 802712.
- Petersen CA, Barr SC 2009. Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 39: 1065-1074, vi.
- Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJ, Rutten VP, Gebhard D, del Real G, Ruitenberg EJ 1995. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur J Immunol* 25: 1594-1600.

- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 62: 229-235.
- Piscopo TV, Mallia Azzopardi C 2007. Leishmaniasis. *Postgrad Med J* 83: 649-657.
- Poot J, Spreeuwenberg K, Sanderson SJ, Schijns VE, Mottram JC, Coombs GH, Vermeulen AN 2006. Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania infantum*. *Vaccine* 24: 2460-2468.
- Porrozzini R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A, Grimaldi G, Jr. 2007. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 14: 544-548.
- Quaresma PF, Murta SM, Ferreira Ede C, da Rocha-Lima AC, Xavier AA, Gontijo CM 2009. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop* 111: 289-294.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, Shaw JJ, Shaw MA, Dye C 2001a. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 122: 253-261.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C 1997. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* 115 (Pt 2): 143-156.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, Kaye PM 2001b. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 183: 1421-1424.
- Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G 1999. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol* 37: 2931-2935.
- Reis AB, Giunchetti RC, Carrillo E, Martins-Filho OA, Moreno J 2010. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol* 26: 341-349.
- Reis AB, Giunchetti RC, Coura-Vital W 2006a. Antígeno solúvel aplicado ao diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina através da reação imunoenzimática (ELISA). In UFOP, *Instituto Nacional de Tecnologia*, Brasil, p. 84.
- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, Franca-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Correa-Oliveira R 2006b. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 81: 68-75.
- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Correa-Oliveira R 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 87-95.

- Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, Mayrink W, Genaro O, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA 2006c. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol* 146: 303-311.
- Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA 2006d. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 112: 102-116.
- Reithinger R, Canales Espinoza J, Llanos-Cuentas A, Davies CR 2003a. Domestic dog ownership: a risk factor for human infection with *Leishmania (Viannia)* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 141-145.
- Reithinger R, Davies CR 2002a. American cutaneous leishmaniasis in domestic dogs: an example of the use of the polymerase chain reaction for mass screening in epidemiological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 Suppl 1: S123-126.
- Reithinger R, Davies CR 2002b. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends Parasitol* 18: 289-290.
- Reithinger R, Espinoza JC, Courtenay O, Davies CR 2003b. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). *J Clin Microbiol* 41: 1486-1493.
- Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR 2000. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. *Journal of clinical microbiology* 38: 748-751.
- Riera C, Fisa R, Udina M, Gallego M, Portus M 2004. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 102-110.
- Rodriguez-Cortes A, Fernandez-Bellon H, Ramis A, Ferrer L, Alberola J, Solano-Gallego L 2007. *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 116: 190-198.
- Rodriguez A, Solano-Gallego L, Ojeda A, Quintana J, Riera C, Gallego M, Portus M, Alberola J 2006. Dynamics of *Leishmania*-specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniasis before and after treatment. *J Vet Intern Med* 20: 495-498.
- Rolao N, Martins MJ, Joao A, Campino L 2005. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite* 12: 183-186.
- Romero GA, Boelaert M 2010. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e584.
- Rondon FC, Bevilaqua CM, Franke CR, Barros RS, Oliveira FR, Alcantara AC, Diniz AT 2008. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceara state, Brazil. *Vet Parasitol* 155: 24-31.

- Rosario EY, Genaro O, Franca-Silva JC, da Costa RT, Mayrink W, Reis AB, Carneiro M 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 197-203.
- Ross R 1903. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes on Leishman's bodies. *Brit. Med. J.* 2: 1261-1401.
- Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Duncan RB, Jr., Waki K, Chang KP, Lindsay DS 2003. Emergence of zoonotic canine leishmaniasis in the United States: isolation and immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* from foxhounds from Virginia. *J Eukaryot Microbiol* 50 Suppl: 691-693.
- Salomon O, Sinagra A, Nevot M, Barberian G, Paulin P, Estevez J, Riarte A 2008. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 109-111.
- Salomon OD, Orellano PW 2005. *Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 475-476.
- Salomon OD, Ramos LK, Quintana MG, Acardi SA, Santini MS, Schneider A 2009. [Distribution of vectors of visceral leishmaniasis in the Province of Corrientes, 2008]. *Medicina (B Aires)* 69: 625-630.
- Sanchez-Robert E, Altet L, Alberola J, Rodriguez-Cortes A, Ojeda A, Lopez-Fuertes L, Timon M, Sanchez A, Francino O 2008. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 125: 168-175.
- Santos-Gomes GM, Campino L, Abranches P 2000. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 193-198.
- Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romao P, Silveira H 2002. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 88: 21-30.
- Santos FR, Pena SD, Epplen JT 1993. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Genet* 90: 655-656.
- Saraiva L, Andrade Filho JD, Falcao AL, de Carvalho DA, de Souza CM, Freitas CR, Gomes Lopes CR, Moreno EC, Melo MN 2011. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored locations as determined by spatial analysis. *Acta Trop* 117: 137-145.
- Schallig HD, Schoone GJ, Kroon CC, Hailu A, Chappuis F, Veecken H 2001. Development and application of 'simple' diagnostic tools for visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol* 190: 69-71.
- Schantz PM, Steurer FJ, Duprey ZH, Kurpel KP, Barr SC, Jackson JE, Breitschwerdt EB, Levy MG, Fox JC 2005. Autochthonous visceral leishmaniasis in dogs in North America. *J Am Vet Med Assoc* 226: 1316-1322.

- Schonian G, Mauricio I, Gramiccia M, Canavate C, Boelaert M, Dujardin JC 2008. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol* 24: 135-142.
- Scott P, Pearce E, Cheever AW, Coffman RL, Sher A 1989. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev* 112: 161-182.
- Sewell WA, North ME, Webster AD, Farrant J 1997. Determination of intracellular cytokines by flow-cytometry following whole-blood culture. *J Immunol Methods* 209: 67-74.
- Sharma U, Singh S 2008. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45: 255-272.
- Sherlock IA, Maia H, Dias-Lima AG 1996. [Preliminary results of a project about the ecology of Phlebotomus vectors of cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia]. *Rev Soc Bras Med Trop* 29: 207-214.
- Sideris V, Karagouni E, Papadopoulou G, Garifallou A, Dotsika E 1996. Canine visceral leishmaniasis in the great Athens area, Greece. *Parasite (Paris, France)* 3: 125-130.
- Silva AR, Tauil PL, Cavalcante MN, Medeiros MN, Pires BN, Goncalves Eda G 2008. [Epidemiological situation of visceral leishmaniasis on the Island of Sao Luis, State of Maranhao]. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 358-364.
- Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, de Souza CM, Figueiredo FB 2011. Laboratory tests performed on Leishmania seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol*.
- Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP 2001a. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 285-291.
- Silva ES, Gontijo CM, Pirmez C, Fernandes O, Brazil RP 2001b. Short report: detection of Leishmania DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 65: 896-898.
- Silva JR 1957. Leishmaniose visceral (calazar). In SNdE Sanitária. Rio de Janeiro.
- Soares MR, de Mendonca IL, do Bonfim JM, Rodrigues JA, Werneck GL, Costa CH 2011. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Trop* 117: 6-9.
- Sobrinho R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, Arnal MC, Trisciuglio A, Gortazar C 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 155: 198-203.
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology* 165: 1-18.
- Solano-Gallego L, Lull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L 2000. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection. *Vet Parasitol* 90: 37-45.

- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L 2001a. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of clinical microbiology* 39: 560-563.
- Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portus M 2001b. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol* 96: 265-276.
- Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J 2007. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol* 147: 315-319.
- Strauss-Ayali D, Baneth G, Jaffe CL 2007. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 38: 547-564.
- Strauss-Ayali D, Baneth G, Shor S, Okano F, Jaffe CL 2005. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Int J Parasitol* 35: 63-73.
- Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis* 189: 1729-1733.
- Sundar S, Mondal D, Rijal S, Bhattacharya S, Ghalib H, Kroeger A, Boelaert M, Desjeux P, Richter-Airijoki H, Harms G 2008. Implementation research to support the initiative on the elimination of kala azar from Bangladesh, India and Nepal--the challenges for diagnosis and treatment. *Trop Med Int Health* 13: 2-5.
- Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, Kumar PC, Murray HW 2000. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis* 31: 1104-1107.
- Sundar S, Pai K, Kumar R, Pathak-Tripathi K, Gam AA, Ray M, Kenney RT 2001. Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India. *Am J Trop Med Hyg* 65: 193-196.
- Sundar S, Sinha PK, Rai M, Verma DK, Nawin K, Alam S, Chakravarty J, Vaillant M, Verma N, Pandey K, Kumari P, Lal CS, Arora R, Sharma B, Ellis S, Strub-Wourgaft N, Balasegaram M, Olliaro P, Das P, Modabber F 2011. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet* 377: 477-486.
- Suni MA, Picker LJ, Maino VC 1998. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods* 212: 89-98.
- Szklo M, Nieto J 2000. *Epidemiology: Beyond the Basics*. 2 ed.
- Teixeira C, Gomes R, Collin N, Reynoso D, Jochim R, Oliveira F, Seitz A, Elnaiem DE, Caldas A, de Souza AP, Brodskyn CI, de Oliveira CI, Mendonca I, Costa CH, Volf P, Barral A, Kamhawi S, Valenzuela JG 2010. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum* chagasi in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e638.

- Teixeira Neto RG, Giunchetti RC, Carneiro CM, Vitor RW, Coura-Vital W, Quaresma PF, Ker HG, de Melo LA, Gontijo CM, Reis AB 2010. Relationship of Leishmania-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 169: 248-257.
- Travi BL, Ferro C, Cadena H, Montoya-Lerma J, Adler GH 2002. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. *Res Vet Sci* 72: 83-86.
- Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramillo C, Llano R, Velez ID 1996. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. *J Med Entomol* 33: 278-285.
- Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y 2001. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg* 64: 119-124.
- Vieira JB, Coelho GE 1998. Visceral leishmaniasis or kala-azar: the epidemiological and control aspects. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 85-92.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A 1976. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ* 53: 55-65.
- Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 90: 31-37.
- Werneck GL 2008. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cad Saude Publica* 24: 2937-2940.
- Werneck GL, Costa CH, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH 2002. The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. *Epidemiology* 13: 364-367.
- Werneck GL, Pereira TJCF, Farias GC, Silva FO, Chaves FC, Gouvea MV, Costa CHN, Carvalho FAA 2008. Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial – 2004. *Epidemiol. Serv. Saúde* 17: 87-96.
- WHO 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. In WHO: Geneva, p. 184.
- Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD 2005. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog* 38: 147-160.
- Ya'ari A, Jaffe CL, Garty BZ 2004. Visceral leishmaniasis in Israel, 1960-2000. *Isr Med Assoc J* 6: 205-208.
- Zerpa O, Ulrich M, Benitez M, Avila C, Rodriguez V, Centeno M, Belizario D, Reed SG, Convit J 2002. Epidemiological and immunological aspects of human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1079-1083.
- Zerpa O, Ulrich M, Borges R, Rodriguez V, Centeno M, Negron E, Belizario D, Convit J 2003. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. *Rev Panam Salud Publica* 13: 239-245.