

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI
PRÓ-REITORIA DE ENSINO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS
APLICADAS A ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL - PPGTAIR**

SAYONARA MARIA SANTOS LEAL

**SOROPREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES DE TIMON E
CAXIAS – MARANHÃO-BRASIL, SUBMETIDOS AO USO DE COLEIRAS
IMPREGNADAS COM DELTAMETRINA 4%: COMPARAÇÃO ENTRE OS
ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS (EIE-LVC BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ) E
UTILIZANDO O ANTÍGENO RECOMBINANTE K28**

SAYONARA MARIA SANTOS LEAL

**SOROPREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES DE TIMON E
CAXIAS – MARANHÃO-BRASIL, SUBMETIDOS AO USO DE COLEIRAS
IMPREGNADAS COM DELTAMETRINA 4%: COMPARAÇÃO ENTRE OS
ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS (EIE-LVC BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ) E
UTILIZANDO O ANTÍGENO RECOMBINANTE K28**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Linha de pesquisa: Diagnóstico e terapêutica em medicina veterinária

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz

Coorientador: Prof. Dr. André Luís Souza dos Santos

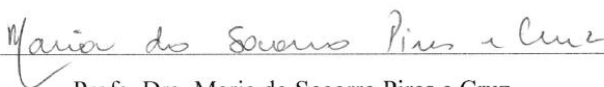
FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação Temática da Informação

- S232a Leal, Sayonara Maria Santos.
Soroprevalência da leishmaniose visceral em cães de Timon e Caxias – Maranhão-Brasil, submetidos ao uso de coleiras impregnadas com deltametrina 4%: comparação entre os ensaios imunoenzimáticos (EIE-LVC Bio-manguinhos/FIOCRUZ) e utilizando o antígeno recombinante K28. / Sayonara Maria Santos Leal. -- 2026.
44 f.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, 2026.
“Orientadora: Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz.”
1. Calazar canino. 2. Epidemiologia. 3. Leishmaniose visceral - diagnóstico. I. Cruz, Maria do Socorro Pires e. II. Título.
- CDD 636.089693

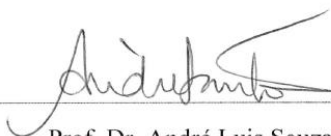
Soroprevalência da leishmaniose visceral em cães usando coleiras com deltametrina 4% em Timon e Caxias, Maranhão, Brasil: comparação entre os EIE-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz e rK28

Sayonara Maria dos Santos Leal

Banca examinadora:



Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz
(Presidente / Orientadora) DMV/CCA/UFPI



Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos
(Coorientador) IMPG/UFRJ

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIANO BORGES FIGUEIREDO
Data: 05/02/2026 09:27:42-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. Fabiano Borges Figueiredo

(Examinador externo) Instituto Carlos Chagas - Fiocruz do Paraná



Dra. Regina Lucia dos Santos Silva
(Examinadora interna) PPGTAIR/UFPI

Dedico à minha avó Maria (*in memoriam*) por ter sido a base do incentivo à educação na minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, proteção diária, oportunidades e coragem para enfrentar todos os desafios. “Seja forte e corajosa”.

Agradeço a minha mãe, minha base e fortaleza; ao José Luís, meu grande companheiro na vida; à Dandinha, Drica e Nala pelo amor singelo dos animais que tanto conforta e ensina. À minha família, especialmente a tia Ivanilde pelos incentivos.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI), pela oportunidade, pela estrutura institucional, pelo corpo docente e pela qualificação essencial à minha formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz, pela orientação, dedicação e, principalmente, pela confiança no meu trabalho. Agradeço, com especial reconhecimento, pelos conselhos e por conduzir este estudo da melhor forma possível.

Ao Prof. Dr. André Luís Souza dos Santos, por integrar a construção deste trabalho e por contribuir, com orientações fundamentais, para o seu melhor desenvolvimento.

Aos pós-graduandos do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt), em especial à minha colega de pós-graduação Vitória de Cássia Coelho Rodrigues com quem trilhei todo o percurso do mestrado.

Aos funcionários do NUPCelt, pela colaboração e suporte durante a realização deste trabalho.

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”

(Eduardo Galeano)

RESUMO

A leishmaniose visceral permanece um agravo zoonótico relevante, e estimativas sorológicas em cães podem variar conforme o desempenho dos ensaios diagnósticos. Este estudo teve como objetivo estimar e comparar a soroprevalência para *Leishmania infantum* em cães domiciliados e encoleirados com coleiras impregnadas com deltametrina 4% nos municípios de Timon e Caxias (Maranhão, Brasil), por meio dos ensaios EIE-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz e ELISA rK28. Foi conduzido um estudo transversal com cães domiciliados inscritos no programa de encoleiramento em Timon (n = 194) e Caxias (n = 211). As amostras de soro foram analisadas pelo ELISA padrão (Bio-Manguinhos/Fiocruz) e por ELISA utilizando a proteína recombinante K28. A comparação entre os testes dentro de cada município foi realizada pelo teste de McNemar (dados pareados), e a comparação dos mesmos testes entre municípios pelo teste do qui-quadrado, considerando $p < 0,05$. A concordância entre os testes foi avaliada pelo coeficiente Kappa. Os resultados de soroprevalência foram apresentados em porcentagem (%). No ELISA padrão e no ELISA rK28, a soropositividade foi de 9,8% (19/194) e 2,6% (5/194) em Timon, e 6,6% (14/211) e 4,3% (9/211) em Caxias, respectivamente. Não houve diferença significativa entre municípios para os diferentes testes. Entretanto, houve diferença significativa entre os testes dentro de cada município, com maior positividade no teste Bio-Manguinhos em relação ao rK28. Conclui-se que a soroprevalência foi maior no ELISA padrão do que no ELISA rK28, em Timon e Caxias, sem diferença significativa entre municípios para cada ensaio. A concordância fraca entre os testes sugere que não são intercambiáveis.

Palavras-chave: Calazar Canino; Controle; Diagnóstico; Epidemiologia.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis remains a relevant zoonotic disease, and serological estimates in dogs may vary according to the performance of diagnostic assays. This study aimed to estimate and compare the seroprevalence of *Leishmania infantum* in household dogs wearing 4% deltamethrin-impregnated collars in the municipalities of Timon and Caxias (Maranhão, Brazil), using the EIE-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz assay and the rK28 ELISA. A cross-sectional study was conducted with household dogs enrolled in the collaring program in Timon (n = 194) and Caxias (n = 211). Serum samples were tested using the standard ELISA (Bio-Manguinhos/Fiocruz) and an ELISA based on the recombinant K28 protein. Within each municipality, paired comparisons between tests were performed using McNemar's test, and comparisons of the same tests between municipalities were performed using the chi-square test, considering $p < 0.05$. Agreement between tests was assessed using the Kappa coefficient. Seroprevalence results were expressed as percentages (%). In the standard ELISA and the rK28 ELISA, seropositivity was 9.8% (19/194) and 2.6% (5/194) in Timon, and 6.6% (14/211) and 4.3% (9/211) in Caxias, respectively. There was no significant difference between municipalities for either test. However, there was a significant difference between tests within each municipality, with higher positivity in the Bio-Manguinhos assay than in the rK28 ELISA. In conclusion, seroprevalence was higher with the standard ELISA than with the rK28 ELISA in Timon and Caxias, with no significant between-municipality differences for each assay. The weak agreement between tests suggests that they are not interchangeable.

Keywords: Canine Calazar; Control; Diagnosis; Epidemiology.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Grau Celsius.
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
CCA – Centro de Ciências Agrárias.
CVL – Canine Visceral Leishmaniasis
DOI – Digital Object Identifier.
DPP® – Dual-Path Platform.
EIE – Ensaio Imunoenzimático.
EIE-LVC – Ensaio Imunoenzimático para Leishmaniose Visceral Canina.
ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
EUA – Estados Unidos da América.
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz.
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio.
H₂SO₄ – Ácido sulfúrico.
HSP70 – Heat Shock Protein 70.
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
IDHM – Índice de Desenvolvimento Humano Municipal.
IDRI – Infectious Disease Research Institute.
IFN-γ – Interferon-gama.
IgG – Imunoglobulina G.
IL-2 – Interleucina 2.
IL-6 – Interleucina 6.
IL-18 – Interleucina 18.
kDNA – Kinetoplast DNA.
km² – Quilômetro quadrado.
LV – Leishmaniose Visceral.
LVC – Leishmaniose Visceral Canina.
LVH – Leishmaniose Visceral Humana.
MG – Minas Gerais.
nm – Nanômetro.
NTD – Neglected Tropical Diseases.
NUPCelt – Núcleo de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco.
OMS – Organização Mundial da Saúde.
OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde.
OPD – o-fenilenodiamina (substrato cromogênico).
PBS – Phosphate-Buffered Saline.
PBS-TB – PBS + Tween 20.
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase.
PCR-HRM – PCR com High-Resolution Melting (fusão de alta resolução).
qPCR – PCR quantitativa em tempo real.
SP – São Paulo.
TNF – Fator de necrose tumoral.
TR-DPP® – Teste Rápido Dual-Path Platform.

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

UFPI – Universidade Federal do Piauí.

UVZ – Unidade de Vigilância em Zoonoses.

WHO – World Health Organization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Soropositividade para *Leishmania infantum* em cães, submetidos ao encoleiramento com deltametrina 4%, de Timon e Caxias (MA, Brasil) pelos ensaios EIE-LVC (Bio-Manguinhos/Fiocruz) e ELISA rK28 (n/N). *Diferença significativa entre ensaios no município.....Pág. 31.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soroprevalência de *Leishmania infantum* em cães avaliados nos municípios de Timon e Caxias (MA, Brasil), estimada pelos ensaios ELISA padrão e ELISA rK28, e concordância entre os testes (coeficiente Kappa). (^{A,B}) indicam diferenças significativas entre os ensaios dentro do mesmo município.....Pág. 31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1 Leishmanioses: Um Desafio Global de Saúde Única	16
1.1.1. Epidemiologia da leishmaniose Visceral no Brasil	17
1.2. Aspectos Clínicos e Patológicos da Leishmaniose Visceral Canina	19
1.3. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.....	21
1.4. Estratégias de Controle e Prevenção da Leishmaniose Visceral.....	23
2. CAPÍTULO I*... ..	26
RESUMO.....	27
INTRODUÇÃO	28
MÉTODOS	29
Área do estudo	29
População do estudo	29
Ensaio sorológicos... ..	30
Análise estatística.....	30
Ética	30
RESULTADOS	31
Positividade por município e por ensaio.....	31
DISCUSSÃO	32
CONCLUSÃO	33
AGRADECIMENTOS.....	33
REFERÊNCIAS.....	33
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
4. REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Leishmanioses: Um Desafio de Saúde Única

As leishmanioses permanecem entre as principais doenças tropicais negligenciadas e demandam respostas integradas que contemplem as dimensões humana, animal e ambiental. A persistência e (re)emergência do agravo resultam de determinantes interconectados como saneamento precário, urbanização desordenada e alterações ambientais, climáticas, e de intervenções efetivas que exigem coordenação entre políticas públicas, serviços de saúde, pesquisa e participação comunitária (Cosma *et al.*, 2024). Nesse sentido, a transmissão da doença decorre da interface dinâmica entre reservatórios, particularmente o cão nas áreas urbanas e periurbanas com a *Leishmania infantum*, vetores flebotomíneos e condições socioambientais, com papel decisivo da organização dos serviços de saúde e da vigilância integrada (Cosma *et al.*, 2024; WHO 2024).

Um importante aspecto, considerado na perspectiva de Saúde Única, é o componente sociocultural. Nesse contexto, inquéritos de conhecimentos, atitudes e práticas mostram reconhecimento pela população do caráter zoonótico da leishmaniose e do enfoque Saúde Única, mas práticas preventivas e adesão às intervenções ainda são variáveis, indicando a necessidade de estratégias de educação em saúde, comunicação de risco e engajamento comunitário, especialmente em áreas urbanas com circulação sustentada do vetor (Khan *et al.*, 2025).

Para além disso, fatores climáticos como precipitação, umidade e temperatura e o uso do solo modulam a densidade de flebotomíneos e a circulação de *Leishmania sp.*, influenciando a sazonalidade e a intensidade da transmissão (Senanayake *et al.*, 2024). No Brasil, análises espaciais de tendência reforçam a urbanização da leishmaniose visceral (LV), devido a expansão para novos territórios, saneamento deficiente, disposição inadequada de resíduos e fragmentação do ambiente (Cruz *et al.*, 2022; Santos Júnior *et al.*, 2023). Essas condições são particularmente presentes no Nordeste brasileiro, onde a heterogeneidade intraestadual sugere a necessidade de estratégias territorializadas e integradas ao planejamento urbano e ambiental (OPAS, 2024). Diante disso, no Brasil, esse enquadramento reforça a centralidade de políticas que combinem vigilância ativa, melhoria das condições ambientais e controle vetorial contextualizado (Santos Júnior *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a integração entre vigilância animal e humana é decisiva para reduzir tempos de resposta e orientar medidas focalizadas em áreas de maior risco (OPAS, 2024; WHO, 2024). Dessa forma, medidas de controle focadas no reservatório canino tem se destacado, como a aplicação de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em cães. Nesse sentido, avaliações recentes no Brasil apontam o benefício populacional quando a cobertura é ampla e a implementação é bem conduzida, com redução da incidência humana de LV nas áreas de

intervenção (Werneck *et al.*, 2024). Em paralelo, estudos de suscetibilidade de *Lutzomyia longipalpis* à deltametrina são fundamentais para sustentar a efetividade e orientar ajustes programáticos, sobretudo em cenários de longo prazo e ampla escala (Lima *et al.*, 2024). Assim, esses achados reforçam a lógica causal do reservatório, vetor, humano e justificam a integração de coleiras 4% ao conjunto de intervenções de Saúde Única.

1.1.1. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no Brasil

A leishmaniose visceral (LV) no Brasil é uma endemia zoonótica causada por *Leishmania infantum*, que tem o cão doméstico como principal reservatório e os flebotomíneos, do complexo *Lutzomyia longipalpis*, como vetores em ambientes urbanos e periurbanos (Soares *et al.*, 2025). Em escala nacional, a distribuição de casos e óbitos é marcadamente heterogênea entre regiões e, muitas vezes, dentro do próprio estado. Essa heterogeneidade reflete a combinação de vulnerabilidade socioambiental, capacidade de detecção oportuna e divergências no acesso ao cuidado especializado, além da adequação ecológica local para o vetor (Soares *et al.*, 2025; Cota *et al.*, 2021; Gutiérrez *et al.*, 2024).

A disponibilização recente de painéis oficiais de monitoramento pelo Ministério da Saúde permite acompanhar indicadores como incidência, letalidade e distribuição espacial por unidade federativa e município, oferecendo suporte direto à vigilância e à tomada de decisão em nível local, incluindo a contextualização do Maranhão e a justificativa para a seleção de Timon e Caxias com base em indicadores recentes e na estratificação oficial de risco (Brasil, 2022; Brasil, 2024). A síntese epidemiológica das últimas duas décadas mostra que a LV mantém elevada carga no território brasileiro, historicamente concentrada nas regiões Nordeste e Norte, mas com manutenção de focos no Centro-Oeste e Sudeste e consolidação de transmissão autóctone em áreas do Sul, indicando expansão geográfica e interiorização do agravo (Soares *et al.*, 2025).

Análises espaço-temporais de casos humanos notificados entre 2001 e 2020 descrevem aglomerados persistentes de alto risco e mudanças no padrão espacial desses aglomerados ao longo do tempo. Esses achados demonstram que a transmissão não é estática e que o risco se desloca territorialmente, em intensidade e localização, dentro do Brasil (Bruhn *et al.*, 2024).

Do ponto de vista clínico-epidemiológico, a LV humana no país mantém letalidade elevada em comparação a letalidade observada a nível internacional. Estudos nacionais e regionais recentes descrevem taxas médias de óbito entre 8% e 10% e com valores superiores a 10% em alguns estados do Nordeste. Esses níveis refletem diagnóstico tardio e barreiras de acesso ao tratamento especializado e se traduzem em maior gravidade entre populações socialmente vulneráveis (Cota *et al.*, 2021; Vieira-Duarte *et al.*, 2024; Brasil, 2024). No Maranhão, análises de 2009 a 2020 evidenciam heterogeneidade espacial, com concentração de casos em São Luís, seguido de

Imperatriz e Caxias, além de letalidade de 6,8% no período e maior ocorrência em crianças, atingindo predominantemente populações socialmente vulneráveis (Amaral *et al.*, 2024).

Em contraste, ao longo das últimas décadas, a LV no Brasil deixou de ser descrita apenas como um agravo rural concentrado em bolsões específicos do Nordeste e passou a configurar uma endemia urbano-peridomiciliar inserida em cenários de rápida urbanização, expansão desordenada da malha urbana e precariedade de infraestrutura básica nas periferias (Maia-Elkhoury *et al.*, 2008). Esse processo envolveu a interiorização da transmissão ao longo de eixos rodoviários e de corredores de ocupação urbana, como documentado no estado de São Paulo, onde a difusão da doença acompanha fluxos humanos e logísticos e não se limita mais a áreas “tradicionalmente endêmicas” (Cardim *et al.*, 2016).

Na cidade de Guarujá (SP), um município litorâneo do Sudeste, foram registrados casos humanos e caninos e foram capturados flebotomíneos (*Lutzomyia longipalpis*) naturalmente infectados por *Leishmania infantum* no peridomicílio das residências, evidenciando a instalação do ciclo de transmissão em um ambiente urbano costeiro (Casanova *et al.*, 2022). Esses achados, somados à confirmação de infecção natural por *L. infantum* em vetores capturados em áreas urbanas e periurbanas e à identificação de fontes de repasto sanguíneo que incluem cães e humanos, reforçam que a vigilância entomológica precisa ser mantida não apenas em áreas historicamente endêmicas, mas também em municípios onde a transmissão foi recentemente detectada ou se encontra em consolidação (Neitzke-Abreu *et al.*, 2023; Leonel *et al.*, 2024).

Mesmo diante dos avanços recentes, como os painéis oficiais de monitoramento, a vigilância nacional ainda enfrenta casos de subnotificação, inconsistências de preenchimento e baixa integração entre vigilância de casos humanos, vigilância vetorial e vigilância do reservatório canino, o que pode resultar em subestimação da carga real e retardar respostas oportunas em territórios prioritários (Soares *et al.*, 2025).

No que se refere a vigilância do reservatório canino e a subestimação da carga real de parasitas, um estudo recente confirmou a presença de cães sororreagentes para LV e permitiu identificar áreas críticas dentro dos municípios avaliados em Santa Catarina, estado historicamente classificado como área de menor risco para LV. Esses achados indicam circulação do parasito em uma região do Sul do país e evidenciam a organização espacial da infecção canina em territórios que antes não eram reconhecidos como prioritários (Spíndola *et al.*, 2024). A integração entre informação sorológica canina, vigilância entomológica e notificação de casos humanos de LV tem sido proposta como abordagem operacional para definir áreas urbanas prioritárias e orientar ações de controle de forma territorialmente focalizada (Soares *et al.*, 2025).

Nesse contexto, as abordagens espaço-temporais aplicadas à LV humana no Brasil identificam aglomerados persistentes de alto risco e mostram que esse risco se desloca entre regiões ao longo dos anos, confirmando o caráter dinâmico e heterogêneo da transmissão (Bruhn *et al.*, 2024).

Modelos que incorporam variáveis ambientais e climáticas descrevem padrões sazonais e associações com anomalias meteorológicas, sugerindo que fatores ecológicos e condições climáticas extremas modulam o risco de ocorrência da doença (Adams *et al.*, 2025). Há ainda evidência de que extremos climáticos, inclusive períodos associados ao El Niño, e alterações ambientais locais podem favorecer tanto a adequação ecológica do vetor quanto o aumento de risco humano em áreas socialmente vulneráveis (Gutiérrez *et al.*, 2024).

Estudos nacionais recentes destacam que esse risco se expressa de forma mais intensa nas periferias urbanas, onde coexistem vulnerabilidade social, infraestruturas incompletas e reservatórios domésticos infectados (Soares *et al.*, 2025). Nesse cenário, a vigilância de LV precisa ir além da contagem de casos e incorporar rotinas de análise espacial contínua, identificação de microterritórios prioritários e monitoramento integrado de hospedeiro, vetor e ambiente, algo já incorporado tanto nos painéis oficiais de monitoramento quanto em análises espaço-temporais multicêntricas (Brasil, 2024; Bruhn *et al.*, 2024).

A experiência brasileira com intervenções direcionadas ao reservatório canino ilustra que ações de controle focalizadas podem repercutir na epidemiologia humana. Em um estudo comunitário multicêntrico de intervenção realizado em municípios endêmicos para LV, o uso contínuo de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em cães esteve associado à redução da incidência de casos humanos enquanto a intervenção permaneceu ativa, indicando que barreiras vetoriais aplicadas ao reservatório doméstico podem interferir de forma mensurável na transmissão para humanos (Werneck *et al.*, 2024).

No conjunto, a LV no Brasil configura uma endemia urbano-peridomiciliar complexa, sustentada pela interação entre reservatórios domésticos, vetores adaptados ao ambiente peridomiciliar e contextos socioambientais marcados por vulnerabilidade social (Soares *et al.*, 2025). Essa endemia se expressa em aglomerados persistentes de alto risco em regiões historicamente endêmicas, ao mesmo tempo em que avança para novas fronteiras geográficas, mantém letalidade elevada e produz desfechos proporcionalmente mais graves em populações vulneráveis, incluindo crianças em áreas periféricas do Nordeste (Soares *et al.*, 2025; Cota *et al.*, 2021; Amaral *et al.*, 2024; Vieira-Duarte *et al.*, 2024; Bruhn *et al.*, 2024).

1.2. Aspectos Clínicos e Patológicos da Leishmaniose Visceral Canina

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma infecção sistêmica crônica cujo espectro varia de portadores subclínicos a doença multissistêmica grave, frequentemente associada a lesão renal e maior risco de óbito (Freitas *et al.*, 2012; Molina *et al.*, 2023). Em áreas endêmicas brasileiras, observam-se emagrecimento, linfadenomegalia generalizada e dermatopatias crônicas, além de alterações laboratoriais típicas como anemia não regenerativa, hipoalbuminemia com hiperglobulinemia policlonal e azotemia compatível com injúria renal crônica, o que evidencia a

relevância clínica da LVC na rotina veterinária (Baneth; Solano-Gallego, 2022; Freitas *et al.*, 2012).

No contexto epidemiológico, cães soropositivos e, em muitos casos, em estado parasitêmico em testes moleculares, apesar de clinicamente saudáveis, podem atuar como reservatórios domésticos ativos em ambientes urbanos e periurbanos. Esse achado reforça estratégias de vigilância em Saúde Única que incluam não apenas os cães doentes, mas também os soropositivos sem sinais evidentes (Baxarias *et al.*, 2023; Lopes *et al.*, 2024).

Em cães experimentalmente infectados por *L. infantum* e acompanhados longitudinalmente, por até seis anos, verificou-se persistência da infecção em linfonodos, baço e pele, com carga parasitária detectável mesmo diante de baixo escore clínico. O perfil imunológico inclui produção de IFN- γ , IL-6 e IL-18, com alterações em TNF e IL-2, sugerindo inflamação crônica parcialmente eficaz para contenção parasitária (Abbehusen *et al.*, 2017).

Do ponto de vista imunopatológico, há deposição de imunocomplexos circulantes e inflamação granulomatosa multissistêmica (pele, rim, fígado e articulações), associadas a proteinúria, vasculite, glomerulonefrite e poliartrite (Koutinas; Koutinas, 2014). No fígado, descrevem-se inflamação portal/perivascular, granulomas portais e intralobulares, agregados inflamatórios intrasinusoidais e hipertrofia/hiperplasia de células de Kupffer; a intensidade global das alterações é maior em cães com cultura esplênica positiva e relaciona-se à gravidade clínica (Lima *et al.*, 2019). Achados oculares e renais complementares corroboram o componente imunomediado e a natureza multissistêmica da enfermidade (Santos *et al.*, 2024).

O comprometimento renal proteinúrico configura determinante prognóstico central e pode evoluir para síndrome nefrótica e insuficiência renal terminal. Em coortes clínicas, azotemia, leucocitose e estadiamento avançado associam-se a maior risco de óbito intra-hospitalar (Molina *et al.*, 2023).

Do ponto de vista clínico-laboratorial em cães doentes, as lesões cutâneas são frequentes, seguidas por linfadenomegalia e perda de peso; disproteinemia e proteinúria ocorrem de forma recorrente (Meléndez-Lazo *et al.*, 2018). Em cães soropositivos classificados como aparentemente saudáveis, podem ser detectadas disproteinemia, proteinúria, linfopenia, títulos elevados de anticorpos anti-*Leishmania infantum* e parasitemia sanguínea por qPCR, indicando que alterações compatíveis com doença sistêmica inicial antecedem o reconhecimento clínico (Baxarias *et al.*, 2023).

Em síntese, a LVC é uma doença multissistêmica em que portadores subclínicos podem sustentar a transmissão, a imunopatologia medeia parte substancial do dano tecidual, e o envolvimento renal proteinúrico impacta diretamente o prognóstico. Programas de vigilância e manejo clínico devem considerar triagem de cães soropositivos assintomáticos, aplicação sistemática de escores clínicos e monitoramento de proteinúria, com explicitação do estadiamento

adotado e reporte de medidas quantitativas de risco (Baxarias *et al.*, 2023; Lopes *et al.*, 2024; Molina *et al.*, 2023).

1.3. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) no Brasil utiliza como triagem o TR-DPP® (Dual-Path Platform) seguido de confirmação por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Este algoritmo é projetado para maximizar a especificidade do diagnóstico utilizando a alta sensibilidade do DPP na triagem e a validação laboratorial subsequente do ELISA (Coura-Vital *et al.*, 2014; Laurenti *et al.*, 2014; Figueiredo *et al.*, 2018). O TR-DPP® é um ensaio imunocromatográfico que emprega o antígeno recombinante rK28, proteína quimérica multi-epítopo derivada de componentes k9, k39 e k26, para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (Venturin *et al.*, 2015; Lauricella *et al.*, 2016). Em validações de campo, apresentou sensibilidade global em torno de 83–91% e especificidade de aproximadamente 70–73%, com desempenho superior em cães sintomáticos em comparação a assintomáticos (Laurenti *et al.*, 2014; Figueiredo *et al.*, 2018).

O desempenho do ELISA varia significativamente dependendo do antígeno: o uso de antígenos brutos (*Leishmania major-like*) resulta em variabilidade de sensibilidade (11,59% a 100,0%) e especificidade (68,0% a 90,74%), e pode estar sujeito a reações cruzadas (Fujimori *et al.*, 2021; Teixeira *et al.*, 2019). Por outro lado, o ELISA com antígenos recombinantes, como rK39 e rK28, apresenta desempenho notavelmente superior devido à maior especificidade da proteína (Fujimori *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o ELISA Bio-Manguinhos (EIE-LVC) é utilizado na detecção de anticorpos anti *Leishmania major-like*, em soros ou plasma de cães e ocupa papel central como ensaio confirmatório na rotina de vigilância, sobretudo em campanhas e inquéritos conduzidos de forma padronizada (Coura-Vital *et al.*, 2014). Estudos nacionais e revisões sistemáticas demonstram que esse ensaio apresenta desempenho consistentemente melhor em cães sintomáticos e queda de sensibilidade em assintomáticos, fato que contribui para baixa estimativa da infecção em inquéritos populacionais quando se baseiam apenas em sorologia (Peixoto; Oliveira; Romero, 2015; Pessoa-e-Silva *et al.*, 2019).

Os métodos parasitológicos diretos, como a citologia, histopatologia e cultura de amostras de linfonodo, medula óssea ou pele, são os critérios mais confiáveis e o padrão-ouro para o diagnóstico da LVC, pois apresentam alta especificidade e confirmam a etiologia da infecção quando positivos (Bento *et al.*, 2023; Teixeira *et al.*, 2019). No entanto, sua sensibilidade é altamente variável e limitada, tendendo a ser significativamente menor em cães assintomáticos e naqueles com baixa carga parasitária, o que impede que sejam ferramentas eficazes para triagem

populacional (Pessoa-e-Silva *et al.*, 2019; Teixeira *et al.*, 2019; Peixoto; Oliveira; Romero, 2015).

Além disso, importa destacar que, o uso rotineiro dos métodos parasitológicos diretos em inquéritos de campo é restrito pelo caráter invasivo dos procedimentos de coleta, como punção de medula óssea, e pela necessidade de laboratórios com infraestrutura específica e tempo prolongado de execução, tornando-os logisticamente pouco viáveis para grandes estudos (Garay *et al.*, 2022; Marcelino *et al.*, 2020). Portanto, o valor primário desses métodos reside em servirem como componente essencial de padrões de referência compostos em estudos de validação de testes diagnósticos (como sorológicos e moleculares), e para o diagnóstico individual em casos clínicos específicos (Teixeira *et al.*, 2019).

O diagnóstico molecular, por sua vez, apresenta alta sensibilidade e especificidade, desde que a escolha do alvo e da matriz seja adequada. Estudos comparativos mostram que alvos como kDNA e HSP70 apresentam bom desempenho em diferentes plataformas (PCR convencional, qPCR) com maior rendimento em linfonodos e pele, enquanto sangue e algumas amostras de mucosa tendem a ser menos sensíveis (Marcelino *et al.*, 2020; Garay *et al.*, 2022).

Vale destacar que o swab conjuntival se apresenta como alternativa não invasiva para estudos de campo e, em cães com LV, a qPCR em swab conjuntival detectou DNA de *Leishmania sp.* em 86,36% (19/22), enquanto a citologia conjuntival não identificou formas amastigotas em nenhuma amostra, sugerindo maior utilidade do método molecular nesse tipo de material (Carvalho *et al.*, 2024). Ainda assim, a quantificação e correlação clínica deve ser interpretada com cautela, pois no mesmo estudo, a maior carga parasitária conjuntival não se associou necessariamente a maior número de alterações oculares (Carvalho *et al.*, 2024), alinhando-se à necessidade de padronização e de interpretação cuidadosa diante de heterogeneidade entre protocolos e cenários (Bento *et al.*, 2023).

Em investigação prospectiva de cães naturalmente infectados, o qPCR em swab conjuntival, apesar da vantagem de ser pouco invasivo, apresentou desempenho limitado quando utilizado isoladamente para acompanhamento terapêutico, o que reforça seu uso como complemento, e não substituto, de outras matrizes e métodos, como escore clínico significativo e positividade em outros testes diagnósticos diretos (Cavalera *et al.*, 2022). Em estudo realizado por Carvalho *et al.* (2024) observou-se que lesões oculares podem persistir independentemente da carga parasitária detectada na conjuntiva em animais sob alopurinol em monoterapia. Portanto, de forma geral, em assintomáticos, a PCR em tecidos de maior carga parasitária, como linfonodo e pele tende a reduzir discordâncias sorológicas e pode ser útil para confirmar infecção subclínica em cenários de baixa prevalência (Pessoa-e-Silva *et al.*, 2019; Garay *et al.*, 2022).

Em síntese, a escolha e interpretação do teste determinam a acurácia da vigilância e condicionam a tomada de decisão em saúde pública. Dessa maneira, discute-se como as estratégias de controle e prevenção, incluindo as intervenções sobre reservatórios e vetores dependem do

desempenho diagnóstico e do cenário epidemiológico local.

1.4. Estratégias de Controle e Prevenção da Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV) se sustenta em uma interface dinâmica entre infecção humana, reservatório canino, vetor, determinantes ambientais e sociais. Por isso, o controle não é resultado de uma ação isolada, mas depende de um arranjo integrado, com vigilância e intervenções combinadas, ao território e às capacidades locais (Cosma *et al.*, 2024). Em estados onde a distribuição espacial e temporal é desigual, análises de risco e priorização territorial ajudam a orientar onde intensificar ações e como monitorar resultados, com potencial aplicação ao Maranhão, onde há heterogeneidade espacial, com concentração de casos em áreas específicas e manutenção de transmissão em microrregiões prioritárias (Amaral *et al.*, 2024).

No que se refere a prevenção da LV no reservatório canino, as coleiras impregnadas com deltametrina 4% se destacam por estarem associadas a menor incidência de infecção canina, como observado na intervenção comunitária em Montes Claros (MG) (Alves *et al.*, 2020), e maior efetividade com foco em LV humana, sugerindo benefício adicional embora com variação entre municípios e períodos avaliados (Werneck *et al.*, 2024).

Estudos de intervenção indicam que a efetividade depende da execução, uma vez que apontam diferenças entre análises por *intention-to-treat* e *per-protocol*, sugerindo que uso contínuo e aderência, incluindo perdas e substituição, mudam a dimensão do efeito observado (Coura-Vital *et al.*, 2018). Segundo Alves *et al.* (2020) houve indicação de proteção indireta em cães não encoleirados em áreas com maior cobertura, sugerindo efeito de comunidade. Em paralelo, análises que consideram desigualdades de renda e vizinhança reforçam que o contexto social pode alterar alcance e desempenho, o que precisa ser antecipado na organização de campanhas e na alocação de recursos (Matsumoto *et al.*, 2022).

Do ponto de vista biológico, há coerência entre a estratégia e evidências de ação repelente e anti-alimentação de coleiras impregnadas sobre flebotomíneos, mecanismo compatível com menor contato vetor-cão (David *et al.*, 2001). Em paralelo, a avaliação da suscetibilidade de populações de *L. longipalpis* à deltametrina é relevante para sustentar a efetividade do componente químico em longo prazo (Lima *et al.*, 2024), e o uso de painéis oficiais pode apoiar a tomada de decisão local e a priorização de áreas para intervenção (Brasil, 2024).

Além do encoleiramento em massa, há propostas de implementação que buscam reduzir custos e contornar controvérsias. Uma alternativa é o uso estratégico de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% apenas em cães soropositivos, em comparação com um cenário de controle convencional. Nesse contexto, foi observado menor risco/incidência de sororreatividade no território onde se adotou o encoleiramento estratégico, e os autores destacam que a abordagem

pode reduzir custos quando comparada ao encoleiramento em massa e não depender da eutanásia como eixo da intervenção. Assim, por intervir exclusivamente em animais soropositivos, essa proposta pressupõe inquéritos sorológicos periódicos para identificar os cães elegíveis ao encoleiramento (Cortez *et al.*, 2024).

Nesse sentido, o diagnóstico em cães é fundamental para orientar muitas decisões relacionadas às ações de controle. Avaliações que analisam a cobertura dessas ações, como inquéritos sorológicos, eutanásia e pulverizações, indicam que a intensidade operacional costuma ser baixa e que os efeitos dessas intervenções podem levar algum tempo para aparecer. Por isso, é importante planejar o monitoramento com metas realistas (Bermudi *et al.*, 2020). Alguns estudos que focaram na eutanásia de cães soropositivos como estratégia principal mostraram uma redução nos desfechos em contextos específicos, especialmente em áreas de maior risco. No entanto, essa abordagem ainda gera debates e depende da execução, cobertura e aceitação por parte da comunidade (França-Silva *et al.*, 2023).

No controle vetorial, a literatura reforça que a redução do vetor é possível, mas existe complexidade na demonstração do efeito direto em doença humana. Revisão sistemática de pulverização residual intradomiciliar aponta redução de densidade vetorial em diferentes contextos, com ênfase em qualidade de execução e vigilância de resistência, além de lacunas sobre impacto em transmissão (Faber *et al.*, 2022). Além disso, revisão de redes impregnadas descreve efeito sobre vetor, boa aceitação e baixo custo, mas ressalta que ganhos entomológicos nem sempre se traduzem em redução de LV, sobretudo em cenários de baixa incidência (Montenegro-Quiñonez *et al.*, 2022).

Em cenário brasileiro, estudo com pulverização e manejo ambiental, isolados e combinados, relatou redução de *L. longipalpis* e destacou a necessidade de alinhar ações à sazonalidade e manter vigilância entomológica (Rocha *et al.*, 2022). Além disso, revisões entomológicas reforçam que medidas isoladas tendem a ter limites e que estratégias combinadas precisam de adaptação local e avaliação contínua (Amóra *et al.*, 2009).

Dessa maneira, a vigilância integrada constitui o eixo articulador entre as intervenções dirigidas ao reservatório canino, ao vetor e ao componente humano. No plano operacional, o acompanhamento sistemático da cobertura e da continuidade das ações é essencial para interpretar adequadamente resultados, evitando atribuir a ausência de impacto a uma suposta ineficácia da intervenção quando a limitação pode estar relacionada à execução das atividades no território (Bermudi *et al.*, 2020). Já no plano estratégico, o emprego de geotecnologias e análises espaço-temporais possibilita integrar informações de LVH, LVC e vetor para subsidiar a definição de áreas prioritárias e a alocação mais racional de recursos em cenários de marcada heterogeneidade territorial (Ferro *et al.*, 2025).

No componente humano, as estratégias concentram-se em detecção precoce, acesso oportuno

ao diagnóstico e ao tratamento e comunicação de risco para populações expostas. Uma intervenção educativa dirigida a profissionais da Atenção Primária à Saúde avaliou conhecimentos antes e após a capacitação, situando a educação permanente como elemento relevante no enfrentamento da LVH (Carvalho *et al.*, 2021). Em paralelo, estudos de conhecimentos, atitudes e práticas em áreas de transmissão esporádica abordam fatores comunitários que podem influenciar a adesão às medidas recomendadas, aspecto particularmente sensível em áreas emergentes (Limongi *et al.*, 2021). Por fim, análises com integração de dados em escala ampla apontam variações de letalidade em determinados períodos, o que sustenta a necessidade de fortalecer a rede de atenção para reduzir atrasos nos diagnósticos e desfechos desfavoráveis (Ferro *et al.*, 2025).

A efetividade das estratégias depende, em larga medida, da capacidade de implementação no território. Em uma análise econômica aplicada a um programa municipal, a incorporação de coleiras impregnadas foi classificada como custo-efetiva em comparação com estratégias tradicionais, oferecendo elementos úteis para decisões de gestão em saúde pública (Assis *et al.*, 2020). Além disso, em estudo de modelagem, estimou-se que estratégias com coleiras podem apresentar melhor relação custo-efetividade do que a vacinação em cenários simulados, inclusive ao considerar perdas e necessidade de substituição ao longo do tempo (Sevá; Ferreira; Amaku, 2020).

Do ponto de vista operacional, a sustentabilidade do componente coleiras depende de cobertura mantida e uso contínuo, uma vez que diferenças entre análises por intenção de tratar e por protocolo indicam sensibilidade a perdas/interrupções (Coura-Vital *et al.*, 2018). Por fim, intervenções químicas exigem atenção à qualidade de execução e ao monitoramento do desempenho dos inseticidas; nesse sentido, revisões sistemáticas destacam a relevância desses elementos no controle vetorial (Faber *et al.*, 2022).

Em síntese, o controle e a prevenção da LV no Brasil se beneficiam de integração Saúde Única e territorialização, com evidência consistente para coleiras deltametrina 4% em desfechos caninos e evidência em desfecho humano em cenário específico, ao mesmo tempo em que permanecem lacunas sobre métricas operacionais comparáveis, tradução de impacto entomológico em redução de doença e evidência longitudinal aplicada a territórios como o Maranhão.

2. CAPÍTULO I*

(*Manuscrito submetido ao periódico Canadian journal of physiology and pharmacology)

SOROPREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES DE TIMON E CAXIAS – MARANHÃO-BRASIL, SUBMETIDOS AO USO DE COLEIRAS IMPREGNADAS COM DELTAMETRINA 4%: COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS (EIE-LVC BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ) E UTILIZANDO O ANTÍGENO RECOMBINANTE K28

RESUMO

A leishmaniose visceral permanece um agravo zoonótico relevante, e estimativas sorológicas em cães podem variar conforme o desempenho dos ensaios diagnósticos. Este estudo teve como objetivo estimar e comparar a soroprevalência para *Leishmania infantum* em cães domiciliados e encoleirados com coleiras impregnadas com deltametrina 4% nos municípios de Timon e Caxias (Maranhão, Brasil), por meio dos ensaios EIE-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz e ELISA rK28. Foi conduzido um estudo transversal com cães domiciliados inscritos no programa de encoleiramento em Timon (n = 194) e Caxias (n = 211). As amostras de soro foram analisadas pelo ELISA padrão (Bio-Manguinhos/Fiocruz) e por ELISA utilizando a proteína recombinante K28. A comparação entre os testes dentro de cada município foi realizada pelo teste de McNemar (dados pareados), e a comparação dos mesmos testes entre municípios pelo teste do qui-quadrado, considerando $p < 0,05$. A concordância entre os testes foi avaliada pelo coeficiente Kappa. Os resultados de soroprevalência foram apresentados em percentagem (%). No ELISA padrão e no ELISA rK28, a soropositividade foi de 9,8% (19/194) e 2,6% (5/194) em Timon, e 6,6% (14/211) e 4,3% (9/211) em Caxias, respectivamente. Não houve diferença significativa entre municípios para os diferentes testes. Entretanto, houve diferença significativa entre os testes dentro de cada município, com maior positividade no teste Bio-Manguinhos em relação ao rK28. Conclui-se que a soroprevalência foi maior no ELISA padrão do que no ELISA rK28, em Timon e Caxias, sem diferença significativa entre municípios para cada ensaio. A concordância fraca entre os testes sugere que não são intercambiáveis.

Palavras-chave: Calazar Canino; Controle; Diagnóstico; Epidemiologia.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença tropical causada por *Leishmania infantum* e que tem o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) como principal reservatório e os flebotomíneos do complexo *Lutzomyia longipalpis* como vetores em ambientes urbanos e periurbanos (Soares *et al.*, 2025). Essa zoonose, frequentemente negligenciada, permanece como um problema de saúde pública global, com recomendações de vigilância e controle orientadas por Saúde Única (WHO, 2024; OPAS, 2024; Cosma *et al.*, 2024).

No Brasil, a vigilância nacional da LV ainda é limitada devido a casos de subnotificações e a baixa integração entre a vigilância de casos humanos, a vigilância vetorial e a vigilância do reservatório canino, o que pode favorecer à identificação de dados subestimados da disseminação parasitaria real e retardar respostas oportunas em territórios prioritários (Soares *et al.*, 2025). Além disso, a manutenção da transmissão e a heterogeneidade espacial reforçam a necessidade de indicadores de vigilância localmente informativos para apoiar decisões programáticas sobre a LV (Bruhn *et al.*, 2024; Brasil, 2024).

No Maranhão, estado brasileiro localizado na região Nordeste, a distribuição espacial da LV foi heterogênea e apresentou aumento de indicadores em áreas específicas, com impacto importante em crianças e em populações socialmente vulneráveis (Amaral *et al.*, 2024). Nesse contexto, coleiras impregnadas com deltametrina 4% têm sido implementadas pelo Ministério da Saúde, em municípios prioritários para as ações de controle da leishmaniose visceral humana e canina no Brasil, como nos municípios de Timon e Caxias, no Maranhão (Coura-Vital *et al.*, 2018; Werneck *et al.*, 2024).

Para a vigilância dos casos de LV canina estimativas sorológicas são frequentemente utilizadas. No entanto, estas variam conforme o tipo de ensaio, a composição antigênica e escolhas analíticas, o que pode influenciar diretamente na positividade do teste (Pessoa-e-Silva *et al.*, 2019; Peixoto; Oliveira; Romero, 2015; Fujimori *et al.*, 2021; Teixeira *et al.*, 2019).

Nesse cenário, evidências recentes apontam que o Elisa padrão pode ter variação considerável de sensibilidade e especificidade entre diferentes estudos e contextos epidemiológicos, além de menor capacidade de detecção em cães assintomáticos. Esse conjunto de limitações sustenta a discussão sobre a necessidade de aprimorar as ferramentas sorológicas utilizadas na rotina de vigilância. Uma abordagem que vem ganhando destaque é o desenvolvimento e a incorporação de antígenos recombinantes (Borja *et al.*, 2018).

Dessa maneira, este estudo teve como objetivo estimar e comparar a soroprevalência para *Leishmania infantum* em cães domiciliados e encoleirados, com coleiras impregnadas com deltametrina 4%, nas cidades de Timon e Caxias (Maranhão, Brasil) por meio dos ensaios imunoenzimáticos de EIE-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz e ELISA rK28.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área do estudo

O estudo foi desenvolvido nos municípios de Timon e Caxias, ambos localizados a Mesorregião Leste Maranhense. A cidade de Timon está posicionada no extremo leste maranhense (latitude 05°05'39" Sul e longitude 42°50'12" Oeste), com uma altitude média de 69 metros. O município possui uma extensão territorial de aproximadamente 1.743,24 km², clima tropical semiúmido, caracterizado por altas temperaturas ao longo do ano, com máximas que podem exceder 40°C e mínimas que raramente baixam de 22°C. O regime pluviométrico apresenta concentração entre os meses de janeiro e maio, seguidos por um período de forte estiagem. Geograficamente, o município é delimitado a leste pelo Rio Parnaíba, que serve como fronteira natural e política com a cidade de Teresina, estado do Piauí (IBGE, 2024). A população residente em Timon é de 174.465 habitantes, consolidando-o como o quarto município mais populoso do Maranhão. A densidade demográfica é de aproximadamente 96,54 hab/km², o Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) é de 0,649, e a economia destaca-se pelo setor de serviços, que representa a maior parcela do Valor Adicionado Bruto local (IBGE, 2023).

A cidade de Caxias por sua vez, ocupa uma área territorial de 5.313,10 km² e está localizada nas coordenadas geográficas de latitude 04°51'32" Sul e longitude 43°21'22" Oeste, com uma altitude média de 66 metros. O clima é classificado como tropical semiúmido caracterizado por duas estações bem definidas: um período chuvoso (predominante de janeiro a maio) e um período seco (de junho a dezembro). A temperatura média anual varia entre 26°C e 28°C. A rede hidrográfica é dominada pela bacia do Rio Itapecuru, fundamental para o abastecimento e economia local (IBGE, 2024). A população residente de Caxias é de 156.970 habitantes, o que a posiciona como a quinta cidade mais populosa do estado. Com densidade demográfica de, aproximadamente, 30,12 hab/km², e com uma taxa de urbanização de 76,27%, Caxias apresenta um Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) de 0,624, considerado médio. A economia local é impulsionada pelo setor de serviços (49% do valor adicionado) e pela administração pública (36,3%), consolidando a cidade como um polo regional de saúde e educação (IBGE, 2023).

População do estudo

A população deste estudo foi uma amostra por conveniência, composta por cães domiciliados vinculados ao programa de encoleiramento com coleiras impregnadas com deltametrina 4%. O animais (n = 194 em Timon; n = 211 em Caxias) foram avaliados e as amostras sorológicas foram coletadas durante visitas domiciliares previamente programadas e em conjunto com a Unidade de Vigilância em Zoonoses (UVZ) dos municípios de Timon e Caxias.

Ensaaios sorológicos

As amostras de soro foram testadas pelo ELISA padrão EIE-LVC (Bio- Manguinhos/Fiocruz) conforme instruções do fabricante.

A detecção sorológica de anticorpos IgG anti-*Leishmania* foi realizada por ensaio de ELISA com a utilização de antígeno recombinante K28, gentilmente cedidos pelo Dr. Steven Reed, do Infectious Disease Research Institute – IDRI (Seattle – EUA).

Para a realização do ELISA *in house* utilizando o antígeno rK28 de *Leishmania*, foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços do tipo MaxiSorp (NUNC/Thermo Fisher Scientific), previamente sensibilizadas com a proteína diluída a 1 µg/mL em PBS 1× (50 µL/poço) e incubadas a 4°C overnight. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-TB (PBS + 0,5% Tween 20) e bloqueadas com blocking buffer (BB): PBS-TB + 5% leite desnatado por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os soros foram adicionados aos poços na diluição 1:400 (em BB), em duplicata, e após lavagens foi adicionado o conjugado IgG Total na diluição 1:15.000 em BB. Para evidenciar a reação foi utilizado o-fenilenodiamina (OPD) (5 mg/10 mL em PBS 1× + 5 µL de H₂O₂), com interrupção da reação por H₂SO₄ 3N e leitura em espectrofotômetro a 492 nm, utilizando o software SoftMax Pro 5.0.

Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente pelo teste de McNemar, para a comparação dos diferentes testes sorológicos dentro do mesmo município, e pelo teste de Qui-quadrado para a comparação dos mesmos testes em municípios diferentes. Nesse caso, os resultados de soroprevalência foram apresentados em percentagem (%). A concordância entre os testes foi avaliada pelo coeficiente Kappa. A análise estatística foi realizada utilizando o software BioEstat 5.0, considerando a significância quando $p \leq 0,05$

Ética

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz (CEUA/Fiocruz), licença LW-18/21 (protocolo P-36/20-3), em conformidade com a Lei nº 11.794/2008.

RESULTADOS

Positividade por município e por ensaio

A soroprevalência para *Leishmania infantum* pelo ELISA padrão Bio-Manguinhos/Fiocruz foi de 9,8% (19/194) em Timon e 6,6% (14/211) em Caxias, sem diferença entre municípios ($p>0,05$). Pelo ELISA rK28, as frequências foram de 2,6% (5/194) em Timon e 4,3% (9/211) em Caxias, também sem diferença entre municípios ($p>0,05$).

Na comparação entre ensaios dentro de cada município, observou-se diferença significativa em Timon e Caxias, com maior positividade no Bio-manguinhos em relação ao rK28 ($p<0,05$) (Figura 1.)

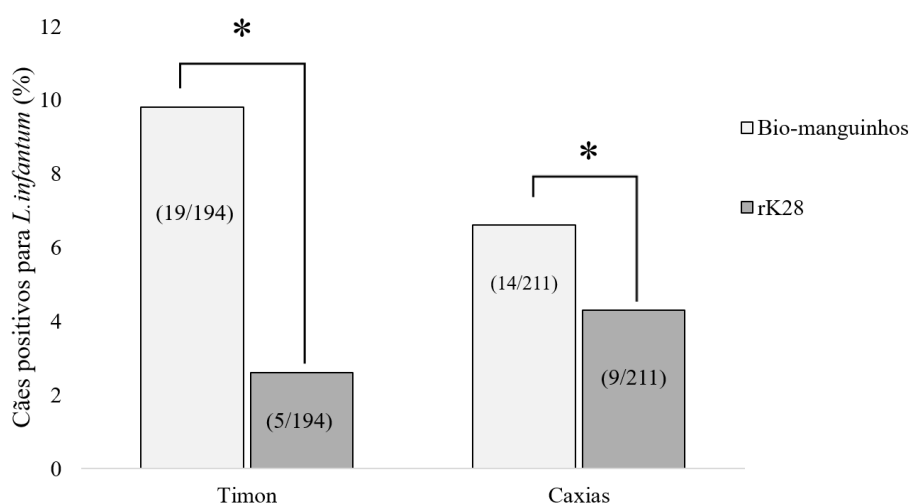


Figura 1. Soropositividade para *Leishmania infantum* em cães, submetidos ao encoleiramento com deltametrina 4%, de Timon e Caxias (MA, Brasil) pelos ensaios EIE-LVC (Bio-Manguinhos/Fiocruz) e ELISA rK28 (n/N). *Diferença significativa entre ensaios no município.

Na avaliação da concordância entre os ensaios, observou-se baixa concordância entre os testes, independente do município avaliado. Em Timon, o coeficiente Kappa foi 0,0722, com concordância observada de 53,61% e esperada de 50,00%. Em Caxias, o Kappa foi 0,0247, com concordância observada de 51,64% e esperada de 50,42%, indicando concordância fraca entre ELISA padrão e ELISA rK28 (Tabela 1.).

Tabela 1. Soroprevalência de *Leishmania infantum* em cães avaliados nos municípios de Timon e Caxias (MA, Brasil), estimada pelos ensaios ELISA padrão e ELISA rK28, e concordância entre os testes (coeficiente Kappa). (^{A,B}) indicam diferenças significativas entre os ensaios dentro do mesmo município.

Município	Ensaio (ELISA)	Positivos % (n/N)	Kappa
Timon	Bio-manguinhos	9,8 (19/194) ^A	0.0722
	rK28	2,6 (5/194) ^B	
Caxias	Bio-manguinhos	6,6 (14/211) ^A	0.0247
	rK28	4,3 (9/211) ^B	

DISCUSSÃO

Esse estudo mostrou, pela primeira vez, a taxa de soroprevalência de LV em cães submetidos ao encoleiramento com deltametrina a 4% nos municípios de Timon e Caxias, no Maranhão, por meio da comparação dos ensaios de ELISA Biomanguinhos e rK28. O ELISA é um método sorológico para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. O desempenho do ELISA varia significativamente dependendo do antígeno: o uso de antígenos brutos (*Leishmania major-like*) resulta em variabilidade de sensibilidade (11,59% a 100,0%) e especificidade (68,0% a 90,74%), e pode estar sujeito a reações cruzadas (Fujimori *et al.*, 2021; Teixeira *et al.*, 2019). Por outro lado, o ELISA com antígenos recombinantes, como rK39 e rK28, apresenta desempenho superior devido à maior especificidade da proteína (Fujimori *et al.*, 2021).

O ELISA padrão Bio-Manguinhos/Fiocruz é utilizado na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (*Leishmania major-like*), em soros ou plasma de cães e ocupa papel central como ensaio confirmatório na rotina de vigilância, sobretudo em campanhas e inquéritos conduzidos de forma padronizada (Coura-Vital *et al.*, 2014). Estudos nacionais e revisões sistemáticas demonstram que esse ensaio apresenta acurácia global considerada moderada, com desempenho consistentemente melhor em cães sintomáticos, com queda de sensibilidade em assintomáticos, fato que contribui para baixa estimativa da infecção em inquéritos populacionais quando se baseiam apenas em sorologia (Peixoto; Oliveira; Romero, 2015; Pessoa-e-Silva *et al.*, 2019).

Dessa maneira, considerando que diferentes composições antigênicas e plataformas sorológicas podem produzir estimativas distintas, torna-se relevante quantificar, em condições de campo, como a escolha do teste influencia a soroprevalência estimada e, consequentemente, a comparabilidade entre inquéritos e a interpretação de indicadores de vigilância, justificando a comparação entre o EIE-LVC (Bio-Manguinhos/Fiocruz) e o ELISA rK28 (Pessoa-e-Silva *et al.*, 2019; Peixoto; Oliveira; Romero, 2015; Fujimori *et al.*, 2021; Teixeira *et al.*, 2019).

Nossos resultados mostram que em cães inseridos no programa de encoleiramento a positividade dos testes de ELISA não diferiu em detrimento da cidade de execução, Timon ou Caxias. No entanto, em ambos os municípios a positividade no ELISA padrão foi superior ($p < 0.05$) que a observada no ELISA utilizando rK28. Tais diferenças entre plataformas de ELISA para LVC são esperadas quando há variação de antígenos (brutos versus recombinantes), pontos de corte e condições analíticas, o que pode gerar resultados não comparáveis e alterar estimativas usadas na vigilância (Pessoa-e-Silva *et al.*, 2019; Teixeira *et al.*, 2019; Fujimori *et al.*, 2021).

A análise de concordância indica que os ensaios não foram intercambiáveis no cenário avaliado. O coeficiente Kappa, empregado para quantificar a concordância entre os testes diagnósticos foi baixo em Timon e Caxias, indicando concordância fraca entre o ELISA padrão (antígeno bruto) e o ELISA rK28 (antígeno recombinante). Assim, os resultados divergentes

sugerem que um teste não deve substituir o outro para fins operacionais (Lopes *et al.*, 2017).

Diante desses resultados, a diferença entre os ensaios pode estar relacionada, entre outros fatores, a reatividade cruzada associada ao uso de antígeno bruto. Como perspectiva, futuros inquéritos no cenário local podem incorporar, de forma complementar, métodos parasitológicos e/ou moleculares para melhor caracterizar infecção ativa e qualificar a interpretação de discordâncias entre testes no contexto da vigilância canina (Teixeira *et al.*, 2019; Pessoa-e-Silva *et al.*, 2019).

CONCLUSÃO

A soroprevalência de LVC foi maior com a utilização do ELISA padrão em comparação ao ELISA rK28 nos municípios de Timon e Caxias, no Maranhão. Em ambos os municípios, a concordância entre os ensaios foi fraca, o que sugere que os ensaios não devem ser considerados intercambiáveis.

AGRADECIMENTOS

Ao Núcleo de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt/UFPI), onde foram realizados os ensaios de ELISA. À Unidade de Vigilância de Zoonoses (UVZ) de Timon, na pessoa do Sr. Marques, pelo apoio técnico e operacional durante as atividades de campo, bem como à UVZ de Caxias, pela colaboração e suporte essenciais à execução deste estudo.

Ao apoio financeiro do Ministério da Saúde, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

AMARAL, C. A. et al. Spatio-temporal analysis and clinical-epidemiological characterization of visceral leishmaniasis in Maranhão, Brazil, from 2009 to 2020. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 9, n. 4, 76, 2024. DOI: 10.3390/tropicalmed9040076.

BORJA, L. S. et al. High accuracy of an ELISA test based in a flagella antigen of *Leishmania* in serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis with potential to improve the control measures in Brazil – A Phase II study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 10, 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006871.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde lança painéis para monitorar leishmanioses no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 6 set. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/setembro/saude-lanca-paineis-para-monitorar-leishmanioses-no-brasil>. Acesso em: 30 out. 2025.

BRUHN, F. R. P. et al. Spatio-temporal dynamics of visceral leishmaniasis in Brazil. *Zoonoses and Public Health*, v. 71, n. 1, e13092, 2024. DOI: 10.1111/zph.13092.

COSMA, C. et al. Leishmaniasis in Humans and Animals: A One Health Approach for Surveillance, Prevention and Control in a Changing World. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 9, n. 11, 258, 2024. DOI: 10.3390/tropicalmed9110258.

COURA-VITAL, W. et al. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area in Brazil. *PLOS ONE*, v. 13, n. 12, e0208613, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0208613.

COURA-VITAL, W.; et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLOS ONE*, v. 9, n. 3, e91009, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0091009.

FUJIMORI, M. et al. Validation of ELISA with recombinant antigens for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 116, e200359, 2021. DOI: 10.1590/0074-02760200359.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Panorama Timon (MA): Censo 2022. Rio de Janeiro: IBGE, 2023.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Panorama Caxias (MA): Censo 2022. Rio de Janeiro: IBGE, 2023

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Timon (MA) | Cidades e Estados. Rio de Janeiro: IBGE, 2024.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Caxias (MA) | Cidades e Estados. Rio de Janeiro: IBGE, 2024.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Leishmaniasis: Epidemiological Report for the Americas. No. 13, December. 2024. (Publicado em 16 dez. 2024). Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/leishmaniasis-epidemiological-report-americas-no13-december-2024>

LOPES, E. G. et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiology and Infection*, v. 145, n. 12, p. 2436–2444, 2017. DOI: 10.1017/S0950268817001443.

PEIXOTO, H. M.; OLIVEIRA, M. R. F.; ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine & International Health*, v. 20, n. 3, p. 334–352, 2015. DOI: 10.1111/tmi.12429.

PESSOA-E-SILVA, R. et al. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: confronting old problems. *Experimental Parasitology*, v. 199, p. 9–16, 2019. DOI: 10.1016/j.exppara.2019.02.012.

SOARES, F. M. A. et al. Human visceral leishmaniasis in Brazil in the past 20 years: an epidemiologic update. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 58, e0019-2025, 2025. DOI: 10.1590/0037-8682-0019-2025.

TEIXEIRA, A. I. P. et al. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A challenge for current and future tests. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 114, e180452, 2019. DOI: 10.1590/0074-02760180452.

WERNECK, G. L. et al. Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of human visceral leishmaniasis: a community intervention trial in Brazil. *Pathogens*, v. 13, n. 2, 135, 2024. DOI: 10.3390/pathogens13020135.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global leishmaniasis surveillance updates 2023: 3 years of the NTD road map. *Weekly Epidemiological Record*, v. 99, n. 45, p. 653-669, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer-9945-653-669>.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas amostras de cães encoleirados avaliadas em Timon e Caxias, as estimativas de soroprevalência para *Leishmania infantum* variaram conforme o ensaio utilizado, com baixa concordância entre ELISA padrão e ELISA rK28. Esses resultados indicam que diferentes plataformas podem produzir estimativas distintas. Dessa maneira, estudos longitudinais, com métodos complementares, são recomendados para melhor interpretar tendências no cenário local.

4. REFERÊNCIAS

- ABBEHUSEN, M. M. C. et al. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. *Scientific Reports*, v. 7, 15914, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-15651-8.
- ADAMS, Q. H. et al. Impact of weather extremes on the spatiotemporal dynamics of visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 19, n. 7, e0013316, 2025. DOI: 10.1371/journal.pntd.0013316.
- ALVES, E. B. et. al. *Effectiveness of insecticide-impregnated collars for the control of canine visceral leishmaniasis*. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 182, art. 105104, 2020. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2020.105104.
- AMARAL, C. A. et al. Spatio-temporal analysis and clinical-epidemiological characterization of visceral leishmaniasis in Maranhão, Brazil, from 2009 to 2020. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 9, n. 4, 76, 2024. DOI: 10.3390/tropicalmed9040076.
- AMÓRA, S. S. A. et. al. Control of phlebotomine (Diptera: *Psychodidae*) leishmaniasis vectors. *Neotropical Entomology*, v. 38, n. 3, p. 303–310, 2009. DOI: 10.1590/S1519-566X2009000300001.
- ASSIS, T. M. de. et. al. Cost-effectiveness of a canine visceral leishmaniasis control program in Brazil based on insecticide-impregnated collars. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 53, e20200680, 2020. DOI: 10.1590/0037-8682-0680-2020.
- BANETH, G.; SOLANO-GALLEGU, L. Leishmaniasis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 52, p. 1359-1375, 2022. DOI: 10.1016/j.cvsm.2022.06.012.
- BAXARIAS, M. et al. Signalment, immunological and parasitological status and clinicopathological findings of *Leishmania*-seropositive apparently healthy dogs. *Animals*, v. 13, n. 10, 1649, 2023. DOI: 10.3390/ani13101649.
- BENTO, M. F. et al. Sensitivity of PCR in conjunctival swab samples for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 32, e009423, 2023. DOI: 10.1590/S1984-29612023063.
- BERMUDI, P. M. M.; et. al. Canine serological survey and dog culling and its relationship with human visceral leishmaniasis in an endemic urban area. *BMC Infectious Diseases*, v. 20, art. 401, 2020. DOI: 10.1186/s12879-020-05125-0.
- BORJA, L. S. et al. High accuracy of an ELISA test based in a flagella antigen of *Leishmania* in serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis with potential to improve the control measures in Brazil – A Phase II study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 10, 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006871.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde lança painéis para monitorar leishmanioses no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 6 set. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/setembro/saude-lanca-paineis-para-monitorar-leishmanioses-no-brasil>. Acesso em: 30 out. 2025.

BRUHN, F. R. P. et al. Spatio-temporal dynamics of visceral leishmaniasis in Brazil. *Zoonoses and Public Health*, v. 71, n. 1, e13092, 2024. DOI: 10.1111/zph.13092.

CARDIM, M. F. M. et al. Visceral leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil: spatial and space- time analysis. *Revista de Saúde Pública*, v. 50, p. 48, 2016. DOI: 10.1590/S1518- 8787.2016050006513.

CARVALHO, A. G. de; et. al. Basic knowledge about visceral leishmaniasis before and after educational intervention among primary health care professionals in Midwestern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 63, e56, 2021. DOI: 10.1590/S1678-9946202163056.

CARVALHO, S. M. R. et. al. Oftalmopatias em Cães com Leishmaniose Visceral - Tratamento com Alopurinol e Diagnóstico por qPCR e Citologia. *Acta Scientiae Veterinariae*, [S. l.] , v. 1, 2024. DOI: 10.22456/1679-9216.137186.

CASANOVA, C. et al. The transmission of visceral leishmaniasis in the municipality of Guarujá, on the Coast of São Paulo state, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v. 56, 2022. DOI: 10.11606/s1518-8787.2022056003680.

CAVALERA, M. A. et al. Conjunctival swab real-time PCR in *Leishmania infantum* naturally infected dogs: diagnostic value and prognostic role during treatment. *Biology*, v. 11, n. 2, p. 184, 2022. DOI: 10.3390/biology11020184.

CORTEZ, L. R. P. de B.; et al. Strategic use of 4% deltamethrin impregnated-collar in seropositive dogs reduces the incidence of seroreactivity to visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas. *Research in Veterinary Science*, v. 179, art. 105397, 2024. DOI: 10.1016/j.rvsc.2024.105397.

COSMA, C. et al. Leishmaniasis in Humans and Animals: A One Health Approach for Surveillance, Prevention and Control in a Changing World. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 9, n. 11, p. 258, 2024. DOI: 10.3390/tropicalmed9110258.

COTA, G. F. et al. Inequalities of visceral leishmaniasis case-fatality in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 6, e0009567, 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009567.

COURA-VITAL, W.; et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLOS ONE*, v. 9, n. 3, e91009, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0091009.

COURA-VITAL, W.; et. al. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area in Brazil. *PLoS ONE*, v. 13, n. 12, e0208613, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0208613.

CRUZ, C. da S. S. et al. Spatial and spatiotemporal patterns of human visceral leishmaniasis in an endemic southeastern area in countryside Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 55, e07022021, 2022. DOI: 10.1590/0037-8682-0702-2021.

DAVID, J. R.; et. al. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 6, p. 839–847, 2001. DOI: 10.1590/S0074-02762001000600018.

FABER, C.; et. al. Indoor residual spraying for the control of visceral leishmaniasis: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 16, n. 5, e0010391, 2022. DOI: 10.1371/journal.pntd.0010391

FERRO, R. S.; et. al. Geospatial technologies for targeting priority areas on surveillance and response of visceral leishmaniasis in São Paulo state, Brazil: embracing a One Health integrative approach. *Journal of Global Health*, v. 15, 04200, 2025. DOI: 10.7189/jogh.15.04200.

FRANÇA-SILVA, J. C.; et. al. The Program for the Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil: The Effect of the Systematic Euthanasia of Seropositive Dogs as a Single Control Action in Porteirinha, a Brazilian City with an Intense Transmission of Visceral Leishmaniasis. *Pathogens*, v. 12, n. 8, art. 1060, 2023. DOI: 10.3390/pathogens12081060

FIGUEIREDO, F. B.; VASCONCELOS, T. C. B.; MADEIRA, M. F. et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 11, e180260, 2018. DOI: 10.1590/0074-02760180260.

FREITAS, J. C. C. et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 1, p. 24-29, 2012. DOI: 10.1590/S0037-86822012000100006.

FUJIMORI, M. et al. Validation of ELISA with recombinant antigens for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 116, e200359, 2021. DOI: 10.1590/0074-02760200359.

GARAY, A. F. G. et al. Sensitivity comparison for the *Leishmania* spp. detection in different canine tissues using PCR-HRM (hsp70). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 55, e0069- 2022, 2022. DOI: 10.1590/0037-8682-0069-2022.

GUTIÉRREZ, J. D. et al. Effect of environmental variables on the incidence of visceral leishmaniasis in Brazil and Colombia. *Acta Tropica*, v. 252, 107131, 2024. DOI: 10.1016/j.actatropica.2024.107131.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Panorama Timon (MA): Censo 2022. Rio de Janeiro: IBGE, 2023.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Panorama Caxias (MA): Censo 2022. Rio de Janeiro: IBGE, 2023.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Timon (MA) | Cidades e Estados. Rio de Janeiro: IBGE, 2024.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Caxias (MA) | Cidades e Estados. Rio de Janeiro: IBGE, 2024.

KHAN, Y. et al. Knowledge, attitudes, and practices toward leishmaniasis and one health: a cross- sectional study among medical and veterinary professionals. *Frontiers in Veterinary Science*, 24 jan. 2025. DOI: 10.3389/fvets.2024.1515370.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Veterinary Pathology*, v. 51, n. 2, p. 527- 538, 2014. DOI: 10.1177/0300985814521248.

LAURICELLA, M. A. et al. An rK28-based immunoenzymatic assay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Latin America. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 1, p. 92-98, 2016. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0768.

- LAURENTI, M. D. et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 108, n. 5, p. 284-290, 2014. DOI: 10.1093/trstmh/tru142.
- LEONEL, J. A. F. et al. Species, natural *Leishmania* spp. detection and blood meal sources of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in peridomiles from a leishmaniasis endemic area of Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2024. DOI: 10.1155/2024/9932530.
- LIMA, I. S. et al. Assessment of histological liver alterations in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasites & Vectors*, v. 12, 487, 2019. DOI: 10.1186/s13071-019-3723-1.
- LIMA, M. de S. F. de et al. Insecticide-impregnated dog collars for the control of visceral leishmaniasis: evaluation of the susceptibility of field *Lutzomyia longipalpis* populations to deltamethrin. *Parasites & Vectors*, v. 17, n. 1, p. 468, 2024. DOI: 10.1186/s13071-024-06474-4.
- LIMONGI, J. E. et al. Knowledge, attitudes and practices concerning visceral leishmaniasis among residents of a sporadic transmission area in southeast Brazil. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 115, n. 6, p. 644–652, 2021. DOI: 10.1093/trstmh/traa102.
- LOPES, E. G. et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiology and Infection*, v. 145, n. 12, p. 2436–2444, 2017. DOI: 10.1017/S0950268817001443.
- LOPES, R. et al. Distribution of and relationships between epidemiological and clinicopathological parameters in canine leishmaniosis: a retrospective study of 15 years (2009–2023). *Pathogens*, v. 13, n. 8, 635, 2024. DOI: 10.3390/pathogens13080635.
- MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008. DOI: 10.1590/S0102-311X2008001200024.
- MARCELINO, A. P. et al. Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* infection in dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 283, p. 109162, 2020. DOI: 10.1016/j.vetpar.2020.109162.
- MATSUMOTO, P.; et al. Efficacies of insecticide dog collars against visceral leishmaniasis in low and high-income areas and the effects for non-collared neighbor dogs. *Acta Tropica*, v. 235, art. 106626, 2022. DOI: 10.1016/j.actatropica.2022.106626.
- MEDEIROS, F. A. C.; SOUZA FILHO, J. A.; BARBOSA, J. R. et al. Phase II validation study of the rK39 ELISA prototype for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 37, n. 3, e00041320, 2021. DOI: 10.1590/0102-311X00041320.
- MELÉNDEZ-LAZO, A. et al. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: comparison of five different clinical classification systems. *Research in Veterinary Science*, v. 117, p. 18-27, 2018. DOI: 10.1016/j.rvsc.2017.10.011.
- MOLINA, C. C. et al. Clinical findings and prognostic factors for mortality in hospitalized dogs with leishmaniosis: a retrospective study. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 101, 102041, 2023. DOI: 10.1016/j.cimid.2023.102041.
- MONTENEGRO-QUÍÑONEZ, C. A.; et. al. Efficacy and community-effectiveness of insecticide treated nets for the control of visceral leishmaniasis: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 16, n. 3, e0010196, 2022. DOI: 10.1371/journal.pntd.0010196.
- NEITZKE-ABREU, H. C. et al. Natural infection of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) by *Leishmania infantum* in a municipality with a high incidence of visceral leishmaniasis in the Brazilian Midwest. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 56, e0259-2023, 2023. DOI: 10.1590/0037-8682-0259-2023.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Leishmaniasis: Epidemiological Report for the Americas. No. 13, December 2024. 2024. (Publicado em 16 dez. 2024). Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/leishmaniasis-epidemiological-report-americas-no13-december-2024>.

PEIXOTO, H. M.; OLIVEIRA, M. R. F.; ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine & International Health*, v. 20, n. 3, p. 334-352, 2015. DOI: 10.1111/tmi.12429.

PESSOA-E-SILVA, R. et al. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: confronting old problems. *Experimental Parasitology*, v. 199, p. 9-16, 2019. DOI: 10.1016/j.exppara.2019.02.012.

ROCHA, M. F.; et. al. Impact of vector control actions in the abundance of *Lutzomyia longipalpis* in Montes Claros, Brazil. *Acta Tropica*, v. 228, art. 106305, 2022. DOI: 10.1016/j.actatropica.2022.106305.

SANTOS, R. C. dos et al. A compared histopathological study on kidneys and eye bulbs in distinct clinical presentations of canine leishmaniasis by *Leishmania infantum*. *Veterinary Research Communications*, v. 48, p. 2243-2261, 2024. DOI: 10.1007/s11259-024-10379-z.

SANTOS JÚNIOR, C. J. dos et al. Temporal trend in the incidence of human visceral leishmaniasis in Brazil. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 28, n. 9, p. 2709-2719, 2023. DOI: 10.1590/1413-81232023289.15422022.

SENANAYAKE, S. C. et al. Impact of climate and land use on the temporal variability of sand fly density in Sri Lanka: A 2-year longitudinal study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 18, n. 11, e0012675, 2024. DOI: 10.1371/journal.pntd.0012675.

SERVIÇO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS/MS). Banco de dados – Maranhão. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2025.

SEVÁ, A. da P.; FERREIRA, F.; AMAKU, M. How much does it cost to prevent and control visceral leishmaniasis in Brazil? Comparing different measures in dogs. *PLoS ONE*, v. 15, n. 7, e0236127, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0236127.

SOARES, F. M. A. et al. Human visceral leishmaniasis in Brazil in the past 20 years: an epidemiologic update. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 58, e0019-2025, 2025. DOI: 10.1590/0037-8682-0019-2025.

SPÍNDOLA, C. Z. et al. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and georeferencing in the state of Santa Catarina, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v. 52, 101054, 2024. DOI: 10.1016/j.vprsr.2024.101054.

TEIXEIRA, A. I. P.; SILVA, D. M.; VITAL, T. et al. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A challenge for current and future tests. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 114, e180452, 2019. DOI: 10.1590/0074-02760180452.

VENTURIN, G. L.; NUNES, C. M.; BRUNO, R. E. et al. Recombinant K28 antigen in ELISA in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative evaluation with rK39 and crude antigen. *Veterinary Parasitology*, v. 212, n. 3-4, p. 332-335, 2015. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.09.011.

VIEIRA-DUARTE, P. A. S. et al. Mortality due to visceral leishmaniasis in Brazil by municipalities, 2001–2018: a spatial-temporal analysis of estimates from the Global Burden of Disease study. *Public Health*, v. 234, p. 58-63, 2024. DOI: 10.1016/j.puhe.2024.06.003.

WERNECK, G. L. et al. Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of human visceral leishmaniasis: a community intervention trial in Brazil. *Pathogens*, v. 13, n. 2, 135, 2024. DOI: 10.3390/pathogens13020135.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global leishmaniasis surveillance updates 2023: 3 years of the NTD road map. *Weekly Epidemiological Record*, v. 99, n. 45, p. 653-669, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer-9945-653-669>.