



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

SAMUEL SOUZA SILVA

**Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Canina na microrregião do Pajeú,
Pernambuco, Brasil**

RECIFE - PE

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

SAMUEL SOUZA SILVA

**Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Canina na microrregião do Pajeú,
Pernambuco, Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos

RECIFE - PE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586e

Silva, Samuel

Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Canina na microrregião do Pajeú, Pernambuco, Brasil / Samuel Silva. -
2022.

50 f. : il.

Orientador: Rafael Antonio do Nascimento Ramos.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência
Animal, Recife, 2023.

1. Leishmania. 2. Epidemiologia. 3. Sorologia. 4. Cão doméstico. I. Ramos, Rafael Antonio do Nascimento, orient.
II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Canina na microrregião do Pajeú,
Pernambuco, Brasil**

Dissertação elaborada por

Samuel Souza Silva

Aprovada em 18 de dezembro de 2022

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco – UFAPE

ORIENTADOR

Prof. Dra. Gílcia Aparecida de Carvalho
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco – UFAPE

Prof. Dr. Victor Fernando Santana Lima
Universidade Federal de Sergipe - UFS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada disso estaria sendo possível.

Agradeço aos meus pais José Luciano da Silva e Risomar Lourenço da Silva, pois são meus maiores exemplos de vida e sempre estão ao meu lado dando suporte em todas minhas escolhas e conquistas.

Agradeço a minha irmã Samilla Mariani Silva que sempre está ao meu lado em todos os momentos sem nunca me deixar enfraquecer até mesmo nos momentos difíceis da vida.

Agradeço as minhas avós Luiza Carlos da Silva (*in memoriam*) e Estela Maria de Souza que sempre cuidaram de mim da melhor forma, me protegendo e dando carinho necessário, principalmente nos momentos de maior turbulência em minha vida.

Agradeço a minha namorada Danniely Rodrigues de Oliveira por estar sempre ao meu lado dividindo, em especial, os momentos mais felizes de minha vida.

Agradeço ao meu orientador Professor Rafael Antonio do Nascimento Ramos por ter aceitado me orientar nesse período de desafios que é a Pós-Graduação e ter tido grande paciência durante todo esse tempo, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço a todos os meus amigos que são pessoas que estão ao meu lado para comemorarem todas as minhas conquistas, em especial a Érika, Carol, Maciel, Junior, Mirella, Joseane, Jaine, Mércia e Anne.

Agradeço a todos do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE) – Jéssica, Lívia, Rebeca, Lucas Santos, Renata, Carlos, Arthur, Yuri, Ivaldo e Eduardo – pelo acolhimento e aprendizagem durante esse tempo de vivência, em especial a professora Gílcia Aparecida de Carvalho.

Agradeço ao Laboratório de Doenças Parasitárias e ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco por concederem espaço para realização de parte do experimento, em especial aos professores Leucio Câmara Alves e Rinaldo Aparecido Mota, responsáveis pelos laboratórios, respectivamente, e aos membros que me ajudaram no processamento das amostras, Renata, Renato, Jéssica, Denny e Sophi.

A todos, meu muito obrigado!

RESUMO

Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma enfermidade causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* que tem como principal vetor no Brasil flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Os cães são considerados os principais reservatórios do agente etiológico em áreas urbanas, podendo desempenhar um importante papel na cadeia epidemiológica desta enfermidade. Objetivou-se neste estudo determinar a soroprevalência e analisar os fatores de risco associados a infecção por *L. infantum* em cães da microrregião do Pajeú, Sertão de Pernambuco. Amostras sanguíneas (n = 247) foram obtidas de caninos provenientes de oito diferentes municípios. Simultaneamente, fichas clínicas individuais foram preenchidas para obtenção de dados necessários a avaliação dos fatores de risco. Além disso, em cada residência foram coletadas as coordenadas geográficas para determinação da distribuição espacial dos casos positivos. As amostras foram inicialmente triadas através de um teste imunocromatográfico (Teste Rápido *Dual Path Plataforma* – TR DPP®, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil), e os animais reagentes foram submetidos ao teste ELISA (ELISA/S7, Biogene, Recife, Brasil) para confirmação da infecção. Os fatores de risco foram calculados através da análise univariada da variável de interesse e regressão logística considerando como dependente o resultado da sorologia. Uma soroprevalência geral de 13,77% (34/247) foi obtida. Em particular, a maior e menor prevalência foi determinada para os municípios de Tabira (26,47%; 9/34) e Quixaba (12,5%; 18/144), respectivamente. A idade acima de 10 anos foi considerada um fator de risco para infecção por *Leishmania* spp. (OR = 4,94; p = 0,029) nos animais avaliados. A distribuição espacial dos casos positivos revelou ampla dispersão na área de estudo, em especial no município de Quixaba. Por fim, conclui-se que a LVC é uma enfermidade presente na região estudada, sendo necessário a adoção de medidas preventivas para reduzir os casos caninos e mitigar o seu impacto a Saúde Pública.

Palavras-chave: *Leishmania*, epidemiologia, sorologia, cão doméstico

ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a disease caused by the protozoan *Leishmania (Leishmania) infantum*, which has as main vector in Brazil sandflies of the species *Lutzomyia longipalpis*. Dogs have been considered the main reservoirs of this parasite in urban areas, playing an important role in the epidemiological chain of the disease. The aim of this study was to determine the seroprevalence and analyze the risk factors associated with the infection by *L. infantum* in dogs from the microregion of Pajeú, state of Pernambuco. Blood samples (n = 247) were obtained of canines from eight different municipalities. Simultaneously, individual clinical charts were filled out to obtain data for the risk factors analyses. Additionally, in each residence the geographic coordinates were collected to the determination of the spatial distribution of cases. Samples were screened by using an immunochromatographic test (Dual Path Platform Rapid Test – TR DPP®, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil), and the reagent ones were submitted to the ELISA test (ELISA/S7, Biogene, Recife, Brazil) to confirm the infection. Risk factors were calculated through univariate analysis of the variables of interest and logistic regression analysis considering as dependent variable the results of the serology. An overall seroprevalence of 13.77% (34/247) was obtained. In particular, the highest and lowest prevalence was observed for the municipalities of Tabira (26.47%; 9/34) and Quixaba (12.5%; 18/144), respectively. The age (> 10 years old) was considered a risk factor for the infection by *Leishmania* spp. (OR = 4.94; p = 0.029). The spatial distribution of positive cases revealed a wide dispersion in the study area, in particular in the municipality of Quixaba. In conclusion the CVL is a disease present in the area of study; therefore, the adoption of preventive measures to reduce canine cases and mitigate its impact on Public Health are needed.

Keywords: *Leishmania*, epidemiology, serology, domestic dog

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Agente etiológico	13
2.2 Vetores	15
2.3 Ciclo biológico	16
2.4 Reservatórios	17
2.5 Epidemiologia	17
2.6 Patogenia e sinais clínicos	21
2.7 Diagnóstico	23
2.7.1 Diagnóstico direto	23
2.7.2 Diagnóstico indireto	24
2.8 Profilaxia	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Geral	26
3.2 Específicos	26
4. REFERÊNCIAS	27

CAPÍTULO I

1. Abstract	34
2. Introduction	34
3. Material and Methods	36
4. Results	38
5. Discussion	44
6. References	46
7. CONCLUSÕES GERAIS	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cPCR – PCR convencional

DAT – Teste de Aglutinação Direta

DO – Densidade óptica

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

FC – Fixação de Complemento

ICT – Imunocromatográfico

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCLV – Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

P-MAPA – Agregado Proteico de Anidrido de Fosfolinoleato de amônio e magnésio e anidrido palmitoleato

qPCR – PCR em Tempo Real

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SMF – Sistema Mononuclear Fagocitário

TR DPP® – Teste Rápido *Dual Path Plataforma*

WB – Western Blotting

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1:** Formas amastigotas de *Leishmania* sp. de medula de cão (Fonte: Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco) 14
- Figura 2:** Formas promastigotas de *Leishmania* sp. (Fonte: Fiocruz) 15

CAPÍTULO I

- Figure 1:** Map of Brazil indicating the state of Pernambuco and municipalities where animals were sampled 36
- Figure 2:** Map indicating the distribution of reagent and non-reagent animals for the presence of antibodies anti-*Leishmania (Leishmania) infantum* in the study area 42
- Figure 3:** Kernel density map demonstrating clusters of reagent animals for the presence of antibodies anti-*Leishmania (Leishmania) infantum* 43
- Figure 4:** Map indicating the buffer zone (250 m) surrounding the reagent and non-reagent animals for the presence of antibodies anti-*Leishmania (Leishmania) infantum* 44

LISTA DE QUADROS

Revisão de Literatura

Quadro 1: Classificação taxonômica da *Leishmania (Leishmania) infantum* 13

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1: Prevalência de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> em cães domésticos avaliados nos últimos 10 anos no Brasil	18
--	----

CAPÍTULO I

Table 1: Detection of antibodies anti- <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> in dogs from rural and urban areas of the microregion of Pajeú	39
--	----

Table 2: Clinical signs observed in sampled dogs, in seropositive dogs and frequency of clinical signs in seropositive dogs	40
--	----

Table 3: Univariate analysis of risk factors associated with the presence of antibodies anti- <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> in dogs of the microregion of Pajeú	41
--	----

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* (Dawit et al., 2013; Moheabali et al., 2018), e transmitido através do repasto sanguíneo de dípteros pertencentes a Família Psychodidae (Dawit et al., 2013; Rêgo & Soares, 2021).

Diversas espécies de animais silvestres (marsupiais, roedores, canídeos) podem atuar como reservatórios do parasito, entretanto, no Brasil, o cão doméstico tem sido considerado uma importante fonte de infecção em áreas urbanas (Aschar et al., 2016). Nestes animais, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é caracterizada sobretudo por dermatopatias, emagrecimento, onicogribose e lesões oculares (Pinilla et al., 2022; Kaszak et al., 2015). Adicionalmente, manifestações como hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenomegalia, inapetência e atrofia muscular são comumente observadas (Akhtardanesh et al., 2021).

A LV tem grande importância para saúde pública e faz parte da lista prioritária de doenças negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Castro et al., 2022). Tal patologia possui alta letalidade (95%) se não tratada. Ocorre mais frequentemente no Brasil, África Oriental e Índia, com acometimento de cerca de 50.000 a 90.000 pessoas anualmente. Em 2020, 90% dos casos notificados foram originários de apenas 10 países, incluindo o Brasil (WHO, 2022).

No estado de Pernambuco, a soroprevalência da LVC apresenta valores diferentes a depender do contexto epidemiológico local, basicamente varia entre 2,4% e 42,8% nas diferentes regiões do estado (Lins et al., 2018; Santos et al., 2010; Silva & Braga, 2008; Souza et al., 2014; Pimentel et al., 2015; Evaristo et al., 2021b; Araújo et al., 2016; Evaristo et al., 2020; Evaristo et al., 2021a; Dantas-Torres et al., 2006). De um modo geral, essas positivities são determinadas através de análises sorológicas que detectam anticorpos anti-*L. infantum* (Akhtardanesh et al., 2021). O Ministério da Saúde (MS) recomenda que para o diagnóstico confirmatório pelo menos duas técnicas sorológicas sejam utilizadas, sendo elas, o teste Imunocromatográfico (ICT) utilizado para a triagem e aqueles animais reagentes neste, devem ser testados pelo teste ELISA para confirmação (Brasil, 2014; Solano-Galego et al., 2017).

O tratamento dos cães com LV tem sido uma temática bastante discutida ao longo dos anos. Atualmente, o Brasil dispõe de uma única droga recomendada pelo MS (Miltefosina)

(Gonçalves et al., 2021), que embora não promova cura parasitológica, promove a cura clínica com redução da carga parasitária dos animais infectados (Noli & Auxilia, 2005). Entretanto, é importante destacar que a LVC predomina em áreas de vulnerabilidade social, sendo o tratamento muitas vezes inalcançável a maioria da população. Diante desta problemática, o MS trabalha com diversas medidas para minimizar os problemas ocasionados pela LVC, as quais incluem a eutanásia de cães positivos, utilização de coleiras impregnadas com deltametrina, utilização de telas em janelas e utilização de inseticidas para a eliminação dos vetores (Brasil, 2014). Além disso, já há a disponibilidade de vacinas para a proteção dos animais (Solano-Galego et al., 2017; Dantas-Torres et al., 2020).

Considerando o importante impacto para saúde pública e a endemicidade (muitas vezes desconhecida) de algumas áreas do Nordeste do Brasil, objetivou-se neste estudo determinar a soroprevalência e analisar os fatores de risco associados a infecção por *L. infantum* em cães da microrregião do Pajeú, Sertão de Pernambuco.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente etiológico

As Leishmanioses são enfermidades causadas por protozoários que se enquadram no filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Dawit et al., 2013), o qual possui quatro subgêneros (*Leishmania*, *Vianna*, *Mundinia* e *Sauroleishmania*) (Espinosa et al., 2018). Quadro 1.

Quadro 1: Classificação taxonômica da *Leishmania (Leishmania) infantum*

Reino:	Protista
Filo:	Sarcomastigophora
Subfilo:	Mastigophora
Classe:	Kinetoplastae
Subclasse:	Metakinoplastina
Ordem:	Kinetoplastida
Família:	Trypanosomatidae
Subfamília:	Leishmaniiae
Gênero:	<i>Leishmania</i>
Subgênero:	<i>Leishmania</i>
Espécie:	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>

Fonte: Akhoundi et al. (2016); Dawit et al. (2013); Espinosa et al. (2018).

As espécies de *Leishmania* responsáveis pela LV são *Leishmania (Leishmania) donovani* que ocorre na África ocidental e Central e na Índia (Torres-Guerrero et al., 2017; Castro-Júnior et al., 2014) e *Leishmania (L.) infantum* com ocorrência na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia Central, partes da África e no continente Americano (Castro-Júnior et al., 2014; Coura-Vital et al., 2014; Dawit et al., 2013), inclusive no Brasil (Benassi et al., 2018).

Duas formas morfológicamente distintas que podem ser encontradas no hospedeiro vertebrado (amastigota) e invertebrado (promastigota) (Brasil, 2014; Dawit et al., 2013; Solano-Galego et al., 2017), as quais são indistinguíveis morfológicamente das demais espécies causadoras Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (Megid et al., 2016). As amastigotas possuem um formato arredondado medindo entre 3 e 5 µm e possuem o flagelo internalizado,

enquanto as formas promastigotas possuem forma alongada, medem entre 10 e 15 μm , e possuem um flagelo livre responsável pela sua motilidade (Dawit et al., 2013) (Figuras 1 e 2).

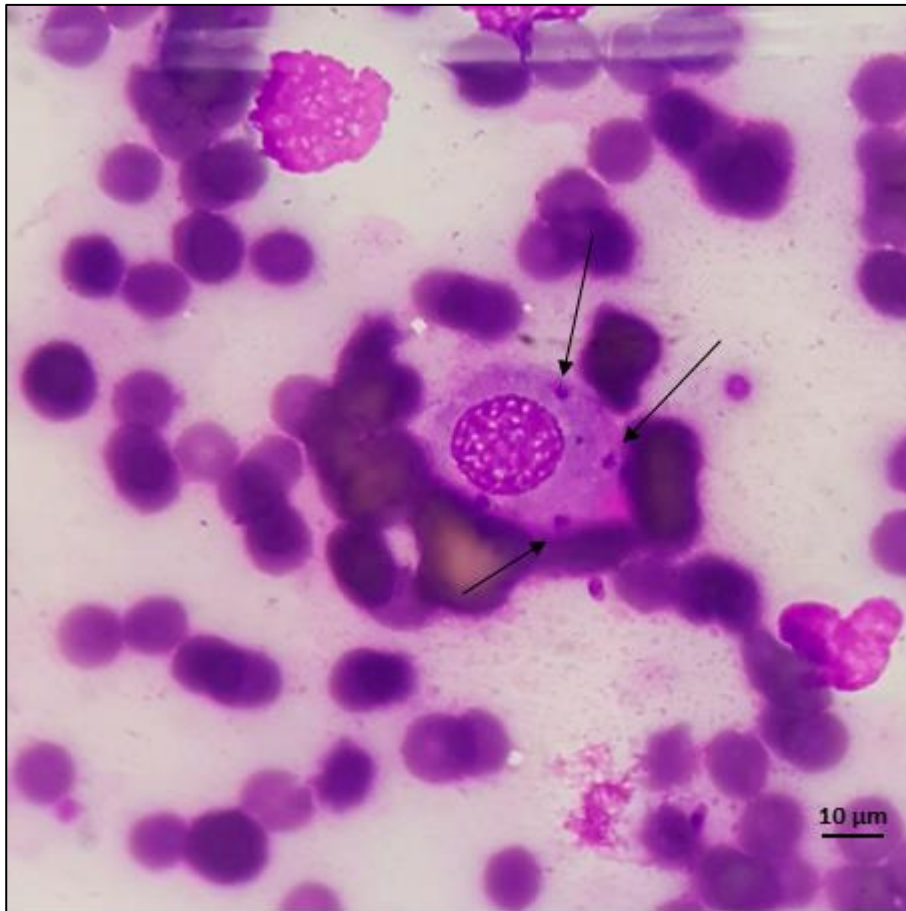


Figura 1: Formas amastigotas de *Leishmania* sp. em medula óssea de cão (Fonte: Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco)

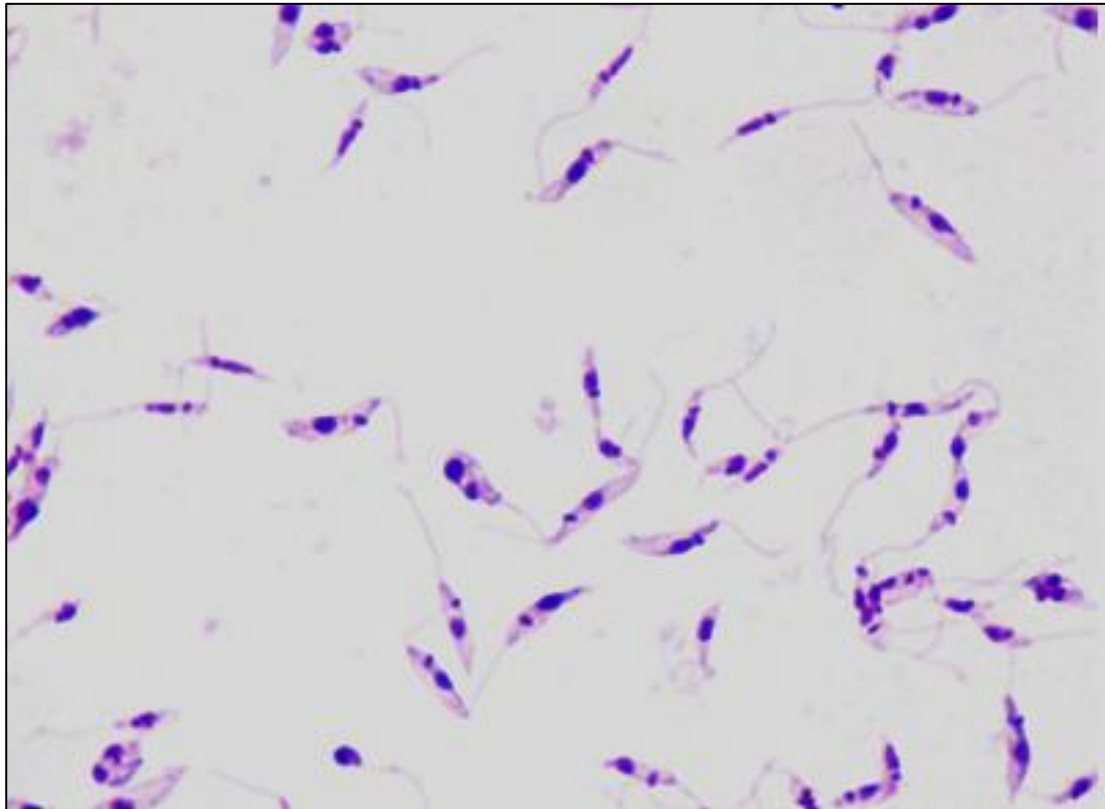


Figura 2: Formas promastigotas de *Leishmania* sp. (Fonte: Fiocruz)

2.2 Vetores

Os protozoários do gênero *Leishmania* são transmitidos por flebotomíneos vetores pertencentes a Ordem Diptera e Família Psychodidae (Roque & Jansen, 2014). No Brasil, o gênero *Lutzomyia* agrupa as principais espécies de importância epidemiológica, sendo *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* responsáveis pela transmissão da *L. infantum* (Brasil, 2014; Galvis-Ovallos et al., 2020). Embora, *Lu. longipalpis* seja a espécie mais importante na transmissão da *L. infantum*, existem outras que potencialmente podem estar relacionadas a transmissão como *Pintomyia fischeri* (Galvis-Ovallos et al., 2017), *Lu. wellcomei*, *Lu. sordellii*, *Lu. whitmani* (Pereira-Filho et al., 2018) and *Lu. evandroi* (Ubirajara Filho et al., 2020).

Conhecido popularmente como mosquito-palha, tatuquira ou birigui, *Lu. longipalpis* possui hábito crepuscular-noturno, mede de 1 a 3 mm de comprimento, possui coloração acastanhada e o corpo revestido por cerdas (Azevedo et al., 2020; Brasil, 2014). Seu ciclo biológico compreende os estágios de ovo, larva (L1 até L4), pupa e adulto, e precisa de aproximadamente 30 a 40 dias para o completo desenvolvimento. Após a cópula, a fêmea

realiza a deposição dos ovos na matéria orgânica, que dura em torno de 7 a 10 dias até a eclosão das larvas. O estágio larval (L1 à L4) a depender das condições ambientais pode durar de 20 a 30 dias. Após esse período, as larvas de quarto estágio se transformam em pupas que são uma forma mais resistente as intempéries ambientais, ficam fixadas na matéria orgânica, e entre 7 a 14 dias se desenvolvem para o estágio adulto (Brasil, 2014).

De hábito alimentar variado, existem uma ampla gama de hospedeiros vertebrados que são considerados fontes para a hematofagia desses vetores, como: cães, aves, equídeos, gambás, roedores, bovinos e humanos (Missawa et al., 2008; Dias et al., 2003). No estudo realizado por Guimarães-e-Silva et al. (2017) no estado do Maranhão, observaram que esta espécie de flebotomíneo realizou alimentação em diversas espécies animais, sendo mais comum a alimentação em aves, além disso, animais como os já citados também foram importantes fontes alimentares para essa espécie, bem como os suínos.

2.3 Ciclo biológico

Durante o repasto sanguíneo do vetor em um hospedeiro vertebrado infectado, ocorre a ingestão de formas amastigotas presentes no interior de macrófagos. Estes se rompem no trato digestório do vetor e os parasitos passam por transformações até se desenvolverem para a fase promastigota (Megid et al., 2016). Inicialmente chamada de promastigota procíclica, é uma forma flagelada e não infectante, em seguida, sofrerá um processo de metaciclogênese que originará a forma promastigota metacíclica que é a forma infectante (Liévin-Le Moal & Loiseau, 2016).

Ao realizar o repasto em hospedeiro suscetível, ocorrerá a infecção pela promastigota metacíclica que penetrará no animal juntamente com a saliva do vetor. Nesse momento, no local da picada, há uma reação inflamatória a qual se tem um recrutamento de células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) (Megid et al., 2016). No interior dessas células, há um impedimento da fusão de lisossomos e endossomos como mecanismo de escape do parasito, formando dessa forma o vacúolo parasitóforo, onde ocorrerá a modificação do agente para sua forma amastigota, seguida de sua multiplicação por fissão binária (Liévin-Le Moal & Loiseau, 2016). Em decorrência da alta multiplicação, essas células se rompem ocorrendo a liberação do agente na via hematogena, possibilitando dessa forma a penetração de outras novas células. Ainda por esta via há o direcionamento do agente para os órgãos do SMF, como fígado, baço,

linfonodos e medula óssea, caracterizando assim a forma visceral da doença (Megid et al., 2016).

2.4 Reservatórios

Diversas espécies de animais silvestres atuam naturalmente como reservatórios da *L. infantum*. Dentre eles, destacam-se hospedeiros como *Cerdocyon thous* (cachorro do mato), *Speothos venaticus* (cachorro vinagre), roedores (*Rattus rattus* e *Thrichomys aurentius*), marsupiais (*Didelphis marsupialis* e *D. albiventris*) e chiroptera (*Carollia perspicillata*) (Roque & Jansen, 2014). Recentemente, até morcegos (*Carollia perspicillata*) têm sido reportados como reservatórios silvestres deste agente (Lima et al., 2008). Considerando a alta capacidade de locomoção, estes quirópteros podem atuar como importantes dispersores da *L. infantum*, principalmente para áreas não endêmicas, além do mais, estudos têm demonstrado que morcegos fazem parte da ampla gama de fontes alimentares do *Lu. longipalpis* (Azevedo et al., 2020).

Em outras regiões do mundo diferentes espécies de animais também podem atuar como reservatórios. Desde roedores (*Rattus rattus*) na Itália (Zanet et al., 2014), até canídeos (*Vulpes vulpes*, *Canis aureus*, *Canis lupus*) e roedores (*Cricetulus migratorius*, *Mesocricetus auratus* e *Meriones persicus*) no Irã (Mohebbali et al., 2018).

Dentre os animais domésticos, além do cão, os gatos e equídeos podem participar desta cadeia epidemiológica (Mendonça et al., 2020; Benassi et al., 2018; Berenguer et al., 2021). Entretanto, o papel do cão no contexto urbano do Brasil é muito importante devido ao contato próximo com os humanos, além do alto parasitismo cutâneo, que os fazem excelentes fontes de infecção para os flebotomíneos vetores (Monteiro et al., 2005).

2.5 Epidemiologia

Atualmente a LVC encontra-se amplamente distribuída em todo o Brasil, com casos descritos em todos os estados da federação. A maioria dos estudos foca na determinação da soroprevalência que se apresenta de forma variável a depender da região e tipo de teste

empregado. A Tabela 1 ilustra a prevalência de *L. infantum* em caninos avaliados nos últimos 10 anos no Brasil.

Tabela 1: Prevalência de *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães domésticos avaliados nos últimos 10 anos no Brasil.

Região	Estado	Técnica	Prevalência	Referência
Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	TR-DPP, ELISA, RIFI	47%	Zuque et al. (2022)
	Mato Grosso	PCR	7,71%	Dias et al. (2021)
	Mato Grosso	TR-DPP e ELISA	14%	Carvalho et al. (2020)
	Mato Grosso	TR-DPP e ELISA	1,14%	Menegatti et al. (2020)
	Distrito Federal	TR-DPP e ELISA	55%	Ribeiro et al. (2019)
	Mato Grosso	TR-DPP e ELISA	19,2%	Carvalho et al. (2018)
	Mato Grosso	ELISA	23%	Fujimoro et al. (2016)
Nordeste	Pernambuco	TR-DPP, ELISA e RIFI	13%	Evaristo et al. (2021a)
	Pernambuco	TR-DPP, ELISA, RIFI e PCR	87,1%	Evaristo et al. (2021b)
	Sergipe	TR-DPP	34,69%	Oliveira et al. (2021)
	Paraíba	TR-DPP e ELISA	15,49%	Silva et al. (2021)
	Piauí	RIFI	39%	Veloso et al. (2021)
	Paraíba	ELISA	29,3%	Bernardino et al. (2020)
	Pernambuco	TR-DPP e ELISA	42,8%	Evaristo et al. (2020)
	Paraíba	TR-DPP e ELISA	13,3%	Alves et al. (2018)
	Pernambuco	ELISA	2,4%	Lins et al. (2018)
	Paraíba	ELISA	38,6%	Silva et al. (2017)
	Pernambuco	ELISA e RIFI	11,2%	Araújo et al. (2016)
	Alagoas	RIFI	16,8%	Cordeiro et al. (2016)
	Paraíba	RIFI e ELISA	7,8%	Fernandes et al. (2016)
	Paraíba	TR-DPP, ELISA, RIFI, PCR	11,33%; 43,9%	Silva et al. (2016)
	Pernambuco	ELISA e Microscopia	19%; 39,5%	Pimentel et al. (2015)
Pernambuco	RIFI, ELISA	5,5%	Souza et al. (2014)	
Norte	Rondônia	PCR	1,90%	Almeida et al. (2021)
	Pará	RIFI e ELISA	9,89%	Figueiredo et al. (2014)
	Tocantins	PCR	59,3%	Bigeli et al. (2012)
Sudeste	Minas Gerais	TR-DPP e ELISA	29,6%	Batista-Santos et al. (2021)
	São Paulo	ELISA e TR-DPP	0,52%	Silva et al. (2021b)
	Minas Gerais	RIFI e ELISA	29%	Pinheiro et al. (2020)
	São Paulo	TR-DPP e ELISA	16,08%	Rodrigues et al. (2020)
	São Paulo	TR-DPP, ELISA e RIFI	1,6%	Prestes-Carneiro et al. (2019)
	Minas Gerais	TR-DPP e ELISA	8,9%	Belo et al. (2017)

	Minas Gerais	TR-DPP e PCR	2,3%	Castro-Júnior et al. (2014)
Sul	Santa Catarina	RIFI, RIFI e PCR	11,1%	Pinto et al. (2020)

No estado de Pernambuco, vários estudos foram realizados ao longo dos anos em diferentes regiões. Por exemplo, em 2006 uma alta soroprevalência (40,37%) foi reportada no município de Paulista, região litorânea do estado (Dantas-Torres et al., 2006). Ao adentrar no interior do estado o cenário se repete, e diferentes soroprevalências têm sido detectadas como 16% (Santos et al., 2010) e 2,4% (Lins et al., 2018) no município de Garanhuns, e 5,5% município de Caruaru (Souza et al., 2014), ambas localidades situadas na região Agreste do estado. Já na região Sertão as prevalências variam de 11,2% a 42,8% (Pimentel et al., 2015; Evaristo et al., 2020; Evaristo et al., 2021b; Araújo et al., 2016). Diante de todos esses resultados é notório as diferenças de soropositividades, sendo assim, é importante que seja levado em consideração vários fatores para avaliação dessas diferentes prevalências, como os tipos de testes diagnóstico utilizados, o tamanho da população a ser estudada e a área em que os animais se encontram.

Um dos fatores que levou a esses altos índices da doença em áreas urbanas é o seu processo de urbanização, tendo em vista que era restrita a ambientes rurais, entretanto, alterações das características ecoepidemiológicas levaram a esse evento. Áreas de transição (áreas verdes periurbanas) têm mostrado grande relevância para que a transmissão urbana aconteça, além disso, fatores como deficiência no saneamento (ex. ausência de esgoto e de coleta de lixo) também foram importantes para que a LVC pudesse adquirir este comportamento urbano (Costa, 2008). Mesmo sendo uma doença que possui os flebotomíneos como principais transmissores, na sua ausência, é relatada outras formas de transmissão, como através de transfusão sanguínea, transmissão vertical e transmissão venérea através de sêmen de cães infectados (Salant et al., 2021).

2.6 Patogenia e sinais clínicos

Na LVC a presença ou ausência de sinais clínicos é dependente do tipo de resposta imune desencadeada pelo hospedeiro (Th1 ou Th2) (Alexandre-Pires et al., 2010). A resposta Th1 promove o desenvolvimento da resistência à infecção pelo fato de possuírem uma resposta imune celular exacerbada, já a resposta Th2 confere uma suscetibilidade dos animais por possuírem uma resposta humoral aumentada, sendo comum o aparecimento de sinais clínicos (Almeida et al., 2017).

Após a inoculação das formas promastigotas no organismo, há o recrutamento de células efectoras para o local, e consequente ativação de células T e macrófagos, essas células T são ativadas a partir da presença do antígeno de *Leishmania* associados a moléculas classe II do complexo principal de histocompatibilidade que estão na superfície das células apresentadoras de antígeno (Alexandre-Pires et al., 2010). Na resposta Th1, há a produção das citocinas Interferon-gama e IL-2 e TNF- α , as quais são produzidas por células T desencadeando uma resposta protetora, dessa forma, os macrófagos serão ativados para a produção de óxido nítrico que são responsáveis pela ação leishmanicida e consequente destruição do patógeno por apoptose, além disso, é observado que os macrófagos parasitados são destruídos por células T (CD8+) (Koutinas & Koutinas, 2014).

Já na resposta Th2, a qual é observada uma suscetibilidade do cão, há uma proliferação de célula B e também um declínio da produção de células T, além disso, existe uma alta atividade de plasmócitos, histiócitos e macrófagos. Contudo, essa resposta leva ao desencadeamento dos sinais clínicos comumente vistos na LVC, isso em decorrência da deposição de células nos órgãos, bem como a deposição de anticorpos (Koutinas & Koutinas, 2014).

Nos animais sintomáticos o período de incubação pode variar de 3 meses a 7 anos (Akhtardanesh et al., 2021), e a severidade das lesões está associada à carga parasitária encontrada nos tecidos (Torrecilha et al., 2016). Dentre os sinais clínicos mais frequentes destacam-se as dermatopatias que podem ser desde uma simples alopecia até uma dermatite grave com presença de úlceras (Solano-Gallego et al., 2017; Noli & Auxilia, 2005; Paltrinieri et al., 2016). Estas lesões são alterações frequentes, estando presentes em 80 a 90% dos animais sintomáticos. Sabe-se que elas são decorrentes de inflamação piogranulomatosa ou por deposição de imunocomplexos (Koutinas & Koutinas, 2014).

Na LVC, o comprometimento sistêmico torna a evolução da doença grave na maioria dos animais. Sendo assim, além das dermatopatias, sinais clínicos como caquexia, anorexia, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, distúrbios digestivos, epistaxe, atrofia muscular, poliúria, polidipsia e sinais oculares podem estar presentes (Peris et al., 2021; Akhtardanesh et al., 2021; Castro et al., 2022). É importante destacar que a principal causa de morte nos animais com LVC está relacionada a problemas renais, devido a esse fato, o quadro renal apresentado é levado em consideração para o estadiamento da doença. A principal manifestação relacionada a este sistema é a glomerulonefrite que leva a disfunção excretora ou alteração do fluxo

glomerular podendo levar a uma hipertensão. A causa dessa manifestação decorre da deposição de imunocomplexos nos glomérulos renais (Koutinas & Koutinas, 2014).

Alterações oftálmicas também são relatadas em cães com LV, tais lesões podem ser decorrentes tanto da presença do parasito nesse local bem como por uma resposta imune desencadeada pelo hospedeiro (Brito et al., 2010). Blefarite, conjuntivite, ceratoconjuntivite e ceratouveite estão entre os sinais mais comuns observados em animais com alterações oftálmicas (Andrade et al., 2009).

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico da LVC tem sido considerado um desafio, o que tem estimulado o desenvolvimento de inúmeras ferramentas para este fim. Na verdade, existem diversos métodos diretos e indiretos capazes de detectar desde o parasito em si, até os anticorpos produzidos pelo animal. Dentre os métodos diretos empregados para diagnóstico da LVC os mais utilizados são: citologia, histologia, imuno-histoquímica, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), cultura e xenodiagnóstico. Por outro lado, dentre os indiretos destacam-se Teste Imunocromatográfico (ICT), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), Fixação de Complemento (FC), Western Blotting (WB) e Teste de Aglutinação Direta (DAT) (Brasil, 2014; Paltrinieri et al., 2016).

2.7.1 Diagnóstico direto

Uma das técnicas utilizadas para o diagnóstico da LVC é a citologia, a qual consiste na identificação das formas amastigotas de *Leishmania* spp. a partir de diferentes amostras biológicas como linfonodo, medula óssea, pele, baço e fígado. Embora seja uma técnica rápida, de baixo custo e altamente específica (Pereira et al., 2018), existe a limitação de possuir sensibilidade limitada, aumentando a possibilidade de falso-negativo (Barbosa et al., 2012). Além do mais, existe uma variação de sensibilidade e especificidade a depender da amostra biológica utilizada, sendo as amostras de medula óssea e linfonodo as mais comumente utilizadas (Ramos et al., 2012).

Outras ferramentas amplamente utilizadas recentemente são as técnicas baseadas na tecnologia da PCR, a qual possui alta especificidade e sensibilidade (Peris et al., 2021). Nela há a amplificação sequencial de uma parte específica do DNA do parasito (Reale et al., 1999). Neste caso várias amostras biológicas também podem ser utilizadas, como amostras de sangue, aspirado de medula óssea ou linfonodos e fragmentos de pele (Peris et al., 2021). Mesmo sendo uma técnica que possui uma boa sensibilidade e especificidade, há limitações que dificultam sua implementação nas rotinas laboratoriais como o custo envolvido (Castro et al., 2022). Dentre as variações da PCR utilizadas para o diagnóstico da LVC, destacam-se a PCR convencional (cPCR) e a PCR em Tempo Real (qPCR). A cPCR pode ser utilizada tanto para o diagnóstico de cães sintomáticos como assintomáticos, entretanto essa sensibilidade (89 a 100%) variável é mais fiel nos cães com sinais clínicos (Travi et al., 2018). Por outro lado, qPCR tem se mostrado como uma ferramenta muito útil no acompanhamento, monitoramento e eficácia do tratamento de animais com LVC (Paltrinieri et al., 2016), dentre as variações ela tem mostrado maior confiabilidade no diagnóstico por apresentar uma melhor sensibilidade (Travi et al., 2018) e uma de suas vantagens é a identificação da carga parasitária em tempo real (Ramos et al., 2012).

2.7.2 Diagnóstico indireto

Os testes sorológicos embora muito úteis para utilização em larga escala, muitas vezes determinam apenas a exposição do animal ao agente etiológico. De acordo com o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) do MS, o diagnóstico sorológico da LVC é realizado por um teste rápido imunocromatográfico (ICT) seguido pela confirmação por um teste ELISA (Brasil, 2014). Atualmente, o teste ICT mais utilizado no Brasil é baseado na proteína recombinante k39 do complexo *Leishmania (L.) donovani*, a qual detecta a presença de anticorpos IgG nas amostras testadas. Embora apresentem altas sensibilidade (95%) e especificidade (99%) (Dourado et al., 2007), é imperativo a utilização do teste ELISA para a confirmação.

O ELISA pode ser utilizado para quantificação de anticorpos e confirmação da infecção após a triagem pelo teste ICT, uma de suas vantagens é a aplicabilidade de uma grande quantidade de amostras ao mesmo tempo. A quantificação de anticorpos é feita através de um espectrofotômetro que avalia a titulação por densidade óptica, diminuindo dessa forma as

possibilidades de erro de leitura pelo operador (Travi et al., 2018). A depender do tipo de antígeno utilizado, a sensibilidade e especificidade podem ser variadas, sendo normalmente valores acima de 90% para ambos os parâmetros (Castro et al., 2022).

A RIFI é outra técnica disponível para o diagnóstico confirmatório de LVC, a qual é considerada semi-quantitativa (Silva et al., 2009). Nela são utilizados como antígenos promastigotas de *Leishmania* sp.. Para a execução do teste será utilizado um conjugado marcado com isotiocianato de fluoresceína e a amostra será considerada positiva quando observado reação fluorescente por completo da superfície do antígeno em amostras com diluições de soro a partir de 1:40 (Ratzlaff et al., 2018). Mesmo sendo um teste com uma boa sensibilidade (de 82 a 95%) e especificidade (de 78 a 92%), possui algumas limitações, como o uso de microscópio específico e, além disso, habilidade do técnico em realizar a leitura da reação (Matsumoto, 2022).

2.8 Profilaxia

É necessário que o controle da LVC seja baseado em uma abordagem de Saúde Única focando não apenas nas medidas voltadas ao reservatório, mas também ao manejo ambiental com foco no controle vetorial e no diagnóstico e tratamento precoce de pacientes humanos. Neste contexto, o MS através do PCLV (Brasil, 2014) tem recomendado medidas como:

- Ações voltadas para o cão
 - Eutanásia de cães positivos
 - Uso de coleiras impregnadas com deltametrina 4%
 - Vacinação dos cães
 - Utilização de telas em canis
- Ações voltadas para os humanos
 - Educação permanente
 - Uso de telas em portas e janelas
 - Uso de repelentes
 - Evitar atividades em horário crepuscular em ambientes que o vetor pode ser encontrado
- Ações voltadas para os vetores
 - Eliminação dos criadouros através do saneamento do ambiente

- Uso de inseticidas de ação residual

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Estudar os aspectos epidemiológicos da LVC na microrregião do Sertão do Pajeú, Pernambuco.

3.2. Específicos

- Determinar a soroprevalência da LVC em cães provenientes da microrregião do Sertão do Pajeú.
- Identificar a distribuição espacialmente dos casos de cães sorroreagentes para LVC.
- Avaliar os fatores de risco associados a infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* nos cães estudados.

4. REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1-40, 2016.
- AKHTARDANESH, B. *et al.* Seroepidemiology of visceral leishmaniasis among free-roaming dogs and children in Zahedan city, southeast of Iran, 2018–2020. **Microbial Pathogenesis**, v. 161, p. 1-5, 2021.
- ALEXANDRE-PIRES, G. *et al.* Canine leishmaniosis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 137, n. 3-4, p. 275-283, 2010.
- ALMEIDA, A. P. *et al.* The spread of visceral leishmaniasis in Brazil: the first canine cases described in Ji-Paraná, Rondônia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, p. 1-7, 2021.
- ALMEIDA, B. F. M. *et al.* The effects of increased heme oxygenase-1 on the lymphoproliferative response in dogs with visceral leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 222, n. 5, p. 693-703, 2017.
- ALVES, T. W. B. *et al.* Soroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniosis in Itaporanga-PB. **Periódico Tchê Química**, v. 16, n. 31, p. 353-364, 2018.
- ANDRADE, A. L. *et al.* Citologia de impressão da superfície ocular de cães infectados naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*. **Archives of Veterinary Science**, v. 14, n. 1, p. 9-16, 2009.
- ARAÚJO, A. C. *et al.* Epidemiological aspects and risk factors for infection by *Leishmania infantum chagasi* in dogs from municipality of Petrolina, Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 3, p. 41-48, 2016.
- ASCHAR, M. *et al.* Value of the oral swab for the molecular diagnosis of dogs in different stages of infection with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 225, p. 108-113, 2016.
- AZEVEDO, R. *et al.* Leishmaniose Visceral no Brasil: o que é preciso saber. **Brazilian Journal of Global Health**, v. 1, n. 3, p. 24-31, 2020.
- BARBOSA, V.T. *et al.* Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido a partir de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.64, n.6, p.1465-1470. 2012.
- BATISTA-SANTOS, F. *et al.* Eco-epidemiological Aspects of Visceral Leishmaniasis in the Municipality of Diamantina, Jequitinhonha Valley (Minas Gerais State, Brazil). **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 94, n. 2, p. 209-215, 2021.
- BELO, V. S. *et al.* Reliability of techniques used in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by the national control program in Brazil: a survey in an area of recent transmission. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 146, p. 10-15, 2017.
- BENASSI, J. C. *et al.* Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1058-1063, 2018.

- BERENGUER, L. K. A. R. *et al.* Correction to: *Leishmania infantum* Infection in a domestic cat: A real threat or an occasional finding?. **Acta Parasitologica**, v. 66, n. 3, p. 673-676, 2021.
- BERNARDINO, M. G. S. *et al.* High seroprevalence and associated factors for visceral leishmaniasis in dogs in a transmission area of Paraíba state, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, p. 1-9, 2020.
- BIGELI, J. G. *et al.* Diagnosis of *Leishmania* (Leishmania) *chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 18-23, 2012.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Ministério da Saúde, Brasília, 2014.
- BRITO, F. L. C. *et al.* Histopathological findings and detection of parasites in the eyes of dogs infected naturally with *Leishmania chagasi*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1141-1147, 2010.
- CARVALHO, A. M. R. S. *et al.* An ELISA immunoassay employing a conserved *Leishmania* hypothetical protein for the serodiagnosis of visceral and tegumentary leishmaniasis in dogs and humans. **Cellular Immunology**, v. 318, p. 42-48, 2017.
- CARVALHO, A. G. *et al.* High seroprevalence and peripheral spatial distribution of visceral leishmaniasis among domestic dogs in an emerging urban focus in Central Brazil: a cross-sectional study. **Pathogens and Global Health**, v. 112, n. 1, p. 29-36, 2018.
- CARVALHO, M. R. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: perception, prevalence, and spatial distribution in municipality of Nossa Senhora do Livramento, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, p. 1-11, 2020.
- CASTRO-JÚNIOR, J. G. *et al.* Evidence of *Leishmania* (Leishmania) *infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPP®) and PCR assays. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, p. 225-229, 2014.
- CASTRO, R. B. *et al.* Antigens and their diagnostic performance for Canine Visceral Leishmaniasis: a critical review. **Veterinary Parasitology**, v. 301, p. 1-12, 2022.
- CORDEIRO, L. L. L. R. *et al.* Leishmaniose Visceral Canina na microrregião serrana dos Quilombos, leste alagoano, Alagoas, Brasil. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 12, n. 22, p. 169-176, 2016.
- COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 2959-2963, 2008.
- COURA-VITAL, W. *et al.* Evaluation of changes in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new protocol for diagnosis. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. 1-6, Mar, 2014.
- DANTAS-TORRES, F. *et al.* Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 54-60, 2006.
- DANTAS-TORRES, F. *et al.* Vaccination against canine leishmaniasis in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 3, p. 171-176, 2020.
- DAWIT, G. *et al.* A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. **Journal Bacteriology & Parasitology**, v. 4, n. 166, p. 1-7, 2013.

- DIAS, A. F. L. R. *et al.* Molecular detection of visceral leishmaniasis in dogs from Barão de Melgaço, Pantanal region of Mato Grosso, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, p. 1-5, 2021.
- DIAS, F. O. P. *et al.* Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 1373-1380, 2003.
- DOURADO, Z. F. *et al.* Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 36, n. 3, p. 205-214, 2007.
- ESPINOSA, O. A. *et al.* An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430-442, 2018.
- EVARISTO, A. M. C. F. *et al.* Canine leishmaniasis in the semi-arid region of Pernambuco, northeastern Brazil: epidemiology, factors associated with seropositivity and spatial analysis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, 2020.
- EVARISTO, A. M. C. F. *et al.* Detecção e caracterização molecular de *Leishmania* em cães do Nordeste do Brasil. **Brazilian Journal of Global Health**, p. 23-29, 2021a.
- EVARISTO, A. M. C. F. *et al.* Comparison of serological and molecular tests to investigate *Leishmania* spp. infections in stray dogs from an area of intense visceral leishmaniasis transmission in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, p. 1-8, 2021b.
- FERNANDES, A. R. F. *et al.* Risk factors associated with seropositivity for *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* in dogs in the state of Paraíba, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 90-98, 2016.
- FIGUEIREDO, M. J. F. M. *et al.* Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, p. 102-106, 2014.
- FUJIMORI, M. *et al.* Prevalence and associated factors of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Mato Grosso, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-6, 2016.
- GONÇALVES, G. *et al.* Increased *Leishmania infantum* resistance to miltefosine and amphotericin B after treatment of a dog with miltefosine and allopurinol. **Parasites and Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2021.
- GALVIS-OVALLOS, F. *et al.* Detection of *Pintomyia fischeri* (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania infantum* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) promastigotes in a focus of visceral leishmaniasis in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 58, n. 2, p. 830-836, 2020.
- GALVIS-OVALLOS, F. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 24, p. 1-10, 2017.
- GUIMARAES-E-SILVA, A. S. *et al.* *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. 1-19, 2017.
- KASZAK, I. *et al.* Canine leishmaniasis—an emerging disease. **Annals of Parasitology**, v. 61, n. 2, p. 69-76, 2015.

- KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.
- LIÉVIN-LE MOAL, V.; LOISEAU, P. M. *Leishmania* hijacking of the macrophage intracellular compartments. **The FEBS Journal**, v. 283, n. 4, p. 598-607, 2016.
- LIMA, H. *et al.* Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 412-414, 2008.
- LINS, T. N. B. *et al.* Seroprevalence and spatial distribution of canine leishmaniasis in an endemic region in Brazil: how has the situation changed after 10 years?. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. 680-682, 2018.
- MATSUMOTO, P. S. S. *et al.* The path of canine visceral leishmaniasis versus the path of Center for Zoonoses Control: contributions of spatial analysis to health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 38, p. 1-16, 2022.
- MEGID, J. *et al.* Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. **Rio de Janeiro: Roca**, p. 799-821, 2016.
- MENDONÇA, I. L. *et al.* Infection of *Lutzomyia longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 280, n. 280, p. 1-4, 2020.
- MENEGATTI, J. A. *et al.* Fauna flebotômica e soroprevalência para leishmaniose visceral canina em área urbana na região Centro-Oeste do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p. 1197-1205, 2020.
- MISSAWA, N. A. *et al.* Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 365-368, 2008.
- MOHEBALI, M. *et al.* Geographic distribution and spatial analysis of *Leishmania infantum* infection in domestic and wild animal reservoir hosts of zoonotic visceral leishmaniasis in Iran: A systematic review. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 55, n. 3, p. 173-183, 2018.
- MONTEIRO, E. M. *et al.* Leishmaniose visceral: estudo de flebotômicos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 147-152, 2005.
- NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, v. 16, n. 4, p. 213-232, 2005.
- OLIVEIRA, M. R. *et al.* Canine leishmaniasis in an endemic region, Northeastern Brazil: a comparative study with four groups of animals. **Parasitology Research**, v. 120, n. 11, p. 3915-3923, 2021.
- PALTRINIERI, S. *et al.* Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 552-578, 2016.
- PEREIRA, P. *et al.* Leishmaniose visceral canina: relato do primeiro caso sintomático, autóctone em Guaíra/PR. **Revista Científica de Medicina Veterinária–Pequenos Animais e animais de estimação**, n. 15, p. 38-43, 2018.
- PEREIRA-FILHO, A. A. *et al.* Molecular Identification of *Leishmania* spp. in Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the Lençóis Maranhenses National Park, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 55, n. 4, p. 989-994, 2018.

- PERIS, M. P. *et al.* Comparative Study of Real-Time PCR (TaqMan Probe and Sybr Green), Serological Techniques (ELISA, IFA and DAT) and Clinical Signs Evaluation, for the Diagnosis of Canine Leishmaniasis in Experimentally Infected Dogs. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, p. 1-10, 2021.
- PIMENTEL, D. S. *et al.* Prevalence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs in an endemic area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 491-493, 2015.
- PINHEIRO, A. C. *et al.* Epidemiological aspects and spatial distribution of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, Brazil, between 2008 and 2012. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1-5, 2019.
- PINILLA, J. C. *et al.* Canine Visceral Leishmaniasis in Colombia Resistant to the Treatment of Choice (Meglumine Antimoniate Plus Allopurinol). **International Journal of Veterinary Science**. v. 11, n. 1, p. 117-120, 2022.
- PINTO, A. O. *et al.* First case of canine visceral leishmaniasis in the midwestern of Santa Catarina State, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. 1-6, 2020.
- PRESTES-CARNEIRO, L. E. *et al.* Spatiotemporal analysis and environmental risk factors of visceral leishmaniasis in an urban setting in São Paulo State, Brazil. **Parasites e Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2019.
- RAMOS, R. A. N. *et al.* Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of *Leishmania infantum chagasi* in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 192-195, 2012.
- REALE, S. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2931-2935, 1999.
- RÊGO, F. D.; SOARES, R. P. *Lutzomyia longipalpis*: an update on this sand fly vector. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. 1-29, 2021.
- RODRIGUES, T. F. *et al.* Spatial and seroepidemiology of canine visceral leishmaniasis in an endemic Southeast Brazilian area. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1-7, 2020.
- ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.
- SALANT, H. *et al.* Early onset of clinical leishmaniosis in a litter of pups with evidence of in utero transmission. **Parasites and Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2021.
- SANTOS, J. M. L. *et al.* Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 41-45, 2010.
- SILVA, D. A. *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in a vulnerable region in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, p. 1-12, 2021.b
- SILVA, J. D. *et al.* Leishmaniose visceral em cães de assentamentos rurais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1292-1298, 2017.
- SILVA, O. A.; BRAGA, G. M. S. Leishmaniose visceral canina no município de São Vicente Férrer, Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 101-102, 2008.

- SILVA, R. *et al.* Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 625-629, 2016.
- SILVA, R. M. *et al.* Análise TG-ROC de testes de imunofluorescência no diagnóstico de leishmaniose visceral canina. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 6, p. 1044-1053, 2009.
- SILVA, R. B. S. *et al.* Spatial analysis of canine leishmaniasis in an area of transmission of the semi-arid region of the State of Paraíba, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, p. 1-10, 2021.
- SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 706-717, 2017.
- SOUZA, Z. C. *et al.* Leishmaniose visceral canina e humana em Caruaru, Pernambuco, no período de 2005 a 2010. **Journal of Tropical Pathology**, v. 43, n. 1, p. 57-68, 2014.
- RATZLAFF, F. R. *et al.* Coinfecções por *Leishmania infantum*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães necropsiados da região central do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 109-116, 2018.
- RIBEIRO, C. R. *et al.* Prevalência da leishmaniose visceral canina e coinfecções em região periurbana no Distrito Federal–Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. 1-8, 2019.
- TORRECILHA, R. B. P. *et al.* Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 132, p. 83-87, 2016.
- TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 1-15, 2017.
- TRAVI, B. L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2018.
- UBIRAJARA FILHO, C. R. C. *et al.* *Lutzomyia evandroi* in a New Area of Occurrence of Leishmaniasis. **Acta Parasitologica**, v. 65, n. 3, p. 716-722, 2020.
- VELOSO, E. C. M. *et al.* Socio-economic and environmental factors associated with the occurrence of canine infection by *Leishmania infantum* in Teresina, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 24, p. 1-8, 2021.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**, 2022. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis#:~:text=Visceral%20leishmaniasis%20\(VL\)%2C%20also,East%20Africa%20and%20in%20India](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis#:~:text=Visceral%20leishmaniasis%20(VL)%2C%20also,East%20Africa%20and%20in%20India). Acesso em 11 abril. 2022.
- ZANET, S. *et al.* Epidemiology of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in *Rattus rattus* in absence of domestic reservoir and definitive hosts. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 3-4, p. 247-249, 2014.
- ZUQUE, M. A. S. *et al.* Ocorrência de *Leishmania* spp. na população canina domiciliada e humana de Três Lagoas, Mato Grosso do Sul e análise espacial. **Veterinária e Zootecnia**, p. 1-18, 2022.

CAPÍTULO 1

Canine Visceral Leishmaniasis: risk factors and spatial analysis in an endemic area of Northeastern Brazil

Abstract

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a disease caused by the protozoon *Leishmania (Leishmania) infantum*, parasite of zoonotic concern. In this study we determined the seroprevalence, assessed the risk factors as well as the spatial distribution of infection by *L. infantum* in dogs from the microregion of Pajeú, Sertão of Pernambuco. Canine sera samples (n = 247) were tested (*Dual Path Platform* Rapid Test – TR DPP® for screening, followed by ELISA/S7® for confirmation) and risk factors assessed through univariate analysis and logistical regression. The spatial distribution of reagents dogs was analyzed by drawing a map using the QGIS. Overall, a seroprevalence of 13.77% (34/247) was detected, with the majority of cases predominating in the in the municipality of Tabira (26.47%; 9/34). No positive animals were observed in four municipalities. The age above 10 years-old was considered the only risk factor associated to the presence of antibodies anti-*L. infantum*. The spatial distribution of positive cases revealed a wide dispersion in the study area, in particular in the municipality of Quixaba. Findings of this research demonstrated the presence of antibodies anti-*L. infantum* in dogs, indicating that the age (>10 years old) is a risk factor. Finally, preventive measures (use of repellent products, control of vectors and environmental management) are needed in order to reduce the risk of infection for animals, mitigating the potential impact for the local public health.

Introduction

Visceral Leishmaniasis (VL) is a disease of cosmopolitan distribution caused by the protozoan *Leishmania (Leishmania) infantum* (Akhoundi et al., 2016). Of zoonotic concern, the VL is responsible for approximately 50.000 to 90.000 cases annually in the world, with the highest occurrence in Brazil, East Africa and India (WHO, 2022). The etiological agent is predominantly transmitted by vectors, being sandflies of the genus *Lutzomyia* those more important in the Americas (Galvis-Ovallos et al., 2020). For a long time, cases of VL

predominated in rural areas, but in recent years has occurred also in urban areas with high population density (Almeida and Wernek, 2014).

The infection by *L. infantum* can occur in several wild animal species (e.g., foxes, rodents and marsupials), as well as in domestic ones, such as dogs and less frequently cats (Roque and Jansen, 2014; Berenguer et al., 2021). Dogs are those more threatened and clinically they present a wide range of signs (e.g., skin lesions, onychogryphosis, ophthalmopathies and weight loss). It is important to note that many animals remain asymptomatic, serving as important reservoirs (Akhtardanesh et al., 2021; Peris et al., 2021). Because the presence of asymptomatic animals in endemic regions, serological surveys are pivotal to understand the distribution of potential reservoirs in these areas (Rondon et al., 2008).

The seroprevalence of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) varied widely depending of the geographic region and type of test employed (Carvalho et al., 2020). In the state of Pernambuco, prevalence rates from 2.4% (Lins et al., 2018) to 42.8% (Evaristo et al., 2020) have been observed. This serological information in dogs is useful from an epidemiological perspective, since canine cases precede human cases. In addition, the early diagnosis in these animals may drive the measure to be conducted for maintain a good health status. In pursuit of improve the prevention of canine infection, several risk factors have been assessed, and features such as living in rural areas or close to green areas, male animals and crossbreeding animals may be considered risk factors (Evaristo et al., 2020; Araújo et al., 2016).

The CVL has passed for an urbanization process in Brazil, with the full epidemiological chain occurring also urban areas (Batista-Santos et al., 2021; Arruda et al., 2019). Undoubtedly, anthropic actions (e.g., deforestation and unplanned cities growth) along with the absence of basic sanitation in many regions have contributed for the aggravation of this panorama (Batista-Santos et al., 2021). Therefore, the understanding of the spatial distribution of cases and how they spread in an endemic region is paramount to establish barriers and avoid the dispersion of cases (Arruda et al., 2019; Evaristo et al., 2020). The aim of this study was to determine the seroprevalence, assess the risk factors as well as the spatial distribution of infection by *L. infantum* in dogs from the microregion of Pajeú, Sertão of Pernambuco.

Material and Methods

Study area and ethical aspects

The study was conducted in the microregion of Pajeú, Sertão of Pernambuco, Northeastern Brazil. Eight municipalities that notified human cases on the last 15 years were included in the research: Afogados da Ingazeira ($07^{\circ}45'03''$ S and $37^{\circ}38'21''$ W), Brejinho ($07^{\circ}20'58''$ S and $37^{\circ}17'10''$ W), Carnaíba ($07^{\circ}48'19''$ S and $37^{\circ}47'38''$ W), Iguaracy ($07^{\circ}50'07''$ S and $37^{\circ}30'55''$ W), Quixaba ($07^{\circ}43'13''$ S and $37^{\circ}50'54''$ W), São José do Egito ($07^{\circ}28'44''$ S and $37^{\circ}16'28''$ W), Tabira ($07^{\circ}35'27''$ S and $37^{\circ}32'22''$ W) and Tuparetama ($07^{\circ}36'08''$ S and $37^{\circ}18'41''$ W) (Figure 1). The area is characterized by a hot and dry tropical climate, inserted in the caatinga biome, it has stretches of hyper xerophilous forest and an average temperature ranging between 17 and 36 °C. The rainy season runs from November to July, with an average annual precipitation that varies from 5 to 118 millimeters (IBGE, 2021).

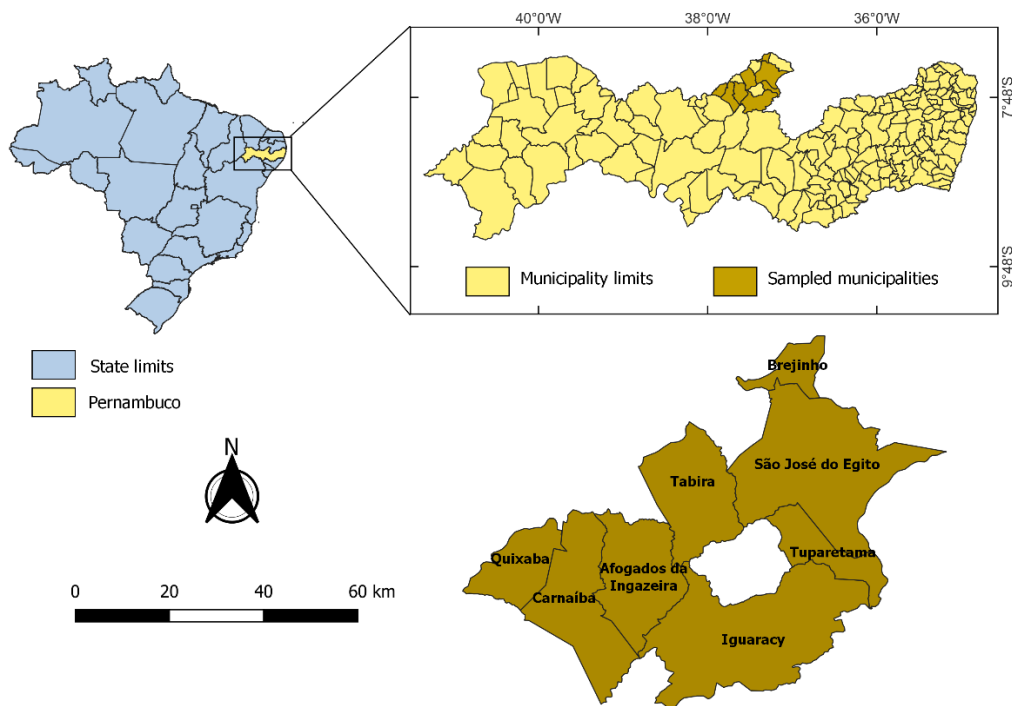


Figure 1: Map of Brazil indicating the state of Pernambuco and municipalities where animals were sampled.

All procedures herein reported were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal Rural University of Pernambuco (protocol number: 9537180121).

Animals, sampling and serological examination

The minimum sample size required ($n = 246$) was calculated considering the estimated canine population of the region ($n = 35,129$), which followed the proportion established in a previous study (Canatto et al., 2012). A margin of error of 5% and a confidence interval of 95% were taken into account (Thrusfield, 2004). The collection points in each municipality were randomly determined (Reis, 2003).

Blood samples were obtained from animals of both sexes, different breeds and aged between 6 months and 13 years-old. A physical examination of each animal was performed and clinical signs suggestive of the infection by *Leishmania* were recorded in individual clinical charts. An epidemiological questionnaire was applied to each owner to obtain data for analysis of risk factors.

All samples were screened by the Rapid Dual Path Platform Test (TR DPP[®], Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil), which is a qualitative test that identifies anti-*Leishmania* IgG antibodies. Afterwards, reagent samples were analyzed through a quantitative test ELISA/S7[®] (Biogene, Recife, Brazil) and concentration of antibodies measured in a spectrophotometer at absorbance of 450 nm. All tests were performed according to the manufacturers' recommendations, and animals were considered reagent when scored positive in both techniques.

Data analysis

Data were analyzed using descriptive statistics to obtain absolute and relative frequencies. Subsequently, the G Test was used to assess the seropositivity of dogs in each municipality, as well as in rural and urban areas. Risk factors were calculated using univariate analysis for the variable of interest and logistic regression considering the serology result as dependent. A significance level of 5% was considered in both analyses. The G test and risk factor analyses were conducted using the BioEstat version 5.3 (Instituto Mamirauá, Brazil) and EPIINFOTM7.2.2.6 software, respectively.

Spatial analysis

The geographic coordinates of each collection point (residence of animals) were obtained through the Global Positioning System (GPS). Maps were created using the QGIS

3.22.10 software, where georeferenced data were inserted in continue cartographic bases (shapefiles version 2017) available at the IGBE database.

A thematic map and a Kernel density map were created for indicate the distribution of cases, as well as the cluster of positive cases, respectively. In addition, considering the mean dispersion of vectors (250 m), a buffer zone was established surrounding positive and negative cases, demonstrating a risk area of potential transmission.

Results

The overall seroprevalence obtained was 13.77% (34/247), with the highest number of positive animals (26.47%; 9/34) in the municipality of Tabira. Non-reagent animals were observed in Afogados da Ingazeira, Brejinho, Iguaracy and Tuparetama. The detailed results of the serological analysis, according to the municipality and collection area (urban or rural), are described in Table 1.

Table 1: Detection of antibodies anti-*L. infantum* in dogs from rural and urban areas of the microregion of Pajeú.

Municipality	Urban area (UA)			Rural area (RA)			Prevalence by municipality (34/247; 13.77%)
	DPP	ELISA	DPP+ELISA	DPP	ELISA	DPP+ELISA	
Afogados da Ingazeira	0/16	-	0/16	-	-	-	0/16
Brejinho	1/12 (8.33%)	0/1	0/12	-	-	-	0/12
Carnaíba	5/6 (83.33%)	4/5 (80%)	4/6 (66.67%)	4/14 (28.57%)	1/4 (25%)	1/14 (7.14%)	5/20 (25%)
Iguaracy	0/3	-	0/3	-	-	-	0/3
Quixaba	1/7 (14.29%)	1/1 (100%)	1/7 (14.26%)	38/137 (27.74%)	17/38 (44.74%)	17/137 (12.41%)	18/144 (12.5%)
São José do Egito	3/9 (33.33%)	2/3 (66.66%)	2/9 (22.22%)	-	-	-	2/9 (22.22%)
Tabira	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	10/33 (30.30%)	8/10 (80%)	8/33 (24.24%)	9/34 (26.47%)
Tuparetama	0/6	-	0/6	-	-	0/3	0/9

A total of 13.90% (26/187) of animals from rural areas were reagents, while among those of the urban region a seroprevalence of 13.33% (8/60) was observed. It is important to note a predominance of reagent animals from the rural areas of the municipalities of Tabira and Quixaba compared with the urban one (G-Test = 10.2792; p = 0.0059).

Of all the evaluated animals, 53% (131/247) presented at least one clinical sign. Taken into account the seroreagents, 61.8% (21/34) presented clinical signs suggestive of infection by *L. infantum*, being lymphadenomegaly (38.2%; 13/34) and alopecia (23.5%; 8/34) those more commonly observed (Table 2).

Table 2: Clinical signs observed in sampled dogs, in seropositive dogs and frequency of clinical signs in seropositive dogs.

Clinical signs	Dogs with clinical signs		Frequency (%)
	Total	Seropositive	
Alopecia	32	8	23.5
Paronychia	5	1	2.9
Onychogryphosis	35	7	20.6
Ophtalmopathies	14	3	8.8
Gastrointestinal	43	5	14.7
Disorder micturition	3	0	0
Lymphadenomegaly	62	13	38.2
Anorexia	1	1	2.9
Hyporexia	14	4	11.8

Based on the univariate analysis the only risk factor identified was the age of animals. In particular, those older than 10 years old were more prone to the infection (OR=0.029). The Table 3 shows the analysis of risk factors associated with the presence of antibodies anti-*L. infantum*.

Table 3: Univariate analysis of risk factors associated with the presence of antibodies anti-*L. infantum* in dogs of the microregion of Pajeú.

Variables	N	Positives - n (%)	Univariate analysis - OR (CI 95%)	p-value	
Huntig	Yes	69	9 (13.0)	0.91 (0.35 – 2.18)	0.509
	Not	178	25 (14.0)		
Housing	Residence	57	7 (12.3)	0.84 (0.29 – 2.14)	0.451
	Peridomicile	190	27 (14.2)		
Area	Rural	187	26 (13.9)	1.04 (0.42 – 2.85)	0.551
	Urban	60	8 (13.3)		
Ectoparasites	Yes	103	12 (11.7)	0.73 (0.31 – 1.63)	0.266
	Not	144	22 (15.3)		
Sex	Male	175	24 (13.7)	0.98 (0.42 – 2.45)	0.558
	Female	72	10 (13.9)		
Age	<5 years	174	19 (10.9)	1.59 (0.62 – 3.89)	0.184
	≥5 a 10 years	61	10 (16.4)		
	≥10 years	10	5 (50.0)		
Pelage	Short	210	32 (15.2)	4.94 (0.95 – 26.22)	0.029*
	Avarage	34	2 (5.9)		
	Long	3	0 (0.0)		

N: Total samples; *n*: Total positive and negative samples; *OR*: Odds Ratio; *CI*: Confidence interval;

**p* <0.05, significant association

The spatial analysis revealed a broad distribution of reagent dogs in the study area (Figure 2).

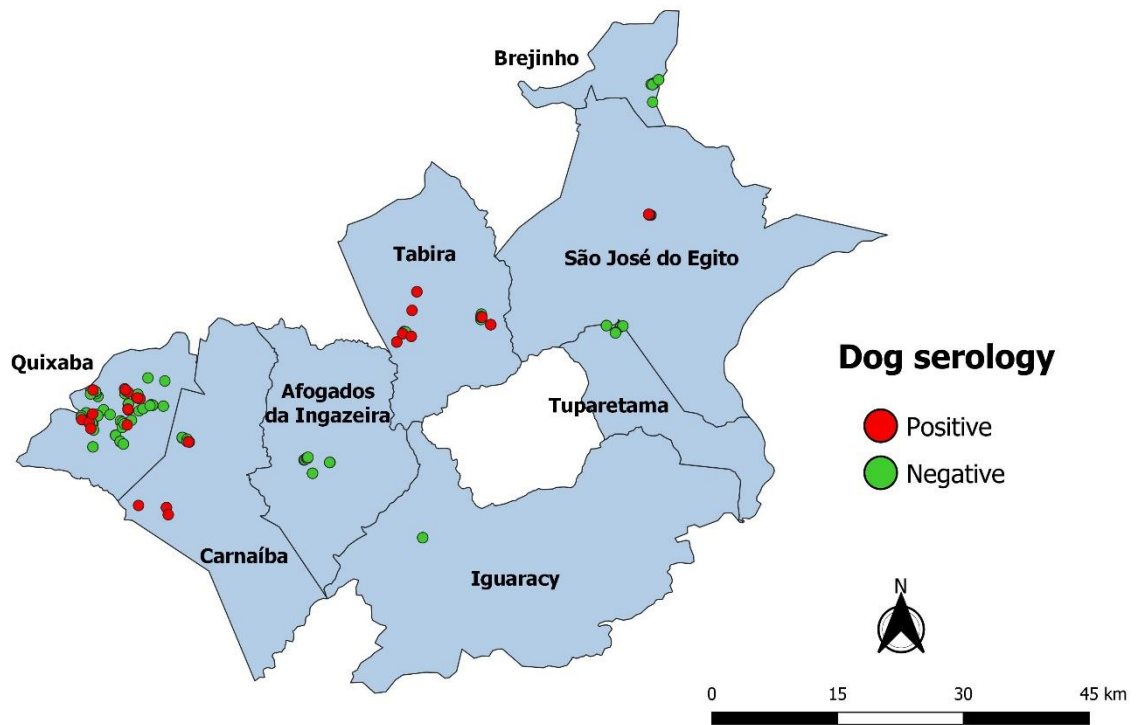


Figure 2: Map indicating the distribution of reagent and non-reagent animals for the presence of antibodies anti-*L. infantum* in the study area.

The Kernel density map revealed a cluster of positive cases in urban areas of three municipalities (Carnaíba, Quixaba and Tabira). Beyond that, the rural area of Quixaba demonstrated a cluster of reagent cases as well (Figure 3).

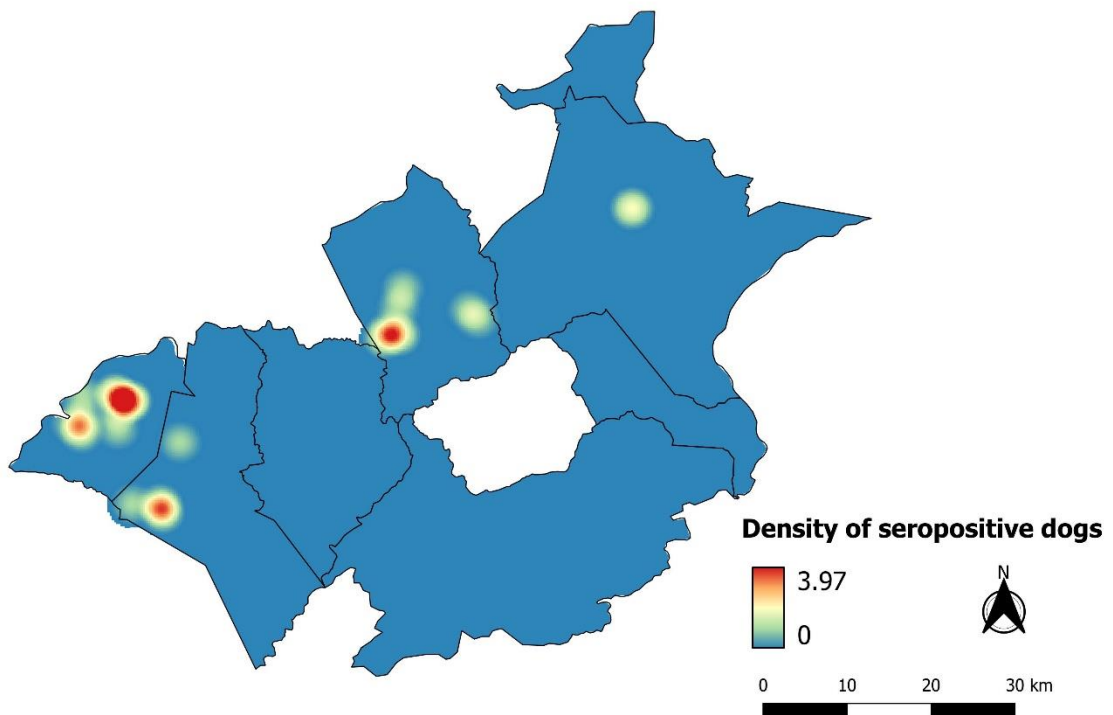


Figure 3: Kernel density map demonstrating clusters of reagent animals for the presence of antibodies anti-*L. infantum*.

A confluence of the buffer zone between positive and negative cases was observed. It is important to note also the overlap of green areas with the buffer zone of positive cases (Figure 4).

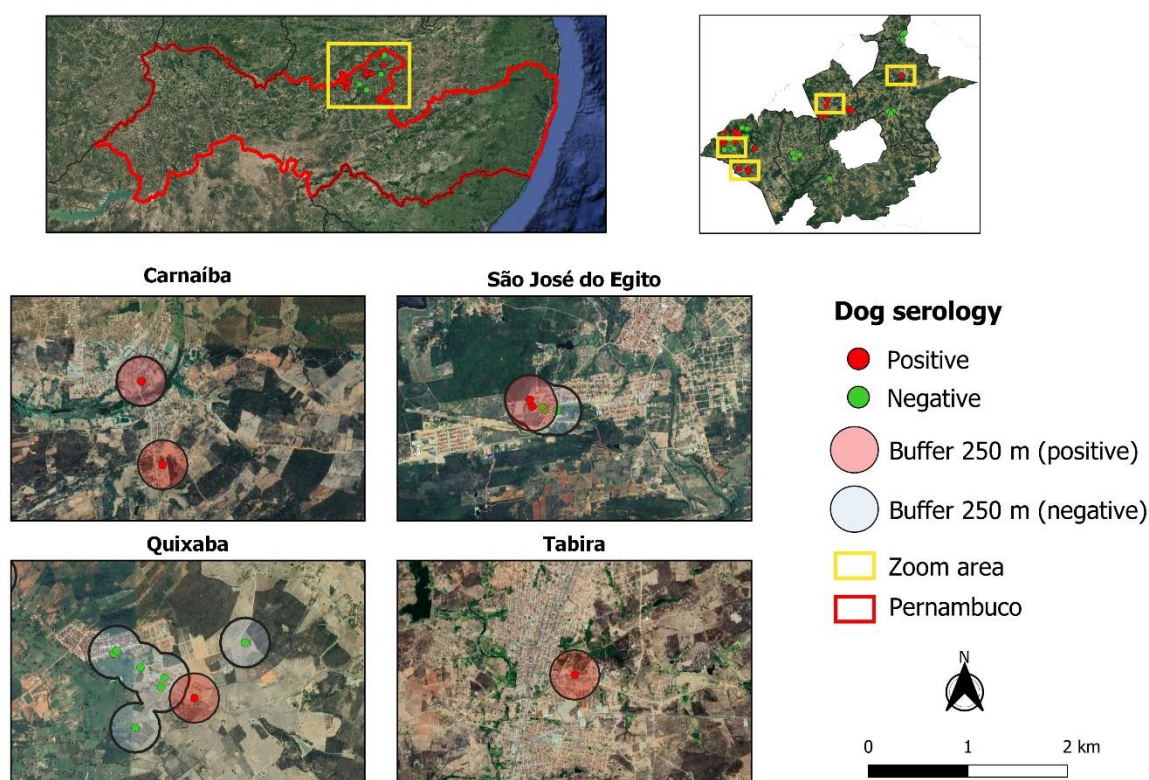


Figure 4: Map indicating the buffer zone (250 m) surrounding the reagent and non-reagent animals for the presence of antibodies anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*.

Discussion

This study assessed the presence of antibodies anti-*L. infantum* in dogs and demonstrated that the age (> 10 years old) was a risk factor for the occurrence of reagent cases that are broadly distributed in the study area.

The overall seroprevalence (13.77%) indicates the circulation of *Leishmania* parasites in the population assessed, following a trend observed in other regions of the state of Pernambuco (Lins et al., 2018; Dantas-Torres et al., 2006; Araújo et al., 2016). Recently, a study carried out in the Sertão of Pernambuco reported a mean prevalence of 13.9% (Evaristo et al., 2021), similar to that one obtained in this study. It is known that this region presents favorable climatic conditions for vector development (Macedo et al., 2008); additionally, a wide variety of wild hosts (rodents, canids, marsupials), important for the epidemiological chain of canine leishmaniasis have been observed in this area. In four municipalities (Afogados da Ingazeira, Brejinho, Iguaracy and Tuparetama), no reagent animals were observed. This result

should be interpreted with caution, due to the low number of samples ($n = 40$) that may have influenced the final outcome. It is known that the study area present similar environmental features (e.g., climate, relative humidity, vegetation, wild host population) with conditions for the development of vectors and occurrence of cases.

No difference between rural (13.90%; 26/187) and urban (13.33%; 8/60) areas was observed. Even if the CVL predominates in the rural areas, in recent years the urbanization of the disease has been responsible for the occurrence of cases in areas with high population density (Araújo et al., 2016). This event (i.e., urbanization of CVL) is a negative impact of the anthropic actions (deforestation, disorderly urban growth and lack of basic sanitation), which favored the movement of wild reservoirs close urban areas, as well as the establishment of vector populations in urban areas (Barbosa et al., 2010; Pimentel et al., 2015).

Clinically, the most common signs were lymphadenomegaly (38.2%; 13/34) and alopecia (23.5%; 8/34), which are frequently observed in dogs with VL (Akhtardanesh et al., 2021; Peris et al., 2021). It is important to highlight that 38.2% (9/34) of the seroreagents animals were asymptomatic. From an epidemiological point of view, these animals are very important, since they act as sources of infection in endemic areas. Therefore, it is necessary to carry out serological surveys for the early detection of these cases and for the adoption of preventive measures (Rondon et al., 2008). The univariate analysis revealed that the age (>10 years-old) was considered the sole risk factor (OR=0.029). The longer exposure to vectors, as well as immunological weakness observed in elderly patients contributed for this outcome (Araújo et al., 2016).

The Kernel map showed clusters of CVL cases in four municipalities, demonstrating that is an important tool able to identify specific zones where preventive measures should be strengthened. Active vigilance should be implemented in these areas in order to reduce the risk of transmission and occurrence of human and animal cases (Evaristo et al., 2020; Araújo et al., 2016). From the buffer zone (250 m) observed close to positive dogs, it was detected the overlap with forest areas, indicating a likely close contact among vectors, domestic and wild reservoir. Additionally, it reflects an indiscriminate growth of cities, important factor for the urbanization of the disease (Batista-Santos et al., 2021).

Data presented here are very important, mainly because CVL has expanded its distribution area in several regions, with the domestic dog as the main source of infection in

these places (Veloso et al., 2021; Silva et al., 2021; Oliveira et al., 2021). Although the non-collection of sandflies is considered a limitation of this study, it is known that the area presents favorable environmental conditions for their development (Macedo et al., 2008). Furthermore, during the collections, a great diversity of livestock (e.g., horses, pigs and ruminants) and some synanthropic (rodents and marsupials) animals were observed in the peridomiliary areas. This highlights the great variety of food sources for the vectors, as well as the presence of reservoirs of *L. infantum*, contributing for the occurrence of the disease in the studied area.

Even known for a long time, the VL continues to cause deaths of humans and dogs in endemic regions of Brazil (Oliveira et al., 2021; Sousa et al., 2018). Measures of control are widely known, but the heterogeneity on the application of these prevention actions, along with the poor infrastructure of many municipalities make the control of this disease a great challenge for the public health. The awareness about the CVL control in Brazil had improved in recent years (Belo et al., 2017), but is still based on isolated measures focusing especially on the dog (Alves et al., 2017). The best way to control neglected diseases is through the One Health approach, in which humans, animals and environment, where these hosts reside, are equally considered (Silva et al., 2021; Brasil, 2014; Costa et al., 2020).

Findings of this study demonstrated the presence of antibodies anti- *L. infantum* in dogs, indicating that the age (>10 years old) is a risk factor. Therefore, preventive measures (use of repellent products, control of vectors and environmental management) are needed in order to reduce the risk of infection for animals, mitigating the potential impact for the local public health.

References

ALMEIDA, A. S.; WERNECK, G. L. Prediction of high-risk areas for visceral leishmaniasis using socioeconomic indicators and remote sensing data. **International Journal of Health Geographics**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2014.

ALVES, E. B. *et al.* Operational difficulties in the use of insecticidal dog collars for the control of visceral leishmaniasis, municipality of Montes Claros, MG, Brazil, 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, 2018.

AKHTARDANESH, B. *et al.* Seroepidemiology of visceral leishmaniasis among free-roaming dogs and children in Zahedan city, southeast of Iran, 2018–2020. **Microbial Pathogenesis**, v. 161, p. 1-5, 2021.

- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1-40, 2016.
- ARAÚJO, A. C. *et al.* Epidemiological aspects and risk factors for infection by *Leishmania infantum chagasi* in dogs from municipality of Petrolina, Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 3, p. 41-48, 2016.
- ARRUDA, R. M. F. *et al.* Space-time analysis of the incidence of human visceral leishmaniasis (VL) and prevalence of canine VL in a municipality of southeastern Brazil: Identification of priority areas for surveillance and control. **Acta Tropica**, v. 197, p. 105052, 2019.
- BARBOSA, D. S. *et al.* Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à Leishmaniose visceral canina em área endêmica no Município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**. v. 11, n. 3, p. 653-659, 2010.
- BATISTA-SANTOS, F. *et al.* Eco-epidemiological Aspects of Visceral Leishmaniasis in the Municipality of Diamantina, Jequitinhonha Valley (Minas Gerais State, Brazil). **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 94, n. 2, p. 209-215, 2021.
- BELO, V. S. *et al.* Reliability of techniques used in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by the national control program in Brazil: a survey in an area of recent transmission. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 146, p. 10-15, 2017.
- BERENGUER, L. K. A. R. *et al.* *Leishmania infantum* infection in a domestic cat: a real threat or an occasional finding?. **Acta Parasitologica**, v. 66, n. 2, p. 673-676, 2021.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Ministério da Saúde, Brasília, 2014.
- CANATTO, B.D. *et al.* Caracterização demográfica das populações de cães e gatos supervisionados do município de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.64, n.6, p.1515-1523, 2012.
- CARVALHO, M. R. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: perception, prevalence, and spatial distribution in municipality of Nossa Senhora do Livramento, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, p. 1-11, 2020.
- COSTA, D. N. C. C. *et al.* Controle da leishmaniose visceral canina por eutanásia: estimativa de efeito baseado em inquérito e modelagem matemática. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, p. e00221418, 2020.
- DANTAS-TORRES, F. *et al.* Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 54-60, 2006.
- EVARISTO, A. M. C. F. *et al.* Canine leishmaniasis in the semi-arid region of Pernambuco, northeastern Brazil: epidemiology, factors associated with seropositivity and spatial analysis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, p. 1-13, 2020.
- EVARISTO, A. M. C. F. *et al.* Detecção e caracterização molecular de *Leishmania* em cães do Nordeste do Brasil. **Brazilian Journal of Global Health**, p. 23-29, 2021.
- GALVIS-OVALLOS, F. *et al.* Detection of *pintomyia fischeri* (Diptera: Psychodidae) with *leishmania infantum* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) promastigotes in a focus of visceral leishmaniasis in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 58, n. 2, p. 830-836, 2020.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2022). **IBGE Cidades**. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/>. Acesso em 13 jun. 2022.

- LINS, T. N. B. *et al.* Seroprevalence and spatial distribution of canine leishmaniasis in an endemic region in Brazil: how has the situation changed after 10 years?. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. 680-682, 2018.
- MACEDO, I. T. F. *et al.* Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. **Ciência Animal**, v. 18, n. 2, 2008.
- OLIVEIRA, M. R. *et al.* Canine leishmaniasis in an endemic region, Northeastern Brazil: a comparative study with four groups of animals. **Parasitology Research**, v. 120, n. 11, p. 3915-3923, 2021.
- PERIS, M. P. *et al.* Comparative study of real-time PCR (TaqMan probe and Sybr Green), serological techniques (ELISA, IFA and DAT) and clinical signs evaluation, for the diagnosis of canine leishmaniasis in experimentally infected dogs. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, p. 1-10, 2021.
- PIMENTEL, D. S. *et al.* Prevalence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs in an endemic area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 491-493, 2015.
- REIS, J. C. Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária. **Olinda: Luci Artes Gráficas Ltda**, 2003.
- RONDON, F. C. M. *et al.* Cross-sectional serological study of canine Leishmania infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1-2, p. 24-31, 2008.
- ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.
- SILVA, M. M. S. *et al.* Epidemiologia da leishmaniose visceral humana em Petrolina, Pernambuco, no período de 2009 a 2020: uma análise descritiva. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. e202101421848-e202101421848, 2021.
- SOUSA, J. M. S. *et al.* Demographic and clinical characterization of human visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco, Brazil between 2006 and 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. 622-630, 2018.
- THRUSFIELD, M.V. Epidemiologia veterinária. 2.ed. **São Paulo: Roca**, 2004. 556p
- VELOSO, E. C. M. *et al.* Socio-economic and environmental factors associated with the occurrence of canine infection by *Leishmania infantum* in Teresina, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 24, p. 1-8, 2021.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**, 2022. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis#:~:text=Visceral%20leishmaniasis%20\(VL\)%2C%20also,East%20Africa%20and%20in%20India](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis#:~:text=Visceral%20leishmaniasis%20(VL)%2C%20also,East%20Africa%20and%20in%20India). Acesso em 11 abri. 2022.

CONCLUSÕES GERAIS

Este foi o primeiro estudo em que se determinou a soroprevalência da LVC nestes municípios da mesorregião do Pajeú, Sertão de Pernambuco. A área de estudo foi caracterizada como uma área de transmissão ativa para a LVC, além disso, casos humanos já tinham sido notificados. É importante destacar que os cães são os principais reservatórios do agente etiológico em ambiente urbanos, contudo é importante que seja dada maior importância a esses animais, reforçando que o diagnóstico precoce é essencial para que possa realizar o saneamento da doença juntamente com outras medidas preventivas.