



**ISAAC DAVID PINEDA SIRIAS**

**Epidemiologia da Leishmaniose Canina em Cães de  
um Abrigo no Município de Lavras, Minas Gerais**

**Lavras - MG**

**2021**

**ISAAC DAVID PINEDA SIRIAS**

**EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE CANINA EM CÃES DE  
UM ABRIGO NO MUNICÍPIO DE LAVRAS, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para obtenção do título de Mestre.

**Profa. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles**

**Orientadora**

**LAVRAS – MG**

**2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Sirias, Isaac David Pineda.

Epidemiologia da leishmaniose canina em cães de um abrigo  
no município de Lavras, Minas Gerais / Isaac David Pineda Sirias. -  
2021.

60 p.

Orientador(a): Elaine Maria Seles Dorneles.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Leishmania spp. 2. Leishmaniose canina. 3. Zoonose. I.  
Dorneles, Elaine Maria Seles. II. Título.

**ISAAC DAVID PINEDA SIRIAS**

**EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE CANINA EM CÃES DE  
UM ABRIGO NO MUNICÍPIO DE LAVRAS, MINAS GERAIS**

**EPIDEMIOLOGY OF CANINE LEISHMANIASIS IN DOGS OF  
A SHELTER IN THE MUNICIPALITY OF LAVRAS, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de julho de 2021

Dr. Thiago Pasqua Narciso – Unilavras

Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante – Universidade Federal de Lavras

Dr. Sidney de Almeida Ferreira – Universidade Federal de Lavras

**Profa. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles**

**Orientadora**

**LAVRAS – MG**

**2021**

*Dedico este trabajo a Melania Patricia Siria y Félix Wilber Pineda, mis padres; a Aura Luz Ramírez, mi abuelita y segunda madre; a Claudia Denisse Pineda, mi hermanita; a Belkys Karina Guevara, mi linda prometida; a mi Nicaragua, Nicaragüita, la flor más linda de mi querer... Y, por encima de todo y todos, a Dios, autor y consumidor.*

## AGRADECIMENTOS

Desde o momento que tomei esse avião, aquele 18 de julho de 2019 às 8:04 horas, na Manágua, Nicarágua, com destino a um país maravilhoso e ao mesmo desconhecido para mim, já sabia que provavelmente a viagem ia ser com altos e baixos; porém, tinha total certeza que um grupo de pessoas estavam ao meu lado, com seu total apoio e dependentes de mim, para que tudo der certo até o final. E essa lista de pessoas é longa... Vou tentar ser sucinto e ao mesmo tempo não esquecer ninguém.

Quero começar com agradecer a Deus, pois sem Ele, esta oportunidade jamais tivera chegado as minhas mãos; assim como por manter com vida e saúde à minha família em todo esse tempo na Nicarágua, e a mim no Brasil.

Agradeço a Melania Patricia (mi Patricita linda) e Felix Wilber, mãe e pai, respectivamente; a minha avozinha Aura e, minha irmã Claudia; por tanto amor e apoio durante toda minha formatura e durante estes dois anos. Esse mestrado é de vocês! A minha linda Belkys Karina, minha namorada, por sempre resistir junto comigo, ao meu lado, com tanto amor para mim. A todas minhas amizades no meu país, que sempre estiveram dando uma palavra de conforto no momento necessário, nestes dois anos.

Ao parque Francisco de Assis e seus funcionários e funcionárias, por nós permitir conduzir esta pesquisa e sempre ser tão amáveis e dispostos ao serviço. A meus professores, por fazer de mim uma alguém com mais conhecimentos em ciência e como pessoa. A todos os membros do Laboratório de Epidemiologia Molecular; especialmente a quem estiveram envolvidos nesta pesquisa: Raisa, Anna, Érika, Carine, Amanda e Dirce, que colocaram todo seu esforço, forças e recursos por mim e por ver concluído com sucesso este trabalho. E, a professora Elaine Maria Seles Dorneles, minha orientadora, a pessoa que me acolheu. Eu sei que colocou toda sua confiança, esforço, conhecimentos e, principalmente, toda sua paciência em mim. É parte fundamental para que este trabalho seja uma realidade. Não tenho como agradecer!

Por último, mas não menos importante, agradeço à República Federativa do Brasil por abrir para mim suas portas e me fornecer educação de qualidade e aprender uma nova língua. A Universidade Federal de Lavras (UFLA), por me formar como mestre e, ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar meus estudos e a condução deste projeto.

## RESUMO

A leishmaniose canina (LCan) é uma doença parasitária e zoonótica grave, que já foi descrita em pelo menos 98 países ao redor do mundo, que tem como agentes os protozoários do gênero *Leishmania*, principalmente, *L. infantum*, os quais são transmitidos por artrópodes flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. A doença apresenta formas clínicas que podem ser tipificadas por seus inúmeros sinais clínicos, incluindo sinais cutâneos e viscerais. Na América do Sul, o número de cães infectados estima-se em milhões, e há altas taxas de infecção, especialmente no Brasil, onde uma alta prevalência da infecção canina está associada a um alto risco da doença em seres humanos. Trabalhos de pesquisa no estado de Minas Gerais tem demonstrado prevalência de quase 25%; contudo, determinar uma prevalência real é difícil. Por ser uma doença zoonótica, trabalhos de pesquisa na cidade de Lavras são necessários para determinar a prevalência em cães, os quais são sentinelas para a doença humana e reservatórios naturais de *Leishmania* spp. Este trabalho teve como objetivo determinar a prevalência e fatores de risco para *Leishmania* spp. em amostras de sangue de cães de um abrigo no município de Lavras, Minas Gerais. Neste estudo foi realizado um censo epidemiológico nos 324 cães do parque Francisco de Assis, nos meses de junho e julho de 2019. Foram encontrados 18 animais positivos, que equivale a uma prevalência uma taxa de prevalência de [5,56% (IC 95%: 3,33 a 8,64%)] de CanVL, tendo como fatores de risco para a infecção por *Leishmania* spp. a observação de valores baixos de hemácias e hemoglobinas no hemograma. A baixa taxa de prevalência em comparação ao apresentado em outros lugares pode ser o resultado tanto da ação da Vigilância e Controle Epidemiológico contra flebotomíneos no município de Lavras, quanto da higienização realizada pelo mesmo abrigo; por outro lado, foi evidenciada a alta utilidade do hemograma para a suspeita da doença, uma vez que as alterações hematológicas associadas com a presença do parasita foram observadas mesmo em animais sem sinais clínicos clássicos da doença.

**Palavras chave:** *Leishmania* spp., *Leishmania infantum*, zoonose, Lavras, leishmaniose canina, flebotomíneos.

## ABSTRACT

Canine leishmaniasis (CanL) is a serious parasitic and zoonotic disease, which has been described in at least 98 countries around the world, whose agents are the protozoa of the genus *Leishmania*, mainly *L. infantum*, which are transmitted by arthropods and flies of the genera *Phlebotomus* and *Lutzomyia*. The disease has clinical forms that can be typified by its numerous clinical signs, including cutaneous and visceral signs. In South America, the number of infected dogs is estimated in millions, and there are high rates of infection, especially in Brazil, where a high prevalence of canine infection is associated with a high risk of the disease in humans. Research works in the state of Minas Gerais have shown a prevalence of almost 25%; however, determining an actual prevalence is difficult. As it is a zoonotic disease, research works in the city of Lavras are needed to determine the prevalence in dogs, which are sentinels for the human disease and natural reservoirs of *Leishmania* spp. This study aimed to determine the prevalence and risk factors for *Leishmania* spp. in blood samples from dogs from a shelter in the city of Lavras, Minas Gerais. In this study, an epidemiological census was carried out on 324 dogs in the Francisco de Assis Park, in June and July 2019. Eighteen positive animals were found, which is equivalent to a prevalence rate of [5.56% (95% CI: 3.33 to 8.64%)] of CanVL, with risk factors for infection by *Leishmania* spp. the observation of low values of red blood cells and hemoglobins in the blood count. The low prevalence rate compared to that presented elsewhere may be the result both of the action of the Surveillance and Epidemiological Control against phlebotomies in the municipality of Lavras, as well as of the cleaning carried out by the same shelter; on the other hand, the high usefulness of the blood count for the suspicion of the disease was evidenced, since the hematological alterations associated with the presence of the parasite were observed even in animals without classic clinical signs of the disease.

**Keywords:** *Leishmania* spp., *Leishmania infantum*, zoonose, Lavras, leishmaniose canina, flebotomíneos.



## SUMÁRIO

<b>CAPITULO 1.....</b>	<b>10</b>
<b>LEISHMANIOSE EM CÃES.....</b>	<b>10</b>
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
i. Etiologia.....	13
ii. Epidemiologia.....	20
iii. Patogenia.....	25
iv. Sinais clínicos.....	27
v. Diagnóstico.....	28
vi. Tratamento.....	32
vii. Controle.....	32
viii. Saúde Pública.....	34
3. REFERENCIAS.....	35
<b>CAPITULO 2.....</b>	<b>50</b>
<b>EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE CANINA EM CÃES DE UM ABRIGO DO MUNICÍPIO DE LAVRAS, MINAS GERAIS.....</b>	<b>50</b>
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
i. Comitê de ética.....	53
ii. População e local do estudo.....	53
iii. Desenho do estudo e coleta de amostras.....	54
iv. Extração de DNA.....	54
v. Reação em Cadeia da Polimerase para <i>Leishmania</i> spp.....	55
vi. Análises estatístico.....	55
3. RESULTADOS.....	56
i. Descrição da população em estudo.....	56
ii. Análises epidemiológicas.....	56
4. DISCUSSÃO.....	59
5. CONCLUSÃO.....	61
6. REFERENCIAS.....	62

**CAPITULO 1**  
**LEISHMANIOSE EM CÃES**

## 1. INTRODUÇÃO

Um das doenças transmitidas por vetores mais importantes da nossa época e com crescente relevância epidemiológica são as leishmanioses. Estas são um grupo de doenças causadas pela colonização de parasitas do gênero *Leishmania* em mamíferos, transmitidas principalmente por flebotomíneos e manifestando-se em uma ampla variedade de formas clínicas, variando em gravidade, desde a leishmaniose cutânea (*cutaneous leishmaniasis* - CL) auto curável até a fatal, denominada leishmaniose visceral (*visceral leishmaniasis* - VL) (Ribeiro et al., 2013).

Em 1903, foi obtido pela primeira vez algum conhecimento sobre as doenças causadas por *Leishmania*, sob responsabilidade de William Leishman e Charles Donovan, médicos, trabalhando em possessões britânicas na Índia, publicaram artigos complementares, diferentes e de maneira simultâneas, no *British Medical Journal* afirmando que teriam encontrado o microrganismo causador do calazar (nome com que é conhecida a leishmaniose visceral em seres humanos); descoberta que foi confirmada no mesmo ano por Laveran e Mesnil, que propuseram homenagear a dupla inglesa, denominando *Leishmania donovani* o protozoário responsável por essa doença (Leishman, 1903; Donovan, 1903) (Awasthi et al., 2004; Jogas Jr., 2017).

O transmissor da *Leishmania* conta com uma variedade de 30 espécies, espalhadas por regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Esses vetores, coloquialmente chamados de “mosquito-palha” pertencem, a subfamília *Phlebotominae*, que possui muitos gêneros, sendo os principais *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Akhoundi et al., 2016; FIOCRUZ, 1997).

Em seres humanos, as mortes pela doença acumulam-se em milhões em mais de 88 países e, de acordo com as projeções futuras, esses dados podem aumentar ainda mais nos próximos anos (WHO, 2010). A América Latina é uma das regiões mais atingidas pela doença, devido a fatores ecológicos, como localização tropical, bem como às condições socioeconômicas, como a falta de higiene e a pobreza. É válido destacar que todos os países latinos reportam casos de leishmaniose atualmente (Marcondes & Day, 2019).

Neste contexto, o fato de o cão doméstico (*Canis familiaris*) ser o animal com maior proximidade aos seres humanos e, ao mesmo tempo, reservatório natural de

*Leishmania infantum* (principal agente da leishmaniose visceral) coloca esse mamífero doméstico em uma posição epidemiológica de muita importância para o estudo da doença na própria espécie, e também em seres humanos (Duarte et al., 2016).

A detecção da doença em animais de abrigos recebe uma importância epidemiológica em decorrência de diversos aspectos, entre os quais destacam-se: a aglomeração de animais com diversas doenças de base e imunocomprometidos, predispõe o desenvolvimento da doença clínica; e a procedência distinta dos animais com desconhecimento do histórico prévio de exposição ou motivo do possível abandono, o que precisamente acontece no Parque Francisco de Assis, local de estudo para este trabalho, a qual é uma organização não governamental localizada no Km 341 da rodovia 265 no município de Lavras, Minas Gerais que fornece abrigo, alimento e atenção veterinária a animais da rua, geralmente sem raça definida, de ambos os sexos, diversas idades; alguns deles com doenças crônicas; o que faz preciso levar em conta o papel desses animais como foco de transmissão, e dessa forma, risco para funcionários do abrigo, futuros tutores e outros animais.

O Brasil, maior país da América Latina e com uma enorme população humana e canina, é o país mais atingido pela doença neste continente, considerada um grave problema de saúde pública. Países vizinhos como Argentina, Paraguai, Uruguai, Venezuela e Colômbia já reportaram surtos com números importantes de indivíduos acometidos (Marcondes & Day, 2019).

No estado de Minas Gerais, *Leishmania* spp. já foi identificada tanto em cães (Coura-Vital et al., 2011; Lara-Silva et al., 2015), como em flebotomíneos (Castro et al., 2019). Também em Lavras, município no sul do estado, em 2018, foi registrado o primeiro caso autóctone da doença em uma menina de 12 anos (Narciso et al., 2018). Esses resultados demonstram a importância da doença não apenas no Brasil, mas também em Minas Gerais e em Lavras.

Assim, considerando que a leishmaniose é uma doença importante em saúde pública e animal, assim como a proximidade social que existe entre a população humana e o principal reservatório urbano da doença, além das constantes mudanças ambientais que tem permitido ao vetor se expandir territorialmente, o objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência e fatores de risco para leishmaniose em cães de um abrigo no município de Lavras, Minas Gerais.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### i. Etiologia

#### **O parasita: *Leishmania* spp.**

Os parasitas do gênero *Leishmania* spp. são um grupo de aproximadamente 30 protozoários flagelados intracelulares obrigatórios, mundialmente distribuídos; pertencentes ao sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Destes, ao menos 20 espécies têm sido reportadas como causadoras da leishmaniose em seres humanos e em cerca de 70 espécies de animais mamíferos (alguns deles considerados reservatórios naturais do agente). O agente é transmitido ao hospedeiro pela picada de fêmeas de flebotomíneos hematófagos (Antinori et al., 2012; Disch et al., 2005; Jorgensen & Pfaller, 2015; Schönian et al., 2010; WHO, 2010).

O gênero *Leishmania* divide-se em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. O subgênero *Leishmania* é formado pelos complexos *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e *L. mexicana* e suas espécies. Já o subgênero *Viannia* tem como complexos *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. lainsoni* e suas espécies. As diferenças em aspectos clínicos e epidemiológicos entre essas espécies relacionam-se a diferenças genéticas e fenotípicas, identificáveis entre espécies apenas por análise de isoenzimas, métodos moleculares ou anticorpos monoclonais (Bañuls et al., 2007; CDC, 2017; WHO, 2010). A organização taxonômica do gênero *Leishmania* é apresentada de maneira detalhada na seguinte figura:

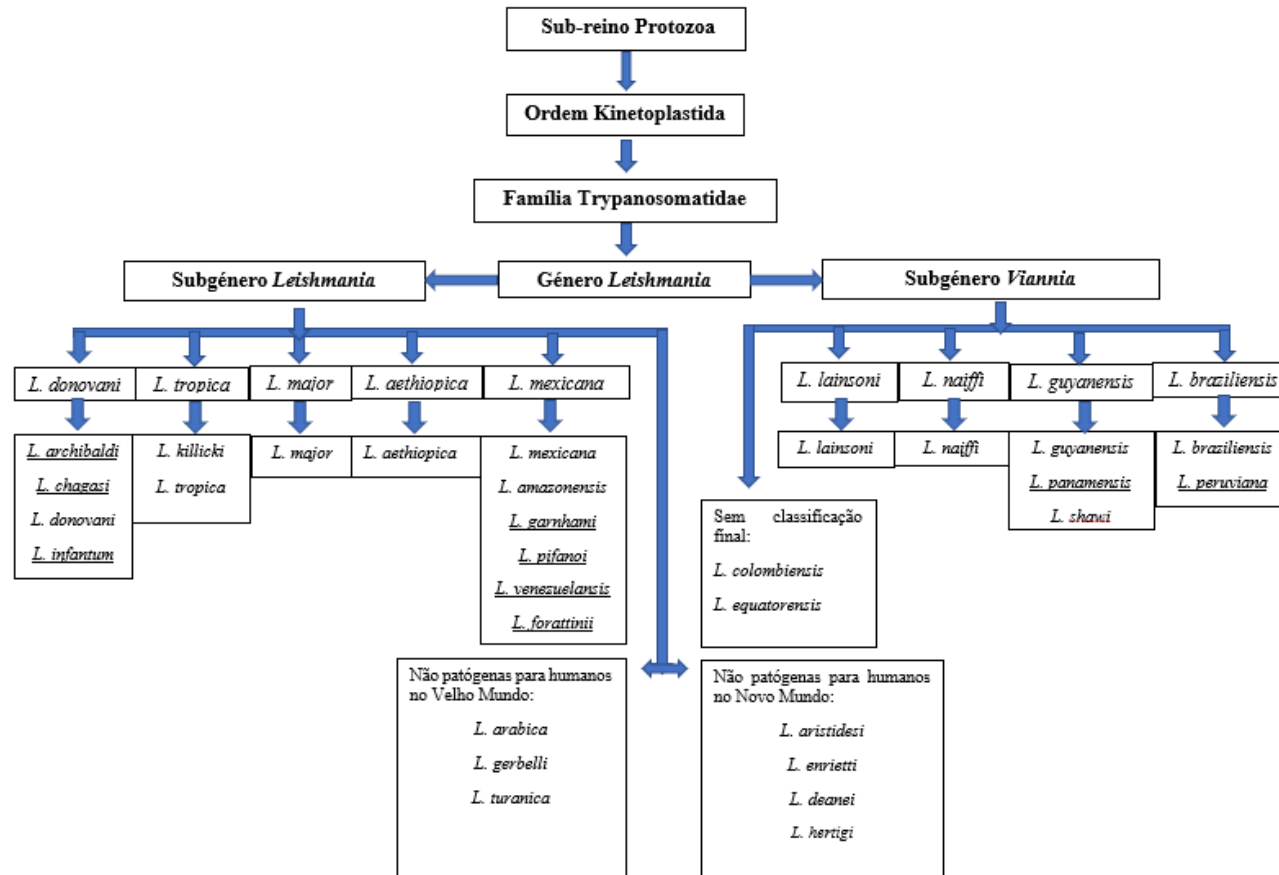


Figura 1. Taxonomia de *Leishmania* (espécies sublinhadas são ou foram questionadas).

Adaptado de Bañuls et. al. (2007) e WHO (2010)

No Velho Mundo, existe apenas um subgênero, *Leishmania*, enquanto no Novo Mundo os dois subgêneros: *Leishmania* (aquelas que se aderem na porção anterior e média do intestino do vetor) e *Viannia* (aquelas que se aderem ao intestino posterior) já foram identificados (Bañuls et al., 2007; Disch et al., 2005).

A *Leishmania infantum* (sinonímia de *Leishmania chagasi*) é uma espécie do subgênero *Leishmania* e o agente causal de leishmaniasis visceral (LV), produzindo uma doença mais severa, tanto em seres humanos quanto em cães. No hospedeiro vertebrado (mamífero) permanece em estágio de amastigota, com forma ovoide ou redonda, de 1,5–3,0 por 2,5–6,5  $\mu\text{m}$ , e um grande núcleo e um cinetoplasto em forma de bastonete associado a um flagelo rudimentar. Encontrado dentro do macrófago e outras células do sistema reticuloendotelial, na pele, baço, fígado, medula óssea, nódulos linfáticos e mucosa desses hospedeiros (Taylor, 2016).

Na América do Sul, já foram isoladas ou identificadas por técnicas moleculares em cães as espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. colombiensis*, *L. infantum* (*L. chagasi*), *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. pifanoi*; sendo as espécies *L. braziliensis* e *L. infantum* as de maior distribuição nessa parte do continente. Existe robusta evidência científica que aponta que o cão doméstico é o principal reservatório doméstico de *L. infantum*, com importância epidemiológica da doença que acomete os seres humanos na América Latina, o que não ocorre para *L. braziliensis*, para a qual existe a possibilidade do cão for um reservatório acidental (Rivas et al., 2020). Contudo, *L. infantum* e *L. braziliensis* são as duas subespécies mais importantes em causar doença em canídeos, a leishmaniose visceral canina (LVCan) e leishmaniose tegumentar (LTCan), respectivamente (Cardoso et al., 2019; Carvalho et al., 2015; Marcondes & Day, 2019).

### **O vetor: flebotomíneos hematófagos, “mosca-palha” ou *sandflies***

Os vetores flebotomíneos, coloquialmente chamados de “moscas-palha”, pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocera, família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae* (Akhoundi et al., 2016; FIOCRUZ, 1997). Estes insetos estão presentes principalmente em climas quentes em zonas da Ásia, África, Austrália, sul da Europa e o Américas (Killick-Kendrick, 1999). Estes insetos passam por metamorfose completa por meio de quatro estágios de desenvolvimento: ovo; larva (quatro instares); pupa e adultos. Ao contrário dos mosquitos, os estágios imaturos não precisam de água parada para

completar seu desenvolvimento, embora necessitam de habitats relativamente úmidos e quentes (Volf & Volfova, 2011).

Os adultos são pequenos e raramente excedem 3,5 mm de comprimento corporal. Estão cobertos com uma densa pelagem e mantém, suas asas em uma forma característica de 'V' sobre suas costas quando estão em repouso; variam em cor de quase branco a quase preto, as pernas são muito longas e delicadas (Maroli et al., 2013). Fêmeas exigem pelo menos um repasto sanguíneo para completar o desenvolvimento dos folículos ovarianos e, ao contrário dos mosquitos, seus ataques ao hospedeiro são silenciosos. Os adultos são principalmente ativos à noite e pela manhã, embora possam realizar o repasto sanguíneo durante o dia também, caso sejam incomodados (Maroli et al., 2013).

São reconhecidas cerca de 800 espécies de flebotomíneos, sendo aproximadamente 464 delas encontradas no Novo Mundo (as Américas) e 375 no Velho Mundo (Europa, Ásia e África). Dessas, cerca de 98 espécies são atualmente comprovadas ou suspeitas de serem vetores da leishmaniose (Filho & Pinto, 2004; Maroli et al., 2013). Porém, Galati *et. al.* (2014), realizou uma nova proposta na qual inclui 931 espécies existentes (916 espécies válidas e 15 com estado taxonômico incerto) classificadas em seis subtribos:

- Phlebotomina (gênero *Phlebotomus*, 110 espécies);
- Australophlebotomina (gênero *Australophlebotomus*, dez espécies);
- Brumptomyiina (gêneros *Brumptomyia* [26 espécies] e *Oligodontomyia* [três espécies]);
- Sergentomyiina (gêneros *Sergentomyia* [310 espécies], *Deanemyia* [cinco espécies] e *Micropygomyia* [55 espécies]);
- Lutzomyiina (gêneros *Sciopemyia* [oito espécies], *Lutzomyia* [74 espécies], *Migonemyia* [sete espécies], *Pintomyia* [57 espécies], *Dampfomyia* [20 espécies], *Expapillata* [dois espécies], *Pressatia* [oito espécies], *Trichopygomyia* [16 espécies] e *Evandromyia* [42 espécies]) e;
- Psychodopygina (gêneros *Psathyromyia* [43 espécies], *Viannamyia* [quatro espécies], *Martinsmyia* [11 espécies], *Bichromomyia* [seis espécies], *Psychodopygus* [40 espécies], *Nyssomyia* [20 espécies] e *Trichophoromyia* [39 espécies]) (Galati et al., 2014).



Uma abordagem atual levou à subdivisão do Phlebotominae em seis gêneros: três gêneros encontrados no Velho Mundo (*Phlebotomus* [13 subgêneros], *Sergentomyia* [dez subgêneros] e *Chinius* [quatro espécies]) e três no Novo Mundo (*Lutzomyia* [26 subgêneros e grupos], *Brumptomyia* [24 espécies] e *Warileya* [seis espécies]); classificação que é amplamente usada (Akhoundi et al., 2016).

### **Flebotomíneos do Velho Mundo:**

Os flebotomíneos do Velho Mundo incluem três gêneros: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*, que são encontrados nas regiões paleárticas, afrotropicais, malgaxes, orientais e australianas. Estes gêneros estão presentes apenas no Velho Mundo e são particularmente prevalentes na região Paleártica, que é a principal área temperada do Velho Mundo, sendo a maioria das espécies habitantes de áreas semiáridas e savanas, não de florestas. Portanto, a distribuição geográfica do gênero *Phlebotomus* se estende desde as regiões do Mediterrâneo, Afrotropical, Oriente Médio e Oriente até a Ásia central. Todos os vetores da leishmaniose cutânea e visceral humana encontrados na Europa, Ásia e a África pertencem a este gênero (Akhoundi et al., 2016).

Há evidências que sugerem *Phlebotomus argentipes* como possível vetor de *L. donovani* na CL no Sri Lanka e confirma o papel vetorial de *Phlebotomus orientalis* para *L. donovani* no Quênia; *Phlebotomus salehi* para *L. major* e membros do complexo principal de *Phlebotomus* para *L. infantum* no Irã. Além disso, *P. sergenti* foi confirmado como o vetor de CL causado por *L. tropica* na Argélia e Tunísia (Maroli et al., 2013).

### **Flebotomíneos do Novo Mundo:**

Segundo a classificação proposta por Galati *et. al.*, (2014), e atualmente aceita, os flebotomíneos do Novo Mundo incluem três gêneros: *Lutzomyia*, *Warileya* e *Brumptomyia*, que são encontrados nas regiões Neártica e Neotropical, dos quais o gênero *Lutzomyia* é o mais diverso. Esses flebotomíneos possuem menor importância na América do Norte devido ao clima, porém tem muita importância e abundância na parte tropical das Américas (Akhoundi et al., 2016; Galati et al., 2014).

*Lutzomyia* é o gênero mais importante em termos de diversidade de espécies e importância médica; algumas espécies são encontradas apenas no Novo Mundo,

principalmente em áreas florestais na América do Sul e Central. Amplas variações morfológicas já foram descritas para as espécies deste gênero, e com isso a classificação desses vetores permanece amplamente não resolvida e depende de divisões baseadas em caracteres taxonômicos morfológicos que ainda são controversos (Akhoundi et al., 2016).

Parasitas do gênero *Leishmania* são transmitidos principalmente pela picada de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* na América Latina, sendo *L. infantum* transmitida principalmente por *Lutzomyia longipalpis*, uma espécie amplamente distribuída desde México à Argentina, com uma aparente maior disseminação no Brasil, Argentina e Uruguai (Marcondes & Day, 2019). Contudo, a ocorrência de leishmaniose visceral (LV) em áreas onde o vetor usual da VL, *Lu. longipalpis*, está ausente, assim como a descoberta de outros flebotomíneos naturalmente infectados com este agente sugerem que existem outros vetores na América Latina; de fato, há evidências que incriminam *Lu. forattinii* e *Lu. migonei* como vetores potenciais de LV (Marcondes & Day, 2019; Maroli et al., 2013).

Neste sentido, Pita-Pereira *et. al.* (2008) encontraram *Lu. forattinii* junto a isomórfica *Lu. cruzi*, no estado de Mato Grosso naturalmente infectadas por parasitas identificados como *L. infantum* por métodos moleculares. Similarmente, *Lu. migonei*, suspeito de ser o vetor de VL em La Banda, Argentina, também foi indicado como possível vetor da doença em Pernambuco, Brasil, a partir da detecção de *L. infantum* em cães; encontrando que nenhum *Lu. longipalpis* foi identificado, enquanto 89% dos flebotomíneos das casas, e 96% das moradias dos animais domésticos eram *Lu. migonei* (Carvalho et al., 2007).

Ademais, é preciso considerar que certamente, o impacto das mudanças ambientais no comportamento dos vetores de LC na América Latina é crucial para o estabelecimento de algumas espécies de *Lutzomyia* no ambiente doméstico, o que pode alterar o perfil epidemiológico da doença (Maroli et al., 2013).

### **Ciclo biológico de *Leishmania infantum***

O parasita tem um ciclo de vida assexuado, digenético e heteroxeno: apresenta uma forma promastigota móvel flagelada, localizada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado e uma forma amastigota, imóvel e flagelar, que afeta o hospedeiro vertebrado,

localizando-se principalmente em macrófagos; cuja transmissão se origina durante as refeições de sangue que as fêmeas do vetor precisam para desenvolver os ovos (Killick-Kendrick, 1999; Ribeiro et al., 2018).

Quando um flebotomíneo pica um hospedeiro mamífero infectado, ele ingere macrófagos infectados por parasitas no estágio amastigota arredondado e não móvel, os quais se transformam para o estágio promastigota flagelado, por fissão binária múltipla no intestino médio. Depois, migram para o intestino anterior e, posteriormente, para as partes da boca (faringe, cibárium e probóscide) do inseto infectado, podendo ser transmitido para novos hospedeiros no momento que o inseto se alimentar novamente de sangue. Dessa forma, dá por concluído o ciclo no vetor invertebrado (Ribeiro et al., 2018).

No momento da picada, estas promastigotas infecciosas são inoculadas pela probóscide do vetor para a pele do hospedeiro vertebrado. Nesse momento, o parasita é fagocitado por macrófagos, evoluem para a forma amastigota, na qual acontece uma reprodução assexuada e de forma contínua até que ocorre a ruptura do macrófago. A partir deste momento, os parasitas se espalham invadindo fagócitos mononucleares em muitos órgãos, principalmente baço, fígado, medula óssea, nódulo linfático, e outros tecidos (Ribeiro et al., 2018)

## ii. Epidemiologia

### Distribuição geográfica e prevalência

A leishmaniose compõe parte do grupo das “Doenças Tropicais Negligenciadas” (*Neglected Tropical Diseases*, ou NTD), as quais têm como características comuns sua associação com a pobreza e a escassez de recursos para pesquisa, além de desnutrição, moradias de baixa qualidade, higiene precária, imunossupressão e doenças associadas ao HIV. Todas essas condições se apresentam de maneira mais acentuada em países em desenvolvimento; mas também, a isso se adiciona a pouca capacidade da indústria farmacêutica em criar fármacos novos e mais eficazes para um melhor controle e tratamento da doença (Alvar et al., 2012a; Dujardin et al., 2008).

A leishmaniose já foi identificada como endêmica em mais de 88 países em quatro continentes e cerca de 700 mil a 1 milhão de novos casos e entre 20 e 30 mil mortes ocorrem anualmente no mundo, sendo LV uma das formas clínicas mais importantes da leishmaniose em seres humanos e em cães (Alvar et al., 2012b; CDC, 2017; WHO, 2010). A maioria dos países afetados estão nos trópicos e subtropicais, com territórios que variam de florestas tropicais na América Central e do Sul a desertos na Ásia Ocidental. Mais de 90% dos casos mundiais de leishmaniose visceral ocorrem na Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (CDC, 2017).

Marcondes & Day (2019), explicam que o número de cães infectados na América do Sul está estimado em milhões, com altas taxas de infecção, especialmente no Brasil, onde uma alta prevalência de infecção canina está associada a um alto risco de doença na população humana. Porém, esses mesmos autores expõem razões pelas quais é difícil calcular a prevalência real nesta região:

- o número limitado de publicações em alguns países;
- limitações na metodologia utilizada nos estudos relatados, não permitindo a identificação das espécies *Leishmania*;
- a sobreposição de áreas endêmicas para doença de Chagas (relatada em cães do sul dos EUA), o que pode levar a reação sorológica cruzada com CL e VL;
- Coinfecção humana e canina por *L. infantum* e *L. braziliensis*;

- Animais que não apresentam sintomas clínicos, resultam ser positivos na hora de aplicar a Reação em Cadeia da Polimerase para *Leishmania* spp.

Nesse cenário, é grande o desafio de conseguir a identificação de cães infectados subclínicamente e embora a soropositividade seja encontrada em 88-100% dos casos clínicos em cães afetados, a infecção é evidente em apenas 30-66%. Utilizando o método diagnóstico baseado em PCR em áreas endêmicas, tem-se confirmado que a prevalência da infecção em cães é muito maior do que a proporção daqueles que realmente desenvolvem a doença (Baneth et al., 2008; Miró et al., 2008). Esse aspecto é uma dificuldade para pesquisadores na América Latina, pois o acesso a métodos moleculares algumas vezes não é possível ou é limitado (Marcondes & Day, 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, os países latinos onde a doença já foi reportada são: Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Cuba, República Dominicana, Ecuador, El Salvador, Guayana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela (WHO., 2017). Contudo, são Brasil, Argentina e Paraguai os países onde *L. infantum* apresenta maior evidencia de disseminação, como agente da CanVL (Marcondes & Day, 2019). Cabe destacar que estes resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que muitos estudos sorológicos foram realizados em áreas com sobreposição entre LV e LC (Tolezano et al., 2007). No Paraguai, o número de casos registrados de LV e LVCan aumentou significativamente nos últimos anos, com taxas de soroprevalência de LVCan variando de 23% a 32% de 2005 a 2016; a maioria dos casos estão concentrados em torno a Assunção, a capital do país. Neste local, a transmissão urbana é uma grande preocupação, pois a soroprevalência de LVCan variou de 3,1% a 11,8% até 1999, e foi estimado em 58% em 2006, atingindo valores de 69% em cães esterilizados em 2010 (Marcondes & Day, 2019).

Já na Argentina, no ano 2006, em Posadas, quando o primeiro caso de LVCan foi relatado a prevalência de LVCan (com base em sorologia e/ou PCR) foi estimada 57,3% (Cruz et al., 2010). Uma taxa de a prevalência também alta de LVCan (27,7%) foi também registrada em uma área onde *L. braziliensis* e *L. amazonensis* foi previamente isoladas de pacientes humanos (Padilla et al., 2002). Além disso, a incidência anual de soroconversão para leishmaniose e do aparecimento de lesões ulcerativas, em cães morando em uma área endêmica para *L. braziliensis* no país, foi estimada em 22,7% e 13,5%, respectivamente (Marco et al., 2001).

No Brasil, inicialmente, a LV estava concentrada apenas em áreas rurais pobres do Nordeste, mas desde a década de 1980 epidemias tem surgido nas principais cidades do país, e os relatos da doença em cães e no ser humano têm gradualmente se estendido para o sudeste e centro-oeste do país. Depois de 2004, mais de 3000 casos humanos foram reportados (Brasil, 2017).

Em uma pesquisa desenvolvida em Belo Horizonte, capital do estado de Minas Gerais, Brasil, em 2008, coletaram sangue em 1443 cães que moram em casas de família, nos quais foi aplicado ELISA, como técnica sorológica, e a Reação em Cadeia da Polimerase com Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP), como técnica molecular. Como resultado os pesquisadores acharam que 230 (15,9%) foram soropositivos em pelo menos um ELISA, enquanto PCR-RFLP demonstrou 356 animais (24,7%) positivos para DNA de *L. infantum* (Coura-Vital et al., 2011).

Em 2011, nos distritos de Salgado Filho e Miramar, também em Belo Horizonte, Minas Gerais, Lara-Silva *et. al.* (2015) realizaram um censo e em 1408 cães avaliados pelos testes de imunofluorescência indireta (IFAT) e ELISA a presença de anticorpos anti-*L. infantum* foi observada em 3,6% (51/1408) dos animais, sendo cães com a infecção subclínica 45% dos animais soropositivos (Lara-Silva et al., 2015).

Ainda em Belo Horizonte, em estudo conduzido em uma área endêmica para VL em 1443 cães de rua, 230 (15,9%) animais foram soropositivos no ELISA para leishmaniose, enquanto 356 (24,7%) cães foram PCR positivos, demonstrando que a prevalência de infecção foi maior quando determinada por PCR em comparação com sorologia; sendo apenas 60 (16,8%) dos cães PCR-positivos, soropositivos (Coura-Vital et al., 2011).

No município de Lavras, Minas Gerais, em 2018, foi reportado o caso de uma menina de 12 anos com história de febre recorrente, anorexia, caquexia, fadiga crônica, perda de peso, edema unilateral da pálpebra esquerda, tosse persistente e pancitopenia. Foi realizado teste imunocromatográfico rápido e o diagnóstico foi de LV, e a identificação molecular foi realizada por PCR com material obtido de medula óssea. Esse foi o primeiro caso de VL autóctone do município de Lavras, o qual respondeu satisfatoriamente a terapia (Narciso et al., 2018). Também em Lavras, em 2016-2017, no peridomicílio de residências localizadas em áreas com uma alta incidência de leishmaniose visceral canina, foi detectado *Leishmania* spp. em cinco fêmeas de *Lu. longipalpis* por meio da técnica da PCR (Castro et al., 2019).

## Fatores de risco

A fator de risco mais importante para apresentação da leishmaniose é a presença do flebotomíneo infectado com o parasita (Suárez Rodríguez et al., 2012). Já no que respeita ao hospedeiro canino, os fatores de risco já descritos são:

- **Localização:** animais morando em regiões rurais ou áreas periurbanas com um grão população de cães infectados ao redor (Carrillo et al., 2013; Solano-Gallego et al., 2006). Em áreas rurais e semirurais, 3% dos cães são infectados em cada estação de transmissão e cães de guarda tem risco 70% maior de infecção do que outros cães (Alvar et al., 2004).
- **Idade:** maior prevalência em animais jovens de até 3 ou 4 anos, devido à falta de maturidade do sistema imune; e depois dos 7 ou 8 anos, devido à presença de comorbidades de base, outras doenças infecciosas ou neoplasias, assim como terapias com imunossupressores (Amela et al., 1995; Cardoso et al., 2004; Miranda et al., 2008; Miró et al., 2008).
- **Sexo:** não tem uma importância epidemiológica, porém é sinalizado que os machos apresentam maior prevalência provavelmente devido ao fato de se movimentar mais que as fêmeas (Amela et al., 1995; Miranda et al., 2008).
- **Raça:** todas as raças de cães são suscetíveis à infecção por *Leishmania* spp., embora seja aceito que a raça Ibiza Hound e os coloquialmente como “*vira-latas*” (animais sem raça definida, ou SRD) de áreas endêmicas, tenham desenvolvido um certo nível de resistência, enquanto parece que os animais consanguíneos podem ser mais suscetíveis (Alvar et al., 2004). Por outro lado, raças como Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler, Doberman y Pastor Alemã aparentemente são mais susceptíveis a apresentar a doença (França-Silva et al., 2003; Miranda et al., 2008; Quilez et al., 2012).
- **Porte:** também já foi identificada maior soroprevalência em animais de médio e grande porte, o que acredita-se que seja em função da maior massa muscular e consequente maior área para picada (Miró et al., 2012).

## Reservatórios e transmissão

Desde a primeira descrição da leishmaniasis canina (LCan) na Tunísia, por Nicolle e Comte (1908), o cão foi apontado como um importante reservatório do agente etiológico da LC

e com grande importância epidemiológica na sua transmissão (Nicolle & Comte, 1908; Ribeiro et al., 2013). O gato (*Felis catus*), como animal doméstico, não tem um papel na manutenção do ciclo de vida do agente; a pouca informação que existe, relata que o sistema imunitário deste felino é eficaz para controlar o parasito, embora este tópico ainda careça de mais investigação (Maia & Campino, 2011; Pennisi & Persichetti, 2018; Solano-Gallego et al., 2007).

O cão doméstico é o principal reservatório da LV, causada por *L. infantum*, a qual é transmitida por insetos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, respectivamente (WHO, 2010). Os canídeos, de modo geral, fornecem todas as condições para se tornarem reservatórios de *L. infantum*, e muitos lobos, raposas e chacais carregam o parasita, constituindo o ciclo selvagem da doença, porém por causa das baixas populações e da distância de habitações humanas não são considerados reservatórios principais do agente. Apenas a raposa cruza o ciclo selvagem e o doméstico que é mantido pelos cães como reservatório hospedeiros (Alvar et al., 2004). Como parte desse ciclo selvagem já foi detectado DNA de *L. infantum* em roedores das espécies *Dasyprocta* sp. e *Proechimys cuvieri* no Brasil (E. S. Moreno et al., 2019); foi detectado parasitas do complexo *L. donovani* em roedores selvagens das espécies *Arvicanthis* sp., *Mastomys erythroleucus*, *Mastomys erythroleucus*, *Mastomys erythroleucus* e *Gerbilliscus nigricaudus*; e *L. tropica* em *Acomys* sp., *Arvicanthis* sp., *Acomys cf. mullah*, *Acomys cf. mullah* e *Gerbillus nanus* na Etiópia (Kassahun et al., 2015); assim como DNA de *L. infantum* em *Mangusta* egípcio em Portugal (Gomes et al., 2020).

*L. infantum* é transmitida pela picada de flebotomíneos e até agora não foi provado que outros artrópodes são capazes de agir como vetores. Na América Latina, o principal vetor de *L. infantum* é *Lu. longipalpis*, distribuído desde México até Argentina. Embora já exiba uma extensa distribuição geográfica, parece que este vetor está sofrendo ainda mais expansão no Brasil, Argentina e Uruguai, o que poderia justificar a ampla presença da doença nestes países, principalmente Brasil (Marcondes & Day, 2019).

### **Ecologia da doença**

Compreender doenças, mais do que em escala de casos clínicos individuais, requer a avaliação de perspectivas ecológicas e evolutivas, o que permite entender que uma epidemia é uma interação entre duas populações de espécies: patógeno e hospedeiro (Karesh et al., 2012). No caso de uma zoonose, existe uma interação entre pelo menos três espécies: um patógeno e duas espécies hospedeiras vertebradas, com pessoas e outras espécies animais agindo como o



reservatório da infecção. Para aquelas doenças zoonóticas transmitidas por vetor (como leishmaniose), a ecologia é ainda mais complicada, considerando que a ecologia dos vetores, hospedeiros e reservatórios podem mudar a dinâmica da transmissão (Kilpatrick & Randolph, 2012). Enquanto princípios ecológicos que moldam a dinâmica e sobrevivência de patógenos tem permanecido semelhantes, a população humana tem mudado o ambiente em que esses princípios operam, e isso é observável em ações como a domesticação de animais, desmatamento para agricultura e pastagem e caça de animais selvagens em novos habitats; o resulta em uma evolução dos patógenos e se traduz em novas infecções zoonóticas (Coker et al., 2011).

A leishmaniose, em todas as suas formas de apresentação, é exemplo perfeito do anteriormente exposto: no início, a doença estava limitada a ambientes rurais; mas, com as mudanças ambientais e ecológicas, houve uma transição epidemiológica, com aumento incidências em áreas urbanas, associadas à colonização de flebotomíneos e à propagação e adaptação de hospedeiros reservatórios naturais a estes ambientes antrópicos (Marcondes & Day, 2019).

De fato, a expansão de VL na América Latina está relacionada com: a destruição de ecossistemas e modificação de ambientes naturais devido ao desmatamento, estabelecimento de assentamentos rurais, industrialização e construção de estradas, rodovias, gasoduto de gás natural Brasil - Bolívia, campos de mineração, barragens e usinas hidrelétricas; urbanização, associada à migração em massa de pessoas das áreas rurais para as cidades; migração concomitante de cães infectados; movimento de cães com CanVL para evitar eutanásia; pobreza e falta de higiene; controle ineficaz ou parcialmente eficaz de vetores e da doenças (Maroli et al., 2013); (Marcondes & Day, 2019).

### **iii. Patogenia**

De acordo as manifestações clínicas, a doença está classificada em leishmaniose visceral (LV), a forma mais severa da doença, e leishmaniose cutânea ou tegumentar (LC), a forma mais comum. No Brasil, o maior parte dos casos são de CL, sendo o termo “leishmaniose” o preferido para distinguir a doença em cães (LVCan) em contraposição a “leishmaniase” que é usado para seres humanos (Carvalho et al., 2015; Marcondes & Day, 2019; Sykes, 2014).

Na CanVL, após a picada do flebotomíneo infectado e durante o longo período de incubação (até 7 anos), a distribuição do parasita é extensa, em todo o organismo, especialmente no baço, fígado, nódulos linfáticos, medula óssea, rins e pele, e se dá por meio de disseminação por via sanguínea e linfática (Alvar et al., 2004). A presença de parasitas em diversos tecidos e órgãos provoca lesões e sintomas característicos da CanVL, entre as quais: reações inflamatórias proliferativas que resultam em infiltração celular (as vezes extensas) que provocam uma alteração progressiva e desequilíbrio funcional dos órgãos afetados. A doença gera também uma resposta humoral, começando com estimulação policlonal de células B, que produzem uma alta concentração de globulinas, incluindo imunoglobulinas específicas e não específicas; assim como imunocomplexos, compostos principalmente de IgG e as frações C1, C2 e C4 do complemento, que se desenvolvem em diferentes locais do corpo (Alvar et al., 2004).

Neste processo, começam a se apresentar as alterações dermatológicas, que são manifestações da resposta imune. Na resposta de resistência há uma dermatite característica com células de Langerhans e queratinócitos expressando complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, células T, macrófagos e parasitas na derme. Enquanto, na resposta de animais mais suscetíveis, as lesões nodulares aparecem sem células apresentadoras de antígeno com muitos macrófagos parasitados (Fondevila et al., 1997), sendo comum também a aparição de fibroblastos parasitados, o que é importante no desenvolvimento de úlceras (Rodríguez et al., 1996).

No rim, a resposta imune causa lesões, caracterizadas por danos tubulares e glomerulares, que levam a uma glomerulonefrite aguda e glomerulonefrite extramembranosa, e posteriormente a insuficiência renal como resultado da deposição de imunocomplexos formados por IgG anti-*Leishmania* (Benderitter et al., 1988; Mancianti et al., 1989). No baço do cão com CanVL, produz-se uma desorganização da polpa branca, com apenas alguns linfócitos ao redor da arteríola central; enquanto a polpa vermelha torna-se hiper celular, com células plasmáticas e macrófagos parasitados na zona marginal e proliferação de células endoteliais, com a cápsula e as trabéculas espessadas. Os nódulos linfáticos apresentam hipertrofia das regiões cortical e medular, os centros germinativos aparecem com uma zona hiperplásica B-dependente e muitos macrófagos, enquanto a zona T-dependente está reduzida (Tafari et al., 2001).

O parasita também é capaz de afetar as mucosas e tem sido observadas lesões na língua, pênis e cavidade oral. Além disso, amastigotas produzem lesões vasculares envolvendo as

pequenas artérias de numerosos órgãos (Font et al., 1996; Pumarola et al., 1991). Lesões oculares também são uma consequência da infiltração de células plasmáticas e macrófagos infectados com amastigotas, causando lesões em diferentes estruturas oculares e a presença de depósitos de IgG, que afeta a permeabilidade vascular (Garcia-Alonso et al., 1996). A manifestação ocular mais comum é a uveíte anterior, caracterizada por edema, miose, formação fibrina na câmara anterior e vários nódulos no corpo da íris (Garcia-Alonso et al., 1996; Pena et al., 2000).

Apesar de não ter sido encontrada uma relação clara entre CanVL e doença cardiorrespiratória, foram observados infiltrados inflamatórios no coração e pulmões em cães com leishmaniose, e detectado por citologia a presença de uma baixa carga de amastigotas nestes órgãos, embora não tenha sido encontrado sinais de alteração cardíaca ou pulmonar (Alves et al., 2010).

#### **iv. Sinais clínicos**

As manifestações clínicas da infecção por *Leishmania* spp. são variáveis. Alguns cães conseguem eliminar completamente a infecção, mas uma porcentagem dos animais desenvolve a forma grave da doença, com risco de óbito (Molina et al., 1994). Outros cães permanecem persistentemente infectados, mas com infecção subclínica e com a possibilidade de reativação em um momento de imunossupressão. Estes animais têm um papel importante como hospedeiros reservatórios, uma vez que os podem infectar flebotomíneos adquirem o parasito deles (Palatnik-de-Sousa, 2012).

Quando a doença clínica aparece, suas manifestações podem variar de dermatite papular leve ou esfoliativa a doença disseminada grave, devido à proliferação maciça de histiócitos, linfócitos B, células plasmáticas em tecidos reticuloendoteliais, e consequências imunomediadas de uma infecção crônica e persistente. As lesões cutâneas que mais comumente se manifestam na LCCan são alopecia, descamação e/ou ulceração. Estes sinais são frequentemente notados antes do desenvolvimento dos sinais de infecção sistêmica, apesar de ocorrerem como consequência de disseminação do parasita. Muitos cães também desenvolvem onicogribose (unhas anormalmente longas ou quebradiças) (Sykes, 2014).

Os sinais sistêmicos de CanVL incluem febre, perda de peso, atrofia muscular, inapetência e letargia, ulceração oral, esplenomegalia e linfadenomegalia progressivas, mucosa

pálida devido à anemia e, raramente, hepatomegalia. Acredita-se que o desenvolvimento de autoanticorpos e complexos imunes circulantes leve a uma trombocitopenia imunomediada e/ou trombocitopatia e sinais como epistaxe ou melena, claudicação e inchaço das articulações, devido a poliartrite imunomediada, miosite, uveíte, vasculite e glomerulonefrite (Sykes, 2014). No caso de sintomas renais, para muitos cães a lesão glomerular culmina em síndrome nefrótica e/ou falha da função tubular, com poliúria e polidipsia, vômitos, diarreia e desidratação. Entretanto, é válido ressaltar que a insuficiência renal pode ocorrer na ausência de outras lesões (Ciaramella et al., 1997).

Como parte das condições que justificam a anemia se enumera uma combinação de fatores que incluem perda de sangue, inflamação, insuficiência renal, destruição imunomediada e aplasia ou hipoplasia da medula. Também são comuns lesões oculares, além da uveíte, outras lesões oculares incluem blefarite, conjuntivite, panoftalmite e ceratoconjuntivite. A ceratoconjuntivite é um resultado direto da infecção da glândula lacrimal por *Leishmania* (Naranjo et al., 2012).

A *Leishmania* spp. é capaz de afetar qualquer órgão e alguns relatos incluem sinais clínicos como prostatite e infertilidade; lesões nodulares em língua e outras superfícies mucosas; pancreatite; envolvimento gastrointestinal, miocárdico ou pulmonar; osteomielite; meningite; e formação de granuloma dentro a medula espinhal (Sykes, 2014).

## **v. Diagnóstico**

O diagnóstico da leishmaniose tem dois objetivos: a) confirmar a doença clínica e; b) detectar cães e pessoas infectados e clinicamente saudáveis que vivem em áreas endêmicas. Com isso, evita-se a transmissão por portadores subclínicos por transfusão de sangue, a importação de cães infectados para áreas não endêmicas, além de controlar a resposta ao tratamento (Solano-Gallego et al., 2011).

Diagnosticar a infecção não é sinônimo de diagnosticar de doença, uma vez que a maioria de cães infectados não desenvolvem a doença (Baneth et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2011) e que os resultados diferem entre cães clinicamente saudáveis e cães clinicamente doentes (Noli & Saridomichelakis, 2014). Os ensaios diagnósticos específicos para leishmaniose incluem o exame citológicos ou histopatológico dos tecidos afetados, sorologia e cultura do organismo ou PCR dos tecidos envolvidos ou a partir de sangue (Sykes, 2014).

## **Exames laboratoriais disponíveis para o diagnóstico de leishmaniose**

Para uma abordagem detalhada, este tópico descreve exames complementares, os quais reflexam o estado fisiopatológico do paciente na rotina clínica; assim como cultivo de *Leishmania* e visualização por método de citologia, análises imunológicas e a técnica molecular; as quais permitem uma identificação do agente.

### ***Exames complementares***

***Hemograma:*** a anormalidade mais comum em cães com leishmaniose é a anemia, em grau leve a moderado, normocítica, normocrômica e não regenerativa, com trombocitopenia leve em até 50% dos animais afetados. As contagens totais de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos podem estar diminuídas, dentro o intervalo de referência, ou aumentada, e pode haver pancitopenia. Embora a maioria dos cães apresentem linfopenia ou linfocitose moderada a grave (Sykes, 2014).

***Bioquímica:*** as alterações na bioquímica sérica incluem hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e azotemia leve a moderada. Entretanto, a hiperglobulinemia e hipoalbuminemia estão presentes em mais de 75% dos cães afetados. A concentração de globulina sérica varia de leve a grave (até 8 g/dl) e reflete uma gammapatia policlonal, enquanto gammapatia monoclonal é rara (Font et al., 1996; Sykes, 2014).

***Análise de urina:*** cães com leishmaniose podem ter proteinúria ou isostenúria, secundária ao prejuízo da função renal glomerular e tubulointerstitial, respectivamente. Cilindrúria pode também ser detectada (Sykes, 2014).

### ***Cultivo de Leishmania e visualização por método de citologia***

***Cultivo em meio específico:*** Existem meios monofásicos (líquidos) e bifásicos. Os monofásicos são meios de difícil aplicação e uso limitado em áreas endêmicas de países pobres, devido a que possuem um alto custo, entre eles o Schneider Drosophila o RPMI. Já os meios de cultura bifásicos são os meios de cultura mais amplamente utilizados para a cultura de parasitas devido ao baixo investimento e a alta efetividade para isolar o agente, sendo o mais conhecido o meio NNN (Bermúdez et al., 2005; Gramiccia, 2011).

O meio NNN consiste em uma mistura de ágar sangue de coelho 15% com uma fase líquida de água de condensação, originado quando o meio se solidifica; no qual serão inoculadas

1 ou 2 gotas da amostra clínica seguida de incubação a uma temperatura de 22-26°C; o que permitirá que os parasitas de *Leishmania* spp. passem da forma intracelular (amastigota) para a forma extracelular (promastigota). O isolamento é considerado negativo só se não for observado promastigotas depois de quatro passagens sucessivas (Maia & Campino, 2008).

**Exame citológico:** as densidades de organismos são particularmente altas em lesões de pele, medula óssea e baço, mas as amostras coletadas de outros tecidos, tais como nódulos linfáticos e aspirados hepáticos, também podem conter microrganismos. Patologistas inexperientes podem não conseguir identificar organismos quando presentes ou confundi-los com outros parasitas, como *Trypanosoma*, *Histoplasma* ou *Sporothrix schenckii*. Raramente os organismos são vistos em glóbulos brancos circulantes, no entanto, a identificação de amastigotas de *Leishmania* spp. em citologia é diagnóstica para leishmaniose (Sykes, 2014).

**Exame de medula óssea:** as alterações citológicas da medula óssea incluem eritrofagocitose, hipoplasia eritroide e displasia, hipoplasia eosinofílica, hiperplasia granulocítica e aumento do número de linfócitos e células plasmáticas; assim como a observação de amastigotas em microscópio óptico (Foglia Manzillo et al., 2006; Trópia de Abreu et al., 2011).

### **Análises sorológicas**

**Dual Path Platform (DPP®):** produzido pela Fiocruz, o kit DPP® CVL para detecção rápida de anticorpos específicos para K26 / K39, consiste em um cassete de plástico contendo duas fitas nitrocelulose, conectadas em forma de 'T' para permitir entrega da amostra de teste e reagente de detecção de anticorpos. DPP® CVL requer de 5 µL de soro, plasma ou sangue fresco total; além de duas gotas de tampão (incluídas no kit), logo essa amostra diluída migra para a segunda tira contendo um linha de teste (K2/ K39 impresso em nitrocelulose como um banda) e uma linha de controle (Grimaldi et al., 2012).

Com a diluição de quatro gotas de tampão para o conjugado, ocorre uma liberação de partículas de ouro coloidal secas acopladas à proteína A/G e facilita sua migração ao longo a segunda tira para a área de teste. O que segue é a reação entre essas partículas de e os anticorpos ligados ao antígeno que estão presentes, criando um complexo imune colorido para visualização da banda de teste em um período de 15 minutos, o que confirma a presença de anticorpos específicos; ou bem, a ausência de anticorpos, se nenhuma banda for visível na janela do teste (Grimaldi et al., 2012).

**Ensaio Imunoenzimático (ELISA):** os métodos sorológicos são as técnicas de diagnóstico mais comuns usadas para em LCan (Solano-Gallego et al., 2014). ELISA é um teste diagnóstico com sensibilidade e especificidade que pode oscilar entre 80 e 99,5% e entre 81 e 100%, respectivamente; e que para sua realização vários antígenos que podem ser classificados de acordo com sua natureza em: extratos amastigotas solúveis ou completos, proteínas recombinantes e proteínas purificadas (Marcondes et al., 2011; Solano-Gallego et al., 2014). O ELISA usando o antígeno rK39 possui 99% de especificidade e sensibilidade em cães com a doença demonstrada por identificação parasitológica (Scalone et al., 2002).

**Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI):** nesta técnica é necessário pessoal qualificado e requer de muito tempo naquelas análises de grande número de amostras; utilizando promastigotas de *Leishmania* spp. como antígeno, que podem ser de espécies tais como *L. mexicana* e *L. braziliensis* (C. A. da Costa et al., 1991; Rachamim et al., 1991; Tavares et al., 2003). RIFI tem uma sensibilidade variando de 83% a 100%, e especificidade, que varia de 74% a 100%, em dependência da região geográfica (Almeida et al., 2005; E. S. da Silva et al., 2006).

**Imuno-histoquímica:** esta técnica auxilia na identificação ou confirmação da presença do parasito, principalmente em órgãos com baixa carga parasitária ou quando os parasitos não são identificáveis de forma clara por microscopia de luz (Maia & Campino, 2011). Essa situação requer laboratórios e instalações especiais, que têm alto custo e necessidade de pessoal qualificado. Além disso, sua má interpretação acarreta resultados falsos positivos (amastigotas podem ser confundidas com artefatos) e/ou falsos negativos (a sensibilidade depende da carga do parasita) (Baneth et al., 2008).

### **Identificação molecular**

**Detecção molecular usando a Reação em Cadeia da Polimerase:** vários ensaios de PCR convencional e em tempo real diferentes têm sido desenvolvidos e avaliados para detecção de *Leishmania* spp. em amostras caninas. Amostras adequadas para os testes incluem aspirados esplênicos, hepáticos, de linfonodos ou de medula óssea, sangue total; biópsias de pele, *swabs* conjuntivais e orais; destacando que *swabs* conjuntivais e aspirados de baço, medula óssea e de nódulos linfáticos, assim como de biópsias de pele são mais propensas a produzir resultados positivos (Lombardo et al., 2012; Martínez et al., 2011).

## **vi. Tratamento**

Na América Latina, o tratamento de cães com leishmaniose geralmente não é realizado, principalmente devido à recomendação de que cães soropositivos devem ser eutanasiados. No Brasil, em 2008, houve a proibição do tratamento da CanVL com medicamentos de uso humano pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2008; Marcondes & Day, 2019).

Apesar dessa proibição, muitos veterinários obtiveram autorização judicial para tratar cães e muitos proprietários que se recusaram a enviar seus animais para a eutanásia optaram por tratar seus animais com medicamentos importados ou de segunda linha. No entanto, em setembro de 2016, o MAPA concedeu uma licença para a venda de Milteforan® (miltefosina; Virbac Animal Health), o primeiro medicamento veterinário para o tratamento da CanVL no Brasil, lançado no mercado brasileiro em janeiro de 2017. Contudo, a recomendação de eutanásia ainda se mantém para aqueles tutores que não tem condições financeiras para adquirir esta medicação (Marcondes & Day, 2019).

Drogas com atividade leishmanioestática incluem os antimoniais pentavalentes, como antimoniato de meglumina (Glucantima) e o estibogluconato de sódio; alopurinol; anfotericina B; e miltefosina; porém, independentemente do tratamento utilizado, a cura parasitológica completa é rara e as recidivas são frequentes (Andrade et al., 2011; Noli & Auxilia, 2005).

## **vii. Controle**

### **Eutanásia de cães soropositivos**

Na Colômbia, no ano 2015, foi realizado o 3º Encontro dos Programas Nacionais da Leishmaniose dos Países Prioritários das Américas, promovido pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). A recomendação para vigilância e controle de reservatórios para *Leishmania* spp. foi mantida, incluindo a eutanásia de cães positivos (PAHO, 2015). Uma medida controversa e que depois da eliminação de 176 mil cães soropositivos no Brasil no período 1990 – 1997, não demonstrou correlação com a diminuição dos casos de leishmaniose humana e canina. Pelo contrário, os casos tem aumentado tanto que a doença se tornou um dos principais problemas de saúde pública em vários estados do país (Marcondes & Day, 2019).



Possíveis fatores relacionados a falta de efetividade da eliminação de cães positivos, são:

- Alta incidência de infecção e infecciosidade em áreas de endemicidade (P. L. Costa et al., 2013);
- Falta de sensibilidade e especificidade suficiente dos métodos sorológicos para identificar com precisão todos os cães infectados (Coura-Vital et al., 2014);
- Demora de 80 – 180 dias desde a detecção de um cão positivo até a eutanásia (Coura-Vital et al., 2014);
- Reposição de animais infectados por filhotes saudáveis, o que gera uma nova geração de animais jovens susceptíveis (Coura-Vital et al., 2014).

No entanto, alguns autores mostraram que a eutanásia de cães infectados, associada a outras medidas de controle, pode reduzir a incidência de casos caninos e humanos de VL (Ashford et al., 1998; da Costa-Val et al., 2007; Nunes et al., 2010).

### **Vacinação de cães**

Cães que resistem à leishmaniose apresentam forte resposta de hipersensibilidade ao antígeno leishmania quando administrado por via intradérmica. Um equilíbrio entre as respostas imunológicas de Th1 e Th2 parecem ser importantes na determinação do resultado clínico da infecção. Uma das vacinas que estimula o sistema imunológico desta forma é a Leishmune, a qual obteve licença para prevenção de leishmaniose em cães no Brasil em 2011, sendo composta por um antígeno promastigota (ligante de fucose-manose) e o adjuvante saponina. A eficácia inicial dos testes de campo foram de aproximadamente 80% e se correlacionaram com uma redução da leishmaniose humana na área (Molina et al., 1994). Além disso, em uma pesquisa a seis meses após a vacinação foi encontrado que induziu um aumento nos níveis de IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-17a e TNF- $\alpha$  e uma diminuição na IL-10. A análise da assinatura das citocinas revelou uma mudança no microambiente em direção a um perfil pró-inflamatório mediado por IL-8 e IFN- $\gamma$ , o que significa que gera uma resposta efetiva seis meses após a primovacinação, e retornando um ano depois a ser necessária uma nova dose de vacina (Costa-Pereira et al., 2015).

CaniLeish, (Virbac) é outra vacina composta por proteínas purificadas de *L. infantum* (LiESP), a qual é licenciada na Europa para prevenção da leishmaniose canina. Essa vacina

estimula a resposta Th1 anti-*L. infantum* dentro de 3 semanas após administração (J. Moreno et al., 2012).

### **Controle de vetores**

O uso de inseticidas tópicos, especialmente coleiras, pode reduzir o risco da infecção por *L. infantum* em cães, apresentando-se como uma ferramenta importante que pode ser integrada em programas de controle da VL junto com outras medidas. No entanto, a fim de alcançar um impacto epidemiológico significativo na transmissão de CanVL, é necessário a utilização delas em massa pelos cães (Marcondes & Day, 2019).

Um modelo matemático usado para comparar a eficácia das medidas de controle para VL (ou seja, vacinas, eutanásia de cães soropositivos e uso de coleiras impregnadas com inseticida) mostrou que as três medidas, em coberturas diferentes, foram associadas a uma diminuição na prevalência da infecção em cães e seres humanos. No entanto, o uso de coleiras impregnadas com inseticida teve o nível mais alto de eficácia (Sevá et al., 2016).

### **viii. Saúde Pública**

Segundo Alvar *et. al* (2012), estima-se que 12 milhões de pessoas em todo o mundo tenham leishmaniose e que ao menos 350 milhões de pessoas estão sob risco. Além disso, estima-se que aproximadamente 200.000 a 400.000 novos casos de VL e 700.000 a 1,2 milhão de novos casos de CL ocorram em seres humanos anualmente, além de 20.000 a 40.000 mortes por ano (Alvar et al., 2012a).

Outro dado importante é que 90% dos casos de VL em todo o mundo ocorrem na Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. Muitos casos são devidos a *L. donovani*, para o qual os seres humanos são o principal reservatório (Alvar et al., 2012b). Na Ásia Central, China, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e América Latina a causa de VL é *L. infantum* e nesses territórios muitos dos casos acontecem em crianças e adultos imunossuprimidos (como pacientes HIV positivos). A *L. infantum* é também responsável pela CL em pacientes humanos e o reservatório primário é o cão doméstico (Dantas-Torres, 2011).

Recomendações da Organização Mundial de Saúde para o controle da leishmaniose na população humana consiste no tratamento de doença no homem, eutanásia de cães soropositivos, domésticos ou selvagens, e tratamento inseticida nas casas de pessoas infectados, como por exemplo usando *sprays* à base de piretróides (WHO, 2010). A vacinação de cães pode ser mais eficaz do que a eliminação de cães soropositivos e pode também evitar as preocupações éticas relacionadas a eutanásia em caninos positivos (Palatnik-de-Sousa, 2012).

### 3. REFERENCIAS

- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *10*(3), e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Almeida, M. a. O., Jesus, E. E. V., Sousa-Atta, M. L. B., Alves, L. C., Berne, M. E. A., & Atta, A. M. (2005). Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*, *127*(3–4), 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.010>
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J. (2004). Canine Leishmaniasis. In *Advances in Parasitology* (Vol. 57, p. 1–88). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X)
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer, M. den, & the WHO Leishmaniasis Control Team. (2012a). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, *7*(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer, M. den, & the WHO Leishmaniasis Control Team. (2012b). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, *7*(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Alves, G. B. B., Pinho, F. A., Silva, S. M. M. S., Cruz, M. S. P., & Costa, F. A. L. (2010). Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *43*(3), 310–315. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009007500037>

- Amela, C., Mendez, I., Torcal, J. M., Medina, G., Pachón, I., Cañavate, C., & Alvar, J. (1995). Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *European Journal of Epidemiology*, *11*(2), 157–161. <https://doi.org/10.1007/BF01719481>
- Andrade, H. M., Toledo, V. P. C. P., Pinheiro, M. B., Guimarães, T. M. P. D., Oliveira, N. C., Castro, J. A., Silva, R. N., Amorim, A. C., Brandão, R. M. S. S., Yoko, M., Silva, A. S., Dumont, K., Ribeiro, M. L., Bartchewsky, W., & Monte, S. J. H. (2011). Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. *Veterinary Parasitology*, *181*(2–4), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.009>
- Antinori, S., Schifanella, L., & Corbellino, M. (2012). Leishmaniasis: New insights from an old and neglected disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *31*(2), 109–118. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1276-0>
- Ashford, D. A., David, J. R., Freire, M., David, R., Sherlock, I., Eulálio, M. C., Sampaio, D. P., & Badaro, R. (1998). Studies on control of visceral leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *59*(1), 53–57. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.53>
- Awasthi, A., Mathur, R. K., & Saha, B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *The Indian Journal of Medical Research*, *119*(6), 238–258.
- Baneth, G., & Aroch, I. (2008). Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, *175*(1), 14–15. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.11.011>
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: Part one. *Trends in Parasitology*, *24*(7), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>
- Bañuls, A.-L., Hide, M., & Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. In *Advances in Parasitology* (Vol. 64, p. 1–458). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)
- Benderitter, Th., Casanova, P., Nashkidachvili, L., & Quilici, M. (1988). Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, *82*(4), 335–341. <https://doi.org/10.1080/00034983.1988.11812255>
- Bermúdez, H., Solano, M., Torrico Rojas, M. C., Carballo Montero, M., Lafuente Covarrubias, O., Lara Arias, M. del P., & Paredes Torrico, P. (2005). DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS UTILIZANDO MEDIO DE CULTIVO TSTB EN

- PACIENTES DE TROPICO DE COCHABAMBA. *Gaceta Médica Boliviana*, 28(2), 31–35.
- Brasil. (2008). [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426\\_11\\_07\\_2008.html](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html)
- Brasil. (2017). *Leishmaniose Visceral*. Ministério da Saúde. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/l/leishmaniose-visceral>
- Cardoso, Bezerra, C., Medina, L. S., Ramasawmy, R., Scheriefer, A., Bacellar, O., & de Carvalho, E. M. (2019). *Leishmania braziliensis* isolated from disseminated leishmaniasis patients downmodulate neutrophil function. *Parasite Immunology*, 41(5), e12620. <https://doi.org/10.1111/pim.12620>
- Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone, G. J., Carreta, P., Varejão, E., van Benthem, B., Afonso, M. O., Alves-Pires, C., Semião-Santos, S. J., Rodrigues, J., & Schallig, H. D. F. H. (2004). Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. Infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology*, 121(1–2), 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.02.008>
- Carrillo, E., Moreno, J., & Cruz, I. (2013). What is responsible for a large and unusual outbreak of leishmaniasis in Madrid? *Trends in Parasitology*, 29(12), 579–580. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.10.007>
- Carvalho, Lima, B. S., Marinho-Júnior, J. F., Silva, F. J. da, Valença, H. F., Almeida, F. de A., Silva, A. L. da, & Brandão-Filho, S. P. (2007). Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 23(5), 1227–1232. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2007000500024>
- Carvalho, Wenceslau, Albuquerque, Munhoz, A. D., Gross, E., Carneiro, P. L. S., Oliveira, H. C., Rocha, J. M., Santos, I. A., & Rezende, R. P. (2015). *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* in dogs in Brazil: Epidemiology, co-infection, and clinical aspects. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 12062–12073. <https://doi.org/10.4238/2015.October.5.19>
- Castro, J. C., Bueno, L. L., Milagres, T. F., Rêgo, F. D., Gontijo, C. M. F., Peconick, A. P., Andrade, A. J., Barçante, T. A., & Barçante, J. M. P. (2019). Molecular detection of *Leishmania* spp in *Lutzomyia longipalpis* in the city of Lavras, Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, 52(9), e8224. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20198224>

- CDC. (2017). (14 de dezembro de 2017) DPDx—Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Centers for Disease Control and Prevention. Recuperado 09 de junho de 2021. <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>  
<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
- Ciaramella, P., Oliva, G., De Luna, R., Ambrosio, R., Cortese, L., Persechino, A., Gradoni, L., & Scalone, A. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, *141*(21), 539–543. <https://doi.org/10.1136/vr.141.21.539>
- Coker, R., Rushton, J., Mounier-Jack, S., Karimuribo, E., Lutumba, P., Kambarage, D., Pfeiffer, D. U., Stärk, K., & Rweyemamu, M. (2011). Towards a conceptual framework to support one-health research for policy on emerging zoonoses. *The Lancet Infectious Diseases*, *11*(4), 326–331. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70312-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70312-1)
- Costa, C. A. da, Genaro, O., Lana, M. de, Magalhães, P. A., Dias, M., Michalick, M. S. M., Melo, M. N., Costa, R. T. da, Magalhães-Rocha, N. M., & Mayrink, W. (1991). Leishmaniose visceral canina: Avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *24*(1), 21–25. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821991000100004>
- Costa, P. L., Dantas-Torres, F., da Silva, F. J., Guimarães, V. C. F. V., Gaudêncio, K., & Brandão-Filho, S. P. (2013). Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. *Acta Tropica*, *126*(2), 99–102. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.01.011>
- Costa-Pereira, C., Moreira, M. L., Soares, R. P., Marteleto, B. H., Ribeiro, V. M., França-Dias, M. H., Cardoso, L. M., Viana, K. F., Giunchetti, R. C., Martins-Filho, O. A., & Araújo, M. S. S. (2015). One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis. *BMC Veterinary Research*, *11*, 92. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0397-6>
- Coura-Vital, W., Ker, H. G., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. O., Leal, G. G. de A., Moreira, N. das D., Oliveira, L. A. M., de Menezes Machado, E. M., Morais, M. H. F., Corrêa-Oliveira, R., Carneiro, M., & Reis, A. B. (2014). Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PloS One*, *9*(3), e91009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091009>

- Coura-Vital, W., Marques, M. J., Veloso, V. M., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. de O., Reis, L. E. S., Braga, S. L., Morais, M. H. F., Reis, A. B., & Carneiro, M. (2011). Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *5*(8), e1291. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001291>
- Cruz, I., Acosta, L., Gutiérrez, M. N., Nieto, J., Cañavate, C., Deschutter, J., & Bornay-Llinares, F. J. (2010). A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). *BMC Infectious Diseases*, *10*(1), 342. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-342>
- Cruz, I., Cañavate, C., Rubio, J. M., Morales, M. A., Chicharro, C., Laguna, F., Jiménez-Mejías, M., Sirera, G., Videla, S., & Alvar, J. (2002). A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *96*, S185–S189. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90074-X](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90074-X)
- da Costa-Val, A. P., Cavalcanti, R. R., de Figueiredo Gontijo, N., Michalick, M. S. M., Alexander, B., Williams, P., & Melo, M. N. (2007). Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, *174*(3), 636–643. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.11.006>
- da Silva, E. S., van der Meide, W. F., Schoone, G. J., Gontijo, C. M. F., Schallig, H. D. F. H., & Brazil, R. P. (2006). Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Veterinary Research Communications*, *30*(6), 637–643. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3324-2>
- D'Andrea, L., Camargo-Neves, V., Sampaio, S., Kronka, S., & Sartor, I. (2009). American visceral leishmaniasis: Disease control strategies in dracen microregion in alta paulista, SP, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *15*(2), 305–324. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992009000200012>
- Dantas-Torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, *149*(3–4), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.007>

- Dantas-Torres, F. (2011). Dogs as reservoirs for *Leishmania braziliensis*. *Emerging Infectious Diseases*, 17(2), 326–327; author reply 327. <https://doi.org/10.3201/eid1702.091823>
- Dantas-Torres, F., Miró, G., Baneth, G., Bourdeau, P., Breitschwerdt, E., Capelli, G., Cardoso, L., Day, M. J., Dobler, G., Ferrer, L., Irwin, P., Jongejan, F., Kempf, V. A. J., Kohn, B., Lappin, M., Little, S., Madder, M., Maggi, R., Maia, C., ... Otranto, D. (2019). Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. *Emerging Infectious Diseases*, 25(12), 1–4. <https://doi.org/10.3201/eid2512.190164>
- Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V. M., de Paiva-Cavalcanti, M., & Otranto, D. (2012). Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*, 28(12), 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.007>
- Disch, J., Pedras, M. J., Orsini, M., Pirmez, C., de Oliveira, M. C., Castro, M., & Rabello, A. (2005). *Leishmania* (Viannia) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 51(3), 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.10.005>
- Duarte, M. C., Lage, D. P., Martins, V. T., Chávez-Fumagalli, M. A., Roatt, B. M., Menezes-Souza, D., Goulart, L. R., Soto, M., Tavares, C. A. P., & Coelho, E. A. F. (2016). Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49(4), 398–407. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0120-2016>
- Dujardin, J.-C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J.-P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y., & Boelaert, M. (2008). Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 14(7), 1013–1018. <https://doi.org/10.3201/eid1407.071589>
- Filho, B., & Pinto, S. (2004). Flebotomíneos do Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 20, 1436–1437. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2004000500043>
- FIOCRUZ. (1997). (1997). As Leishmanioses. FIOCRUZ. Recuperado 01 de junho de 2021 de [www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman](http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman). <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/vetores.htm>
- Foglia Manzillo, V., Restucci, B., Pagano, A., Gradoni, L., & Oliva, G. (2006). Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. *The Veterinary Record*, 158(20), 690–694. <https://doi.org/10.1136/vr.158.20.690>



- Fondevila, D., Vilafranca, M., & Ferrer, L. (1997). Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *56*(3–4), 319–327. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(96\)05755-8](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(96)05755-8)
- Font, A., Roura, X., Fondevila, D., Closa, J. M., Mascort, J., & Ferrer, L. (1996). Canine mucosal leishmaniasis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, *32*(2), 131–137. <https://doi.org/10.5326/15473317-32-2-131>
- França-Silva, J. C., da Costa, R. T., Siqueira, A. M., Machado-Coelho, G. L. L., da Costa, C. A., Mayrink, W., Vieira, E. P., Costa, J. S., Genaro, O., & Nascimento, E. (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, *111*(2–3), 161–173. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00351-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00351-5)
- Galati, E. A. B., Rangel, E. F., & Lainson, R. (2014). Classificação, morfologia, terminologia e identificação de Adultos: Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. *Flebotomíneos do Brasil. FIOCRUZ, Rio de*, 367.
- Garcia-Alonso, M., Nieto, C. G., Blanco, A., Requena, J. M., Alonso, C., & Navarrete, I. (1996). Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunology*, *18*(11), 539–546. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-28.x>
- Gomes, J., Rocha, H., Carvalho, C., Bandeira, V., Fonseca, C., Rosalino, L. M., & Cunha, M. V. (2020). Molecular detection and characterization of *Leishmania infantum* in free-ranging Egyptian mongoose (*Herpestes ichneumon*). *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*, *11*, 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.02.001>
- Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, *181*(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.019>
- Grimaldi, G., Teva, A., Ferreira, A. L., dos Santos, C. B., Pinto, I. de-Souza, de-Azevedo, C. T., & Falqueto, A. (2012). Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *106*(1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.001>
- Guillaume J.J.M., van E., Schoone, G. J., Kroon, N. C. M., & Ebeling, S. B. (1992). Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and

- identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 51(1), 133–142. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90208-2](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90208-2)
- IBGE. (2019). «Estimativa populacional 2019 IBGE». Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/lavras/panorama>
- Jogas Jr., D. G. (2017). Trópicos, ciência e leishmanioses: Uma análise sobre circulação de saberes e assimetrias. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 24(4), 1051–1070. <https://doi.org/10.1590/s0104-59702017000500011>
- Jorgensen, J. H., & Pfaller, M. A. (2015). *Manual of Clinical Microbiology. Cap 137 Leishmania and Trypanosoma. Pag 2357—2372* (Vol. 1). ASM. Press.
- Karesh, W. B., Dobson, A., Lloyd-Smith, J. O., Lubroth, J., Dixon, M. A., Bennett, M., Aldrich, S., Harrington, T., Formenty, P., Loh, E. H., Machalaba, C. C., Thomas, M. J., & Heymann, D. L. (2012). Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories. *The Lancet*, 380(9857), 1936–1945. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61678-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61678-X)
- Kassahun, A., Sadlova, J., Dvorak, V., Kostalova, T., Rohousova, I., Frynta, D., Aghova, T., Yasur-Landau, D., Lemma, W., Hailu, A., Baneth, G., Warburg, A., Volf, P., & Votycka, J. (2015). Detection of *Leishmania donovani* and *L. tropica* in Ethiopian wild rodents. *Acta Tropica*, 145, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.02.006>
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17(3), 279–289. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(99\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(99)00046-2)
- Kilpatrick, A. M., & Randolph, S. E. (2012). Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *The Lancet*, 380(9857), 1946–1955. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61151-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61151-9)
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J. P., & Bastien, P. (2002). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 210–215. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.210-215.2002>
- Laflamme, D. (1997). Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Practice*, 22(4), 10–15.
- Lara-Silva, F. de O., Michalsky, É. M., Fortes-Dias, C. L., Fiuza, V. de O. P., Pessanha, J. E. M., Regina-Silva, S., de Avelar, D. M., Silva, M. A., Ana Cristina Vianna Mariano da Rocha Lima, da Costa, A. J. A., Machado-Coelho, G. L. L., & Dias, E. S. (2015). Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent

- transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Tropica*, 148, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.002>
- Leblois, R., Kuhls, K., François, O., Schönian, G., & Wirth, T. (2011). Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 1091–1095. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.004>
- Lombardo, G., Pennisi, M. G., Lupo, T., Migliazzo, A., Capri, A., & Solano-Gallego, L. (2012). Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*, 184(1), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.010>
- Lopes, E. G. P., Magalhães, D. F., Silva, J. A., Haddad, J. P. A., & Moreira, E. C. (2010). Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte-MG, 1993 a 2007. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62(5), 1062–1071. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000500007>
- Lopes, J. V., Michalsky, É. M., Lara Silva, F. de O., Lima, A. C. V. M. R., de Avelar, D. M., da Costa, A. A. J., França-Silva, J. C., Regina-Silva, S., Fortes-Dias, C. L., & Dias, E. S. (2017). Seroprevalence and molecular characterization of *Leishmania* in dogs from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 5(1), 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.02.002>
- Maia, C., & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 274–287. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.028>
- Maia, C., & Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, 27(8), 341–344. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.03.008>
- Malaquias, L. C. C., do Carmo Romualdo, R., do Anjos, J. B., Giunchetti, R. C., Corrêa-Oliveira, R., & Reis, A. B. (2007). Serological screening confirms the re-emergence of canine leishmaniasis in urban and rural areas in Governador Valadares, Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil. *Parasitology Research*, 100(2), 233–239. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0259-z>
- Mancianti, F., Poli, A., & Bionda, A. (1989). Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parassitologia*, 31(2–3), 213–230.
- Marco, J. D., Padilla, A. M., Diosque, P., Fernández, M. M., Malchiodi, E. L., & Basombrío, M. A. (2001). Force of infection and evolution of lesions of canine tegumentary

- leishmaniasis in Northwestern Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5), 649–652. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000500009>
- Marcondes, M., Biondo, A. W., Gomes, A. A. D., Silva, A. R. S., Vieira, R. F. C., Camacho, A. A., Quinn, J., & Chandrashekar, R. (2011). Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Veterinary Parasitology*, 175(1–2), 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.036>
- Marcondes, M., & Day, M. J. (2019). Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Research in Veterinary Science*, 123, 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022>
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>
- Martínez, V., Quilez, J., Sanchez, A., Roura, X., Francino, O., & Altet, L. (2011). Canine leishmaniasis: The key points for qPCR result interpretation. *Parasites & Vectors*, 4, 57. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-57>
- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., & Ramis, A. (2008). Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Research in Veterinary Science*, 85(1), 35–38. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.09.003>
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: Part two. *Trends in Parasitology*, 24(8), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.05.003>
- Miró, G., Checa, R., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D., & Gálvez, R. (2012). Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasites & Vectors*, 5, 60. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-60>
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J. A., Lucientes, J., & Alvar, J. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(4), 491–493. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90446-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90446-4)
- Monteiro, É. M., Silva, J. C. F. da, Costa, R. T. da, Costa, D. C., Barata, R. A., Paula, E. V. de, Machado-Coelho, G. L. L., Rocha, M. F., Fortes-Dias, C. L., & Dias, E. S. (2005). Leishmaniose visceral: Estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros,

- Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(2), 147–152.  
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822005000200004>
- Moreno, E. S., Sabioni, L. A., de Seixas, M. M. M., de Souza, J. A., Marcelino, A. P., & Shimabukuro, P. H. F. (2019). Evidence of a sylvatic enzootic cycle of *Leishmania infantum* in the State of Amapá, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, e20190169. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0169-2019>
- Moreno, J., & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18(9), 399–405.  
[https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02347-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02347-4)
- Moreno, J., Vouldoukis, I., Martin, V., McGahie, D., Cuisinier, A.-M., & Gueguen, S. (2012). Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(6), e1683. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001683>
- Naranjo, C., Fondevila, D., Altet, L., Francino, O., Ríos, J., Roura, X., & Peña, T. (2012). Evaluation of the presence of *Leishmania* spp. By real-time PCR in the lacrimal glands of dogs with leishmaniosis. *The Veterinary Journal*, 193(1), 168–173.  
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.10.001>
- Narciso, T. P., Carvalho, R. C., Campos, L. C., Viana, A. G., Fujiwara, R. T., Barçante, T. A., Alvarenga, I. M., & Barçante, J. M. de P. (2018). First report of an autochthonous human visceral leishmaniasis in a child from the South of Minas Gerais State, Brazil. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, 61, e1.  
<https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961001>
- Nicolle, C., & Comte, C. (1908). *Origine canine du Kala-azar*.
- Noli, C., & Auxilia, S. T. (2005). Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: A systematic review. *Veterinary Dermatology*, 16(4), 213–232.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2005.00460.x>
- Noli, C., & Saridomichelakis, M. N. (2014). An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *The Veterinary Journal*, 202(3), 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.002>
- Nunes, C. M., Pires, M. M., da Silva, K. M., Assis, F. D., Gonçalves Filho, J., & Perri, S. H. V. (2010). Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Veterinary Parasitology*, 170(1–2), 131–133.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.044>

- Padilla, A. M., Marco, J. D., Diosque, P., Segura, M. A., Mora, M. C., Fernández, M. M., Malchiodi, E. L., & Basombrío, M. A. (2002). Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. *Veterinary Parasitology*, *110*(1–2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00330-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00330-8)
- PAHO. (2015).
- Palatnik-de-Sousa, C. B. (2012). Vaccines for Canine Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00069>
- Pena, M. T., Roura, X., & Davidson, M. G. (2000). Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Veterinary Ophthalmology*, *3*(1), 35–41. <https://doi.org/10.1046/j.1463-5224.2000.00106.x>
- Pennisi, M. G., & Persichetti, M. F. (2018). Feline leishmaniasis: Is the cat a small dog? *Veterinary Parasitology*, *251*, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.012>
- Pumarola, M., Brevik, L., Badiola, J., Vargas, A., Domingo, M., & Ferrer, L. (1991). Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *Journal of Comparative Pathology*, *105*(3), 279–286. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(08\)80196-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(08)80196-x)
- Quilez, J., Martínez, V., Woolliams, J. A., Sanchez, A., Pong-Wong, R., Kennedy, L. J., Quinnell, R. J., Ollier, W. E. R., Roura, X., Ferrer, L., Altet, L., & Francino, O. (2012). Genetic Control of Canine Leishmaniasis: Genome-Wide Association Study and Genomic Selection Analysis. *PLoS ONE*, *7*(4), e35349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035349>
- Rachamim, N., Jaffe, C. L., Abranches, P., Silva-Pereira, M. C. D., Schnur, L. F., & Jacobson, R. L. (1991). Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: Comparison of three methods. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, *85*(5), 503–508. <https://doi.org/10.1080/00034983.1991.11812600>
- Ribeiro, R. R., Michalick, M. S. M., da Silva, M. E., dos Santos, C. C. P., Frézard, F. J. G., & da Silva, S. M. (2018). Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed Research International*, *2018*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/3296893>
- Ribeiro, R. R., Silva, S. M. da, Fulgêncio, G. de O., Michalick, M. S. M., & Frézard, F. J. G. (2013). Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *22*(3), 373–378. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000300009>

- Rivas, A. K., Alcover, M. M., Martínez-Orellana, P., Montserrat-Sangrà, S., Nachum-Biala, Y., Fisa, R., Riera, C., Baneth, G., & Solano-Gallego, L. (2020). Serological and molecular survey of Leishmania infection in dogs from Venezuela. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *21*, 100420. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100420>
- Rodríguez, J. H., Mozos, E., Méndez, A., Pérez, J., & Gómez-Villamandos, J. C. (1996). Leishmania Infection of Canine Skin Fibroblasts In Vivo. *Veterinary Pathology*, *33*(4), 469–473. <https://doi.org/10.1177/030098589603300423>
- Rondon, F. C. M., Bevilaqua, C. M. L., Franke, C. R., Barros, R. S., Oliveira, F. R., Alcântara, A. C., & Diniz, A. T. (2008). Cross-sectional serological study of canine Leishmania infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, *155*(1–2), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.014>
- Scalone, A., De Luna, R., Oliva, G., Baldi, L., Satta, G., Vesco, G., Mignone, W., Turilli, C., Mondesire, R. R., Simpson, D., Donoghue, A. R., Frank, G. R., & Gradoni, L. (2002). Evaluation of the Leishmania recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*, *104*(4), 275–285. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00643-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00643-4)
- Schönian, G., Mauricio, I., & Cupolillo, E. (2010). Is it time to revise the nomenclature of Leishmania? *Trends in Parasitology*, *26*(10), 466–469. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.013>
- Sevá, A. P., Ovallos, F. G., Amaku, M., Carrillo, E., Moreno, J., Galati, E. A. B., Lopes, E. G., Soares, R. M., & Ferreira, F. (2016). Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PloS One*, *11*(7), e0160058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160058>
- Silva, J. N. da, Cotrim, A. C., Conceição, L. A. V. da, Marins, C. M. F., Marchi, P. G. F. de, Honorio-França, A. C., Almeida, A. do B. P. F. de, França, E. L., & Sousa, V. R. F. (2018). Immunohaematological and rheological parameters in canine visceral leishmaniasis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *27*(2), 211–217. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180021>
- Silva, L., & Oliveira, L. (2015). *AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE TEMPERATURA MÉDIA E MÁXIMA NO MUNICÍPIO DE LAVRAS - MG.*
- Soares, M. R. A., Mendonça, I. L. de, Bonfim, J. M. do, Rodrigues, J. A., Werneck, G. L., & Costa, C. H. N. (2011). Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship

- between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Tropica*, *117*(1), 6–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.08.015>
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B., & Breitschwerdt, E. (2006). A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary Research*, *37*(2), 231–244. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005054>
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., & Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, *4*(1), 86. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portús, M., & Alberola, J. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *76*(4), 676–680.
- Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T., & Natale, A. (2014). Serological diagnosis of canine leishmaniosis: Comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and Leishmania 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT. *Parasites & Vectors*, *7*(1), 111.  
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-111>
- Suárez Rodríguez, B., Isidoro Fernández, B., Santos Sanz, S., Sierra Moros, M. J., Molina Moreno, R., Astray Mochales, J., & Amela Heras, C. (2012). [Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain]. *Revista Espanola De Salud Publica*, *86*(6), 555–564. <https://doi.org/10.4321/S1135-57272012000600002>
- Sykes, J. E. (2014). *Canine and feline infectious diseases. Cap 74 Leishmaniosis. Pág 713–726*. Elsevier/Saunders.
- Tafuri, W. L., de Oliveira, M. R., Melo, M. N., & Tafuri, W. L. (2001). Canine visceral leishmaniosis: A remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology*, *96*(3), 203–212. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00436-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00436-2)
- Tavares, C. A. P., Fernandes, A. P., & Melo, M. N. (2003). Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, *3*(5), 657–667.  
<https://doi.org/10.1586/14737159.3.5.657>
- Taylor, M. A. (2016). *Veterinary Parasitology, 4th Edition | Wiley*. Wiley.Com.  
<https://www.wiley.com/en-us/Veterinary+Parasitology%2C+4th+Edition-p-9780470671627>



- Thrusfield, M. (2005). *Veterinary epidemiology* (Third edition). Blackwell.
- Tolezano, J. E., Uliana, S. R. B., Taniguchi, H. H., Araújo, M. F. L., Barbosa, J. A. R., Barbosa, J. E. R., Floeter-Winter, L. M., & Shaw, J. J. (2007). The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, *149*(3–4), 280–284.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.008>
- Trópia de Abreu, R., Carvalho, M. das G., Carneiro, C. M., Giunchetti, R. C., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O. A., Coura-Vital, W., Corrêa-Oliveira, R., & Reis, A. B. (2011). Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with leishmania (*Leishmania*) chagasi. *PLoS One*, *6*(5), e18873. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018873>
- Volf, P., & Volfova, V. (2011). Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology*, *36* Suppl 1, S1-9.  
<https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00106.x>
- WHO (Org.). (2010). *Control of the leishmaniases: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010*. World Health Organization.
- WHO. (2017). World Health Organization. Leishmaniasis. <http://www.who.int/Leishmaniasis/En>. <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/leishmaniasis>

**CAPITULO 2**

**EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE CANINA EM CÃES DE UM ABRIGO DO  
MUNICÍPIO DE LAVRAS, MINAS GERAIS**

|

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVCan) é uma doença zoonótica grave que tem como agentes os parasitos do gênero *Leishmania* que afetam principalmente cães, que se tornam reservatórios do agente da leishmaniose visceral humana (LV) (Dantas-Torres et al., 2012). *Leishmania* spp. é transmitida aos hospedeiros pela picada de fêmeas de artrópodes flebotomíneos, as quais agem como vetores biológicos, sendo o gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (África, Ásia e Europa) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (nas Américas) (J. Moreno & Alvar, 2002; Sykes, 2014) os principais responsáveis pela transmissão do agente. Esta transmissão vetorial origina um ciclo de vida digenético que consiste em duas fases diferentes: a fase de promastigotas de vida extracelular no inseto e a fase nos hospedeiros que compreende as amastigotas intracelulares (Soares et al., 2011).

A LV afeta entre 200.000 e 400.000 pessoas e causa cerca de 20.000 até 40.000 mortes anualmente em todo o mundo (Dantas-Torres et al., 2019). A CanVL afeta milhões de cães em muitos países, causando debilidade e morte nesses animais, a partir de diferentes sinais clínicos, incluindo manifestações cutâneas e viscerais (Baneth & Aroch, 2008; Leblois et al., 2011; Marcondes & Day, 2019). O controle da LVCan é fundamental para a prevenção dos casos humanos, no entanto, considerando que se trata de uma zoonose resultante da interação complexa entre patógeno, vetores e duas espécies hospedeiras, uma abordagem multidisciplinar e holística, focada na estratégia Saúde Única (baseada na indissociabilidade da saúde humana, animal e ambiental) é imperativa para que se alcance êxito.

Na América do Sul, há uma alta taxa de infecção pelo parasito, especialmente no Brasil, onde a prevalência de infecção canina está associada a um alto risco da doença na população humana (Baneth & Aroch, 2008). As taxas de prevalência da LCan no Brasil são muito variáveis, em função de diferentes métodos de amostragem e estratégias diagnósticas empregadas, variando entre 5,9% e 29,8% em áreas endêmicas, nos estados de Ceará, São Paulo e Minas Gerais (Coura-Vital et al., 2011; D'Andrea et al., 2009; França-Silva et al., 2003; E. G. P. Lopes et al., 2010; Malaquias et al., 2007; Monteiro et al., 2005; Rondon et al., 2008). No município de Lavras, Minas Gerais, em 2018, foi reportado o primeiro caso humano de VL autóctone no município, em uma menina de 12 anos (Narciso et al., 2018), assim como já foi identificado DNA de *Leishmania* spp. em fêmeas de *Lu. longipalpis* (Castro et al., 2019).

Neste contexto, devido à grande importância da LVCan para a saúde pública e animal, inquéritos epidemiológicos em cães são imperativos para determinação de estratégias de controle e prevenção da doença, considerando que estes são reservatórios naturais de *Leishmania* spp. e sentinelas para a doença na população humana (Dantas-Torres, 2007). Assim, este trabalho tem como objetivos determinar a prevalência e os fatores de risco associados a infecção por *Leishmania* spp. em cães do Parque Francisco de Assis no município de Lavras, Minas Gerais.

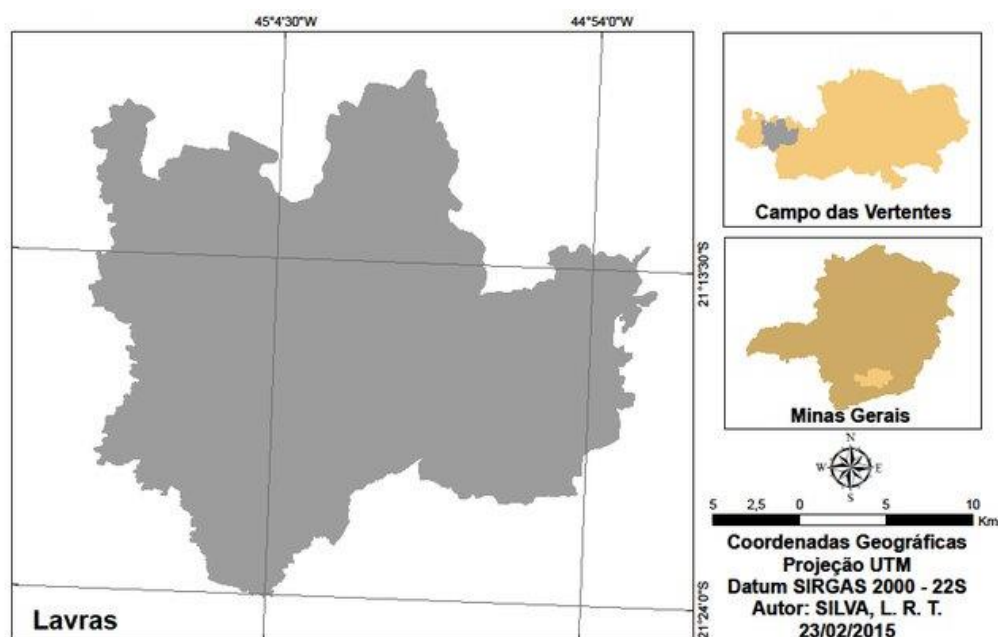
## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### i. Comitê de ética

O presente estudo foi conduzido de acordo com as normas que regulam o uso de animais em pesquisa, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais – CEUA/UFLA sob protocolo 117/2018. Além disso, normas internacionais de bem-estar animal foram rigorosamente seguidas (Ryan et al., 2019).

### ii. População e local do estudo

O município de Lavras se localiza a uma latitude 21° 14' 43 sul e a uma longitude 44° 59' 59 oeste, estando a uma altitude de 919 metros e possuindo uma área de 566,1 km<sup>2</sup>, na região do Campo das Vertentes, Minas Gerais, Brasil (IBGE, 2019). Segundo a classificação climática de Köppen, Lavras possui um clima tipo Cwa, com inverno seco e verão quente chuvoso, sendo fevereiro o mês com o registro de temperatura mais alta (Beck et al., 2018; Dantas et al., 2007; Peel et al., 2007).



**Imagem No. 1:** Mapa de localização do município de Lavras, Minas Gerais. Tomado de (L. Silva & Oliveira, 2015)

A amostragem para este estudo foi realizada nos cães que residem nas instalações da organização não governamental “Parque Francisco de Assis” (PFA). Organização que fornece

abrigo, alimento e atenção veterinária a animais da rua, geralmente sem raça definida, de ambos os sexos, diversas idades; alguns deles com doenças crônicas. O abrigo está localizado no Km 341 da rodovia BR 265, no município de Lavras, Minas Gerais, Brasil. A estrutura do abrigo é de alvenaria e o alojamento dos animais é construída de paredes de concreto com teto de chapa de metal. Possui áreas de estacionamento localizadas fora e um portão, que serve de acesso ao interior, a partir da estrada. Dentro do abrigo existe uma área de atendimento médico veterinário, com emergência, sala de cirurgia e uma área de farmácia. Além disso, há um refeitório, banheiros, jardins e uma capela.

### **iii. Desenho do estudo e coleta de amostras**

Foi conduzido um estudo censitário seccional com coleta de amostras e informações dos 324 animais residentes no abrigo entre julho e agosto de 2019. Antes da coleta das amostras, todos os cães foram individualmente identificados com um *microchip*, examinados clinicamente e tiveram registradas as seguintes informações: sexo, idade estimada, estado de vacinação, altura do pelo (curto, meio ou longo), peso, porte do animal (pequeno, médio ou grande), presença de ectoparasitas, contato com roedores, histórico de doenças e medicamentos. Temperatura, muco, linfonodos, escore corporal (Laflamme, 1997), estado de hidratação, aspecto das fezes, cor da urina, presença de secreção, pele ou quaisquer outras lesões ou alterações, comportamento, resposta ao ambiente, postura e locomoção, frequência respiratória, presença de sangramento e alterações neurológicas também foram avaliados.

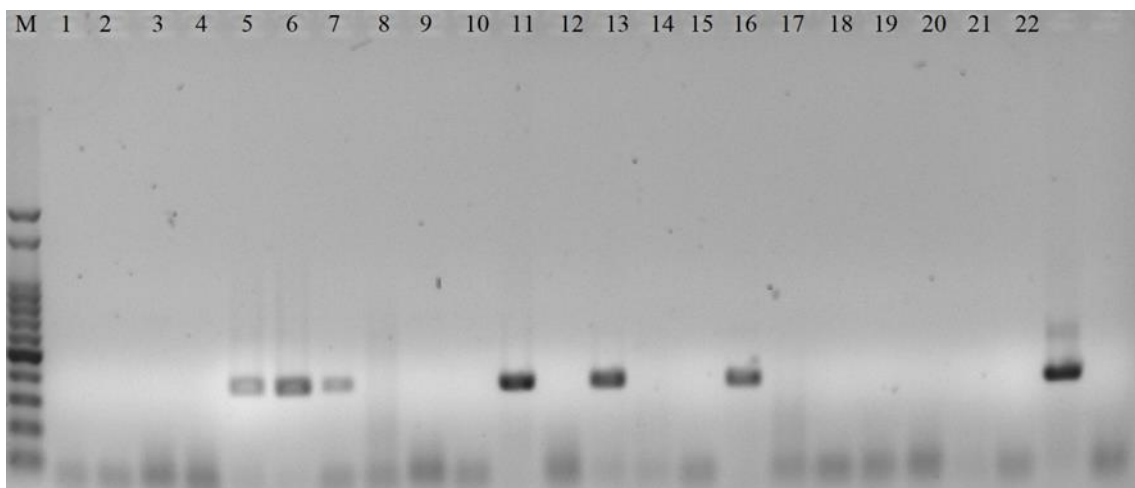
Após o exame clínico, foi coletado amostras de sangue das veias cefálica, safena ou jugular de todos os animais, as quais foram colocadas em tubos de ensaio com EDTA K3 identificados com número do microchip de cada cão. Estes tubos foram colocados em caixas térmicas com gelo e transportados ao Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biologia Celular – LEM da Universidade Federal de Lavras, para realização de hemograma completo e extração de DNA.

### **iv. Extração de DNA**

A extração do DNA genômico de *Leishmania* spp. foi realizada com PureLink® Genomic DNA Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA), seguindo as orientações do fabricante.

**v. Reação em Cadeia da Polimerase para *Leishmania* spp.**

A presença de DNA de *Leishmania* spp. foi determinada por *Nested-PCR*, pela amplificação do gene *SSUrRNA*, uma sequência conservada do gênero *Leishmania*. Na primeira reação foi amplificado um segmento de 603 pares de bases (pb) utilizando os iniciadores R1 (5' GGTTTCCTTTCCTGATTTACG 3') e R2 (5' GGCCGGTAAAGGCCGAATAG 3'), enquanto a segunda reação permitiu a amplificação de um fragmento de 353 pb por meio dos iniciadores R3 (5' TCCCATCGCAACCTCGGTT 3') e R4 (5' AAAGCGGGCGCGGTGCTG 3') (Cruz et al., 2002; Guillaume J.J.M. et al., 1992; J. V. Lopes et al., 2017). Ambas as amplificações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo tampão 1 X (50,0 mM Tris; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10,0 mM KCl; 50,0 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; pH 8,3) (Phoneutria, Brasil), 0,2 mM de dNTPs (Ludwig, Brasil), 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µM de cada iniciador e 1,25 unidades de Taq DNA polimerase (Phoneutria, Brasil). As condições de ciclo foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C (R1-R2) ou 65 °C (R3/R4) por 30 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos. A extensão final foi realizada a 72 °C por 10 minutos. DNA de *Leishmania infantum* foi usado com controle positivo e todos os reagentes do mix sem o DNA foi usado como controle negativo em todos os ensaios. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,0% em tampão tris borato EDTA (89 mM Tris Base; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA pH8.0) por 1 hora a 110 V, como se apresenta na Imagem 2.



**Imagem No. 2.** Gel de agarose ao 1,0% com 6 amostras positivas para *Leishmania* spp.

**vi. Análises estatísticas**

A prevalência de leishmaniose foi estimada de acordo com o descrito por Thrusfield et al. 2005 (Thrusfield, 2005). O intervalo de confiança (IC) de 95% para a prevalência foi obtido pela distribuição binomial exata usando o pacote “binom” (Dorai-Raj, 2014) com auxílio

do software R 4.0.2. A associação entre as variáveis clínicas e epidemiológicas coletadas (variáveis independentes) e a positividade para a infecção (variável dependente) foi testada por meio de análise univariada utilizando o teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, no software R 4.0.2. O valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo em todos os casos.

### **4.3. RESULTADOS**

#### **i. Descrição da população em estudo**

A população do estudo foi composta por 324 cães, dos quais 208 (64,20%) eram fêmeas e 116 machos (35,80%). As idades estimadas variaram entre 2 e 15 anos, dos quais: 68 animais (20,99%) tinham entre 2 e 5 anos, 254 (78,40%) entre 6 e 10 anos, e 2 (0,62%) entre 11 anos e 15 anos. Considerando como animais jovens aqueles que tinham até 3 anos de idade, adultos entre 4 e 8 anos, e idosos aqueles com mais de 9 anos. Em relação a condição corporal, um animal foi considerado caquético (1/324; 0,30%), 12 (12/324; 3,70%) eram magros, 213 (213/324; 65,74%) tinha condição corporal normal, 74 (74/324; 22,83%) eram gordos e 24 (24/324; 7,40%) obesos. Todos foram vacinados em setembro de 2018 com vacina contra a raiva e vacina múltipla, de acordo aos registros da instituição.

#### **ii. Análises epidemiológicas**

Entre 324 os cães testados 18 foram positivos na PCR para *Leishmania* spp., resultando em uma prevalência de 5,56% (IC 95%: 3,33 a 8,64%). Dos animais positivos, 11 eram fêmeas e 7 machos, e 15 animais adultos e 3 idosos. Entre as alterações clínicas comuns na CanVL, linfadenomegalia foi observada em 7 animais PCR-positivo, enquanto 11 apresentavam tamanho normal dos linfonodos. Presença de lesões na pele foram detectadas em 8 animais positivos; as lesões de pele detectadas foram descamação 2 animais, seborreia 1 animal, úlceras 1 animal e onicogribose 2 animais.

Foi analisada a associação entre positividade para CanVL e as variáveis independentes sexo, idade, condição corporal, temperatura, tamanho de linfonodos, hemácias, hematócrito, hemoglobina, leucócitos, segmentados diferencial e absolutos, linfócitos típicos diferenciais e absolutos e plaquetas; assim como presença de lesões de pele (alopecia, descamação, seborreia, eritema, úlcera e onicogribose). A diminuição do número de hemácias no hemograma mostrou-se significativamente ( $P = 0,01533$ ) associada a presença do parasita



no sangue dos cães, com Odds Ratio (OR) de 5,54 (IC 95%: 1,18 a 21,06), o que demonstra que a presença de hemácias diminuídas é um fator de risco para leishmaniose na população em estudo. Similarmente, cães que apresentaram hemoglobina diminuída exibiram significativamente maior risco de serem positivos para CanVL ( $P = 0,02118$ ), com OR de 4,33 (IC 95%: 1,05 a 16,16) entre os animais do estudo. A presença de anemia entre os cães exibiu tendência de associação com os resultados PCR positivos ( $P = 0,0679$ ). As demais variáveis analisadas não mostram associação significativa com o desfecho em estudo. Os resultados clínicos e hematológicos dos animais em que *Leishmania* spp. foi encontrada nas amostras de sangue são detalhadas na Tabela 1.

**Tabela 1. Dados hematológicos e clínicos dos 18 animais *Leishmania* spp. positivos no parque Francisco de Assis, Lavras, Minas Gerais, 2019.**

ID	Sexo	Idade (anos)	Hemograma					Exame físico				
			Hemácias 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	Hemogl. <sup>a</sup>	Plaquetas	Leucócitos mm <sup>3</sup>	Hemat. <sup>b</sup> %	Hemat.	CC <sup>c</sup>	Temp. <sup>d</sup> °C	Linf. <sup>e</sup>	Lesão de pele
8205	M	5	3,62 (D) <sup>f</sup>	7,8 (D)	LI <sup>i</sup>	2.600 (D)	25	Anemia	Normal	38,5	A	Sim
8214	M	5	7,1 (N) <sup>g</sup>	15,8 (N)	148.000 (D)	8.200 (N)	47,8	Normocitemia	Gordo	38,9	N	Sim
8237	F	5	8,84 (A) <sup>h</sup>	20,2 (A)	274.000 (N)	7.300 (N)	57,6	Policitemia	Normal	39,1	N	Não
8251	F	10	5,04 (D)	10,3 (D)	180.000 (D)	3.100 (D)	33,1	Anemia	Gordo	38,4	A	Não
8254	F	7	7,46 (N)	14,8 (N)	LI	17.300 (N)	42,7	Normocitemia	Normal	38,8	A	Sim
8258	F	5	8,45 (N)	19 (A)	341.000 (N)	9.200 (N)	54,9	Normocitemia	Normal	38,8	A	Sim
8266	F	7	8,37 (N)	19,6 (A)	350.000 (N)	11.500 (N)	56,7	Policitemia	Gordo	39,5	N	Não
8298	M	7	6,6 (N)	13,5 (N)	229.000 (N)	6.100 (N)	43,2	Normocitemia	Normal	38,5	N	Não
8301	F	5	5,54 (N)	11,3 (D)	117.000 (D)	11.300 (N)	37,1	Normocitemia	Obeso	37,8	N	Não
8309	F	6	7,91 (N)	16,8 (N)	195.000 (D)	10.100 (N)	48,8	Normocitemia	Normal	39,2	N	Não
8314	F	7	5,34 (D)	11,3 (D)	960.000 (A)	3.400 (D)	36,4	Anemia	Normal	37,4	N	Não
8338	M	7	7,89 (N)	16,7 (N)	216.000 (N)	6.600 (N)	50	Normocitemia	Normal	38,8	N	Não
8362	M	9	4,68 (D)	9 (D)	190.000 (D)	6.900 (N)	28,9	Anemia	Normal	38,6	A	Sim
8405	F	8	7,76 (N)	18,2 (A)	303.000 (N)	9.300 (N)	54	Normocitemia	Gordo	39,1	A	Sim
8410	M	9	7,86 (N)	16 (N)	158.000 (D)	8.100 (N)	47,5	Normocitemia	Gordo	39	N	Não
8442	F	7	7,79 (N)	17,6 (N)	LI	5.800 (D)	51,7	Normocitemia	Normal	39,4	A	Não
8446	F	7	6,32 (N)	13,9 (N)	513.000 (A)	17.600 (N)	42,3	Normocitemia	Gordo	39,2	N	Sim
8558	M	7	8,16 (N)	18,2 (A)	189.000 (D)	9.900 (N)	53	Normocitemia	Gordo	39,4	N	Sim

<sup>a</sup>Hemoglobina; <sup>b</sup>Hematócrito; <sup>c</sup>Condição corporal; <sup>d</sup>Temperatura corporal; <sup>e</sup>Linfonodos; <sup>f</sup>Diminuído; <sup>g</sup>Normal; <sup>h</sup>Aumentado; <sup>i</sup>Leitura impossível de ser realizada.

#### 5.4.DISCUSSÃO

Na América Latina, a doença causada por *Leishmania* spp. já foi relatada em pelo menos 18 países, com diferentes taxas de prevalências, e tendo o cão doméstico como o principal reservatório de *L. infantum* (Baneth et al., 2008; Marcondes & Day, 2019). Cerca de 97% dos casos de leishmaniose visceral em pacientes humanos na América Latina foram registrados no Brasil, tendo *L. infantum* como agente etiológico e *Lu. longipalpis* como principal vetor, conveniando destacar que antigamente era uma doença com maior presença em áreas rurais, porém com o passar do tempo, teve uma transição epidemiológica, com incidências crescentes nas áreas urbanas, atingindo cidades de médio e grande porte (Lara-Silva et al., 2015). No estado de Minas Gerais vários municípios já relataram a ocorrência da enfermidade em cães com diferentes taxas de prevalência (Coura-Vital et al., 2011; Malaquias et al., 2007; Monteiro et al., 2005). Em Lavras, município localizado no sul do estado, apesar do agente da CanVL já ter sido identificado, a real situação epidemiológica da doença ainda permanece por ser identificada. No presente estudo, um inquérito epidemiológico seccional censitário foi conduzido no único abrigo para cães do município, onde também são desenvolvidas as atividades de vigilância ambiental do município, e mostrou uma baixa prevalência da infecção em amostras de sangue [5,56% (IC 95%: 3,33 a 8,64%).

Um coeficiente de soroprevalência similar de 5% foi também observado em estudo conduzido em Montes Claros, Minas Gerais, em 2002 (Monteiro et al., 2005). Essas semelhanças poderiam ser explicadas tomando em consideração que as cidades de Lavras e Montes Claros compartilham características como temperaturas, meses de precipitação e clima tipo tropical semi-úmido; porém, cabe ressaltar que existe uma grande diferença temporal entre os estudos (2002 / 2019), e que é provável que essa taxa não se mantenha a mesma atualmente em Montes Claros. Outros municípios do estado de Minas Gerais como Governador Valadares obtiveram uma taxa de positividade de 12,4% em animais na região urbana e 42,2% na região rural, utilizando as técnicas de ELISA e Imunofluorescência indireta (Malaquias et al., 2007). Na região urbana de Belo Horizonte, a capital do estado, uma pesquisa que incluiu a técnica molecular de PCR RFLP, em 2008, detectou DNA de *L. infantum* em 24,7% dos animais testados (Coura-Vital et al., 2011). À primeira vista comparação direta desses resultados com aqueles obtidos no presente estudo mostram uma grande discrepância nos valores de prevalência, no entanto, cabe destacar que diferentes técnicas diagnósticas foram usadas nos estudos,

a partir de amostras clínicas (sangue total por soro) com representatividade também distintas. Além disso, a baixa prevalência observada entre os cães do abrigo PFA pode ser resultado das intervenções da vigilância ambiental municipal no canil, vigilância e controle do vetor; assim como teste e eutanásia constante dos animais errantes recolhidos ou ainda em função da baixa sensibilidade da PCR a partir de amostras de sangue total (Lachaud et al., 2002). O espécime clínico mais adequado para a detecção do parasita, a medula óssea, possui uma obtenção invasiva, o que tornaria inviável a condução do estudo.

Também o fato de que os animais positivos neste estudo eram animais adultos e idosos, acima dos 5 anos de idade, contrasta um pouco com a teoria de que a prevalência é maior em cães jovens e idosos (Amela et al., 1995; Cardoso et al., 2004; Miranda et al., 2008; Miró et al., 2008). É provável que a baixa densidade de animais jovens na população do PFA explique também a baixa prevalência nessa faixa etária.

Outro importante resultado encontrado neste estudo foi uma associação estatística entre diminuição de hemácias e hemoglobina com a presença da doença. Neste sentido, Silva et al. (2018), realizaram uma pesquisa em animais diagnosticados positivos para a CanVL através das técnicas da RT DPP e PCR (n=31) e animais saudáveis igualmente achados negativos através das mesmas técnicas diagnósticas (n=31) como grupo controle, no qual tinham como objetivo encontrar correlações entre parâmetros hematológicos e reológicos na leishmaniose visceral. O estudo encontrou uma diminuição nos valores de hemácias, hematócrito e plaquetas nos animais positivos em comparação ao grupo controle, como parte dos resultados hematológicos obtidos, porém não houve diferenças em hemoglobina e leucócitos entre os dois grupos. A diminuição da eritropoiese pode ocorrer em função do caráter crônico da doença, devido à perda de sangue, ou mesmo em decorrência da lise de eritrócitos após produção de autoanticorpos que levam a sequestro esplênico (J. N. da Silva et al., 2018). Esses resultados em conjuntos obtidos no presente estudo apontam para a utilidade do hemograma para a suspeita da doença, uma vez que as alterações hematológicas associadas com a presença do parasita foram observadas mesmo em animais sem sinais clínicos clássicos da CanVL (Tabela 1).

## **6.5. CONCLUSÃO**

Uma taxa de prevalência de 5,56% de CanVL foi observada entre os animais do abrigo PFA no município de Lavras, Minas Gerais, tendo como fatores de risco para a infecção por *Leishmania* spp. a observação de valores baixos de hemácias e hemoglobinas no hemograma.

## 7.6. REFERENCIAS

- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J. (2004). Canine Leishmaniasis. In *Advances in Parasitology* (Vol. 57, p. 1–88). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X)
- Baneth, G., & Aroch, I. (2008). Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, 175(1), 14–15. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.11.011>
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: Part one. *Trends in Parasitology*, 24(7), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>
- Beck, H. E., Zimmermann, N. E., McVicar, T. R., Vergopolan, N., Berg, A., & Wood, E. F. (2018). Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1-km resolution. *Scientific Data*, 5(1), 180214. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.214>
- Coura-Vital, W., Marques, M. J., Veloso, V. M., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. de O., Reis, L. E. S., Braga, S. L., Morais, M. H. F., Reis, A. B., & Carneiro, M. (2011). Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(8), e1291. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001291>
- Cruz, I., Acosta, L., Gutiérrez, M. N., Nieto, J., Cañavate, C., Deschutter, J., & Bornay-Llinares, F. J. (2010). A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). *BMC Infectious Diseases*, 10(1), 342. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-342>
- Dantas, A. A. A., Carvalho, L. G. de, & Ferreira, E. (2007). Classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(6), 1862–1866. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000600039>
- Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V. M., de Paiva-Cavalcanti, M., & Otranto, D. (2012). Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*, 28(12), 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.007>
- Dorai-Raj, S. (2014). binom: Binomial Confidence Intervals For Several Parameterizations. R package version 1.0–5. 2009. *R package version*, 1, 1–1.

- «Estimativa populacional 2019 IBGE». Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). (2019). <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/lavras/panorama>
- Leblois, R., Kuhls, K., François, O., Schönian, G., & Wirth, T. (2011). Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. *Infection, Genetics and Evolution*, *11*(5), 1091–1095. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.004>
- Leça Júnior, N. F., Guedes, P. E. B., Santana, L. N., Almeida, V. dos A., Carvalho, F. S., Albuquerque, G. R., Wenceslau, A. A., Munhoz, A. D., & Silva, F. L. (2015). Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil. *Acta Tropica*, *148*, 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.008>
- Lopes, J. V., Michalsky, É. M., Lara Silva, F. de O., Lima, A. C. V. M. R., de Avelar, D. M., da Costa, A. A. J., França-Silva, J. C., Regina-Silva, S., Fortes-Dias, C. L., & Dias, E. S. (2017). Seroprevalence and molecular characterization of *Leishmania* in dogs from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, *5*(1), 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.02.002>
- Madeira, M. de F., Schubach, A. de O., Schubach, T. M. P., Serra, C. M. B., Pereira, S. A., Figueiredo, F. B., Confort, E. M., Quintella, L. P., & Marzochi, M. C. A. (2005). Is *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? *Parasitology Research*, *97*(1), 73–76. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1374-y>
- Marcondes, M., & Day, M. J. (2019). Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Research in Veterinary Science*, *123*, 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022>
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: Part two. *Trends in Parasitology*, *24*(8), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.05.003>
- Peel, M. C., Finlayson, B. L., & McMahon, T. A. (2007). Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*, *11*(5), 1633–1644. <https://doi.org/10.5194/hess-11-1633-2007>
- Pennisi, M. G. (2015). Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. *Veterinary Parasitology*, *208*(1–2), 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.023>
- Reithinger, R., Lambson, B. E., Barker, D. C., & Davies, C. R. (2000). Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. In dog blood and bone marrow. *Journal of*

- Clinical Microbiology*, 38(2), 748–751. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.2.748-751.2000>
- Ryan, S., Bacon, H., Endenburg, N., Hazel, S., Jouppi, R., Lee, N., Seksel, K., & Takashima, G. (2019). WSAVA Animal Welfare Guidelines. *Journal of Small Animal Practice*, 60(5), E1–E46. <https://doi.org/10.1111/jsap.12998>
- Soares, M. R. A., Mendonça, I. L. de, Bonfim, J. M. do, Rodrigues, J. A., Werneck, G. L., & Costa, C. H. N. (2011). Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Tropica*, 117(1), 6–9. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.08.015>
- Thrusfield, M. (2005). *Veterinary epidemiology* (Third edition). Blackwell.