

Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil

Factors related to positive testing of dogs for visceral leishmaniasis in endemic area in the state of Rio Grande do Norte, Brazil

Sthenia Santos Albano Amóra^{1*} Maria José Paes Santos² Nilza Dutra Alves³
Sylvio Celso Gonçalves da Costa⁴ Kátia da Silva Calabrese⁴ André Jalles Monteiro⁵
Marcos Fábio Gadelha Rocha¹

RESUMO

O presente estudo objetivou descrever alguns fatores relacionados à positividade de cães para leishmaniose visceral, em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte. Foram analisados 198 cães, dos quais 62 foram recrutados de propriedades rurais e 136 de residências urbanas. O diagnóstico foi realizado através dos testes de imunofluorescência indireta e imunoadsorção enzimática. Dos cães analisados, 45% dos positivos eram provenientes da área rural e 35% da área urbana. Analisando a função dos animais, a prevalência foi de 50% dos cães de guarda nas áreas rural e de 43% na área urbana. Quanto aos cães que tinham contato com outros cães de origem rural ou urbana, a prevalência observada foi de 54% e 32%, respectivamente. No que se refere ao sexo, as fêmeas da zona rural foram mais prevalentes. Estes resultados sugerem uma atenção maior sobre o papel destes animais como reservatório dessa zoonose, como também na urbanização da leishmaniose visceral e o inquérito epidemiológico desta doença, no qual estas informações poderão contribuir para o planejamento de estratégias de controle do cão como reservatório doméstico.

Palavras-chave: leishmaniose visceral, cão, sorodiagnóstico e fatores de risco.

ABSTRACT

This study aimed at describing several factors related to positive testing of dogs for visceral leishmaniasis, in an endemic area of the state of Rio Grande do Norte. Sera of 198 dogs were analyzed, 62 from rural properties and 136 from urban residences. Diagnosis was performed through indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. Forty five percent of positive dogs were

from the rural area and 35% came from the urban area. Concerning the analysis of dogs' function, the watchdogs showed greater prevalence, with 50% prevalence in the rural area and 43% in the urban area. With regard to contact with other dogs and origin in rural or urban areas, the prevalence was 54% and 32% respectively. In relation to gender, females from the rural area were more prevalent. These results suggest more attention should be paid to dogs as reservoirs for this zoonosis, as well as their important role in the urbanization of Leishmaniasis and in epidemiological survey of the disease. These data can contribute to the planning of strategies for control, targeting dogs as domestic reservoirs.

Key words: visceral leishmaniasis, dog, serological tests and risk factors.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) no Novo Mundo tem como agente etiológico a *Leishmania chagasi*, sendo a *Lutzomyia longipalpis* o principal vetor incriminado na sua transmissão (GONTIJO & MELO, 2004). O cão vem sendo apontado como reservatório da doença e como hospedeiro doméstico, sendo provavelmente o mais importante reservatório natural relacionado com casos humanos (SAVANI et al., 2003; SILVA et al., 2005). Além disso, ainda afirmar que esse reservatório tem um papel fundamental na expansão da doença em áreas endêmicas (SANTOS et al., 2005).

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brasil. *Av. dos Expedicionários, 5405, apt. 204, bloco 8, Vila União, 60410-411, Fortaleza, CE, Brasil. Tel: (0xx84) 9408-6282. E-mail: stheniasantos@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá (UNIC), Cuiabá, MT, Brasil.

³Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brasil.

⁴Laboratório de Imunomodulação, Departamento de Protozoologia, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁵Departamento de Estatística e Matemática Aplicada, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil.

Compreendendo uma das sete endemias mundiais de prioridade absoluta da Organização Mundial de Saúde (OMS), devido ao seu caráter endêmico em várias regiões do mundo (GONTIJO & MELO, 2004), a LV vem se tornando um importante problema de saúde pública (MONTEIRO et al., 2005). No Brasil, sua atual distribuição abrange 19 estados, tendo ocorrido, nos últimos cinco anos, em média 3.500 casos humanos novos, sendo a maioria na região Nordeste do país (OLIVEIRA et al., 2005).

No tocante ao presente estudo, o município de Mossoró, Rio Grande do Norte, é considerado endêmico para a LV, com destaque para o perímetro urbano. Tal asseveração provém de dados do Programa de Combate ao Calazar da Secretaria de Vigilância em Saúde do município, cuja prevalência, no ano de 2003, foi 29,9% e, em 2004, foi 33,7%. O mesmo programa capturou, entre 2003 e 2004, 1.469 flebotomíneos, dos quais 99% eram da espécie *L. longipalpis* e dentro desta espécie, 44% eram fêmeas. O controle realizado pelo programa consiste de inquérito sorológico canino, eutanásia dos cães portadores, diagnóstico e tratamento dos casos humanos e aplicação residual de inseticida à base de cipermetrina (125mg/m²) nas áreas de captura dos vetores. Tais medidas, por sua vez, correspondem às estratégias de controle recomendadas pela OMS (MADEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005). Entretanto, essas medidas não têm apresentado efetividade na redução da incidência da doença, determinando assim a necessidade de reavaliação das ações propostas pelo atual programa (OLIVEIRA et al., 2005; SILVA et al., 2005).

Dessa forma, o conhecimento da história natural da LV canina, através de inquéritos epidemiológicos, serve de base para os programas de controle da doença. Mas, para um bom planejamento, devem ser estudadas informações quantitativas básicas sobre a prevalência e a incidência desta doença através de exames laboratoriais (FRANÇA-SILVA et al., 2003). Dentre as provas sorológicas, a imunoadsorção enzimática (ELISA), a fixação de complemento e a imunofluorescência indireta (IFI) são as mais empregadas, sendo esta última considerada padrão pela OMS, além de ser o teste de escolha para inquéritos populacionais (FEITOSA et al., 2000; GONTIJO & MELO, 2004). A adoção do teste ELISA na rotina diagnóstica da LV canina é uma recomendação válida com vistas à otimização das ações de controle e monitoramento dessa zoonose em suas áreas de ocorrência endêmica (OLIVEIRA et al., 2005).

Estas condições possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho, cujo objetivo foi fazer um estudo sobre alguns fatores relacionados à

positividade de cães para LV, por meio de questionários e métodos sorológicos, em comunidades urbanas e rurais de áreas endêmicas do município de Mossoró-RN. Tal trabalho se baseou no fato de a LV se tratar de uma zoonose que tem o cão como principal elo na manutenção do ciclo doméstico da doença, além de ser este uma importante fonte de alimento para o vetor fora do ambiente rural.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição da Área. O estudo foi realizado em Mossoró-RN, durante o período de agosto de 2003 e janeiro de 2004. O município encontra-se localizado no oeste do Estado do Rio Grande do Norte, a 5° 11' 15" de latitude sul, 37° 20' 39" de longitude oeste e 16m de altitude. Possui uma área total de 2.108,9km², clima semi-árido com temperatura média de 29°. Dos seus 214.901 habitantes, 199.181 encontram-se na área urbana e 15.720 na área rural, com uma densidade demográfica de 101,90hab km⁻². Está localizado entre duas capitais, Natal-RN e Fortaleza-CE (a 277km e 260km de distância, respectivamente) e a 44km do litoral mais próximo (Tibau-RN). Na economia, o município é o segundo maior produtor de petróleo do país, 95% do sal brasileiro é produzido em solo mossoroense e a fruticultura irrigada tem uma produção média de 14 mil toneladas de frutas (IBGE – Escritório Regional, 2003).

A abordagem junto às residências foi realizada com o apoio da Secretaria de Vigilância em Saúde do município, em residências de áreas rurais e urbanas, cuja escolha foi vinculada à presença de cães, de acordo com as notificações de captura de vetor e ocorrência de casos humanos de LV. A área rural avaliada incluiu o Sítio Picada, o Sítio Chafariz, o Sítio Hipólito e o Sítio Olho D'água Velho, todos focos de ocorrência dessa enfermidade em humanos fora do perímetro urbano, segundo a referida secretaria. A área urbana, por sua vez, incluiu diferentes bairros, com localizações distintas, em quatro pontos equidistantes, visando a abranger a maior área possível.

Descrição dos animais. Foram analisados 198 cães, sendo 136 provenientes de 107 residências urbanas e 62 provenientes das 31 propriedades rurais existentes nos sítios visitados. Os cães investigados foram catalogados em fichas, onde foram registrados os seguintes dados: função exercida por eles nas residências (guarda, companhia ou caça); presença de cães contactantes (cães criados juntamente com os animais analisados); seu habitat (peridomicílio ou domicílio, ou seja, animais criados no quintal ou dentro das residências, respectivamente); além do sexo, idade e raça.

Coleta e processamento do espécime clínico. Os cães foram contidos e, após a anti-sepsia local com álcool iodado a 10%, foram coletados 5mL de sangue por venopunção, utilizando-se o sistema vacuntainer. Após este procedimento, os tubos foram submetidos a uma inclinação de 45°, por duas horas, e, a seguir, foram centrifugados por 10 minutos a 800g para favorecer a retração do coágulo. Posteriormente, os soros obtidos foram acondicionados em tubos ependorff identificados e submetidos a um congelamento de -20°C até a realização dos testes sorológicos.

Testes Sorológicos. Os testes de IFI e ELISA foram conduzidos em parceria com o Laboratório de Imunomodulação do Departamento de Protozoologia da FIOCRUZ, no Rio de Janeiro, seguindo os critérios preconizados pelo referido laboratório.

Para realização da IFI, foi utilizado um kit IFI para diagnóstico da leishmaniose canina (BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ). A reação entre o antígeno fixado e o anticorpo presente nas amostras foi visualizada em lâminas de microscopia após a adição de antiimunoglobulina canina conjugada com isotiocianato de fluoresceína. A leitura, por sua vez, foi realizada com o auxílio de microscópio, que utiliza incidência de luz azul e ultravioleta, tendo sido considerados reagentes os soros que apresentaram fluorescência a partir da titulação de 1/40, como preconiza o MINISTÉRIO da SAÚDE (2003), tomando como referência os soros controle positivo e negativo que foram incluídos em cada lâmina.

Quanto ao ELISA, foi utilizado um kit ELISA para diagnóstico da leishmaniose canina (BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ), que, por sua vez, consiste na reação de soros caninos com antígenos solúveis e purificados de *L. chagasi*, obtidos a partir de cultura *in vitro*, que foram previamente adsorvidos nos poços das placas. Após a adição dos soros diluídos em diluente de amostra/conjugado na concentração de 1/100, evidenciou-se a reação pela adição do cromógeno tetrametilbenzidina e, após 30 minutos, foi adicionado o ácido sulfúrico que interrompeu a reação. Em seguida, a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 490nm. Foram considerados positivos os soros que apresentaram valores maiores que o *cut-off* encontrado, através da leitura do espectrofotômetro. O valor do *cut-off* foi obtido a partir da média das absorbâncias dos soros controle mais dois desvios-padrão.

Análise estatística. A soropositividade dos cães em relação a sua procedência e variáveis estudadas foram analisadas pelo teste do Qui-Quadrado e pelo Teste Exato de Fisher, tendo sido considerados significativos os resultados que apresentaram nível de significância $P \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados obtidos, 113 cães eram machos (sendo 42 da área rural e 71 da área urbana), enquanto 85 eram fêmeas (20 da área rural e 65 da área urbana). A idade dos animais variou entre três meses e 10 anos. Além disso, 119 cães eram sem raça definida e os demais variavam entre poodles, cockers, rotweilers, pit-bulls, pastores alemães, dobermans, dálmatas, chow-chows, dogs alemães e pinshers.

Foram identificados 28 cães (45%) soropositivos para anticorpos IgG anti-*L. chagasi* na área rural e 47 cães (34%) na área urbana. Contudo, a análise estatística não evidenciou diferença estatística significativa entre o meio urbano e o rural ($P = 0,16$) (Tabela 1). Esta densa soropositividade encontrada corrobora os estudos de SILVA et al. (2005), realizados em Barra de Guaratiba-RJ, área também considerada endêmica para LV, onde têm sido relatados nos últimos anos tanto casos humanos quanto caninos, sendo que a soroprevalência canina ainda permanece alta, a despeito das medidas adotadas para o controle da doença, assim como no município avaliado no presente estudo.

Tabela 1 - Soropositividade de 198 cães para anticorpos IgG anti-*Leishmania chagasi* em relação à procedência, ao habitat, à função exercida por eles, aos cães contactantes e ao sexo, através dos testes de imunofluorescência indireta e de imunoadsorção enzimática, no município de Mossoró-RN.

Variáveis Estudadas	Animais positivos (%)	X ²	P
Procedência			
Rural	28/62 (45,2)	1,61	0,2046
Urbana	47/136 (34,6)		
Habitat			
Domicílio	3/22 (13,6)	1,68	0,1946
Peridomicílio ¹	72/176 (40,9)		
Função			
Caça	2/11 (18,2)	11,75	0,0028*
Companhia	9/46 (19,6)		
Guarda	64/141 (40,9)*	4,51	0,0336*
Contactantes ²	21/83 (25,3)		
Ausência	21/83 (25,3)	0,01	0,9285
Presença	47/115 (40,9)*		
Sexo			
Fêmeas	32/85 (37,6)	0,01	0,9285
Machos	43/113 (38,1)		

*Resultados estatisticamente significativos.

¹Corresponde aos cães criados por seus donos no quintal das residências.

²Corresponde a cães que mantinham contato com os animais avaliados.

Quanto ao fato de não ter sido observada diferença significativa na positividade dos cães entre a área rural e a urbana, foi observado que, embora ainda mantenha algumas características rurais, essa zoonose vem se urbanizando, fato que possivelmente equilibrou sua prevalência nas duas procedências e que corrobora GONTIJO & MELO (2004) e MONTEIRO et al. (2005), os quais afirmam que, nos últimos 20 anos, a LV vem passando por um processo de urbanização, aspecto esse que deve ser considerado na epidemiologia da doença e que coloca em pauta a discussão das estratégias de controle empregadas. Segundo BONATES (2003), esta mudança se deve principalmente à participação do cão como reservatório doméstico. Tal fenômeno possivelmente se justifica através dos impactos ambientais, tais como secas prolongadas e periódicas, seguidas de migração e urbanização, uma progressiva deteriorização da condição sócio-econômica de ampla parcela da população e, conseqüentemente, a presença de cães infectados, propiciando assim a adaptação do parasita ao novo nicho ecológico (GONTIJO & MELO, 2004; MONTEIRO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005).

Contudo, os dados da presente investigação mostraram também que, apesar da urbanização da LV, essa enfermidade ainda conserva algumas características rurais. Este fato já havia sido observado por MOURA et al., (1999) em Cuiabá - MT,

onde os bairros urbanos analisados pelos autores, cuja prevalência dos cães foi significativa, apresentavam caráter rural, o que viabilizaria a presença do vetor junto às residências (SANTOS et al., 2005). Do mesmo modo, por BARBOSA et al. (1999) constataram, através do ELISA e do IFI, uma positividade de 13% em Paraty-RJ, com maior concentração em Graúna, região com características tipicamente rurais.

Sobre o habitat dos cães, evidenciou-se que, entre os animais peridomiciliados, houve maior número de cães soropositivos, tanto na área rural, com 27 (54%) dos animais soro-reagentes, quanto na área urbana, correspondendo a 45 cães (36%) soropositivos. Entretanto, não foi observada diferença significativa quando se comparou as duas procedências, a rural e a urbana ($P = 0,34$) (Tabela 2).

Quanto aos resultados da sorologia em relação à função exercida pelos cães, os cães de guarda, que também eram peridomiciliados, foram os mais soropositivos (Tabela 1). Mesmo quando se comparou essa prevalência entre as procedências, não houve diferença significativa entre elas, pois foi observado 50% e 43% de prevalência para as áreas rural e urbana, respectivamente (Tabela 2).

Esses dados são possivelmente justificados pelo maior contato que estes animais têm com os ecótopos do vetor por serem cães criados ao ar livre, facilitando assim sua contaminação. Corroborando os

Tabela 2 - Soropositividade de 198 cães da área urbana e rural para anticorpos IgG anti-*Leishmania chagasi* em relação ao seu habitat, à função exercida por eles, aos cães contactantes e ao sexo, através dos testes de imunofluorescência indireta e de imunoadsorção enzimática, no município de Mossoró-RN.

Variáveis estudadas	Procedência								
	Rural			Urbano			Total		
	Nº da amostra	Positivos	%	Nº da amostra	Positivos	%	Nº da amostra	Positivos	%
Domicílio	12	1	8,3	10	2	20,0	22	3	13,6
Peridomicílio ¹	50	27	54,0	126	45	35,7	176	72	40,9
Função									
Caça	7	1	14,3	4	1	25,0	11	2	18,2
Companhia	5	2	40,0	41	7	17,1	46	9	19,6
Guarda	50	25	50,0	91	39	42,9	141	64	45,4
Contactantes ²									
Ausência	16	2	12,5	67	19	28,4	83	21	25,3
Presença	46	25 ^a	54,3	69	22	31,9	115	47	40,9
Sexo									
Fêmeas	20	12 ^b	60,0	65	20	30,8	85	32	37,6
Machos	42	16	38,1	71	27	38,0	113	43	38,1

^a($P = 0,05$), ^b ($P = 0,03$).

¹Corresponde aos cães criados por seus donos no quintal das residências.

²Corresponde a cães que mantinham contato com os animais avaliados.

estudos de SILVA et al. (2005), os quais observaram que a proximidade da mata mostrou uma correlação direta com a incidência de casos caninos, já que 100% dos animais por eles avaliados e que soro-converteram moravam nestes locais, como também 84% dos animais soropositivos. Nesse âmbito, UCHÔA et al. (2001) e SANTOS et al. (2005) afirmaram que a ocupação desordenada do homem, principalmente próximo a encostas e/ou matas, acarretando desequilíbrios ambientais, favorece a instalação do ciclo extraflorestal da doença, beneficiando seu caráter peridomiciliar.

Quanto à análise comparativa da influência dos cães contactantes, foi observado que essa influência foi estatisticamente significativa independentemente da procedência dos cães (Tabela 1), como também do ambiente rural, quando comparada aos achados da área urbana, na mesma situação ($P=0,05$), na qual foi observada uma prevalência de 54% na área rural e de 32% na área urbana (Tabela 2). Ou seja, assim como a presença do cão viabiliza a incidência da doença em humanos, por ser este o reservatório natural da LV mais próximo do homem (SAVANI et al., 2003), a presença de outros cães também facilita a manutenção da infecção entre esta espécie, o que aumenta ainda mais o risco de contaminação ao homem. Pois, em muitas áreas, já foi possível observar que a LV canina precedeu o aparecimento da doença humana. Entretanto, não há concordância entre os pesquisadores de que a LV canina seja causa necessária para a LV humana, embora os estudos até agora realizados apontem para essa direção. Esta é uma questão que necessita de maiores estudos para ser inteiramente esclarecida (GONTIJO & MELO, 2004).

Em relação ao sexo, entre os machos, tanto na área rural quanto na urbana, não foi observada diferença significativa ($P=1,00$). Porém, entre as fêmeas, o percentual de soropositivos foi maior entre as cadelas do meio rural ($P=0,03$) (Tabela 2). Diferindo destes resultados, FEITOSA et al. (2000) e GONTIJO & MELO (2004), em estudos dos fatores de risco para a LV canina no Brasil, até o momento não evidenciaram predisposição sexual, racial ou etária relacionada com a infecção. Contudo, apesar de divergir de outros estudos, o presente trabalho enfatiza as variações que as características dessa infecção vêm sofrendo ao longo dos anos. Na década de 50, nas pesquisas realizadas por ALENCAR & CUNHA (1963) no Ceará, observou-se uma tendência crescente da infecção leishmaniótica do cão à proporção que a idade avançava e constatou-se também uma pequena preferência da leishmaniose pelo sexo masculino.

No que se refere aos testes preconizados neste estudo, as possíveis reações cruzadas e o estado

de saúde do animal também foram levados em consideração, sendo provável que baixos títulos de anticorpos específicos sejam devidos a outros agentes infecciosos presentes que levem à desnutrição (LAURICELLA et al., 1998). Outro fato que foi considerado sobre essas reações é a presença de determinantes antigênicos comuns em várias proteínas de protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae*, fato que possivelmente explica a existência de reações cruzadas em baixas titulações (VENEXAT et al., 1996; GONTIJO & MELO, 2004).

Todavia, aqui foram seguidas as recomendações da OMS, que considera a IFI como teste padrão (MICHALICK, 2003). E para evitar as reações cruzadas que podem ocorrer em títulos iguais ou inferiores a 1/40 (SAVANI et al., 2003), foi também executado o ELISA para minimizar a ocorrência de falsos-resultados, pois, segundo o MINISTÉRIO da SAÚDE (2003), a utilização de duas técnicas na busca de um único diagnóstico permite a execução de uma sorologia confiável. Nesse sentido, apenas os soros que reagiram aos dois testes foram considerados positivos. Ademais, apenas cinco animais apresentaram positividade em titulação menor do que 1/80, titulações essas que poderiam aumentar o risco de reações cruzadas em consequência da baixa concentração de anticorpos específicos contra *L. chagasi*. No entanto, em virtude do baixo número de amostras encontradas nessa situação, tal fato não compromete os resultados do estudo. Ainda, OLIVEIRA et al. (2005) sugerem que a adoção do teste de ELISA na rotina diagnóstica da LV canina seja uma recomendação válida com vista à otimização das ações de controle e monitoramento dessa zoonose em suas áreas de ocorrência endêmica.

CONCLUSÃO

Por fim, é importante ressaltar que o presente estudo não pretendeu avaliar a prevalência da leishmaniose visceral canina em áreas rurais e urbanas de Mossoró, mas sim estudar alguns fatores relacionados à infecção canina em ambas as áreas. Deste modo, não se pôde deixar de relatar algumas ponderações do ponto de vista epidemiológico, considerando algumas peculiaridades que se revestem em relação à ocorrência da infecção canina pela *L. chagasi*. Dessa forma, pode-se assim sugerir uma atenção maior sobre o papel destes animais na transmissão dessa zoonose e de sua conseqüente urbanização, assim como a importância do diagnóstico e do inquérito epidemiológico da doença, no qual estas informações poderão contribuir para o planejamento de estratégias de controle do vetor e do cão como reservatório doméstico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à bióloga Tânia Zaverucha do Valle, do Laboratório de Imunomodulação do Departamento de Protozoologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro; à médica veterinária Gláucia Maria de Oliveira Barbosa, pela fundamental participação no desenvolvimento do trabalho laboratorial; e à também veterinária Jaqueline Bianque de Oliveira, do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, por ter viabilizado a realização experimental deste estudo.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, J.E.; CUNHA, R.V. Inquéritos sobre calazar canino no Ceará – Novos resultados. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, Uberlândia, v.36, n.1, p.391-404, 1963.
- BARBOSA G.M.S. et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em cães, no Município de Paraty, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.15, n.3, p.641-646, 1999.
- BONATES, A. Leishmaniose visceral (Calazar). **Vet News**, Rio de Janeiro, v.61, p.4-5, 2003.
- FEITOSA, M.M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose no Município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.28, p.36-44, 2000.
- FRANÇA-SILVA J.C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Monte Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v.111, p.161-173, 2003.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n.3, p.338-349, 2004.
- LAURICELLA M.A. et al. Immunodiagnosis the *Trypanosoma cruzi* (Chaga's Disease) infection in naturally infected dogs. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.93, n.4, p.501-507, 1998.
- MADEIRA, M.F. et al. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for Leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Society of Infectious Diseases**, Salvador, v.8, p.440-444, 2004.
- MICHALICK M.S.M. Leishmaniose visceral canina: diagnóstico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.40, n. sup, p.144-145, 2003.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120p.
- MONTEIRO, E.M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotômíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.38, n.2, p.147-152, 2005.
- MOURA S.T. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do Município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.36, n.113, p. 101-102, 1999.
- OLIVEIRA, L.S. et al. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.6, n.1, p.41-47, 2005.
- SANTOS, G.P.L. et al. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.38, n.2, p.161-166, 2005.
- SAVANI E.S.M.M. et al. Vigilância da leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.37, n.2, p.260-262, 2003.
- SILVA, A.V.M. et al. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, n.1, p.324-328, 2005.
- UCHÔA C.M.A. et al. Aspectos sorológicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.34, n.6, p.563-568, 2001.
- VENEXAT, A.C. et al. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Vianna) braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.38, n.3, p.177-185, 1996.