



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Valéria Medina Camprigher**

**Uso da Miltefosina como tratamento em cães  
sorologicamente positivos para leishmaniose visceral no  
município de Bauru – São Paulo.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira  
Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo Tolezano

**Botucatu  
2023**

Valéria Medina Camprigher

**Uso da Miltefosina como tratamento em cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral no município de Bauru – São Paulo.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira  
Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo Tolezano

Botucatu  
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Camprigher, Valéria Medina.

Uso da Miltefosina como tratamento em cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral no município de Bauru - São Paulo / Valéria Medina Camprigher. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Virgínia Bodelão Richini Pereira

Coorientador: José Eduardo Tolezano

Capes: 40101096

1. Cães. 2. Leishmaniose. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Saúde Única. 5. Vigilância em Saúde Pública.

Palavras-chave: Cães; Leishmaniose; Reação em cadeia da polimerase; Saúde única; Vigilância em saúde pública.

## **Valéria Medina Camprigher**

Uso da Miltefosina como tratamento em cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral no município de Bauru – São Paulo.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira  
Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo Tolezano

Comissão examinadora:

---

Prof. Titular Dr. Helio Langoni  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) -  
Botucatu

---

Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) -  
Botucatu

---

Dr. Luiz Ricardo Paes de Barros Cortez  
Secretaria Municipal de Saúde – Bauru

---

Profa. Dra. Sílvia Helena Pereira Vergili Sgarbosa  
Médica Veterinária Autônoma

---

Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira  
Instituto Adolfo Lutz - Centro de Laboratórios Regionais – Bauru

Botucatu, 01 de setembro de 2023

*“Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive”*

**Fernando Pessoa**

# *Dedicatória*

A Deus.

Aos meus filhos, Maria Luiza e Pedro Henrique.

Às pessoas acometidas pela Leishmaniose Visceral.

A todos os cães, vítimas dessa doença cruel e, em especial, ao meu cão Tom, que tanto cuidei e amei.

# *Agradecimentos*

## **Agradecimentos**

À UNESP-Botucatu, Instituição que já foi e sempre será a minha casa.

À Faculdade de Medicina de Botucatu, ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, aos professores, funcionários e colegas durante a realização das disciplinas.

A todos os meus colegas de trabalho do Centro de Controle de Zoonoses de Bauru, em especial aos meus queridos colegas e amigos Dr. Luiz Ricardo Paes de Barros Cortez, por toda a ajuda que recebi durante o tratamento dos cães e ao Dr. Mário Ramos de Paula e Silva, por me proporcionar todo apoio necessário para que eu chegasse até aqui.

A todos os meus superiores - chefe de seção (Murilo José Vendramini Cuoghi), de divisão (Daniel Godoy Tarcinalli) e de direção de departamento (Dr. Ezequiel Aparecido dos Santos), dentro da Secretaria Municipal de Saúde de Bauru que, compreendendo a importância do meu trabalho, me apoiaram em todos os momentos.

Aos servidores do Instituto Adolfo Lutz de Bauru e de São Paulo, especialmente a minha orientadora Prof. Dra. Virgínia

Bodelão Richini Pereira, pelos ensinamentos - ora me “abandonava” para que eu pudesse crescer, ora me carregava no colo durante as finalizações dos trabalhos. Muito, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tolezano, por aceitar ser meu coorientador, por dividir seu inesgotável conhecimento sobre o assunto e por proporcionar a minha participação no grande projeto de pesquisa realizado em Bauru sob sua coordenação.

Às colegas Gabriele e Ághata, pelos conhecimentos compartilhados no Adolfo Lutz de Bauru.

A minha querida amiga Vanessa, pela grande amizade e por toda ajuda e apoio dispensados durante a realização das atividades no Centro de Controle de Zoonoses e no Instituto Adolfo Lutz de Bauru.

Ao Laboratório Veterinário Laborcare, aos funcionários e especialmente à Dra. Patrícia Batina, pela parceria na realização dos exames de sangue dos cães em tratamento.

Ao Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, pelo fornecimento de culturas para desenvolvimento das técnicas moleculares; em especial à

querida Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis e à residente Suelen.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa (processos no. 2017/50333-7 e 2018/25889-4) e FESIMA/GAPS (processo no. 2019/01057)

Aos membros da banca examinadora, por suas contribuições na confecção dessa tese.

**RESUMO**

CAMPRIGHER, V.M. **Uso da Miltefosina como tratamento em cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral no município de Bauru – São Paulo**. 2023. 160f. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Botucatu, 2023.

A Leishmaniose Visceral é uma importante zoonose parasitária e encontra-se em franca expansão geográfica. Um dos pilares das políticas públicas de vigilância é o controle da fonte de infecção canina. A miltefosina é o fármaco autorizado para o tratamento dos cães no Brasil. O objetivo do trabalho foi realizar o diagnóstico, tratamento, avaliar a evolução clínica, carga parasitária e os parâmetros laboratoriais dos cães soropositivos; medidas que podem contribuir para o controle da Leishmaniose Visceral no município de Bauru-SP. Foram avaliados 34 cães durante o período de um ano, trimestralmente, sendo que 19 animais finalizaram o tratamento. Houve quatro óbitos por leishmaniose, três óbitos por outras causas e oito tutores abandonaram o tratamento por motivos diversos. Na primeira avaliação clínica, com 34 animais, os sintomas mais frequentes foram linfadenomegalia, descamação, conjuntivite e onicogribose. Na última avaliação, os 19 animais encontravam-se assintomáticos. Nos exames de sangue, os padrões mais alterados foram os das hemáceas, hemoglobina, volume globular, plaquetas, proteína total, albumina, globulina e relação albumina-globulina. De forma geral, houve melhora dos parâmetros hematimétricos e bioquímicos. A qPCR mostrou maior sensibilidade que a cPCR no acompanhamento da carga parasitária; que diminuiu ao longo do período, sugerindo eficácia no tratamento de cães com LVC; mesmo não havendo cura parasitária. Assim, nossos resultados demonstram que o tratamento de cães pode ser incorporado nas estratégias de políticas públicas em saúde com um foco em saúde única.

**Palavras-chave:** Leishmaniose, cães, Reação em Cadeia da Polimerase, Saúde Única, Vigilância em Saúde Pública.

# **ABSTRACT**

## **Abstract**

Visceral Leishmaniasis is an important parasitic zoonosis that has been showing significant geographic expansion. One of the pillars of Public Surveillance Policies is the control of the source of canine infection. Miltefosine is the drug approved for the treatment of dogs in Brazil. The aim of this study was to evaluate the treatment, clinical evolution, parasitic load and laboratory parameters of seropositive dogs; that can contribute to the surveillance and control measures for Visceral Leishmaniasis in the municipality of Bauru – São Paulo, Brazil. Thirty-four dogs were evaluated quarterly for one year, and 19 dogs completed the treatment. Of the 15 losses, eight were due to treatment abandonment and seven were death; being four due to leishmaniasis. In the first evaluation, the most frequent symptoms were lymphadenopathy, desquamation, conjunctivitis and onychogryphosis. After one year, 19 animals that remained in the treatment were asymptomatic. The most altered patterns in the blood tests were: erythrocytes, hemoglobin, packed cell volume, platelets, total protein, albumin, globulin and albumin-globulin ratio. At the end of the evaluation, there was an improvement in the hematimetric and biochemical parameters. qPCR showed greater sensitivity than cPCR in monitoring the parasite load; which decreased over the period, suggesting efficacy in the treatment of dogs with CVL; even though there is no parasitic cure. Thus, our results demonstrate that the treatment of dogs can be incorporated into public health policy strategies that focus the one health concept.

**Keywords:** Leishmaniasis, dogs, Polymerase Chain Reaction, One Health, Public Health Surveillance.

**LISTAS**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AHCC</b>	Composto Correlacionado com Hexose ativa
<b>APCs</b>	Células Apresentadoras de Antígeno
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>CCZ</b>	Centro de Controle de Zoonoses de Bauru
<b>cPCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase convencional
<b>DALY</b>	<i>Disability Adjusted Life Years</i>
<b>DCs</b>	Células Dendríticas
<b>DNA</b>	Ácido Dexoxirribonucleico
<b>ELISA/EIE</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>ETS</b>	Espaçador Transcrito Externo
<b>GPS</b>	<i>Global Positioning System</i>
<b>ICT</b>	Tira de plataforma Única
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<i>Intérferon gama</i>
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>IV</b>	Intravenosa
<b>g6pd</b>	Gene da glicose-6-fosfato desidrogenase
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
<b>HSP70</b>	<i>70Dka heat shock proteins –hsp70</i>
<b>IAL</b>	Instituto Adolfo Lutz
<b>ITS</b>	<i>Internal Transcribed Spacers</i>
<b>kDNA</b>	DNA do Minicírculo do Cinetoplasto
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>LC</b>	Leishmaniose cutânea
<b>LCD</b>	Leishmaniose cutânea difusa
<b>LMC</b>	Leishmaniose muco-cutânea
<b>LT</b>	Leishmaniose Tegumentar
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>LVC</b>	Leishmaniose Visceral Canina

<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
<b>mg</b>	Miligrama
<b>ml</b>	Mililitro
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>nM</b>	Nanômetro
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NO<sub>2</sub></b>	Dióxido Nítrico
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PAHO</b>	<i>Pan American Heath Organization</i>
<b>Pb</b>	Par de base
<b>PT</b>	Proteína total
<b>PVCLV</b>	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
<b>PCR</b>	Reação em Cadeiada Polimerase
<b>qPCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
<b>RIFI</b>	Reação de Imunofluorescência Indireta
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>SC</b>	Sub-cutâneo
<b>SP</b>	São Paulo
<b>SSUrRNA</b>	Subunidade do RNA Ribossomal
<b>T</b>	Tempo
<b>Th1</b>	Linfócito helper 1
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral
<b>TR-DDP</b>	Teste Rápido- <i>Dual Path Platform</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WHO</b>	<i>World Heath Organization</i>
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mapa da endemicidade da LV no mundo em 2020, segundo WHO (2021).....	24
Figura 2: Dados de Leishmaniose Visceral no estado de São Paulo 2019-2022 (CVE, 2023).....	27
Figura 3: Pirâmide representando a proporção de cães sintomáticos, assintomáticos e respectivos testes diagnósticos. ....	32
Figura 4: Localização das quatro áreas do município de Bauru-SP. Área 1: Pousada da Esperança, Área 2: Jaraguá, Área 3: Geisel, Área 4: Beija-flor. ....	55
Figura 5: Visualização de um linfonodo poplíteo infartado (Fonte: wsava.org/committees/oncology-working-group).....	57
Figura 6: Localização geográfica dos animais tratados para leishmaniose visceral no município de Bauru, correlacionando com os casos de leishmaniose visceral humana. ....	64
Figura 7 (A e B): Avaliação clínica dos cães e coleta de amostras biológicas para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral.. ....	65
Figura 7 (C a F): Avaliação clínica dos cães e coleta de amostras biológicas para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral.. ....	65
Figura 8: Gel de agarose a 1,5% utilizando os primers LinR4, Lin19.....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dinâmica dos sinais clínicos comumente relatados para Leishmaniose Visceral Canina nos animais submetidos ao tratamento ao longo de 12 meses.....	68
Tabela 2: Exames bioquímicos realizados nos 34 cães com diagnóstico de LVC no início do tratamento.....	68
Tabela 3: Exames bioquímicos realizados nos 30 cães com diagnóstico de LVC, após três meses de tratamento.....	69
Tabela 4: Exames bioquímicos realizados nos 27 cães com diagnóstico de LVC, após seis meses do início do tratamento (tempo 2). ....	69
Tabela 5: Exames bioquímicos realizados nos 22 cães com diagnóstico de LVC, após nove meses do início do tratamento (tempo 3).....	70
Tabela 6: Exames bioquímicos realizados nos 19 cães com diagnóstico de LVC, após doze meses do início do tratamento (tempo 4).....	70
Tabela 7: Distribuição da positividade para <i>Leishmania</i> spp. em diferentes amostras, na cPCR, em diferentes tempos de tratamento.....	72
Tabela 8: Avaliação por PCR convencional dos cães em tratamento para leishmaniose ao longo do tratamento.....	74
Tabela 9: Avaliação da carga parasitária em parasitas/mL, realizada por PCR em tempo real dos cães em tratamento para leishmaniose ao longo do tratamento. ....	76
Tabela 10: Custo médio em reais do tratamento para LVC para um cão de 10 kg. ....	77

## SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT .....	14
1. Introdução .....	22
2. Objetivos .....	50
2.1 Objetivo geral .....	50
2.2 Objetivos específicos .....	50
3. Material e Métodos.....	52
3.1. Histórico .....	52
3.2. Aspectos éticos .....	54
3.3 Amostras.....	54
3.4 Tratamento.....	55
3.5 Visitas e cronograma de coleta de amostras .....	56
3.6. Avaliação laboratorial .....	58
3.6.1 Avaliação sorológica .....	58
3.6.2. Avaliação hematológica e bioquímica.....	59
3.6.3 Avaliação molecular .....	59
3.6.3.1. Extração de DNA .....	59
3.6.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR) ..	60
3.6.3.3. Eletroforese em gel de agarose.....	61
3.6.3.4. PCR em tempo real .....	62
3.7. Geoprocessamento .....	62
4. Resultados .....	64
5. Discussão.....	79
6. Conclusões.....	92
7. Referências .....	94
8. Manual técnico .....	120
9. Manuscrito.....	127
Anexos .....	157
Anexo 1 .....	157
Anexo 2.....	158
Anexo 3.....	159

# INTRODUÇÃO

## 1. Introdução

O conceito de saúde única (*One Health*) estabelece um vínculo entre a saúde animal e humana, envolvendo o meio ambiente onde as espécies estão inseridas. Devido ao risco de transmissão de agentes infecciosos entre elas, e, associado aos fatores ambientais, sugere-se que pesquisas direcionadas para o controle das doenças devam ser realizadas por equipes interdisciplinares e de visão abrangente (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011; GEBREYES *et al.*, 2014; HONG *et al.*, 2020).

As leishmanioses são consideradas zoonoses e se enquadram nessa concepção: doenças parasitárias, associadas à degradação ambiental e que acometem animais e população humana suscetível, transmitida por vetores e causada por protozoários pertencentes à ordem Tripanosomatida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* e com os subgêneros: *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania*. Até o momento, há relatos de 53 espécies de *Leishmania*, sendo 20 patogênicas para o ser humano e 31 para outros mamíferos; causando quatro tipos de doenças, cuja classificação baseia-se na sua apresentação clínica - Leishmaniose Cutânea (LC), Cutânea Difusa (LCD), Mucocutânea (LMC) e Visceral (LV), (BATES, 2007; PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011; AKHOUNDI *et al.*, 2016; BURZA *et al.*, 2018).

A forma de transmissão de importância epidemiológica é a vetorial (BARATA *et al.*, 2005; LAINSON; RANGEL, 2005); por meio da picada de fêmeas hematófagas pertencentes à ordem Diptera, sub-ordem Nematocera, Família Psychodidae e subfamília Phlebotominae; dos gêneros *Phlebotomus* - encontrados na Europa, Ásia e África - e *Lutzomyia* – nas Américas. Os flebotomíneos picam os cães preferencialmente em áreas glabras - plano nasal, pavilhão auricular, região inguinal e perineal (LEWIS, 1982; GALATI, 2003; BANETH *et al.*, 2008; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; PACE, 2014; AKHOUNDI *et al.*, 2016).

A transmissão da LV por *Lutzomyia longipalpis* ocorre, até o momento, em 193 (29,9%) dos 645 municípios do estado de São Paulo e *Lutzomyia cruzi*, está presente nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás. Em locais com registros de casos autóctones e na ausência de *L. longipalpis* e *L. cruzi*, pressupõe-se que outra espécie de flebotomíneo - *Lutzomyia migonei* - atue na transmissão de LV. Em um estudo realizado no nordeste brasileiro, observou-se fêmeas desta espécie naturalmente infectadas por *Leishmania infantum* (DE CARVALHO *et al.*, 2010; BRASIL, 2019; FONSECA *et al.*, 2021).

Outras formas de transmissão já foram relatadas na espécie canina: por transfusão sanguínea, venérea e vertical por mordeduras e picada de pulgas e carrapatos. Entretanto, a competência vetorial desses artrópodes ainda necessita de maiores estudos (OWENS *et al.*, 2001, GASKIN *et al.*, 2002; GIGER *et al.*, 2002; DINIZ *et al.*, 2005; COUTINHO *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; PANGRAZIO *et al.*, 2009; VIEIRA, 2013; NAUCKE *et al.*, 2016; SVOBODOVA *et al.*, 2017).

A leishmaniose está presente nos cinco continentes e ocorre de forma endêmica em 100 países, com 50 a 90.000 e 0.6 a 1 milhão de novos casos por ano de LV e LC, respectivamente, com um total de 20 a 30 mil óbitos. Em suas diferentes formas clínicas, seu DALY (Disability Adjusted Life Years) atinge 2,35 milhões de vidas perdidas ajustadas por deficiência (AKHOUNDI *et al.*, 2016; WHO, 2020).

Ingressou no continente americano durante o período de colonização (SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA, 2020). No Brasil, foi identificado como problema de saúde pública em 1934. Em pesquisas a respeito de febres suspeitas no estado da Bahia, formas amastigotas do protozoário do gênero *Leishmania* foram identificadas pela primeira vez a partir de cortes histológicos de fragmentos de fígado negativos para pesquisa do vírus amarelo. A primeira epidemia brasileira aconteceu em Sobral-Ceará, 20

anos após a identificação do parasito (PENNA, 1937; DEANE, 1956; GONTIJO; MELO, 2004; WHO, 2020).

Resultados de pesquisas preliminares na Amazônia brasileira foram publicados por Chagas e colaboradores onde inferiram sobre a possibilidade de um inseto de hábitos peridomiciliares (*Phlebotomus longipalpis*) ser o vetor da doença dentro de um ciclo enzoótico do parasito (*L. chagasi*) e, tendo como reservatório animais silvestres (CHAGAS *et al.*, 1937).

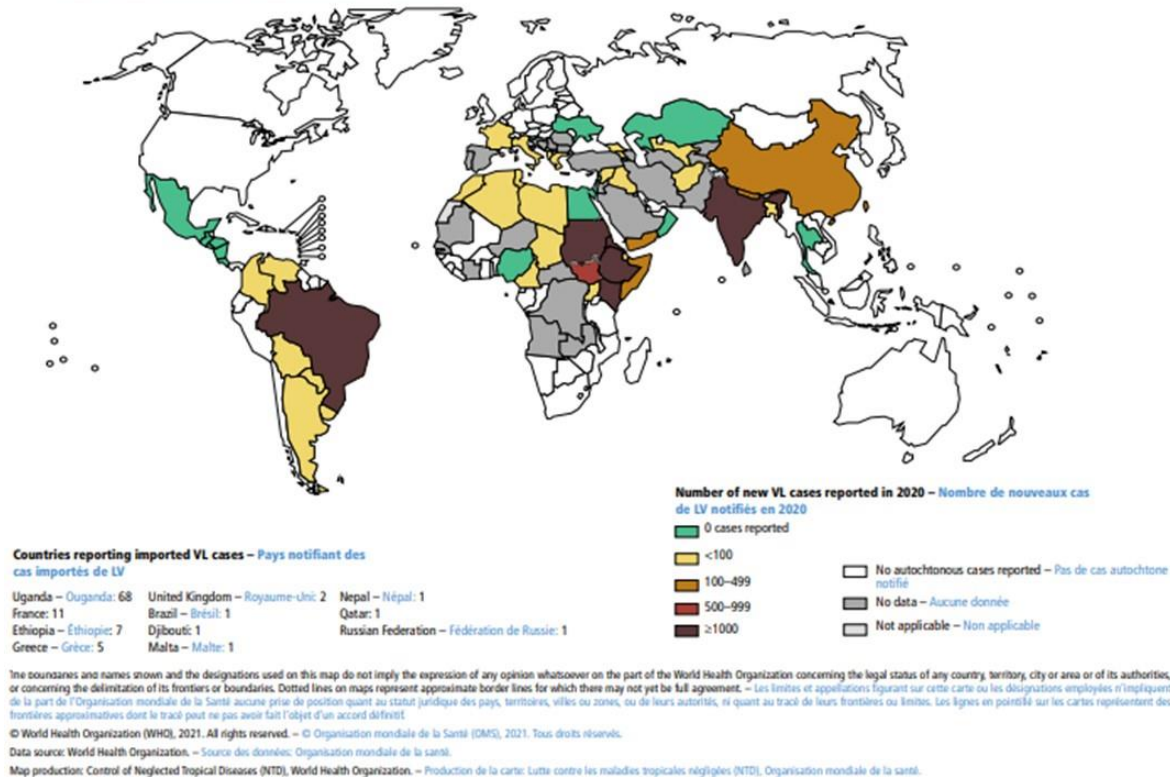
No decorrer da década de 50, pesquisadores no Ceará, estabeleceram a importância epidemiológica da *Lutzomyia longipalpis* como vetor; do cão doméstico (*Canis familiaris*) e da raposa (*Dusicyon ventulus*) como fonte de infecção e manutenção da doença. Ficou assim demonstrado que a LV ocorre em ciclos epidemiológicos distintos: silvestre, peridoméstico de característica rural e o ciclo doméstico periurbano (MICHALICK; GENARO, 2011).

Embora comumente concentrada em regiões tropicais e subtropicais de países em desenvolvimento, é prevalente em áreas de clima temperado. Ocorre nas regiões da bacia do mediterrâneo, sudeste da Ásia, Europa, Américas e África. Em 2020, 12.838 novos casos foram registrados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em “hotspots” eco-epidemiológicos: Etiópia, Eritreia, Kenia, Somália, Sudão, Uganda (África); Bangladesh, Índia, Nepal (subcontinente indiano) e Brasil (Américas) com 57, 18 e 16% dos casos mundiais respectivamente. Seis países foram responsáveis por 79% dos casos do mundo em 2020, com mais de 1000 casos notificados individualmente: Brasil, Etiópia, Eritreia, Kenia, Índia e Sudão (WHO, 2020).

Na Figura 1, observa-se o mapa dos países com maior número de casos de LV em 2020.

**Figura 1:** Mapa da endemicidade da LV no mundo em 2020, segundo WHO (2021).

Map 2 Status of endemicity of visceral leishmaniasis (VL) worldwide, 2020  
 Carte 2 Endémicité de la leishmaniose viscérale (LV) dans le monde, 2020



No Brasil, a ocupação urbana desordenada, condições precárias de saneamento básico e habitação, desnutrição, destruição ambiental com alterações dos habitats das espécies envolvidas no ciclo de transmissão aumentaram a importância da LV no contexto de saúde pública (CERBINO NETO; WERNECK; COSTA, 2009).

São notificados 4.200-6.300 casos anuais, e a letalidade é crescente e considerada a maior entre os países prioritários da OMS, principalmente em indivíduos não tratados e crianças com desnutrição, sendo um dos seis países com o maior número de casos; representando 16% dos casos globais e 97% das Américas (BRASIL, 2014; BANETH *et al.*, 2008; WHO, 2010; ALVAR *et al.*, 2012; PACE, 2014; AKHOUNDI *et al.*, 2016; OPAS, 2019; WHO, 2021).

Devido às ações antrópicas, sua distribuição geográfica passou por grande transformação a partir da década de 80, avançando das áreas rurais do nordeste brasileiro para bairros bem consolidados de centros urbanos

em vários estados; acompanhando a construção de rodovias e ferrovias, de grandes obras de engenharia e consequente migração de pessoas (BRASIL, 2019).

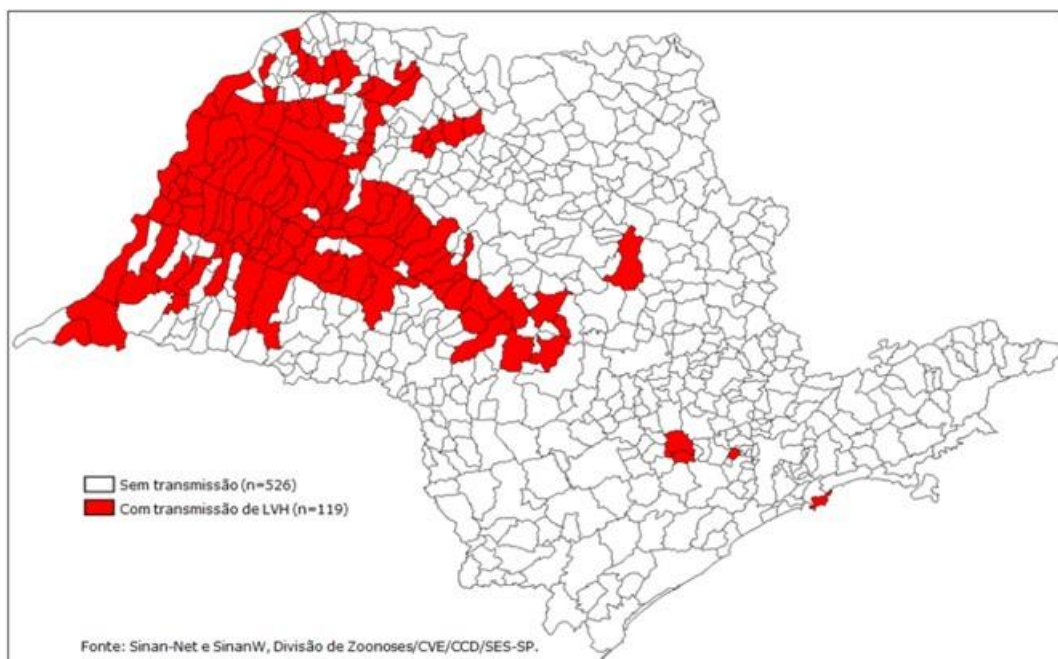
Na década 90, a doença foi introduzida no estado de São Paulo. A substituição da criação de gado pela cultura de cana de açúcar foi um dos fatores impactantes na sua expansão devido à migração de mão-de-obra temporária nas colheitas. A presença do flebotomíneo (*Lutzomyia longipalpis*), em 1997, na área urbana da cidade de Araçatuba-SP, associado à confirmação de caso autóctone canino no município, foi um indício de que o flebotomíneo fosse o vetor da doença no estado. Em 1999, foi notificado o primeiro caso humano no município (COSTA *et al.*, 1997; TOLEZANO, 1999; BARATA, 2000; ALVES; BEVILACQUA, 2004; ROMERO; BOELAERT, 2010; BRASIL, 2014; BRASIL, 2019; SILVA, PACHECO; SAUERBIER, 2021).

Dados referentes ao ano de 2019, demonstraram a presença da zoonose em 107 dos 645 municípios paulistas e 8.553 casos humanos foram notificados no período de 1999-2019, sendo 3046 autóctones e letalidade de 8.7% - 266 óbitos. As cidades mais atingidas concentram-se na região oeste e central do estado, seguindo a rodovia Marechal Rondon desde a divisa com Mato Grosso do Sul; até a cidade de São Paulo. O primeiro caso humano no município de Bauru ocorreu em 2003, e foi precedido pelo encontro do flebotomíneo em 2002 e de caso canino em 2003. No triênio 2017-2019, o município foi classificado como de transmissão intensa e prioritário para as ações do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Estado de São Paulo. Segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica (2020), no período de 2003-2020, foram notificados 580 casos com 45 mortes. Em 2021, quatro casos foram notificados com um óbito; em 2022, cinco casos foram notificados com dois óbitos. Em 2023, até maio, um caso foi notificado sem óbito

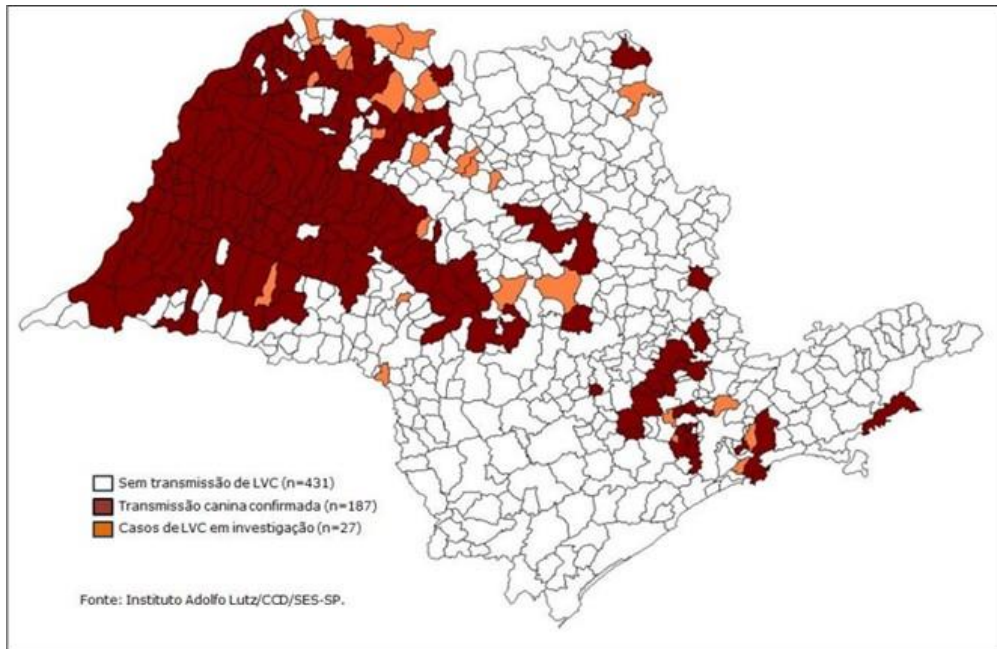
(BRASIL, 2014; BRASIL, 2019; FONSECA *et al.*, 2021; CVE, 2022; CVE, 2023).

Na Figura 2, visualiza-se o mapa do estado de São Paulo, sendo 2a) Municípios com casos humanos autóctones de Leishmaniose Visceral, Estado de São Paulo, 1999 a 2022. 2b) Distribuição dos municípios quanto à presença de Leishmaniose Visceral Canina, Estado de São Paulo, até dezembro de 2022. 2c). Distribuição de municípios segundo a classificação epidemiológica para Leishmaniose Visceral, Estado de São Paulo, 2022

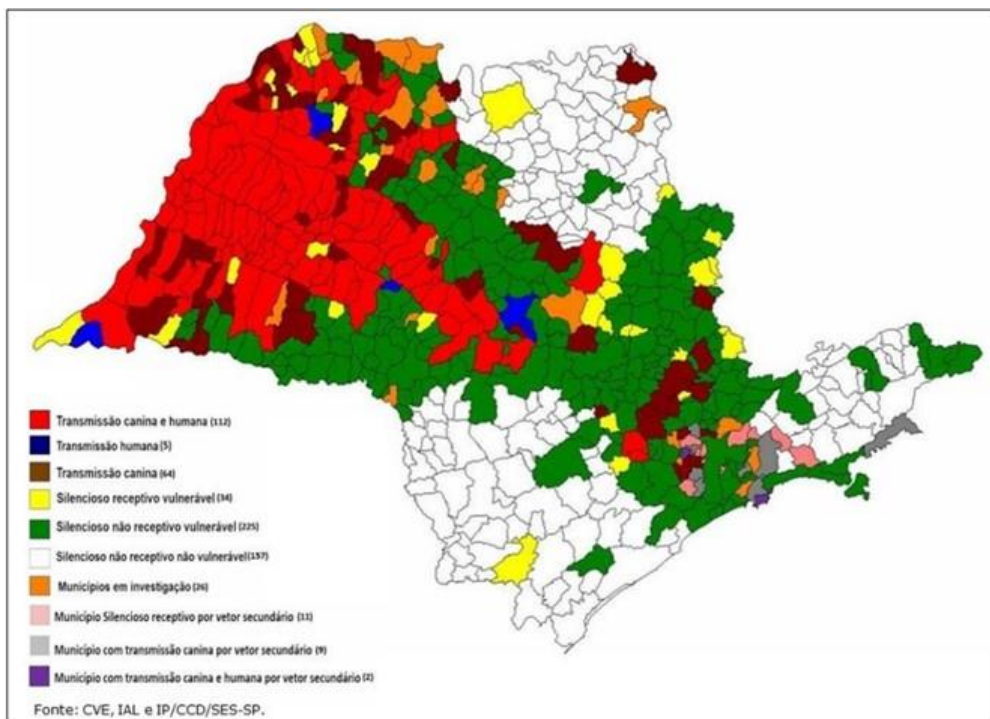
**Figura 2:** Dados de Leishmaniose Visceral no estado de São Paulo 2019-2022 (CVE, 2023)



2a) Municípios com casos humanos autóctones de Leishmaniose Visceral, Estado de São Paulo.



2b) Distribuição dos municípios quanto à presença de Leishmaniose Visceral Canina, Estado de São Paulo, até dezembro de 2022.



2c). Distribuição de municípios segundo a classificação epidemiológica para Leishmaniose Visceral, Estado de São Paulo, 2022

No ser humano, a interação entre a resposta imune delineada por características genéticas e fatores de virulência das espécies de *Leishmania* implicadas, determinam a sintomatologia. Assim como nos cães, há relatos de indivíduos infectados por *L. infantum*, imunocompetentes, que se mantêm assintomáticos por longo período de tempo (ALIAGA *et al.*, 2019; SALANT *et al.*, 2021).

Em contrapartida, pessoas com algum tipo de comprometimento imunológico, podem albergar os parasitos por décadas, mesmo que tratados. A reativação fulminante da infecção pode ocorrer devido à utilização de terapia imunossupressora pós-transplante, uso de imunomoduladores, idade avançada ou à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Adquirida-HIV (ALVAR *et al.*, 2008; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

Cães infectados por *Leishmania* spp. apresentam um misto de resposta imune celular – Th1(Linfócito T helper) e humoral – Th2. Sabe-se que quando há predomínio da resposta Th2, os animais tornam-se susceptíveis à doença e quando tende para Th1, são resistentes. Na resposta Th1, as citocinas IFN- $\gamma$  (interferon gama), IL-2 (interleucina), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral) induzem ativação macrofágica com produção de óxido nítrico (NO); substância com potente ação leishmanicida. Na resposta Th2, IL-10 e IL-4 estão envolvidos na disseminação do parasito, associado ao aumento de linfócitos B e hipergamaglobulinemia. Particularmente, IFN- $\gamma$  e IL 10 são as mais importantes citocinas que determinam o estado de saúde ou doença (DA COSTA-VAL *et al.*, 2007; BRODSKYN; KAMHAWI, 2018; TOEPPE; PETERSEN, 2020).

A IL 10 inibe a apresentação do antígeno para as APCs, a ativação de macrófagos e células dendríticas (DCs) e a proliferação das células T. Estudos demonstraram que o bloqueio do receptor da IL-10 pode ser utilizado no tratamento da LVC (GAUTAM *et al.*, 2011; VERMA *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2021).

O fato de os cães serem os principais reservatórios da LV em área urbana deve-se à alta densidade populacional da espécie (10 a 20% da população humana), ao íntimo convívio com o ser humano, à alta prevalência de portadores assintomáticos e oligossintomáticos (80% dos infectados) e serem fonte de alimento para os flebotomíneos (alta carga parasitária epidérmica). Sendo mais infecciosos para os vetores e mais eficientes na disseminação da infecção, mantêm o parasito na natureza de forma que ele sobreviva por longo período (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; BANETH *et al.*, 2008; QUINNELL; COURTENAY, 2009; PALTRINIERI *et al.*, 2010, BANETH *et al.*, 2020).

Por meio de avaliações sorológicas, supõe-se que existam em torno de 2,5 milhões de cães infectados em países da base do mediterrâneo - Portugal, Espanha, Itália e França) e milhões na América do Sul, e, as enzootias têm normalmente precedido os casos humanos (BARATA, 2004; GRAMICCIA; GRADONI, 2005; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; BRASIL, 2019; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022).

As raposas (*Dusicyon vetulus*), cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), marsupiais - cangurus e gambás (*Didelphis albiventris*), preguiça (*Choloepus* spp. e *Bradypus* spp.), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e roedores (*Rattus* spp., *Proechimys* spp., *Nectomys* spp., *Oligoryzomys* spp.) são considerados reservatórios silvestres. Os gambás, animais silvestres de hábitos sinantrópicos, são frequentemente encontrados no centro urbano de Bauru e uma pesquisa identificou formas promastigotas de leishmania em cultura de tecidos e amastigotas em exames parasitológicos desses animais. Pesquisas realizadas em quirópteros infectados por *Leishmania infantum* detectaram presença do DNA (ácido desoxirribonucleico) do parasito pela técnica de PCR (reação em cadeia de polimerase) em amostras de pele e fígado em áreas endêmicas. Sugerem que a espécie poderia participar na manutenção e no ciclo da doença, e

que seu papel como reservatório não deveria ser ignorado (SANTIAGO *et al.* 2007; CASTRO *et al.* 2020).

Contudo, outras espécies domésticas também estão envolvidas no ciclo da doença. Os casos felinos são esporádicos e relatados em todo o mundo nos mesmos locais onde há casos caninos e humanos. Apresentam sintomatologia cutânea e visceral e menor prevalência em testes sorológicos e moleculares. Entretanto podem exercer função de reservatório numa concepção de saúde única (PENNISI *et al.*, 2013; PENNISI *et al.*, 2015a, 2015b; PENNISI; PERSICHETTI, 2018). Nos animais de produção, há relatos de positividade nos testes sorológicos e moleculares, com ausência de sintomas. São considerados somente fonte de alimentação para o vetor (ASHFORD, 1996; QUINNELL; COURTENAY, 2009; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011; DANTAS-TORRES, 2012; BRASIL, 2014; PENNISE *et al.*, 2015; WHO, 2020; BANETH *et al.*, 2020).

Entretanto, Paixão-Marques *et al.* (2019) isolaram o parasito de bovinos e afirmaram que eles podem ser considerados hospedeiros em locais onde a doença é endêmica.

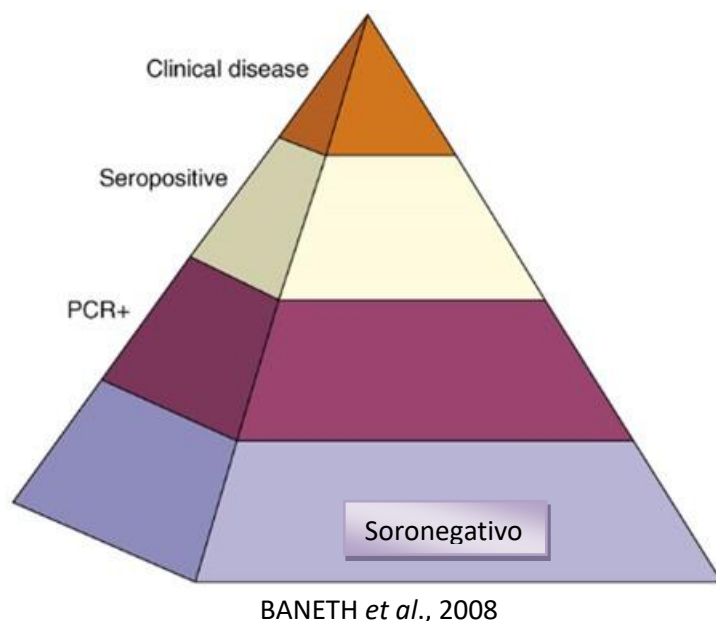
As manifestações clínicas nos cães podem variar da forma multissistêmica até a ausência completa de sinais. De acordo com o estado nutricional, imunológico e a genética canina, a susceptibilidade à infecção pode se modificar entre as diversas raças e individualmente. Animais com resposta imune predominantemente celular podem apresentar exclusivamente dermatite do tipo papular, sem outras alterações clínico patológicas (ABRANCHES; CAMPINO, 1998; LOMBARDO *et al.*, 2014; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2017; SALANT *et al.*, 2021).

Devido à elevada prevalência de infecção subclínica, onde os animais não desenvolvem sintomas (40-60%), é importante ressaltar que, mesmo assintomáticos, são fontes de infecção para o ser humano na presença do vetor (GONTIJO; MELO, 2004; MICHALSKY *et al.*, 2007; BRASIL, 2014). Entretanto, pesquisas confirmaram que cães

oligossintomáticos e assintomáticos infectados são bem menos atrativos e infecciosos para os vetores que os sintomáticos (GRADONI, 1987; MOLINA *et al.*, 1994; CHELBI *et al.*, 2021).

Na Figura 3, a pirâmide representa a proporção de cães sintomáticos, assintomáticos e respectivos testes diagnósticos. No pico da pirâmide (laranja), observa-se pequena quantidade de animais infectados e sintomáticos; em bege, animais infectados e sem sintomas, com sorologia reagente; em roxo, cães infectados com sorologia não reagente e PCR positivo. Na base da pirâmide, cães não infectados e sorologia não reagente (BANETH *et al.*, 2008).

**Figura 3:** Pirâmide representando a proporção de cães sintomáticos, assintomáticos e respectivos testes diagnósticos.



Os sintomas nos cães compreendem febre, tremores, sudorese, perda de peso progressiva, caquexia, hepatoesplenomegalia, onicogrifose - por estímulo parasitário na matriz ungueal - linfadenopatia, epistaxis, lesões oculares-uveíte, poliúria, polidipsia. Os sintomas cutâneos incluem

alopecia, dermatites esfoliativas, úlceras, nódulos, pápulas, hiperqueratinização dos coxins plantares, despigmentação, lignificação e piodermites secundárias. Podem ocorrer falência renal e vasculite pela deposição de imunocomplexos na parede de vasos sanguíneos (CIARAMELLA *et al.*, 1997; BANETH *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2009; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

Um caso raro de osteomielite osteolítica granulomatosa por LVC em um cão de seis meses foi diagnosticado por sorologia e confirmado por técnica histopatológica e PCR (SOUZA *et al.*, 2005).

O Programa de Vigilância e Controle da LV (PVCLV) do Estado de São Paulo prioriza, de forma semelhante ao Ministério da Saúde, ações sobre quatro pilares: diagnóstico e tratamento precoce de todos os casos humanos; monitoramento e redução da densidade populacional dos flebotomíneos, educação em saúde e controle dos reservatórios domésticos que são os cães infectados e identificados como reagentes positivos nos exames laboratoriais. São valorizadas também, as ações relacionadas ao manejo ambiental com o objetivo de reduzir as condições favoráveis à colonização de *L. longipalpis* (BRASIL, 2014; BRASIL, 2019).

A realização de inquéritos soroepidemiológicos caninos para a identificação de animais infectados com posterior recolhimento e eutanásia visando à diminuição dos reservatórios domésticos demandam grande esforço de órgãos municipais de controle de zoonoses, de laboratórios de Saúde Pública para sua operacionalização e a prática da eutanásia, eticamente questionável (PASSANTINO; RUSSO; COLUCCIO, 2010; COSTA, 2011; DANTAS-TORRES *et al.*, 2018).

O PVCLV esclarece que, após criteriosa análise epidemiológica baseadas na estratificação de risco, as ações devem acontecer de forma integrada. Do contrário, não serão eficazes. Ademais, o inquérito canino e posterior diagnóstico acontece somente após a identificação do caso humano e não de forma preventiva. Sabendo que o período de incubação

no cão é longo; que o lapso de tempo entre o diagnóstico e a eutanásia do mesmo é grande (80 a 180 dias), que os testes sorológicos são limitados em termos de sensibilidade e especificidade em áreas endêmicas e que há imediata reposição dos eutanasiados por outros cães susceptíveis, as ações preconizadas no plano são insuficientes para contenção da expansão da doença (DANTAS-TORRES *et al.*, 2018; OPAS, 2019).

A visibilidade alcançada pela ação de identificação da infecção canina, o recolhimento e eutanásia dos animais soropositivos é cada vez mais contestada por diferentes segmentos da sociedade, inclusive na comunidade científica e conseqüente aumento de recusas tanto para o diagnóstico da LVC como para a eutanásia dos cães infectados (QUINNELL; COURTENAY, 2009; ROMERO; BOELART, 2011, HARHAY *et al.*, 2011; GONZÁLES *et al.*, 2015).

Em 2013, as dificuldades para a aplicabilidade do programa de controle da LV (PVCLV) foram relatados por coordenadores de seis municípios brasileiros de grande porte (Campinas, Bauru, Goiânia, Campo Grande, Fortaleza e Belo Horizonte) com transmissão canina e humana. Os principais obstáculos mencionados foram: descontinuidade das atividades de controle, baixa cobertura de controle químico e grande resistência dos tutores e comunidade em geral à indicação de eutanásia dos cães. Evidencia-se a premência de adequação dessas políticas públicas com medidas alternativas e que foram sugeridas pelos gestores como uso da coleira de deltametrina, vacinação e tratamento canino (HARHAY *et al.*, 2011; von ZUBEN; DONALÍSIO, 2016).

No 13º Simpósio Companion Vector-Borne Diseases World Forum em Windsor, Reino Unido, de 19 a 22 de março de 2018, consolidou-se uma declaração de consenso sobre a utilidade da eutanásia de cães como meio de controlar a Leishmaniose Visceral. O comunicado destacou a baixa eficácia da eutanásia de cães infectados, saudáveis ou doentes, como

medida para controlar o reservatório doméstico de *L. infantum* e reduzir o risco de leishmaniose visceral (DANTAS-TORRES *et al.*, 2018).

A conscientização da população em geral sobre medidas de prevenção da doença nos cães e no homem são fundamentais. É de suma importância a participação multiprofissional, devidamente capacitados que podem realizar visitas domiciliares, palestras em escolas públicas e privadas, orientando sobre as medidas de proteção individual (evitar atividades noturnas ao ar livre, utilizar repelentes, mosquiteiros, telar portas e janelas) e sobre os cuidados com os cães (castração, microchipagem, uso de coleiras repelentes, responsabilidade do tutor pelo seu animal) e cuidados com o meio ambiente (RIBEIRO *et al.*, 2013).

Campanhas de prevenção de maior envergadura, com a participação de veterinários, médicos, gestores de saúde pública, políticos, tutores de cães e população da região afetada devem também ser programadas e necessitam de profunda interação multidisciplinar (BANETH, 2013).

Reconhecer a espécie de *Leishmania* que infecta o reservatório, entender da biologia e hábitos dos reservatórios e conhecer a epidemiologia da doença são condições necessárias para o desenvolvimento de novas ferramentas efetivas no controle dessa zoonose (MAIA; DANTAS – TORRES; CAMPINO, 2018).

A construção de políticas públicas que reduzam as desigualdades sociais e determinem acesso à educação em sua totalidade, são ações imprescindíveis no controle tanto da LV, assim como de outras doenças associadas à vulnerabilidade social (MAGALHÃES *et al.*, 2009).

## **Diagnóstico**

Considerando a grande variedade de sintomas que o cão apresenta e que muitos desses animais são portadores assintomáticos, o diagnóstico clínico deve ser acompanhado de exames laboratoriais. Um diagnóstico confiável é fundamental no controle da doença. A necessidade em se

combinar métodos sensíveis e específicos, que exijam poucos equipamentos e que sejam de fácil execução é antiga, devido à preocupação com a saúde animal e seu potencial zoonótico, já que infecções caninas e humanas coexistem em áreas endêmicas. A falta de um teste padrão ouro para humanos e animais infectados gera obstáculos para tomada de decisões nas medidas de controle; adiando o tratamento e a persistência dos reservatórios no ambiente (GRIMALDI; TESH, 1993; FARIA; ANDRADE, 2012; COURA-VITAL *et al.*, 2014; DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; FRAGA *et al.*, 2016).

Os profissionais de saúde se veem diante de um paradigma perante um resultado positivo para LVC. Devem ter conhecimento suficiente para diferenciar o diagnóstico de um cão sadio infectado de um cão doente para planejar adequadamente as possíveis intervenções (PARADIES *et al.*, 2010; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2011).

Os testes sorológicos recomendados para o controle do reservatório urbano da LV, até o ano de 2011, eram ELISA-EIE-LVC-Bio-Manguinhos (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) como teste de triagem e IFAT-IFI-LVC- Bio-Manguinhos (Teste de Imunofluorescência Indireta), como teste confirmatório. Este teste foi substituído pelo teste ELISA tendo em vista possibilitarem reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi*; necessitando de sorologia pareada e verificação de título sorológico; não sendo realizado em inquéritos sorológicos (LUCIANO *et al.*, 2009; TRONCARELI *et al.*, 2009; COURA-VITAL *et al.*, 2014; LAURETI *et al.*, 2014; DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; PERSICHETTI *et al.*, 2017).

O teste rápido foi desenvolvido pelo Instituto Biomanguinhos/Fiocruz (*Dual Path Platform* – TR DPP – Leishmaniose Visceral Canina) e disponibilizado em 2012. Trata-se de um ensaio imunocromatográfico, cuja utilização de proteínas recombinantes (rk 26 e rk 39) garante alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da LVC. Passou a ser

utilizado segundo norma técnica do Ministério da Saúde como teste de triagem para os inquéritos caninos, seguido pelo teste confirmatório.

A utilização de testes de baixa acurácia gera resultados falso-negativos, mantendo o parasito em áreas endêmicas e os resultados falso-positivos, levam a eutanásias desnecessárias e equivocadas (FRAGA *et al.*, 2016).

Laurenti *et al.* (2014), em um estudo com cães sintomáticos e assintomáticos em área endêmica para LVC, observaram alta especificidade para o teste DDP Biomanguinhos (95,1%) com baixa quantidade de reação cruzada (*Babesia* spp.) quando comparado ao teste ELISA Biomanguinhos (77,8%), devido à reação cruzada com outros patógenos. O teste ELISA mostrou boa sensibilidade (90,6%). Sugeriram, então, o uso do teste DDP como teste confirmatório e do teste ELISA como triagem, já que a sensibilidade do DDP varia muito dependendo do curso da infecção - se o cão é sintomático (98% de sensibilidade) ou assintomático (47%). Outros autores disseram que tal inversão da ordem dos exames agilizaria os trabalhos e diminuiria custos (GRIMALDI *et al.*, 2012; PEIXOTO *et al.*, 2015; LAURENTI *et al.*, 2014; COURA-VITA *et al.*, 2014).

Em razão de o teste DPP não ser suficientemente produzido para suprir a demanda nacional, um estudo comparativo entre os testes DPP e o Alere TM (rK28 ICT - tira de plataforma única), sugeriu a utilização deste como opção para triagem, já que apresentou boa sensibilidade. Entretanto, em outro estudo, foi observada baixa sensibilidade do teste Alere, quando comparada ao DDP. Embora utilizem o mesmo antígeno recombinante, o DDP possui fluxo independente para a amostra e conjugado e maior desempenho na ligação antígeno-anticorpo, o que poderia explicar a diferença na sensibilidade (SOUZA FILHO *et al.*, 2016; DANTAS-TORRES *et al.*, 2018).

A associação entre parâmetros clínicos, laboratoriais e epidemiológicos devem estar elencados para o diagnóstico definitivo da doença; já que testes sorológicos podem identificar exposição ao parasito, mas não podem indicar infecção ativa. As formas amastigotas podem estar presentes nos tecidos de cães saudáveis (XAVIER *et al.*, 2006; PALTRINIERI *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2012).

Devido à sua sensibilidade, especificidade e viabilidade de aplicação em variados tipos de amostras, a utilização de técnicas moleculares no diagnóstico da leishmaniose tem sido expressiva. A técnica de PCR em tempo real (qPCR) tem se revelado mais adequada que as demais técnicas moleculares pela rapidez, por extinguir a etapa da eletroforese (utilizada na PCR convencional) e por diminuir o risco de contaminação cruzada. Possibilita a confirmação da infecção pela detecção do parasito, a identificação da espécie, a quantificação da carga parasitária em diferentes tecidos, o monitoramento da infecção durante o tratamento e estudos clínicos para validação de vacinas. Norteia-se pela amplificação do DNA alvo e observação da fluorescência emitida utilizando corantes fluorescentes intercalantes - SYBRGreen® ou sondas fluorescentes-TaqMan®, entre outros (CASTILHO *et al.*, 2008; GALLUZZI *et al.*, 2018; CHAGAS *et al.*, 2021; EVARISTO *et al.*, 2021).

Questionamentos surgem quanto à escolha da melhor amostra biológica a ser empregada no diagnóstico da LVC (sangue, biópsias de pele, aspirado de linfonodo e de medula óssea).

As amostras, cujas coletas são consideradas invasivas, exigem profissional capacitado para sua execução e não são bem aceitas pelos tutores dos animais. A biópsia de pele pode causar dor e sangramentos, além de exigir boa assepsia e anestesia local. A punção de medula óssea requer habilidade na sua execução e sedação pré-anestésica. O aspirado de linfonodo também é considerado um procedimento invasivo, porém

menos doloroso e pode ser usado como alternativa para pesquisa direta de formas amastigotas e qPCR.

As amostras de sangue são as menos invasivas e bem aceitas, embora tenham menor sensibilidade quando comparada às demais, pois a parasitemia tende a ser transitória no processo doença (MANNA *et al.*, 2004; STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004; POURABBAS *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2014). Entretanto, outros autores afirmaram que a detecção do DNA do parasito no sangue ou soro pode ser uma forma exequível de diagnóstico, com sensibilidade de 100% e especificidade de 96,4% em amostras de sangue canino (WEIRATHER *et al.*, 2011; MOHAMMADIHA *et al.*, 2013).

Os cultivos para isolamento do parasito têm grande importância diagnóstica, entretanto, possui muitas limitações. O tempo de crescimento pode levar até quatro meses e o reconhecimento das formas amastigotas e suas estruturas (citoplasma, cinetoplasto e núcleo) exigem profissional capacitado, pois, facilmente, são confundidas com artefatos nas colorações de Giemsa e Panóptico (LUZ, 1999).

Análises moleculares têm sido essenciais para conhecer a diversidade e compreender a complexidade dos tripanossomatídeos. O diagnóstico de leishmaniose pela qPCR por meio da utilização de regiões codificantes e/ou não codificantes de genoma de *Leishmania* (locus do DNA nuclear e do genoma mitocondrial – kDNA) foi relatado em diversas pesquisas. O kDNA é organizado em milhares de minicírculos e de maxicírculos; estes, em bem menor quantidade. Os minicírculos são considerados os alvos mais sensíveis pois contêm 95% do DNA do cinetoplasto do protozoário e milhares de cópias em cada célula, tendo seus domínios conservados. Alguns autores sugeriram que, se a identificação da espécie de *Leishmania* não for necessária, os minicírculos do kDNA devem ser utilizados como metodologia padrão (CASTILHO *et al.*, 2008; SCHÖNIAN; KUHLS; MAURICIO, 2010; ALVARENGA *et al.*, 2012;

JARA *et al.*, 2013; CECCARELLI *et al.*, 2014; KOLTAS *et al.*, 2016; GALLUZZI *et al.*, 2018). Entre os genes codificadores de proteínas utilizados como alvo, o G6PD (glicose6-fosfato desidrogenase), embora permita a identificação e quantificação dos parasitos, é um gene de única cópia e, quando utilizado em amostras com baixa carga parasitária, tem baixa sensibilidade. As proteínas de choque térmico (HSP 70), cuja função é adaptativa na passagem do parasito do vetor para o hospedeiro) são a exceção do grupo das proteínas pois são genes que possuem multicópias (RAMIRES; REQUENA; PUERTA, 2011; GALLUZZI *et al.*, 2018). Diferentes *locus* de genes nucleares (rDNA) que codificam o RNA ribossômico (rRNA) têm sido utilizados. Dezenas ou centenas de cópias de unidades de rDNA podem estar presentes por célula de *Leishmania*, permitindo sensibilidade suficiente para analisar amostras clínicas de DNA (YAN *et al.*, 1999).

Os genes do RNA ribossômico (rRNA) possuem várias cópias em *tandem*. Entre as variadas regiões, a ITS (ribosomal internal transcribed spacer) é a mais variável e ideal para identificação de espécies. É uma região não codificante do DNA. O espaçador transcrito externo (ETS) é uma região de RNA relacionada ao ITS e está situado fora do rRNA estrutural em um transcrito precursor comum (SCHONIAN; KUHL; MAURÍCIO, 2010; KUHL *et al.*, 2005, AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Os genes SSU rRNA ou Spliced Leader (SL) também são utilizados como marcadores. São empregados para identificação e genotipagem de tripanossomatídeos (ALVAREZ, 2017).

O diagnóstico molecular, por meio da confirmação da presença do parasito em amostras de tecidos de cães infectados é o principal objetivo das abordagens clínicas. Está na dependência da carga parasitária da amostra, da sensibilidade e especificidade dos diferentes alvos, da espécie ou gênero do parasito a ser pesquisado e das áreas geográficas acometidas. Nas regiões endêmicas, embora importantes progressos venham sendo conquistados na área da biologia molecular, o alto custo de

seus equipamentos e insumos utilizados em pesquisas, ainda inviabilizam sua aplicabilidade na rotina clínica (GALLUZZI *et al.*, 2018).

## **Tratamento**

Devido às características do metabolismo da Leishmania, e, por se tratar de um parasito intracelular obrigatório - fato que o protege do sistema imune do hospedeiro, há muita dificuldade no controle da doença, apesar das terapias instituídas (MIRÓ *et al.*, 2009).

Na Europa, o tratamento é realizado há 20 anos, com a finalidade de reduzir o parasitismo cutâneo do cão, eliminar as manifestações clínicas, e recuperar a resposta imune celular; reduzindo a capacidade infectante dos flebótomos e levando à redução da prevalência da doença nos cães e no homem (HINTERBERGER-FISCHER, 2000; NOGUEIRA *et al.*, 2019).

Deve ser iniciado após o diagnóstico parasitológico, com identificação de formas amastigotas nos tecidos do animal ou quando o cão se apresentar sintomático e com exames sorológicos reagentes. Os animais submetidos ao tratamento devem ser monitorados a cada três meses, por meio de avaliação clínica, sorologia para detecção de anticorpos anti-Leishmania, avaliação bioquímica sérica, hemograma completo, proteinograma e, quando possível, pesquisas de parasitos na pele (ALVAR *et al.*, 2004).

Os tutores devem receber detalhada explicação a respeito da doença e da sua potencial adesão, a qual indica-se que deva ser formalizado um termo de consentimento devidamente assinado pelo tutor. O protocolo deverá conter informações sobre o acompanhamento veterinário periódico, prognóstico geral esperado, possibilidade de recidivas e o fato de a terapia promover a cura clínica e não parasitológica. Cuidados essenciais devem ser tomados em áreas endêmicas como o uso de coleiras ou outros repelentes nos animais a serem tratados com eficácia

comprovada contra os flebótomos em todos os estágios da doença, pois mesmo os cães soropositivos assintomáticos são competentes para transmitir os parasitos (ABRANCHES *et al.*, 1991; BANETH; SHAW, 2002, CHAGAS *et al.*, 2021; SCORZA *et al.*, 2021).

Além das coleiras repelentes, pode-se optar pelo uso de pipetas ou spray, mosquiteiros e de telas de antiafídeo nos canis individuais ou coletivos (MENZ, 2014, FIOCRUZ, 2019).

Os derivados antimoniais eram fármacos de escolha para o tratamento da LVC, porém, sua utilização em cães no Brasil foi proibida pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária por meio de um parecer técnico nº. 299/2004 da Advocacia Geral da União onde: “fica proibido o uso do Antimoniato de N-metil Glucamina para o tratamento da Leishmaniose canina, quando o mesmo for de distribuição do Ministério da Saúde” (BRASIL, 2018). Essa droga bloqueia o metabolismo parasitário, exercendo ação inibidora na síntese do ATP (adenosina trifosfato) durante o processo de oxidação da glicogenólise e intervém no metabolismo dos ácidos graxos provocando a morte do parasito. A absorção intestinal deste composto é nula. A sua administração é feita por via parenteral (IV-intravenosa, IM-intramuscular, SC-sub-cutâneo), sendo eliminado por via renal algumas horas após a administração. Apenas 20% do produto fica em circulação, apesar de existir um efeito cumulativo ao longo do tratamento. As doses prescritas, os protocolos de administração e a duração do tratamento variam muito de autor para autor (ALVAR *et al.* 1994; NOLI, 1999).

Quando associado ao alopurinol, promove melhora clínica, ausência de parasitos no linfonodo e medula óssea, com 85% dos animais negativos em *imprints* de baço e fígado (IKEDA, 2004).

O fármaco torna-se desvantajoso devido ao risco de diminuição de sensibilidade do parasito ao antimoniato de N-metil glucamina após várias

séries de tratamento, selecionando parasitos resistentes (GRAMICCIA; GRADONI; ORSINI, 1992).

Ademais, o tratamento é doloroso e dispendioso; o período pós-tratamento superestima a eficácia da droga, razões pelas quais os donos decidem muitas vezes tratar os animais apenas durante curtos períodos de tempo. Nestes casos as recidivas são frequentes, e a resistência ao fármaco é alta (LAMOTHE, 1999).

A anfotericina B é um fármaco leishmanicida, atuando nas formas promastigotas e amastigotas do parasito, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. É um macrolídeo sintetizado pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus* (BANETH, 2002).

Foi anteriormente utilizada devido à sua ação fungicida. Age ligando-se ao ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana celular e causando extravazamento do potássio intracelular e outros constituintes celulares. Sua ligação com o colesterol é instável (principal esterol das células de mamíferos) sendo menos agressiva ao tecido do hospedeiro quando comparada à lesão causada ao parasito, quando se liga aos ésteres (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática de *Leishmania* (LAMOTHE, 1999; BANETH, 2002).

Os efeitos colaterais da anfotericina B são inúmeros e frequentes. Todos são dose-dependentes, sendo altamente tóxica para as células do endotélio vascular, causando flebite, considerado um efeito secundário comum. As complicações renais são as mais importantes, com graus variados de comprometimento. Tais alterações ocorrem devido à vasoconstrição renal e conseqüente isquemia cortical com diminuição da filtração glomerular. Os cães parecem ser mais resistentes a estes efeitos secundários que os humanos (LAMOTHE, 1999).

Existem duas formas disponíveis deste fármaco, a forma livre - solução aquosa de anfotericina B (Fungizona®) e formulações lipídicas, menos nefrotóxicas, em lipossomas (AmBisome®). Um exemplo de

protocolo de tratamento consiste em administrar duas a três vezes por semana na dose de 0,5 a 0,8 mg/kg até atingir um valor final de 8 a 15 mg/kg (LAMOTHE, 1999; LAMOTHE, 2001).

O alopurinol é um análogo da purina e é utilizado para o manejo da gota - deposição de cristais de urato monossódico em joelhos humanos em consequência da hiperuricemia. Seu efeito leishmanioestático se deve à formação da molécula de 4-aminopirazolopirimidina ribonucleotídeo trifosfato, um análogo altamente tóxico do ATP que inibe a síntese proteica depois de incorporado ao RNA do protozoário; entretanto, tem eficácia parcial como monoterapia, pois a maioria dos cães tratados apenas com alopurinol tem remissão dos sintomas, mas sem eliminação do parasito (BERMAN, 1988; LAMOTHE, 1999; SIVERA *et al.* 2014; TORRES, 2016).

Embora não seja registrado como medicamento veterinário, o alopurinol é comumente utilizado na prática clínica para o tratamento da LVC. Devido à possibilidade de ser administrado por via oral, ao seu baixo custo, a pouca toxicidade e eficácia na manutenção da remissão dos sintomas em cães tratados, tornou-se uma alternativa acessível como monoterapia ou associado a outro fármaco (GINEL, 1988; BANETH; 2002; MIRÓ, 2009). Entretanto, não existe confirmação de melhora clínica significativa e prolongada com o uso isolado do fármaco e a monoterapia pode desencadear recidivas em muitos dos cães infectados (NOLI; AUXILIA, 2005).

O efeito de um protocolo quimioterápico multidroga, utilizando o alopurinol (metronidazol, cetoconazol e alopurinol) foi realizado em 35 cães naturalmente infectados. Através do xenodiagnóstico, a capacidade de transmissão do protozoário para o vetor, antes e durante o tratamento foi avaliada. O protocolo utilizado mostrou-se eficaz em bloquear a transmissibilidade parasitária do cão para o flebotomíneo ( $p= 0,011$ ) e uma significativa correlação entre recuperação clínica e infectividade dos cães (NERY, 2017).

O interesse no alopurinol advém da sua utilização em tratamento combinado com antimoniais pentavalentes, já que permite manter a remissão dos sinais clínicos devido ao seu efeito leishmanioestático (LAMOTHE, 1999; NOLI; AUXILIA, 2005).

O protocolo sugerido consiste num tratamento inicial com os dois fármacos (alopurinol e antimonial pentavalente) durante pelo menos três semanas seguido de um tratamento a longo prazo com alopurinol na dose de 20 a 40 mg/kg/dia ou de forma intermitente (uma vez por semana ou uma vez por mês). Os efeitos secundários são pouco frequentes, apesar de se exigir uma monitorização da função renal e hepática em pacientes sujeitos a tratamentos prolongados. A formação de urólitos pode ocorrer após três semanas do início do tratamento, particularmente em cães com doença hepática, que têm níveis urinários altos de xantina. A hiperxantínúria pode levar à formação de urolitíase e mineralização renal, razão pela qual se orienta reduzir a duração do tratamento entre 6 e 12 meses (FERRER, 1997; ANDRADE *et al.* 2006; YASUR-LANDAU *et al.* 2016).

A resistência ao alopurinol foi relatada no isolamento de *L. infantum* de cães submetidos ao tratamento, e acompanhada da piora clínica. Há, portanto, necessidade de novos fármacos para serem utilizados nos tratamentos e que podem ser eficazes e seguros quando administrados por longo período em cães com leishmaniose (YASUR-LANDAU, 2016).

Um estudo demonstrou que uma dieta por via oral, moduladora do sistema imune (nutracêutico), pode melhorar a resposta imune canina sob tratamento farmacológico padrão para LVC (CORTESE, 2015).

O sistema imunológico, por ser um tecido de rápida proliferação, necessita de suprimentos constantes de nucleotídeos para novas sínteses. Esses compostos, de baixo peso molecular, influenciam positivamente no metabolismo lipídico e na imunidade, no crescimento, no desenvolvimento e reparo tecidual (GIL, 2002; SEGARRA, 2021).

O AHCC (composto correlacionado com hexose ativa), extraído de cogumelos (Basidiomicota) e rico em alfa-glucano, tem demonstrado capacidade de estimular o sistema imunológico em humanos com aumento de Th1-resposta imune celular. Sua associação com nucleotídeos e antimoniato de N-metil glucamina por seis meses em cães com leishmaniose clínica melhoram os escores clínicos, os biomarcadores utilizados para monitorar a resposta ao tratamento e a eficácia, sem produzir xantínúria. Esta dieta poderia ser uma boa alternativa para o tratamento da LVC, especialmente para cães que sofrem de eventos adversos relacionados ao alopurinol (ULBRICHT *et al.* 2013; SEGARRA *et al.*, 2017).

Os azóis, incluindo os imidazóis (ketoconazole e miconazol) e os triazóis (fluconazole e itraconazole) atuam diretamente no lanosterol dimetilase no ciclo do ergosterol. Estes fármacos podem ser dados oralmente e são uma boa opção para terapias de manutenção (LAMOTHE, 1999).

A marbofloxacina é uma fluoroquinolona sintética de terceira geração, desenvolvida unicamente para uso veterinário. *In vitro*, revelou atividade leishmanicida contra *L. infantum*, interferindo nas vias de síntese de TNF- $\alpha$  e NO, e estando relacionada com a produção de NO<sub>2</sub> (dióxido nítrico). Muitas fluoroquinolonas demonstraram agir nas formas amastigotas intracelulares de *Leishmania*. São conhecidas também pelas suas propriedades imunomoduladoras, regulando a síntese de citocinas, o que condiciona a evolução da infecção, já que esta depende da interação entre o parasito e o sistema imune do hospedeiro. A posologia sugerida é de 2 mg/kg/dia durante 28 dias, apesar de serem ainda necessários muitos estudos para o conhecimento exato da sua ação nos mecanismos imunológicos na *Leishmania* (ROUGIER *et al.* 2006).

A domperidona é um fármaco pró-cinético e antiemético gástrico, capaz de estimular respostas imunes induzidas por linfócitos Th1, por meio

da sua ação antagonista do receptor de dopamina D2 que resulta na liberação de serotonina e estimula a produção de prolactina. Esta tem um papel importante na resposta imune, mas seu mecanismo de ação não está completamente elucidado. Trabalhos com hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) mostraram que poderia haver um papel protetor na lactação contra o protozoário devido á hiperprolactinemia. O hormônio, cuja principal função é estimular a produção de leite em mamíferos, é agora classificado como citocina derivada de linfócitos pró-inflamatórios. Em um estudo com cães, foi administrada duas vezes por dia por via oral, na dose de 1 mg/kg durante um mês a animais naturalmente infectados e com gravidade variável da doença e monitorados por exames sorológicos, bioquímicos e imunológicos durante um ano. Demonstrou ser efetiva na redução dos sintomas; na redução da titulação de anticorpos, quando 40% dos animais tornaram-se soronegativos e no aumento da resposta imune celular\*, mensurada por testes imunológicos (BERCZI; BERTÓK; CHAW, 2000; GOMEZ-OCHOA *et al.*, 2003).

O tratamento canino com fármacos de uso humano é proibido no Brasil (Portaria Interministerial MAPA/MS no. 1.426, 2008). Entretanto, uma nova terapia pode representar uma alternativa de tratamento dos cães, além de contribuir para a redução do risco de selecionar parasitos resistentes (BRASIL, 2008; MIRÓ, 2009).

Trata-se do fármaco miltefosina, utilizado em humanos no tratamento de câncer; reposicionado para tratamento da LVC. Seu mecanismo de ação está relacionado com a interferência em vias de sinalização celular, ativação de macrófagos citotóxicos, alterações na membrana lipídica e apoptose (PARIS *et al.*, 2004).

O fármaco, denominado Milteforan™ (Virbac Brasil), foi desenvolvido para uso veterinário. Entretanto, o tratamento canino da LV não é recomendado pelo Ministério da Saúde-MS, como medida de controle em saúde pública. Seu uso foi autorizado por meio do registro do produto

MILTEFORAN, sob número SP 000175-9.000003, de propriedade da empresa VIRBAC SAÚDE ANIMAL, de acordo com a Nota Técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA, assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde e desde então adquiriu notoriedade para o tratamento canino (BRASIL, 2016; AYRES; ALMEIDA, 2022).

A miltefosina solução oral a 2% é um análogo fosfolipídico-fosfatidilcolina (lecitina) que é o maior constituinte das membranas celulares, possuindo atividade antitumoral e antiprotozoária, interferindo no metabolismo fosfolipídico e biossíntese da membrana celular, levando a apoptose celular (CROFT; SEIFERT; DUCHÊNE, 2003; SINDERMANN; ENGEL, 2006).

Utilizada em cães na dose de 2 mg/kg (miligrama/quilograma) durante 28 dias, tem uma significativa eficácia terapêutica e boa tolerância para o tratamento da LVC, com poucos, autolimitantes e transitórios efeitos colaterais (WOERLY, 2009). Desta forma, múltiplos estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado sua atividade leishmanicida (UNGER, 1998; CROFT; SEIFERT; DUCHÊNE, 2003; VERMA; DAY, 2004; MIRÓ, 2009). Recentemente, também vem sendo utilizada para tratamento de felinos (LEAL *et al.*, 2018; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2022). Contudo, o alto custo deste fármaco impede frequentemente que o tutor do cão possa realizar o tratamento (DORLO *et al.*, 2012).

Assim, considerando a importância do cão como reservatório de *Leishmania* e seu papel na manutenção do ciclo zoonótico de transmissão da leishmaniose visceral urbana; considerando o crescente processo de urbanização, expansão e reemergência das leishmanioses no Brasil e no mundo; considerando a dificuldade no controle da doença utilizando os protocolos atuais; considerando a demanda crescente por métodos alternativos à eutanásia canina e a possibilidade do desenvolvimento e uso de fármacos como medida auxiliar ao controle da doença; o estudo propõe-

se à produção de novos conhecimentos para a revisão das ações de vigilância e controle da LVC com vistas à incorporação de estratégias para políticas públicas em saúde, focando na redução ou mesmo interrupção da transmissão para humanos, a partir da redução da incidência da LVC (BANETH *et al.*, 2008; HARHAY *et al.*, 2011; von ZUBEN; DONALÍSIO, 2017; NOGUEIRA *et al.*, 2019).

# Objetivos

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o uso da miltefosina como tratamento em cães sorologicamente positivos para Leishmaniose Visceral no município de Bauru-SP, área endêmica para LVC.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar as prevalências e a distribuição espacial da LVC nos diferentes setores geográficos de Bauru para a escolha dos animais tratados com miltefosina;
- Avaliar a adesão dos tutores selecionados para o tratamento no que se refere à compreensão das informações repassadas, da importância de tratar seu animal, da valorização das ações e dos profissionais envolvidos, do financiamento de todo o projeto e do comprometimento com a pesquisa como um todo.
  - Avaliar a evolução clínica e bioquímica dos animais em tratamento nas condições de campo;
  - Comparar as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real nas diferentes amostras (sangue, soro e linfonodo) ao longo do tratamento nas condições de campo
  - Avaliar a redução da carga parasitária de *Leishmania* spp. por meio de PCR em tempo real ao longo de 12 meses de tratamento.

# *Material e Métodos*

## **3. Material e Métodos**

### **3.1. Histórico**

Este projeto de doutorado é parte do Edital de Modernização dos Institutos Estaduais de Pesquisa, por meio do Projeto Políticas Públicas: Inovações Tecnológicas em Saúde para o Diagnóstico e Controle da

Leishmaniose Visceral no Município de Bauru, Estado de São Paulo, Brasil (processo FAPESP 2018/25889-4), coordenado pelo Dr. José Eduardo Tolezano do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e possui um desenho experimental em coortes de cães para avaliação de novas estratégias para o controle da LV canina, tais como: coorte I (cães soronegativos), II (cães soronegativos encoleirados), III (cães soropositivos sujeitos ao Programa de Vigilância e Controle da leishmaniose Visceral) e IV (cães soropositivos tratados).

Em um estudo de coorte para avaliar efetividade de diversas medidas de controle para a LV em cães, realizado no município de Panorama, estado de São Paulo, registraram-se perdas de um número expressivo de animais durante o acompanhamento por um ano (LOPES *et al*, 2017). De 300 animais selecionados para formar as coortes, 94 foram perdidos por razões diversas em um período de 12 meses, o que representa uma perda de cerca de 30%. Com vistas a suprir esta perda, as coortes formadas para avaliação das diferentes modalidades de intervenção de controle da LV canina foram acompanhadas pelo período de 12 meses, formadas por 780 animais. O cálculo dos riscos relativos (RR) foi realizado empregando-se o modelo Cox Proportional-Hazards Regression Model (MORGENSTERN; KLEINBAUM; KUPPER, 1980). A efetividade da medida de controle foi calculada considerando-se  $EF = 1 - RR$ . Os cálculos foram realizados com auxílio do programa R, utilizando o pacote *Surviva* (THERNEAU, 2015; TEAM, 2017).

Durante o período compreendido entre outubro de 2019 e março de 2020 (interrompido pela pandemia, foi realizado um inquérito soroepidemiológico canino em oito áreas do município de Bauru, previamente selecionadas tendo como referência a série histórica que permitiu identificar áreas mais críticas em relação à prevalência da LVC e também da LV humana (RAMOS-AUGUSTO, 2018; ORTIZ; ANVERSA, 2015). As equipes de trabalho, formadas por coletores, anotadores e

apoios, realizavam as coletas de sangue e transmitiam orientações pertinentes à doença. O número de equipes variava de acordo com a necessidade dos trabalhos: número de quadras, domicílios e cães.

Os anotadores utilizavam *tablets* para preenchimento do *form-in*, cujas informações foram enviadas, simultaneamente, para a equipe de apoio em Bauru e em São Paulo para conferência e armazenamento dos dados digitados.

Ao término diário dos trabalhos, as amostras foram encaminhadas para o Centro de Controle de Zoonoses de Bauru (Secretaria Municipal de Saúde), onde, após dessoradas e identificadas, foram encaminhadas para o Instituto Adolfo Lutz de Bauru para realização dos exames sorológicos. Todo trabalho de campo foi supervisionado pela autora desta tese e médica-veterinária do Centro de Controle de Zoonoses de Bauru.

A partir dos resultados, foram construídos os mapas de localização espacial de soropositivos e soronegativos, que nortearam a constituição das áreas de estudo para o tratamento dos animais.

### **3.2. Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Conselho Técnico Científico (CTC) do Instituto Adolfo Lutz (nº 59L-2019) e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) nº 02/2020 (Anexo 1 e 2).

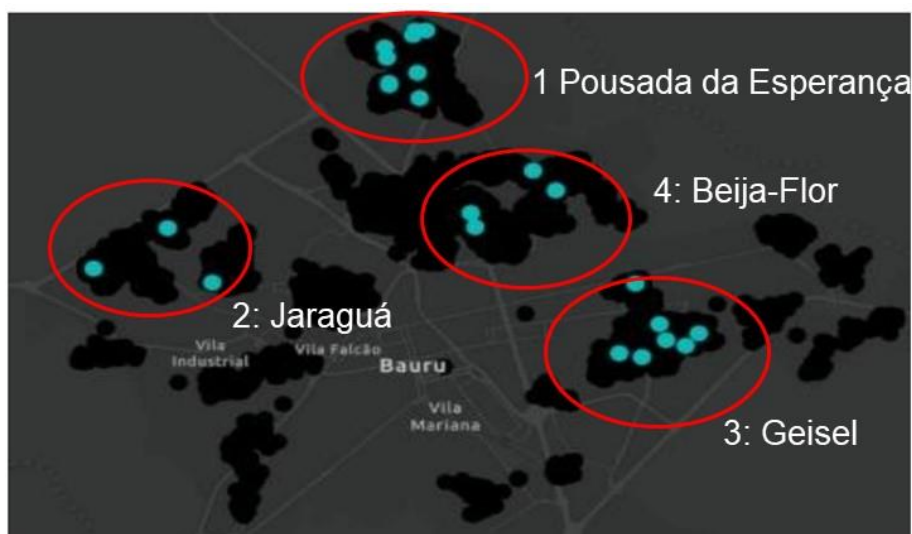
### **3.3 Amostras**

Devido à pandemia da COVID-19, o tratamento iniciou-se com atraso (um ano e seis meses) o que ocasionou grande dificuldade no contato com os tutores (mudança de endereço, de telefone e óbito dos cães). Desta forma, nosso “N” não alcançou o inicialmente proposto.

Foram selecionados e avaliados 34 cães, referente aos bairros Pousada da Esperança, Jaraguá, Geisel e Beija-flor e a Figura 4 representa as quatro áreas delimitadas no espaço urbano de Bauru,

Foram excluídos do tratamento fêmeas prenhes e lactantes, cães com doenças concomitantes e aqueles submetidos a terapias leishmanicidas, leishmaniostáticas, com antibióticos e corticoides. Também foram excluídos cães com insuficiência renal crônica que necessitam de serviços veterinários especializados (diálises, fluidoterapias) e não disponíveis no Centro de Controle de Zoonoses.

**Figura 4:** Localização das quatro áreas do município de Bauru-SP. Área 1: Pousada da Esperança, Área 2: Jaraguá, Área 3: Geisel, Área 4: Beija-flor.



**Fonte:** Arquivo Patrícia Matsumoto, 2023

### 3.4 Tratamento

Os 34 animais com diagnóstico clínico e laboratorial para LVC, incluindo análises sorológicas e moleculares, foram submetidos ao protocolo que segue abaixo:

- Miltefosina a 2 mg/kg por via oral uma vez ao dia por 28 dias
- Alopurinol a 20 mg/kg por via oral duas vezes ao dia e, a partir de seis meses, a dose foi diminuída para 10 mg/kg uso contínuo;

- Domperidona a 0,5 - 1 mg/kg por via oral duas vezes ao dia durante 30 dias a cada 6 meses;

- Prednisona a 0,5 mg/kg por via oral duas vezes ao dia, se necessário;

Para evitar reinfecção e como medida de saúde pública, os animais receberam coleira impregnada por deltrametrina (Scalibor®, MSD Animal Science), que foi trocada de acordo com a recomendação do fabricante.

### **3.5 Visitas e cronograma de coleta de amostras**

No momento das visitas, quando da realização dos trabalhos de campo, foram fornecidas informações acerca da doença, da sua forma de transmissão, do diagnóstico, do prognóstico e da possibilidade de tratamento em clínicas cadastradas para o uso da miltefosina. Para todos os animais incluídos, foi solicitada autorização com o termo de consentimento livre e esclarecido, devidamente assinado pelo proprietário do animal (Anexo 3). Durante a visita ou em qualquer outro momento do atendimento, o proprietário do cão sororreagente pôde optar pela remoção dos cães para eutanásia, que, somente aconteceu, após a confirmação do diagnóstico pela prova de ELISA como definido no PVCLV.

No atendimento dos cães sorologicamente reagentes, estes foram avaliados clinicamente e amostras de sangue (hemograma completo, perfil renal e hepático, proteinograma, relação albumina-globulina) foram colhidas e encaminhadas para análise no Laboratório Veterinário Laborcare Bauru.

Amostras de sangue, soro e linfonodo foram colhidas para o diagnóstico molecular, realizado no Instituto Adolfo Lutz de Bauru.

A obtenção da amostra de linfonodo foi realizada pela técnica de punção aspirativa por agulha fina (PAAF). Optamos pela punção do linfonodo poplíteo, pois pela nossa experiência profissional, trata-se do

linfonodo mais visível (superficial) e o mais comumente infartado. Os cães foram posicionados em decúbito lateral e, após a agulha ser engatada à seringa, foi introduzida com movimentos de vaivém, ao mesmo tempo em que se provocava pressão negativa no interior da mesma. O conteúdo foi armazenado em microtubos livres de RNase e DNase contendo solução salina e encaminhados para realização da cPCR e da qPCR.

Segundo TEIXEIRA *et al.* (2010), por meio desta técnica, obtém-se material em quantidade ideal, mínima lesão tecidual e sem danos ao animal.

O método parasitológico para pesquisa de formas amastigotas em linfonodos não foi realizado por se tratar de um exame moroso, pela ausência de profissional capacitado e falta de microscópio adequado para visualização das formas amastigotas. Na Figura 5, visualizamos um linfonodo poplíteo infartado.



**Figura 5:** Visualização de um linfonodo poplíteo infartado (Fonte: [wsava.org/committees/oncology-working-group](http://wsava.org/committees/oncology-working-group))

Foram coletadas amostras biológicas no tempo 0 (T-0), no qual foi iniciado o protocolo estabelecido supracitado nos animais que se enquadraram nos critérios de inclusão e posteriormente a cada três meses (T1, T2, T3, T4).

Os atendimentos foram realizados mensalmente e reagendados conforme a evolução do animal; totalizando um ano de tratamento. Nesse momento, foi avaliada a eficácia do tratamento, quanto à sintomatologia clínica e avaliação laboratorial.

## **3.6. Avaliação laboratorial**

### **3.6.1 Avaliação sorológica**

As amostras de soro foram analisadas no Instituto Adolfo Lutz (IAL) de Bauru quanto à presença de anticorpos, com o uso das técnicas de diagnóstico oficial.

O teste rápido para amostras de soro canino foi realizado utilizando-se o kit TR DPP® para leishmaniose visceral canina (Bio-Manguinhos), conforme instruções do fabricante. O TR DPP® é um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza a proteína recombinante K28 (fragmentos K 26, K 39 e K9) como antígeno. Esta proteína é o produto de um gene clonado a partir de *Leishmania infantum* e que contém uma repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas de leishmania.

O teste imunoenzimático foi realizado utilizando-se o kit EIE – Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos), de acordo com as informações do fabricante.

Este ensaio consiste na reação de antígenos solúveis purificados de leishmania obtidos de culturas, adsorvidos nas cavidades de microplacas, com os anticorpos específicos para leishmania presentes no soro.

O preparo do diluente de amostras foi realizado de acordo com fabricante: diluir em tubos 5 µL (controles e amostras) em 500 µL do diluente; distribuir na placa 100 µL (controles e amostras) já diluídos; tampar a placa e incubar a 37°C por 30 minutos; preparo do tampão de lavagem de acordo com fabricante; destampar a placa, aspirar o conteúdo e lavar por seis vezes com o tampão de lavagem (200 µL /orifício); adicionar 100 µL de diluição do conjugado em cada orifício; incubar novamente, aspirar e lavar conforme já descrito anteriormente; preparo do substrato de acordo com fabricante; adicionar 100 µL substrato em cada orifício; deixar temperatura

ambiente por 30 minutos; adicionar 50 µL de ácido sulfúrico em todos orifícios; fazer a leitura da microplaca por espectrofotometria, utilizando o filtro de 450nm. Os valores dos controles negativos foram utilizados para o cálculo do *cut-off*. Os resultados foram considerados reagentes quando o valor da densidade óptica foi igual ou superior a 3 desvio-padrões do ponto de corte (*cut-off*).

### **3.6.2. Avaliação hematológica e bioquímica**

A avaliação foi realizada no laboratório veterinário Laborcare-Bauru, utilizando os Kits de diagnóstico padrão Bioclin® (MG, Brasil), nos equipamentos BS-200 (Mindray, China) e MEK-6500 (Nihon Kohden, Japão), com os ensaios realizados conforme protocolo preconizado pelo fabricante. Foram analisados os seguintes parâmetros: hemácias, hemoglobina, volume globular médio, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, proteína total no sangue, leucócitos, segmentados, bastonetes, basófilos, monócitos eosinófilos, linfócitos, plaquetas, ureia, creatinina, proteína total no soro, albumina, globulina e relação albumina/globulina.

### **3.6.3 Avaliação molecular**

A avaliação molecular foi realizada no IAL de Bauru.

#### **3.6.3.1. Extração de DNA**

A extração do DNA foi realizada por meio do sistema automatizado de *beads* magnéticas, utilizando o kit MTTD-P016 Fast (Loccus, Biotecnologia, Brasil), no equipamento Extracta® (Loccus, Biotecnologia, Brasil). Resumidamente o processo consiste em quatro etapas: lise da

amostra, ligação do DNA à sílica, lavagem e eluição. Foram utilizados 100µL de amostra por poço e 5µl de Proteinase K (20mg/ml) na placa de 96 poços de fundo “U” (*deepwell*) que contém o tampão de *lise* e *beads* magnéticas. A placa é encaixada no local determinado do equipamento, assim como as outras placas contendo tampão de lavagem e solução de eluição, a programação da extração é definida conforme orientações do fabricante e após o final do processo, o DNA é recuperado em uma solução de eluição com volume final de 60 µL. A quantificação foi avaliada em espectrofotômetro (Epoch-Biotek, USA), utilizando-se a placa multi-volume Take3™.

### 3.6.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR)

Para realização da técnica da PCR convencional utilizou-se os seguintes reagentes: 16,6 µl de água ultra pura, 2,6 µl de tampão de PCR (50mM KCl, 20mM de Tris-HCl pH 8,4), 0,8 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5 µl (0,2µM) de cada *primer*, 0,5 µl de dNTPs (0,2µM) e 0,5 µl (1U) de Taq-polimerase (*Platinum®Taq DNA Polimerase*, Invitrogen, Brasil) e 2 µl de DNA extraído da amostra. Em seguida realizou-se a incubação das amostras em termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler” (Life Technologies, Carlsbad, USA).

Foi realizada a amplificação do gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) em todas as amostras deste estudo, como controle interno e para avaliar a integridade do DNA extraído. A amplificação foi realizada com os *primers* GAPDH4R (5' -ATTAAGTTG GGCAGGGACT- 3') e GAPDH4F (5'- AGGCTGAGAACGGGAACTT- 3'), de acordo com Kullberg *et al.* (2006) e algumas alterações: um ciclo inicial de 95°C por 50 segundos, seguido de 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 30 segundos, anelamento à 60°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos, seguido por uma extensão final à 72°C por 5

minutos.

Conforme descrito por Aransay *et al.* (2000) foi utilizada a sequência da região do minicírculo kDNA que amplifica 720 pb com os iniciadores LINR4 (5'-GGGGTTGGTGTAAAATAGGG-3') e LIN19 (5'-CAGAACGCCCTACCCG-3'). Algumas modificações foram realizadas nas seguintes etapas: incubação a 95°C por 1 min, seguido por 30 ciclos, sendo cada ciclo composto de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C, e 1 min a 70°C, e uma extensão final a 72°C por 5 min.

Os controles positivos utilizados foram cepas de DNA de referência *L. infantum* (MHOM/BZ/1982) e *L. major* (MHOM/BZ/1982) da Coleção de *Leishmanias* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC FIOCRUZ) e como controle negativo foi utilizado água estéril ultrapura (Invitrogen).

### **3.6.3.3. Eletroforese em gel de agarose**

O material amplificado foi visualizado por meio da corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% adicionado de 0,1 µl/mL de SYBR Safe DNA *gel stain* (Invitrogen, Brasil). Posteriormente adicionou-se em cada poço, 8 µl do material amplificado com 2 µl do tampão de corrida (0,25% azul de bromophenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol, 70% água Milli-Q) e os tamanhos dos fragmentos foram estimados comparando com os marcadores de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (Norgen). A corrida eletroforética ocorreu em uma cuba horizontal contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA) com voltagem de 100V por 45 minutos. Ao finalizar a corrida, o gel foi levado até transluminador de luz Syngene® (DigiGenius, USA) e o resultado visualizado através da luz ultravioleta (296nm) onde as imagens foram capturadas pelo sistema de documentação digital pelo software EOS utility® (Canon, USA).

#### 3.6.3.4. PCR em tempo real

Para a determinação da carga parasitária, foi utilizado o sistema SYBR®Green, por meio do equipamento StepOne™ Plus Real Time PCR System (Life Technologies, USA). A sequência alvo utilizada foi a proteína de choque térmico de 70 kDa (hsp70), HSP70F (5'-AGGTGAAGGCGACGAACG-3') e HSP70R (5'-CGCTTGTCCATCTTTGCTTC-3'), adaptado a partir de Hernández *et al.* (2014) e as condições de ciclagem e concentrações de *primers* foram realizadas de acordo com padronização realizada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (Palmeira, 2022). O perfil de ciclagem constou de um ciclo de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15s, 62°C por 1 minuto e uma etapa para a curva de dissociação de 95°C por 15s, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15s. Foram utilizados 10 µl do reagente Power SYBR®Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,5 µl do *primer forward* (200nM), 0,75 µl do *primer reverse* (300nM), 11,75 µl de água ultrapura e 2 µl do DNA extraído.

A quantidade de DNA presente nas amostras foi expressa em relação à curva padrão de cada ensaio. Para a realização da curva-padrão foram utilizadas amostras de DNA de cepas de leishmanias procedentes da Coleção de leishmanias do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC FIOCRUZ - RJ, nas concentrações decrescentes de  $10^5$   $10^4$   $10^3$   $10^2$   $10^1$   $10^0$  parasitas/ml. Os resultados foram visualizados e analisados no programa StepOne™ Software v2.3. (Life Technologies, USA).

### 3.7. Geoprocessamento

De modo geral, foi utilizado o Sistema de Informação Geográfica ArcGIS 10. para a construção do banco de dados até a elaboração de alguns produtos cartográficos, com pequenas modificações perpassando

pelo software Office Excel 2010 e o Minitab 16.2.4.

O georreferenciamento foi realizado com base em informações de endereço de procedência ou por GPS (Global Positioning System). A geocodificação de endereços permitiu as análises de padrões de distribuição espacial dos casos com suporte da Saint Mary's University – Canadá.

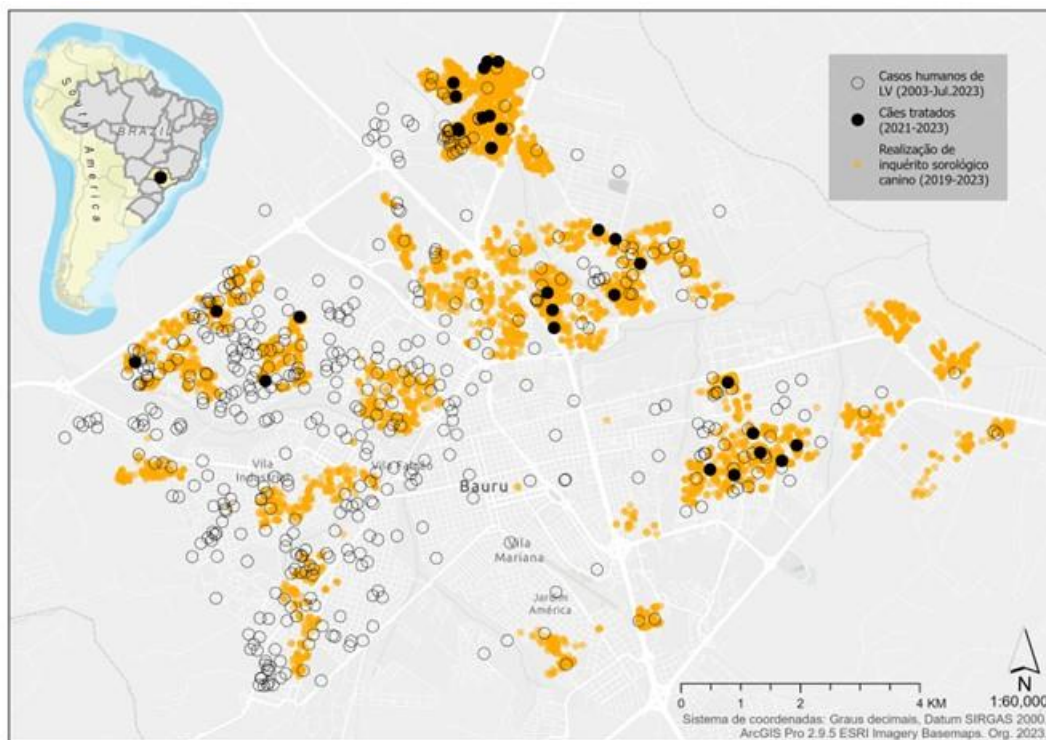
# Resultados

## 4. Resultados

Trinta e quatro animais foram selecionados para o tratamento e acompanhados no Centro de Controle de Zoonose de Bauru, local onde foram realizadas as avaliações clínicas e coleta de amostras para as avaliações laboratoriais. A figura 5 demonstra a localização geográfica desses animais, correlacionando com a série histórica (2003-julho 2023), referente a ocorrência de casos humanos de leishmaniose visceral.

**Figura 6:** Localização geográfica dos animais tratados para leishmaniose

visceral no município de Bauru, correlacionando com os casos de leishmaniose visceral humana.



**Fonte:** Patrícia Matsumoto, 2023

Destes cães, 13 (38,2%) eram fêmeas e 21 (61,8%) machos. A maior parte dos animais não tinha raça definida 28 (82,4%) e os outros seis (17,6%) estavam distribuídos entre as raças: 2 *Schnauzer*, 1 Pastor Alemão, 1 *Boxer*, 1 *Pinscher* e 1 Labrador. A idade variou de 1 a 14 anos, com 17 animais (50%) na faixa entre 1 e 6 anos e 17 animais (50%) entre 7 e 14 anos.

A figura 6 retrata os atendimentos e coleta de material para exames sorológicos, moleculares, hemograma completo e perfil renal ao longo do tratamento.

**Figura 7 (A e B):** Avaliação clínica dos cães e coleta de amostras biológicas para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral. A) cão acompanhado do seu

tutor durante o preenchimento dos formulários (*Form-in*), B) cão durante o atendimento, acompanhado de sua tutora.



**Fonte:** Arquivo pessoal, 2023

**Figura 6 (C a F):** Avaliação clínica dos cães e coleta de amostras biológicas para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral. C) cão durante a avaliação clínica, D) cão durante a coleta de sangue, acompanhado de seus tutores, E) coleta de sangue do cão por meio da punção da veia jugular, F) coleta de sangue do cão por meio da punção da veia cefálica.



**Fonte:** Arquivo pessoal, 2023

A Tabela 1 mostra os sinais clínicos comumente relatados para Leishmaniose Visceral Canina apresentados pelos cães durante as cinco fases do tratamento (tempos de 0 a 4).

**Tabela 1:** Dinâmica dos sinais clínicos comumente relatados para Leishmaniose Visceral Canina nos animais submetidos ao tratamento ao longo de 12 meses.

	Tempos Número de animais	Zero		1		2		3		4	
		34		30		27		22		19	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Sinais clínicos</b>	<b>Linfadenomegalia</b>	18	52,94	11	36,66	5	18,51	3	13,63	0	0,00
	Prurido	14	41,17	5	16,66	5	18,51	0	0,00	0	0,00
	<b>Conjuntivite</b>	10	29,41	4	13,33	4	14,81	2	9,09	1	5,26
	<b>Descamação</b>	10	29,41	3	10,00	4	14,81	0	0	0	0,00
	<b>Onicogribose</b>	8	23,52	5	16,66	4	14,81	2	9,09	0	0,00
	Perda de peso	6	17,64	4	13,33	1	3,70	0	0,00	1	5,26
	Ceratite	3	8,82	1	3,33	1	3,70	1	4,54	0	0,00
	Úlceras	2	6,00	2	20,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	Alopecia	1	3,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	Anorexia/hiporexia	1	3,00	1	3,33	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	Atrofia muscular	1	3,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	Claudicação	1	3,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	Hiperpigmentação	1	3,00	1	3,33	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	Mucosas hipocoradas	1	3,00	1	3,33	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	Epistaxis	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	4,54	0	0,00
	Febre	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	Sintomas neurológicos	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

Os animais foram avaliados no início do tratamento (T0) e no T1 (3 meses), T2 (6 meses), T3 (9 meses) e T4 (12 meses) após a primeira dose do tratamento.

As tabelas 2 a 6 demonstram os resultados dos exames laboratoriais, tais como hemograma, função renal, proteína total e frações. realizados ao longo do tratamento dos cães. Os valores de referência do laboratório clínico Laborcare sofrem variações de normalidade para algumas células, de acordo com a idade dos animais. Respeitamos esses valores para cada animal na mudança de faixa etária durante o tratamento de 1 ano.

**Tabela 2:** Exames laboratoriais realizados nos 34 cães com diagnóstico de LVC no início do tratamento. T.1

Valores	Normal	%	Aumentado	%	Diminuído	%	Não realizado
Hemácias	19	57,57	5	15,15	9	27,27	1
Hemoglobina	21	63,63	2	6,06	10	30,30	1
VG	18	54,54	6	18,18	9	27,27	1
VCM	32	96,96	1	3,03	0	0	1

HCM	31	93,93	1	3,03	1	3,03	1
CHCM	33	100,00	0	0	0	0	1
PT sangue	8	24,24	25	75,75	0	0	1
Leucócitos	30	90,90	0	0	3	9,09	1
Segmentado	26	78,78	2	6,06	5	15,15	1
Bastonetes	33	100,00	0	0	0	0	1
Basófilos	33	100,00	0	0	0	0	1
Monócitos	31	93,93	1	3,03	1	3,03	1
Eosinófilos	28	84,84	2	6,06	3	9,09	1
Linfócitos	26	78,78	0	0	7	21,21	1
Plaquetas	18	54,54	0	0	15	45,45	1
Ureia	25	73,52	6	17,64	3	8,82	-
Creatinina	33	100,00	1	2,94	0	0	-
PT soro	17	50,00	17	50,00	0	0	-
Albumina	16	47,05	2	5,88	16	47,05	-
Globulina	20	58,82	13	38,23	1	2,94	-
Relação A/G	23	67,64	1	2,94	10	29,11	-

VG: Volume Globular Médio, VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, PT: Proteína Total.

**Tabela 3:** Exames laboratoriais realizados nos 30 cães com diagnóstico de LVC, após três meses de tratamento. T.2

Valores	Normal	%	Aumentado	%	Diminuído	%	Não realizado
Hemácias	18	32,06	8	27,58	3	10,34	1
Hemoglobina	18	32,06	5	17,24	5	17,24	1
VG	17	58,62	7	24,13	5	17,24	1
VCM	29	100,00	0	0	0	0	1
HCM	29	100,00	0	0	0	0	1
CHCM	29	100,00	0	0	0	0	1
PT sangue	9	27,27	20	68,96	0	0	1
Leucócitos T	20	68,96	0	0	4	13,79	1
Segmentado	20	68,96	0	0	4	13,79	1
Bastonetes	29	100,00	0	0	0	0	1
Basófilos	29	100,00	0	0	0	0	1
Monócitos	27	93,10	2	6,89	0	0	1
Eosinófilos	20	68,96	4	13,79	5	17,24	1
Linfócitos	25	86,20	0	0	4	13,79	1
Plaquetas	18	62,06	0	0	11	37,93	1
Ureia	18	60,00	6	20,00	6	26,26	-
Creatinina	30	100,00	0	0	0	0	-
PT soro	13	43,43	16	53,53	1	3,33	-
Albumina	20	66,66	4	13,33	8	26,26	-
Globulina	17	56,66	11	36,66	2	6,66	-
Relação A/G	22	73,73	0	0	8	26,26	-

**Tabela 4:** Exames laboratoriais realizados nos 27 cães com diagnóstico de LVC, após seis meses de tratamento. T.3

Valores	Normal	%	Aumentado	%	Diminuído	%	Não realizado
Hemácias	12	48,00	10	40,00	3	12,00	1
Hemoglobina	14	56,00	7	28,00	4	16,00	1
VG	12	48,00	10	40,00	3	12,00	1

VCM	25	100,00	0	0	0	0	1
HCM	25	100,00	0	0	0	0	1
CHCM	25	100,00	0	0	0	0	1
PT sangue	10	40,00	15	60,00	0	0	1
Leucócitos T	19	76,00	0	0	6	24,00	1
Segmentado	22	88,00	0	0	3	12,00	1
Bastonetes	26	100,00	0	0	0	0	1
Basófilos	26	100,00	0	0	0	0	1
Monócitos	21	84,00	1	4,00	3	12,00	1
Eosinófilos	21	84,00	2	8,00	2	8,00	1
Linfócitos	19	76,00	0	0	6	24,00	1
Plaquetas	12	48,00	0	0	13	52,00	1
Ureia	21	80,76	2	7,69	3	11,53	-
Creatinina	25	96,15	1	3,84	0	0	-
PT soro	13	50,00	13	50,00	0	0	-
Albumina	12	46,15	8	30,76	6	23,07	-
Globulina	19	73,07	7	26,92	0	0	-
Relação A/G	19	73,07	0	0	7	26,92	-

**Tabela 5:** Exames laboratoriais realizados nos 22 cães com diagnóstico de LVC, após nove meses de tratamento. T.3

Valores	Normal	%	Aumentado	%	Diminuído	%	Não realizado
Hemácias	11	52,40	5	23,80	5	23,80	1
Hemoglobina	12	57,14	5	23,80	4	19,04	1
VG	17	80,95	1	4,76	3	14,28	1
VCM	21	100,00	0	0	0	0	1
HCM	21	100,00	0	0	0	0	1
CHCM	21	100,00	0	0	0	0	1
PT sangue	10	47,61	11	52,38	0	0	1
Leucócitos T	18	85,71	0	0	3	14,28	1
Segmentado	20	95,23	0	0	1	4,76	1
Bastonetes	0	0	0	0	0	0	1
Basófilos	0	0	0	0	0	0	1
Monócitos	18	85,71	0	0	3	14,28	1
Eosinófilos	18	85,71	1	4,76	2	9,52	1
Linfócitos	19	90,47	0	0	2	9,52	1
Plaquetas	10	47,61	0	0	11	52,38	1
Ureia	18	81,81	2	9,09	2	9,09	-
Creatinina	22	100,00	0	0	0	0	-
PT soro	10	45,45	12	54,54	0	0	-
Albumina	15	68,18	2	9,09	5	22,72	-
Globulina	14	63,63	7	31,81	1	4,54	-
Relação A/G	15	68,18	1	4,54	6	27,27	-

**Tabela 6:** Exames laboratoriais realizados nos 19 cães com diagnóstico de LVC, após doze meses de tratamento. T.4

Valores	Normal	%	Aumentado	%	Diminuído	%	Não realizados
Hemácias	15	78,94	0	0	3	15,78	1
Hemoglobina	11	57,89	4	21,05	3	15,78	1

VG	14	73,68	2	10,52	2	10,52	1
VCM	18	94,73	0	0	0	0	1
HCM	18	94,73	0	0	0	0	1
CHCM	18	94,73	0	0	0	0	1
PT sangue	17	89,47	10	52,63	0	0	1
Leucócitos T	14	73,68	0	0	4	21,05	1
Segmentado	16	84,21	0	0	2	10,52	1
Bastonetes	18	94,73	0	0	0	0	1
Basófilos	18	94,73	0	0	0	0	1
Monócitos	14	73,68	2	10,52	2	10,52	1
Eosinófilos	13	68,42	1	5,26	4	21,05	1
Linfócitos	13	68,42	0	0	5	26,31	1
Plaquetas	6	31,57	0	0	11	57,89	1
Ureia	14	73,68	3	15,78	1	5,26	1
Creatinina	17	89,47	1	5,26	0	0	1
PT soro	7	36,84	8	42,10	1	5,26	1
Albumina	10	52,63	4	21,05	4	21,05	1
Globulina	13	68,42	5	26,31	0	0	1
Relação A/G	13	68,42	0	0	5	26,31	1

A extração de DNA das amostras de sangue, soro e linfonodo dos cães em tratamento foi realizada e aquelas que apresentaram um baixo rendimento foram re-extraídas. A ausência de linfadenomegalia e a dificuldade na contenção dos cães (agressivos, inquietos) durante algumas fases do tratamento, afetaram a coleta de algumas amostras. A quantificação de DNA demonstrou pureza adequada (MATLOCK, 2015) com uma relação de absorvância 260/280 entre 1,8 e 2,0. Ao analisar a integridade do DNA extraído com *primers* que amplificam uma região conservada do gene GAPDH, todas as amostras amplificaram, demonstrando assim ausência de inibidores de DNA e consequente validação para utilização em nossos estudos (GILSBACH *et al.*, 2006; DE CASSIA-PIRES *et al.*, 2017).

Os exames de cPCR foram parcialmente analisados no Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública “Avaliação diagnóstica da aplicação da reação em cadeia da polimerase convencional em amostras biológicas de cães em tratamento para leishmaniose visceral no município de Bauru-SP”, porém foram compilados neste trabalho, juntamente com os dados de qPCR a fim de

uma comparação das técnicas diagnósticas.

A Figura 7 ilustra um gel de agarose com algumas amostras positivas na cPCR e a tabela 7 a distribuição da positividade para *Leishmania* spp. em diferentes amostras.

**Figura 8:** Gel de agarose a 1,5% utilizando os primers LinR4, Lin19 720 pb. 1) DNA Ladder Norgen 100pb, 2) cão 1 Sangue T0, 3) cão1 Soro T0, 4) cão 14 Sangue T0, 5) cão 14 Soro T0, 6) Cão 14 Linfonodo T0, 7) cão 21 Sangue T0, 8) cão 21 Soro T0, 9) cão 21 Linfonodo T0, 10) cão 20 Sangue T0, 11) cão 20 Soro T0, 12) cão 27 Linfonodo T0, 13) cão 27 Sangue T0, 14) cão 32 Soro T0, 15) cão 32 Linfonodo T0, 16) cão 32 Sangue T0, 17) Cão 32 Soro T0, - controle negativo, + controle positivo utilizando cepa padrão *Leishmania*.



**Tabela 7:** Distribuição da positividade para *Leishmania* spp. em diferentes amostras, na cPCR, em diferentes tempos de tratamento.

AMOSTRAS	T-0	T-1	T2	T3	T4
Sangue	32,35% (11/34)	16,66% (5/30)	11,11% (3/27)	4,54% (1/22)	5,26% (1/19)
Soro	11,76% (4/34)	3,33% (1/30)	7,4% (2/27)	4,54% (1/22)	5,26% (1/19)
Linfonodo	50% (9/18)	45,45% (5/11)	40% (2/5)	33,33% (1/3)	0% NR

Os animais foram avaliados no início do tratamento (T0) e no T1 (3 meses), T2 (6 meses), T3 (9 meses) e T4 (12 meses) após a primeira dose do tratamento.

A análise por cPCR de todos os animais nos períodos de tratamento avaliados estão descritos na tabela 8.

**Tabela 8:** Avaliação por PCR convencional dos cães em tratamento para leishmaniose ao longo do tratamento.

Cães	Tempo Zero				Tempo 1				Tempo 2				Tempo 3				1 ano de tratamento			
	Class. 1-7	Linf.	Sangue	Soro	Class. 1-7	Linf.	Sangue	Soro	Class. 1-7	Linf.	Sangue	Soro	Class. 1-7	Linf.	Sangue	Soro	Class. 1-7	Linf.	Sangue	Soro
1	4	N	N	N	3	NR	N	N	3	NR	N	N	3	NR	N	N	2	NR	N	N
2	1	NR	P	N	1	NR	P	N	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	3	NR	N	N	1	NR	P	N	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	4	P	N	N	2	P	N	N	2	N	N	N	1	N	N	N	1	NR	N	N
5	4	P	N	N	1	NR	N	N	1	NR	N	N	1	NR	N	N	1	NR	N	N
6	4	N	N	N	1	NR	N	N	1	NR	N	N	1	NR	N	N	1	NR	N	N
7	3	NR	N	N	1	NR	N	N	1	NR	N	N	1	NR	N	N	1	NR	N	N
8	3	NR	N	N	2	NR	N	N	2	NR	N	N	1	NR	N	N	1	NR	N	N
9	4	N	N	N	3	N	N	N	2	NR	N	N	2	NR	N	N	2	NR	N	N
10	3	NR	N	N	3	NR	N	N	3	NR	N	N	2	NR	N	N	1	NR	N	N
11	3	NR	N	N	3	P	N	N	1	NR	P	P	1	NR	P	P	2	NR	P	P
12	1	NR	N	N	1	NR	N	N	1	NR	N	N	1	NR	N	N	1	NR	N	N
13	4	N	N	N	1	N	N	N	1	NR	N	N	1	N	N	N	D	-	-	-
14	5	N	N	N	2	N	N	N	2	NR	N	N	2	NR	N	N	2	NR	N	N
15	4	NR	P	N	3	NR	N	N	3	NR	N	N	4	NR	N	N	4	NR	N	N
16	3	NR	P	N	4	NR	P	N	3	NR	N	N	3	NR	N	NR	3	NR	N	N
17	4	P	P	N	4	N	N	N	3	P	N	N	3	N	N	N	3	NR	N	N
18	4	NR	N	N	2	NR	N	N	2	NR	N	N	2	NR	N	N	2	NR	N	N
19	3	NR	N	N	3	NR	N	N	3	NR	N	N	3	NR	N	N	3	NR	N	N
20	5	P	P	N	5	P	P	N	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	5	P	P	N	4	N	N	N	4	NR	N	N	4	P	N	N	4	NR	N	N
22	5	N	N	N	4	NR	N	N	5	N	N	N	6	-	-	-	-	-	-	-
23	5	N	N	N	4	P	N	N	2	NR	N	N	2	NR	N	N	2	NR	N	N
24	3	NR	P	N	3	NR	N	N	3	NR	N	N	3	NR	NR	N	3	NR	N	N
25	5	NR	N	N	3	NR	N	N	5	NR	N	N	6	-	-	-	-	-	-	-
26	5	P	P	P	5	P	P	P	5	P	P	P	6	-	-	-	-	-	-	-
27	5	P	P	P	4	N	N	N	4	N	N	N	D	-	-	-	-	-	-	-
28	5	NR	N	N	5	NR	N	N	4	NR	P	N	D	-	-	-	-	-	-	-
29	5	P	P	P	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	2	NR	N	N	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	4	NR	N	N	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	4	N	N	N	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	4	P	P	P	4	NR	N	N	4	NR	N	N	4	NR	N	N	D	-	-	-
34	4	N	N	N	4	NR	N	N	4	NR	N	N	4	NR	N	N	D	-	-	-

**Legenda classificação de 1 a 7:** 1- Assintomático e sem alterações laboratoriais; 2 – Assintomático com até 2 alterações laboratoriais; 3- Assintomáticos com mais de 2 alterações laboratoriais; 4 – Oligossintomático (até 3 sintomas) com alterações laboratoriais; 5 – Sintomático (mais de 3 sintomas) com alterações laboratoriais; 6 – óbito por LVC; 7 – Óbito por outras causas. Linf. - Linfócito; N – Negativo; D – Desistência; NR – Não realizado; P – Positivo.

Em relação as análises por PCR em tempo real, a região hsp70 (70 kDa *heat shock proteins*) tem sido explorada para quantificação e identificação de *Leishmania* e pode ser utilizada para monitorar a amplificação do DNA do parasito e quantificar a carga parasitária em diferentes amostras. A tabela 9 demonstra a análise de qPCR de todos os animais nos períodos de tratamento avaliados.

**Tabela 9:** Avaliação da carga parasitária em parasitas/mL, realizada por PCR em tempo real dos cães em tratamento para leishmaniose ao longo do tratamento.

Cães	Tempo Zero				Tempo 1				Tempo 2				Tempo 3				1 ano de tratamento			
	Class. 1-7	Linf.	Sangue	Soro	Class. 1-7	Linf.	Sangue	Soro	Class. 1-7	Linf.	Sangue	Soro	Class. 1-7	Linf.	Sangue	Soro	Class. 1-7	Linf.	Sangue	Soro
1	3	4800	12	1539	3	NR	ND	ND	3	NR	ND	ND	3	NR	ND	ND	2	NR	NR	NR
2	1	NR	762	ND	1	NR	1121	ND	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	3	NR	41320	ND	1	NR	35450	ND	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	3	7503	>10	ND	2	7890	ND	ND	2	>10	ND	ND	1	NR	ND	ND	1	NR	ND	ND
5	3	15500	ND	ND	1	NR	ND	ND	1	NR	ND	ND	1	NR	ND	ND	1	NR	ND	ND
6	3	>10	ND	ND	1	NR	ND	1020	1	NR	100	ND	1	NR	ND	ND	1	NR	ND	ND
7	3	NR	11945	ND	1	NR	ND	ND	1	NR	NR	NR	1	NR	NR	NR	1	NR	ND	ND
8	3	NR	>10	ND	2	NR	>10	ND	2	NR	150	ND	1	NR	ND	ND	1	NR	ND	ND
9	3	1661	>10	ND	3	>10	ND	ND	2	NR	ND	ND	2	>10	ND	ND	2	NR	ND	ND
10	3	NR	ND	ND	3	NR	ND	ND	3	NR	ND	ND	2	NR	ND	ND	1	NR	ND	ND
11	3	NR	>10	ND	3	27890	>10	ND	1	NR	ND	5960	1	NR	25482	12039	2	NR	>10	>10
12	1	NR	ND	ND	1	NR	ND	ND	1	NR	ND	ND	1	NR	ND	ND	1	NR	ND	ND
13	1	1452	ND	>10	1	>10	ND	ND	1	NR	ND	ND	1	>10	ND	ND	7	-	-	-
14	5	>10	185	ND	2	>10	ND	ND	2	NR	ND	ND	2	NR	ND	ND	2	NR	ND	ND
15	4	NR	5698	1245	3	NR	ND	ND	3	NR	ND	ND	4	NR	ND	ND	4	NR	ND	ND
16	3	NR	5647	731	4	NR	ND	>10	3	NR	ND	ND	3	NR	ND	ND	3	NR	ND	ND
17	4	1000	1599	ND	4	16	ND	ND	3	>10	NR	ND	3	ND	ND	ND	3	NR	ND	ND
18	4	NR	>10	ND	2	NR	ND	ND	2	NR	ND	ND	2	NR	ND	1035	2	NR	ND	ND
19	3	NR	9171	5844	3	NR	ND	ND	3	NR	ND	ND	3	NR	ND	ND	3	NR	ND	ND
20	5	680000	354600	>10	5	NR	3070	2033	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	5	10032	134	>10	4	ND	ND	>10	4	NR	>10	ND	4	NR	ND	ND	4	NR	ND	ND
22	5	1035	ND	ND	4	NR	ND	ND	5	450	>10	>10	6	-	-	-	-	-	-	-
23	5	16448	ND	38	4	5690	ND	ND	2	NR	ND	ND	2	NR	ND	ND	2	NR	ND	ND
24	3	NR	1325	ND	3	NR	ND	ND	3	NR	ND	ND	3	NR	ND	1632	3	NR	ND	ND
25	5	NR	ND	>10	3	NR	ND	ND	5	NR	ND	ND	6	-	-	-	-	-	-	-
26	5	2580	8034	2356	5	2800	3860	3490	5	4500	2540	1020	6	-	-	-	-	-	-	-
27	5	10025	8450	6890	4	3560	2050	1050	4	>10	ND	ND	D	-	-	-	-	-	-	-
28	5	NR	ND	ND	5	NR	ND	ND	4	NR	2140	ND	D	-	-	-	-	-	-	-
29	5	1650	580	530	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	2	NR	ND	ND	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	4	NR	ND	ND	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	4	540	ND	ND	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	4	5870	1750	1500	4	NR	ND	ND	4	NR	ND	ND	4	NR	ND	ND	D	-	-	-
34	4	490	ND	ND	4	ND	ND	ND	4	NR	ND	ND	4	NR	ND	ND	D	-	-	-

**Legenda classificação de 1 a 7:** 1- Assintomático e sem alterações laboratoriais; 2 – Assintomático com até 2 alterações laboratoriais; 3- Assintomáticos com mais de 2 alterações laboratoriais; 4 – Oligossintomático (até 3 sintomas) com alterações laboratoriais; 5 – Sintomático (mais de 3 sintomas) com alterações laboratoriais; 6 – óbito por LVC; 7 – Óbito por outras causas. Linf. - Linfócito; N – Negativo; NC – Não compareceu; D – Desistência; NR – Não realizado; ND – Não Detectado.

Na tabela 10, consta a avaliação de custo médio para o tratamento de LVC, considerando um cão de 10 kg no período de 4 meses e sem intercorrências (necessidade de novos exames e medicamentos). Pela dificuldade no seu cálculo, aqui não foi contabilizado os custos dos honorários profissionais dos veterinários do município.

**Tabela 10:** Custo médio em reais do tratamento para LVC para um cão de 10 kg.

CUSTO MÉDIO EM REAIS DO TRATAMENTO DE LVC PARA UM CÃO DE 10 KG EM UM PERÍODO DE 4 MESES (set. 2023)	
Itens	Total
COLEIRA	80
MILTEFOSINA (frasco 30 mL)	800
ALOPURINOL (4 comprimidos de 100 mg/dia)	176
DOMPERIDONA (1 comprimidos 10mg/dia)	40
PREDNISONA (comprimido 5mg)	se necessário
HEMOGRAMA COMPLETO	31
PERFIL RENAL - UREIA E CREATININA	28
PROTEÍNA TOTAL E FRAÇÕES	25
Biologia molecular	120
<b>TOTAL</b>	<b>1.300</b>

# Discussão

## 5. Discussão

O grupo de estudos da LVC – BRASILEISH afirma que, na avaliação clínica dos animais para tratamento deve-se incluir o exame físico, e que este deve ser complementado com exames laboratoriais. Assim como observado por nós, as alterações hematológicas e bioquímicas nem sempre estão associadas aos sinais clínicos. Segundo orientação do grupo, que classifica os cães com LVC em estádios de I (sem doença) a V (doença grave), por meio de avaliação clínica e laboratorial com medicamentos disponíveis no Brasil; animais no estadio I (baixo título de anticorpos, sem sinais clínicos e sem alterações laboratoriais) não devem ser tratados. Sugerem apenas o uso de imunomoduladores.

Ao longo do tratamento foi possível observar que houve uma diminuição do número de animais analisados. Nos nossos estudos, a porcentagem de desistência do tratamento foi de 23,5% (8/34). A taxa de perda de animais ao longo de um período de análise é comum em estudos (REITHINGER *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2018). Em relação aos óbitos, Andrade *et al.* (2011) obtiveram 14,3% de óbitos de cães após o tratamento somente com miltefosina e Lisboa *et al.* (2018) 24% de óbito nos animais com o tratamento associado de miltefosina com alopurinol. Nos nossos estudos, foram sete óbitos, porém quatro (11,76%) ocorridos por LVC. Assim, nossos índices são considerados inferiores aos de outros estudos relacionados.

O tratamento de cães com miltefosina associada ao alopurinol vem sendo reportado por vários autores, com diferentes resultados (MANNA *et al.*, 2008; MIRÓ *et al.*, 2009; WOERLY *et al.*, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2019; IARUSSI *et al.*, 2020; AYRES *et al.*, 2022).

Segundo orientação do grupo LEISHVET, que também classifica os cães com LVC em estádios (segundo avaliação clínica e laboratorial) e com adesão de outros pesquisadores, animais no estadio I (baixo título de anticorpos e com somente um ou dois sintomas de LVC) não devem ser

tratados. Recomendam que sejam somente monitorados e medicados com Domperidona, pois afirmam que o tratamento pode causar um desequilíbrio na resposta imunológica (MIRÓ *et al.*, 2018, LEISHVET, 2018).

Alguns autores afirmaram que o término do tratamento deve ficar condicionado a três condições: desaparecimento dos sintomas, perfil hematológico, bioquímico e urinário normalizados e na avaliação sorológica (quantitativa) o resultado deve estar abaixo do valor de *cut-off* (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

Iniciamos os atendimentos com 34 animais (tempo zero) e, neste momento, a maior parte dos cães era oligossintomático - infecção subclínica. Segundo inúmeros autores, a doença clínica é bem menos frequente que a subclínica. Há relatos de que em regiões endêmicas ocorra 60% de prevalência de animais infectados detectado por diagnóstico molecular e somente 5% de doentes (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011; HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGO, 2017; MARCONDES; DAY, 2019, ALCOVER *et al.*, 2021).

Os efeitos colaterais observados com o uso da miltefosina foram a hiporexia e vômito, ambos transitórios e autolimitantes; mesmo quando administradas em doses mais altas. Embora também transitórios, outros trabalhos relataram dor abdominal e diarreia (MATEO *et al.*, 2009; WOERLY *et al.*, 2009; DORLO *et al.*, 2012; IARUSSI *et al.*, 2020).

Os eventos adversos, segundo autores citados abaixo, estão relacionados à ação direta do fármaco no sistema gastrointestinal e não devido a alterações sistêmicas; com baixo impacto no que se refere à função renal e hepática. Os tutores dos cães foram orientados para que administrassem a droga no horário das refeições principais, pois a gordura do alimento minimiza os efeitos colaterais descritos; causados pela ação detergente do medicamento. Presumiu-se também que ocorra degradação de colina por fosfolipases *in loco*, elemento essencial para a proteção do revestimento do epitélio gastrointestinal (SINDERMANN; ENGEL, 2006;

BIANCIARDI *et al.*, 2009; WOERLY *et al.*, 2009; DORLO *et al.*, 2012; SANTOS; RIBEIRO; CONTI, 2020).

Os sintomas que predominaram no início do tratamento foram: linfadenomegalia (poplíteo), onicogrifose, conjuntivite e sinais cutâneos de descamação, o que corroboram aos achados de outros autores. (CIAMARELLA *et al.*, 1997; AMUSATEGUI *et al.*, 2003; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011, MELÉNDEZZ-LAZO *et al.*, 2018; AYRES *et al.*, 2022).

Iniciamos a segunda etapa de avaliação (tempo 1) com 30 animais. Um deles iniciou o tratamento já com a doença avançada e em poucos dias foi a óbito por LVC, não completando os 28 dias de tratamento com a miltefosina. Os outros três animais deixaram de participar do projeto, um tutor não alegou o motivo da desistência, o outro referiu que seu animal possuía doença concomitante e decidiu continuar o tratamento com veterinário particular e o outro alegou dificuldade no transporte do animal, pois tratava-se de um cão de porte grande e obeso. Neste momento, houve melhora da maioria dos animais que permaneceram, com predomínio dos sintomas da fase anterior.

Na terceira fase (tempo 2), 27 animais foram avaliados: houve três óbitos, sendo um supostamente por cinomose por meio de diagnóstico clínico, pois o cão apresentou quadro neurológico precedido por quadro respiratório e sem histórico vacinal. Seus exames laboratoriais estavam sem alteração compatível com LVC. Um animal teve morte súbita, provavelmente relacionada ao avanço da idade. O terceiro animal foi a óbito, após um procedimento cirúrgico em clínica particular.

Na quarta fase (tempo 3), 22 animais foram atendidos e os sintomas que prevaleceram foram linfadenomegalia, conjuntivite e onicogrifose com frequência de 13,63%, 9,09% e 9,09% respectivamente.

Embora existam muitos trabalhos referindo a melhora dos sinais clínicos, há persistência de alguns sintomas durante e ao término do

tratamento. Os mais frequentes são linfadenomegalia e dermatite (MIRÓ *et al.*, 2009; IARUSSI *et al.*, 2020), linfadenomegalia e conjuntivite (DIAS *et al.*, 2021), linfadenomegalia, dermatites e alterações oftálmicas (AYRES; ALMEIDA, 2022). Não há relatos de remissão completa dos sintomas associada à ausência de alterações laboratoriais (ANDRADE *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2020).

Estudos prospectivos avaliaram cães com LVC sem tratamento por períodos que variaram de um a seis anos e observaram um declínio natural dos sintomas, com persistência de linfadenomegalia, conjuntivite, onicogribose, linfadenomegalia e esplenomegalia (COSTA *et al.*, 2013; ABBEHUSEN *et al.*, 2017).

Dos cinco animais que não foram acompanhados nesta fase, três ocorreram por óbito e dois abandonaram o tratamento. Um tutor alegou que seu animal não estava melhorando, porém tratava-se um quadro de insuficiência renal desenvolvida durante o tratamento e desta forma, foi orientada a introduzir ração terapêutica renal e realização de fluidoterapia em clínica veterinária particular. O outro tutor alegou dificuldade de transporte.

Na última etapa (tempo 4) permaneceram 19 animais. Três animais foram retirados do tratamento por não comparecerem nas avaliações agendadas. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos utilizando miltefosina associada ao alopurinol para tratamento de LVC. Melhora significativa dos sintomas foi observada em 55% dos animais (MIRÓ *et al.*, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2019).

Ao término da avaliação com um ano de tratamento, foi observada ausência de sinais clínicos relacionados à LVC nos 19 animais; entretanto uma fêmea apresentou emagrecimento pois desenvolveu pseudociese e outro manteve sinais de conjuntivite crônica que foi acompanhada desde a primeira avaliação.

Na primeira avaliação (tempo zero), as alterações hematológicas

mais frequentes observadas foram diminuição moderada do número de hemácias em 27,27% dos animais, assim como na concentração de hemoglobina (30,30%), volume globular (27,27%) e plaquetas (45,45%). Os valores de hemácias, hemoglobina e VG melhoraram durante a evolução do tratamento, corroborando com os dados da literatura (CIAMARELLA *et al.*, 1997; AMUSATEGUI *et al.*, 2002; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014; MELÉNDEZZ-LAZO *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2020, CABRÉ *et al.*, 2021).

Houve poucas alterações na série branca, fato também observado por outros autores (CIARAMELLA *et al.*, 1997; KOUTINAS *et al.*, 2001; GASKIN *et al.*, 2002; CORONA *et al.*, 2004). As plaquetas mantiveram-se diminuídas durante e ao final da avaliação, com porcentagens de T0- 45,45%, T1- 37,93%, T2-52%, T3-52,38% e T4- 57,89% dos cães, assim como relatado por outros autores (SANTOS; RIBEIRO; CONTI, 2020).

As causas de trombocitopenia na LVC estão relacionadas à depleção da trombocitopoese, fatores imunomediados, destruição plaquetária e vasculite (CIARAMELLA *et al.*, 2005; TERRAZANO *et al.*, 2006; FREITAS *et al.*, 2012). A persistência da trombocitopenia poderia estar relacionada à venopunção traumática, conforme relatada e denominada pseudotrombocitopenia (WILLS; WARDROP, 2008). Nos cães com LVC, a anemia pode ser explicada pela cronicidade da doença, insuficiência renal crônica, sangramentos (*epistaxis*, gastroenterites), depressão de medula óssea, hemólise imunomediada e diminuição da fluidez lipídica da membrana eritrocitária e posterior sequestro esplênico (KOUTINAS *et al.*, 1999; DE LUNA *et al.*, 2000; TRÓPIA DE ABREU *et al.*, 2011).

No nosso trabalho, dos quatro tutores cujos animais foram a óbito por LVC, três mostraram-se poucos comprometidos com o tratamento. Os cães apresentavam anemia associada à insuficiência renal desenvolvida ao longo do tempo. Os valores apresentados foram de: hemácias

(milhões/mm<sup>3</sup>), hemoglobina (g/dl) e volume globular (%): animal 1 - 3,1; 6,8 e 20, animal 2 - 2,9; 6,2 e 19, animal 3 - 2,41; 5,6 e 17, animal 4 - 5,2; 10,9 e 33, respectivamente.

No início do tratamento, os níveis de proteína total estavam aumentados em 50% dos cães, a albumina diminuída em 47,05% e a globulina aumentada em 38,23% deles. A relação albumina-globulina (A/G) ficou diminuída em 29,11% dos animais avaliados, resultados amplamente descritos na literatura como o achado laboratorial mais encontrado na LVC (CIAMARELLA *et al.*, 1997; ANDRADE *et al.*, 2011; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014, DA SILVA *et al.*, 2018).

A proteína sérica elevada ocorre devido à hiperglobulinemia e pode estar associada à hipoalbuminemia (proteinúria, desnutrição) (KOUTINAS *et al.*, 1999). A redução dos títulos de anticorpos para níveis não significativos, segundo alguns autores, ocorre ao longo do tempo, com a terapia continuada com alopurinol e não está relacionada à melhora clínica (MIRÓ *et al.*, 2009; IARUSSI *et al.*, 2020).

Ao término do tratamento, os valores de hemácias e volume globular melhoraram, entretanto houve leve diminuição nos de hemoglobina, com 78,94%, 73,68% e 57,89% respectivamente de frequência de normalidade. As plaquetas mantiveram-se diminuídas em 57,89% dos animais. Os valores de ureia mantiveram-se constantes, com pequena piora nos valores de creatinina (T0-100% normais, T4-89,47%).

A elevação nos índices de creatinina pode ser explicada por acúmulo de precipitado antígeno-anticorpo nos néfrons e não pela miltefosina, haja vista que a droga não é nefrotóxica (ESCH *et al.*, 2015; DORLO *et al.*, 2012).

Já, a PT (proteína total) manteve-se alta em 42,10% dos animais; a albumina diminuída em 47,05 % no tempo zero e em 21,05% no tempo quatro. A globulina apresentou-se aumentada em 38,23% dos animais no T0 e em 26,31% no T4. A relação albumina/ globulina manteve-se baixa,

variando de 29,11% no T0 a 26,31% no T4.

De um modo geral, podemos afirmar que houve melhora nos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais; levando-se em consideração que os níveis aumentados de proteína total e diminuídos da relação A/G estão diretamente relacionados com a quantidade de anticorpos, que tende a diminuir tardiamente (MIRÓ *et al.*, 2009; IARUSSI *et al.*, 2020).

Alguns autores referiram melhora na maioria dos índices hematológicos e bioquímicos (BIANCIARDI *et al.*, 2009; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2016; IARUSSI *et al.*, 2020; SANTOS; RIBEIRO; CONTI, 2020). Dias *et al.* (2020) e Mateo *et al.* (2009), obtiveram os mesmos resultados, com exceção dos níveis de globulinas e da relação A/G que se mantiveram altos.

Outros obtiveram melhora em 56% dos animais tratados nos valores hematimétricos; entretanto a relação A/G melhorou somente em 25% (WOERLY *et al.*, 2009)

Pesquisas apontaram que os valores de hemácias, globulinas e relação A/G seriam os mais importantes para acompanhamento do tratamento (KOUTINAS *et al.*, 2001; IARUSSI *et al.*, 2020). Outros autores afirmaram ser a relação A/G o melhor parâmetro para a avaliação clínica dos animais (AMUSATEGUI *et al.*, 2003; COSTA VAL, 2004; REIS *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2013).

Dos quatro óbitos relacionados ao avanço da LVC, as possíveis causas observadas foram: equívocos na administração da medicação pelo tutor - sub ou sobredoses, descontinuidade do tratamento, dificuldade de entendimento dos intervalos entre as doses e a posologia; pouco interesse – pouco vínculo entre o tutor e seu cão, falta de compreensão da importância do tratamento para o animal e para saúde pública; perda do medicamento; ausência nos retornos agendados – sem acompanhamento clínico e laboratorial necessários; dificuldades socioeconômicas diversas –

falta de recursos financeiros para exames complementares em animais com suspeita de comorbidades e para abastecer o veículo e transportar seu animal (PROVÉRPIO *et al.*, 2014). De acordo com todas as dificuldades elencadas acima, entendemos que não podemos imputar os óbitos ocorridos à ineficácia das drogas utilizadas e sim a outros fatores extrínsecos que prejudicaram a eficiência do tratamento.

As amostras de sangue são consideradas menos invasivas e, por esta razão, bem aceita pelos tutores dos animais; além de apresentarem boa sensibilidade, segundo alguns autores. São uma boa opção para o diagnóstico em larga escala (MAIA *et al.*, 2009). Entretanto, não são adequadas para acompanhamento de tratamento devido à transitoriedade da parasitemia durante o curso da doença, devendo ser substituída por outros tecidos - aspirado de linfonodo ou biópsia de pele. Destacaram ainda que, embora o linfonodo seja um bom tecido, ele precisa estar aumentado o suficiente para a realização da punção aspirativa; fato que geralmente não ocorre em cães assintomáticos (MANNA *et al.*, 2004; MOHAMMADIHA *et al.*, 2012).

A urina também pode ser uma boa opção, tanto para diagnóstico, quanto para acompanhamento de tratamento quando há evolução da doença para nefropatia associada ou não à hematuria. Não é considerada invasiva e, nesses casos, a carga parasitária pode ser alta e maior que nas amostras de sangue (MANNA *et al.*, 2008).

Outros autores afirmaram que a presença do parasito no sangue e soro são inconsistentes (MAIA *et al.*, 2009; TSOKANA *et al.*, 2014; DANTAS-TORRES *et al.*, 2017). Nos nossos estudos, verificamos que as amostras provenientes das punções de linfonodos mostraram-se como o melhor tipo de tecido para diagnóstico e acompanhamento de tratamento da LVC (MANNA *et al.*, 2009).

Estudos realizados consideram o baço e os linfonodos são as melhores amostras para diagnóstico, por serem tecidos de eleição da

leishmania (invasão e multiplicação) e que o aspirado de medula óssea poderia ser uma opção quando o animal não apresentar linfadenomegalia; embora existam variações na distribuição dos parasitos nesse tecido, podendo alterar os resultados da carga parasitária (MAIA *et al.*, 2009).

Na nossa pesquisa, a ausência de linfadenomegalia em alguns animais afetou a avaliação molecular da carga parasitária no referido tecido. No tempo zero, estava ausente em 46,7% dos animais, no tempo 1 em 63,64%, no tempo 2 em 81,49% e no tempo 4 em 100%, concordando com Manna *et al.* (2004).

Assim, dos animais soropositivos avaliados, 47,06% foram positivos na cPCR em pelo menos uma das amostras avaliadas (sangue, soro ou linfonodo). De acordo com Lopes *et al.* (2016), a cPCR é um método bastante eficiente, apresentando resultados melhores quando se utiliza mais de uma amostra do mesmo animal, isto porque algumas amostras biológicas são mais sensíveis do que as outras. Outro ponto importante a se destacar é que a associação entre duas amostras aumenta a sensibilidade do diagnóstico molecular da leishmaniose.

Em áreas endêmicas, normalmente os exames sorológicos já apresentam sensibilidade maior, pois há uma grande exposição do cão ao parasito (MARTINEZ *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2017). Em uma região endêmica de Pernambuco, os valores de positividade obtidos nos testes sorológicos foram 71,4% (127/178) com TR-DPP®, 70,2% (125/178) EIE e 50,6% (90/178) com RIFI e nos testes moleculares, a positividade foi de 20,2% (36/178) na cPCR e 38,8% (69/178) na qPCR (EVARISTO *et al.*, 2021). Já, em um trabalho na mesma região de estudo nossa, ao realizar os ensaios moleculares nas amostras TR-DPP® positivas, foi identificado 63,9% amostras positivas para cPCR e 65% para qPCR (PAIVA-CAVALCANTI; RÉGIS-DA-SILVA; GOMES, 2010; RAMOS-AUGUSTO, 2018).

O desempenho da cPCR ainda é assunto em discussão nas

leishmanioses, pois alguns autores apresentaram resultados com alta sensibilidade (FISA *et al.*, 2001; LACHAUD *et al.*, 2002; MANNA *et al.* 2004), enquanto outros demonstraram menor sensibilidade quando comparada à qPCR; além de afirmarem que a técnica de cPCR exige a realização da eletroforese (corrida em gel de agarose), do risco de contaminação das amostras e de intoxicação do pesquisador pela presença do reagente brometo de etídeo (RAMOS *et al.*; 2012; BORJA *et al.*, 2016).

Além disso, alguns fatores podem interferir na PCR, entre eles a presença de inibidores, fatores relacionados aos *primers* e ao protocolo de extração do DNA, bem como a sensibilidade da cPCR pode depender do tipo de amostra avaliada (SILVA *et al.*, 2017).

A carga parasitária no sangue tende a variar no decorrer do tempo, podendo apresentar resultados falsos negativos caso a coleta seja feita no momento em que estiver baixa (STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004). Ademais, o sangue é um tecido de passagem, pois o parasito tem predileção por órgãos como linfonodo, fígado, baço, medula e pele (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Desta forma, a detecção de DNA pode ser menor em relação aos demais tecidos, devido à baixa e transitória parasitemia (LOPES *et al.*, 2017; RIBOLDI *et al.*, 2018).

Em um trabalho, foi avaliada a carga parasitária comparando amostras de pele, linfonodo, medula óssea e *swab* conjuntival. A pele foi a que demonstrou melhor resultado com maior quantidade de parasitos e o *swab* conjuntival o pior. Observaram que a sensibilidade das amostras de linfonodo e medula óssea foi a mesma na maioria dos animais com LVC (CHAGAS *et al.*, 2021). Há que ser considerado que a coleta da amostra de linfonodo é bem menos invasiva e mais rápida na sua execução quando comparada à de medula óssea (MARCELINO *et al.*, 2020).

Amostras de pele, na opinião de vários autores, possibilitam a avaliação do risco de transmissão do vetor para o cão e são a melhor opção para diagnóstico e acompanhamento da infecção quando comparadas às

amostras de sangue e baço (CHAGAS *et al.*, 2021; SCORZA *et al.*, 2021; AYRES *et al.*, 2022). Porém, esses estudos são recentes e no momento do desenho experimental do nosso trabalho, não foi incluída a coleta de pele.

Assim, o trabalho demonstrou que a qPCR é um bom método tanto para o diagnóstico complementar a ser utilizado no monitoramento de cães positivos, confirmando os diagnósticos sorológicos de leishmaniose, quanto para o monitoramento da carga parasitária ao longo do tratamento e que o linfonodo é a melhor amostra para o diagnóstico quando a coleta de material é possível.

Importante salientar que a aplicabilidade do diagnóstico da LVC por biologia molecular ainda não é uma realidade para muitos laboratórios, que não possuem estrutura física, equipamentos e reagentes, além de recursos humanos treinados (LOPES *et al.*, 2017; TRAVI *et al.*, 2018), porém esse diagnóstico pode contribuir com as ações de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Canina de forma mais assertiva e eficiente num futuro próximo.

Realizamos nossas atividades em condições de campo na dependência de que os tutores comparecessem nos retornos agendados no decorrer de um ano, que administrassem os fármacos fornecidos gratuitamente e seguindo rigorosamente a prescrição dos mesmos (acondicionamento, dose, horário, às refeições), que monitorassem seus cães quanto a quaisquer eventos adversos decorrentes da medicação e/ou do uso da coleira, que informassem por meio de contato via telefone (celular particular disponibilizado em tempo integral) a respeito de dúvidas ou agravamento dos sintomas, que mantivessem seus animais fazendo uso da coleira de deltametrina em tempo integral e respeitando o intervalos de troca (conforme orientação do fabricante).

Entretanto, tal parceria não foi unânime nem ocorreu em tempo integral. Para realizarmos os agendamentos, foram necessários vários contatos, pois os celulares dos tutores encontravam-se desligados, fora

de área de cobertura ou não atendiam. Alegavam estarem em horário de trabalho. A comunicação via *WhatsApp* também foi difícil.

Após agendados e confirmados dia e horário dos atendimentos, alguns não compareciam e não avisavam a impossibilidade do comparecimento; e, quando o faziam, não havia tempo hábil para agendarmos outra avaliação.

Houve muita dificuldade na compreensão da dosagem, do intervalo entre a administração dos fármacos e da necessidade de a miltefosina ser administrada logo após a refeição. Ocorreram relatos de intervalos irregulares, sub e sobredosagens, motivos pelos quais acreditamos serem as causas das intercorrências do tratamento em alguns cães e dos sinais clínicos gastrointestinais ocasionados pela sobredose. Um dos tutores perdeu os medicamentos fornecidos e outra tutora relatou que administrava “sempre que se lembrava”.

Apesar de todas as recomendações sobre a importância do uso da coleira impregnada com deltametrina (como medida de saúde pública e para evitar reinfecção) serem exaustivamente reforçadas, houve relatos de perdas, retiradas desnecessárias e até o roubo.

O número do meu celular particular foi disponibilizado a todos os tutores e pouquíssimas vezes utilizavam esse recurso para tirarem suas dúvidas.

Levando-se em conta todas as dificuldades encontradas em relação ao comportamento de parte dos tutores e o custo estimado total quadrimestral (descrito abaixo) para avaliação dos animais, concluímos que, diante da possibilidade de o poder público assumir o financiamento do tratamento; este somente deve ser realizado após criteriosa avaliação.

O estudo que foi idealizado para ser longitudinal, devido às mortes, abandonos e impossibilidade de realização de alguns testes, interferiu na análise estatística dos nossos resultados e desta forma, os dados foram analisados na forma descritiva.

Além disso, devido às regras impostas de quarentena e afastamento social decorrentes da pandemia da COVID-19 e, à crise econômica instalada, nosso projeto de pesquisa foi impactado. Houve desabastecimento de insumos (coleira impregnada com deltametrina e kits de biologia molecular) e interrupção dos trabalhos de campo (inquérito sorológico), de acordo com recomendações do Ministério da Saúde – Nota Técnica nº 11/2020-CGARB/DEIDT/SVS/MS; primordiais para o início das atividades práticas. O tratamento, especificamente, iniciou-se somente em novembro de 2021 e desta forma, as análises laboratoriais previstas no projeto também foram adiadas, devido à priorização do diagnóstico molecular para SARS-CoV-2 e outras demandas de pesquisa que tiveram que ser reagendadas no Instituto Adolfo Lutz de Bauru.

# Conclusões

## 6. Conclusões

- A miltefosina mostrou-se um fármaco seguro e eficaz no controle da LVC na maioria dos cães tratados.
- Os 34 animais foram selecionados de quatro bairros (Pousada das Esperança, Geisel, Beija-Flor e Jaraguá) com maior

prevalência para LVC.

- De forma geral, houve melhora dos parâmetros laboratoriais dos 19 animais que finalizaram o tratamento.
- Grande parte dos tutores pareceu ter bastante dificuldade na compreensão das informações repassadas, na valorização do projeto e pouco vínculo com seus cães; o que pode ter interferido na eficácia do tratamento dos mesmos. Contudo, coincidentemente, os tutores dos 19 animais que finalizaram o tratamento mostraram-se comprometidos, preocupados com a saúde dos seus animais e com a pesquisa.
- A qPCR mostrou-se um método molecular mais sensível que a cPCR no acompanhamento da carga parasitária ao longo do tratamento. A amostra de maior sensibilidade foi o linfonodo, quando está aumentado de tamanho para a realização da punção aspirativa.
- Houve redução da carga parasitária de *Leishmania* spp. por meio de PCR em tempo real ao longo de 12 meses de tratamento.

# Referências

## 7. Referências

ABBEHUSEN, M. M. C. *et al.* Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Scientific Reports**, v. 7: 15914, 2017.  
[DOI:10.1038/s4159801715651-8.](https://doi.org/10.1038/s4159801715651-8)

ABRANCHES, P. *et al.* An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite immunology**, Oxford, v.13, n. 5, p .537-550, 1991.

ABRANCHES, P.; CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G. M. Leishmaniose Canina: novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da Leishmaniose Visceral Humana, **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v.11, p. 871-875, 1998.

AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion o Leishmania Parasites and Sandflies, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Nice, França, v.10(3): e0004349, 2016. [doi:10.1371/journal.pntd.0004349](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349).

ALCOVER, M.M. *et al.* A cross-sectional study of *Leishmania infantum* infection in stray cats in the city of Zaragoza (Spain) using serology and PCR. **Parasites Vectors**, 14, 178, 2021.

ALIAGA, L. *et al.* Asymptomatic Leishmania infection in blood donors from the Southern of Spain. **Infection**, Granada, Espanha, 2019. <https://doi.org/10.1007/s15010-019-01297-3>

ALVAR, J. *et al.* Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 88, n. 4, p. 371-378,1994.

ALVAR, J. *et al.* Canine leishmaniasis, **Advances in Parasitology**, Espanha, v. 57, p.1-88, 2004.

ALVAR, J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, Genebra, v. 21, p. 334–59, 2008.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, **PLOS One**, Austrália, v. 7, e35671, 2012.

ALVARENGA, J.F.C. *et al.* KDNA Genetic Signatures Obtained by LSSPPCR analysis of *Leishmania infantum* (*Leishmania*) isolated from The New and the Old World. **PLOS ONE**, Belo Horizonte, v. 7, n. 8, 2012.

ALVAREZ, O. E. **Spliced Leader (SL) RNA**: análises de genes e regiões intergênicas com aportes na filogenia, taxonomia e genotipagem de *Trypanosoma* spp. de todas as classes de vertebrados. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

ALVES, W.; BEVILACQUA, P. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

AMUSATEGUI, I. *et al.* Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, v.18, n. 2, p. 147–156, 2003.  
[doi:10.1023/a:1023090929302](https://doi.org/10.1023/a:1023090929302)

ANDRADE, H.M. *et al.* Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 83–90, 2011.

ANDRADE, H. M. *et al.* Use of PCR-RFLPv. to identify *Leishmania* species in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 3-4, p. 231-238, 2006.

ARANSAY *et al.* Detection and identification of *Leishmania* DNA within Naturally infected Sand Flies by Seminested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. **Applied Environmental Microbiology**. v.66, n.5, p. 1933-1938, 2000.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis Reservoirs and Their Significance in Control. **Clinics in Dermatology**, England, v. 14, p. 523-522, 1996.

AYRES, E.C.B.S.; ALMEIDA, A.B.P.F. Impacto clínico e parasitológico do tratamento de curta duração com miltefosina e alopurinol em monoterapia ou terapia combinada na leishmaniose visceral canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Mato Grosso, Brasil, v. 31(3), 2022. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022040>

BANETH, G. A review of the treatment of canine leishmaniasis. In: **Canine leishmaniasis: moving toward a solution**. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain, 2002. p.15-19.

BANETH, G. Canine leishmaniasis: Bridging science, public health and politics. **The Veterinary Journal**, Israel, v.198, p. 9–10, 2013.

BANETH, G. *et al.* Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 24, n.7, p.324-330, 2008.

BANETH, G. *et al.* Leishmania infection in cats and dogs housed together in an animal shelter reveals a higher parasite load in infected dogs despite a greater seroprevalence among cats. **Parasites Vectors**, Israel, v. 13(1):115, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3989-3>

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.106, n. 4, p. 315-324, 2002.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 52, p. 1359 –1375, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.06.012>

BARATA, R. A. Cem anos de endemias e epidemias. **Ciência & Saúde Coletiva**, São Paulo, v. 5 (2), p. 333-45, 2000. DOI:10.1590/S1413-81232000000200008

BARATA, R. A. *et al.* Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 481-487, 2004.

BARATA, R. A. *et al.* Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Minas Gerais, v. 38(5), p. 421-425, 2005.

BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, Liverpool, v. 37(10), p. 1097–106, 2007.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 10, n. 3, p. 560-586, 1988.

BERCZI, I.; BERTÓK, L.; CHOW, D. A. Natural immunity and neuroimmune host defense. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 917, p. 248-257, 2000.

BERRAHAL, F. *et al.* Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55(3), p. 273-7, 1996.

BIANCIARDI, P. *et al.* Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy dogs: clinicopathological evaluation of the impact on the kidneys. **Toxicologic Pathology**, v. 37, p. 770–5. [doi:](#)

10.1177/0192623309344088

BORJA, L. S. *et al.* A carga parasitária no sangue e na pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* está correlacionada com sua capacidade de infectar vetores de flebotomíneos. **Veterinary Parasitology**, v. 229, p.110-117, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde, Ministério da Agropecuária, Pecuária e Abastecimento. **Portaria interministerial** nº 1.426, de 11 de julho de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceral\\_1edicao.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf)

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ministério da Saúde. **Nota Técnica Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA**, 2016. Disponível em: <http://www.sbmt.org.br/portal/wpcontent/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>.

BRASIL. Classificação epidemiológica dos municípios do Estado de São Paulo segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2018. **Boletim Epidemiológico Paulista**, 2019, v.16, n.192, p. 29-46. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/BEPA182/issue/view/2260/82>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**, 3. ed. Brasília, 2019. [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_3ed.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf).

BRASILEISH. GRUPO DE ESTUDO DE LEISHMANIOSE ANIMAL, 2018.

BRODSKYN, C.; KAMHAWI, S. Biomarkers for Zoonotic Visceral Leishmaniasis in Latin America. **Front Cell Infect Microbiology**, Salvador, v. 8:245, 2018. [doi: 10.3389/fcimb.2018.00245](https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00245)

BURZA, S.; CROFT, S.L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, Londres, v. 392, p. 951-970, 2018. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)

- CABRÉ, M. *et al.* Is signalment associated with clinicopathological findings in dogs with leishmaniosis? **Veterinary Record**; e451, 2021.
- CAMARGO-NEVES, V. L. F.; Katz, G. Leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 32 (Supl.II), p. 63-4, 1999.
- CARDOSO, J. M. O. *et al.* IL-10 receptor blockade controls the in vitro infectivity of *Leishmania infantum* and promotes a Th1 activation in PBMC of dogs with visceral leishmaniasis. **Molecular Immunology**, Ouro Preto, v.137, p. 20–27, 2021.
- CASTILHO, T.M. *et al.* A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, São Paulo, v. 78(1), p. 122–132, 2008.
- CASTRO, L. *et al.* *Leishmania* presence in bats in areas endemic for leishmaniasis in central-west Brazil. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, **Campo Grande**, v.11, p. 261-267, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.02.008>
- CECCARELLI, M. *et al.*, 2014. Detection and characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. **PLoS One**, Italy, v. 9: e88845, 2014.
- CERBINO NETO, J.; WERNECK, G. L.; COSTA, C.H.N. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25(7), p. 1543-51, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2009000700012>
- CHAGAS, E. *et al.* Leishmaniose visceral americana: relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937.
- CHAGAS, U.M.R. *et al.* Correlations between tissue parasite load and common clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, Minas Gerais, v. 291, 109368, 2021.
- CHELBI, I. *et al.* Enhanced attraction of sand fly vectors of *Leishmania infantum* to dogs infected with zoonotic visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 11: e0009947.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009947>

CIARAMELLA, P. *et al.*, “A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*,” **Veterinary Record**, vol. 141, no. 21, p. 539–543, 1997.

CORONA, M. *et al.* Haemostatic Disorders in Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Research Communications**, v. 28, p. 331–334, 2004.

CORTESE, L. *et al.* An immune-modulating diet increases the regulatory T cells. and reduces T helper 1 inflammatory response in Leishmaniosis affected dogs treated with standard therapy. **BMC Veterinary Research**, London, v. 11, p. 295, 2015.

COSTA, A. I. P. *et al.* Atualização da distribuição geográfica e o primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil; notas e informações. **Revista de Saúde Pública**; v. 31(6), p. 632-3, 1997.

COSTA, C.H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brazil, v. 44, p. 232-242, 2011.

COSTA, D. J. D. J. *et al.* Experimental Infection of Dogs with *Leishmania* and Saliva as a Model to Study Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS One**, v. 8, n. 4, 2013. e60535 - [doi:10.1371/journal.pone.0060535](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060535).

COURA-VITAL, W. *et al.* Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLOS One**, Ouro Preto, v. 9, e91009, 2014. [doi:10.1371/journal.pone.0091009](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091009)

COUTINHO, M. T. Z. *et al.* Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Belo Horizonte, v. 128, p. 149 –155, 2005.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; DUCHÊNE. M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 126, n. 2, p.165-172, 2003.

CVE. **Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”**. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilanciaepidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/>. Acesso em: 22/04/22.

**CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”.**

Disponível em: <https://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/agravos-de-a-z/indice-de-a-z>. Acesso em 14/07/2023 <https://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/agravos-de-a-z/indice-de-a-z>. Acesso em 14/07/2023.

DA COSTA-VAL A. P. *et al.*, 2007. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, Belo Horizonte, v.174, p. 636–643, 2007.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.48, n.3, p.151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences. **Trends Parasitology**, Italy, v. 28, p. 531–538, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.007> PMID: 22995719

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. **Trends in Parasitology**, Italy, v.35, n.2, p. 97-101, 2018.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* *Leishmania*-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. **Molecular Cell Probes**, v.31, p.65-69, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.08.006>.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Vaccination against canine leishmaniasis in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v.50(3), p. 171-176, 2020.

DA SILVA *et al.* Immunohaematological and rheological parameters in canine visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 211-217, 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-296120180021>

DE CARVALHO, M.R. *et al.* Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 116, n.1, p. 108–110, 2010.

DEANE, L. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Serviço Nacional de Educação Sanitária**. Rio de Janeiro; 1956.

DE CASSIA-PIRES *et al.* Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of *Leishmania* spp. kDNA and the gapdh housekeeping gene of mammal hosts. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0173922, 2017.

DE LUNA, R. *et al.* Decreased Lipid Fluidity of the Erythrocyte Membrane in Dogs with Leishmaniasis associated Anaemia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, p. 213–216, 2000.

DE SOUZA, A. *et al.* Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. **Veterinary Parasitology**, v.129, p.51–54, 2005.

DIAS, A. F. R. L. *et al.* Comparative study of the use of miltefosine, miltefosine plus allopurinol, and allopurinol in dogs with visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 217, October 2020, 107947

DINIZ, S. A. *et al.* Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, v. Belo Horizonte, 42(5), p. 650–658, 2005.

DORLO, T. P. *et al.* Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2576–97, 2012. [doi: 10.1093/jac/dks275](https://doi.org/10.1093/jac/dks275)

ESCH, K. J. *et al.* Activation of Autophagy and NLR Family, Pyrin Domain Containing 3 Inflammasome during Q2 Q3 *Leishmania infantum* and Associated Glomerulonephritis. **The American Journal of Pathology**, 2015. [http://dx.doi.org/ 10.1016/j.ajpath.2015.04.017](http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.04.017)

EVARISTO *et al.*, 2021. Comparison of serological and molecular tests to investigate *Leishmania* spp. infections in stray dogs from an area of intense visceral leishmaniasis transmission in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Pernambuco, v. 30(3): e00662, 2021.

FARIA, R. S.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, fac .2, pag. 47-57, 2012.

FERREIRA, A. L.C. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* in 4 different dog samples by real-time PCR and ITS-1 nested PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, Belo Horizonte, v. 78, p. 418–421, 2014.

FERREIRA, M. G.P.A. *et al.* Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.165, n.1-2, p.150-154, 2009.

FERRER, L. Leishmaniasis update in diagnosis and therapy. In: Proceedings of the Annual Congress Europ. Soc. Vet. Dermatol. (ESVD), 14., 1997. **Anais**. Pisa, Italy: ESVD-ECVD. p.33-36, 1997.

FIOCRUZ, 2019. <https://portal.fiocruz.br/noticia/leishmanioses-conhecidos-insetos-transmissores-e-saiba-como-se-prevenir>

FISA, R. *et al.* Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, v. 99, p. 105-111, 2001.

FONSECA, E. S. *et al.* Predicted distribution of sand fly (Diptera: Psychodidae) species involved in the transmission of Leishmaniasis in São Paulo state, Brazil, utilizing maximum entropy ecological niche modeling. **Pathogens and Global Health**, Presidente Prudente, v. 115, n. 2, p.108–120, 2021. <https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1870031>

FRAGA, D. B.M. *et al.* The rapid test based on *Leishmania infantum* chimeric rK28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Salvador, v. 10, e0004333, 2016.

FREITAS, E. *et al.* Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, Belo Horizonte, v. 137, fasc. 1-2, p. 159-167, 2006.

FREITAS J. C. C. *et al.* Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Fortaleza, v. 45(1), pag. 24-29, 2012.

GALATI, E.A.B. Classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E. R.,

LAIRSON, R., editors. Flebotomíneos do Brasil. **Editora Fiocruz**, Rio de Janeiro, Brazil, p. 23–52. 367 pp. 2003.

GALLUZI, L. *et al.* Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, Italy, 11:273, 2018.

GASKIN, A. A. *et al.* Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Nova York, v. 16, p. 34–44, 2002.

GAUTAM, S. *et al.* IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **The Journal Infectious Diseases**, India, v. 204, p. 1134–1137, 2011. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir461>.

GEBREYES, W. A. The Global One Health Paradigm: Challenges and Opportunities for Tackling Infectious Diseases at the Human, Animal, and Environment Interface in Low Resource Settings. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, United States, v. 8(11), e3257, 2014.

GIGER, U. *Leishmania donovani* transmission by packed RBC transfusion to anemic dogs in the United States. **Transfusion**, v. 42(3), p. 381–3, 2002. [doi:10.1046/j.1537-2995.2002.00061.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2002.00061.x)

GIL, A. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. **European Journal of Clinical Nutrition**, Granada, v. 56 (Suppl. 3), S1–S4, 2002.

GILSBACH *et al.* Comparison of *in vitro* and *in vivo* reference genes for internal standardization of real-time PCR data. **Biotechniques**, v. 40, n.2, p.173-177, 2006

GINEL, P. J. *et al.* Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. **The Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 271-274, 1998.

GOMES-OCHOA, P. *et al.* Lactating females Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) show protection against experimental *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, Spain, v. 116, p. 61–64, 2003.

GOMES-OCHOA, P. *et al.* Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. **The Veterinary Journal**, v. 179(2), p. 259-263, 2009.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Belo Horizonte, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GONZÁLES, U. *et al.* Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. *Cochrane Data base Syst Rev.*, Spain, 2015. 8:CD008736.

GRADONI, L. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. **Medical and Veterinary Entomology**, v.1, n. 4, p. 339–342, 1987. pmid:2979550

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; ORSINI, S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Abingdon, v. 86, n. 6, p. 613-620, 1992.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

HARHAY, M. O. *et al.* Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, Brazil, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.

HERNANDEZ, C. *et al.* Identification of Six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. **Parasit Vectors**, 7:501, 2014.

HINTERBERGER-FISCHER, M. Prolactin as pro-anti-inflammatory cytokine: consideration on consolidated immunotherapy after high dosage therapy. **Atta Medica Austriaca Supplement**, Viena, v. 52, p.16-2000.

HONG, A. *et al.* One Health Approach to Leishmaniasis: Understanding the Disease Dynamics through Diagnostic Tools. **Pathogens**, São Paulo, v. 9, 809; 2020. [doi:10.3390/pathogens9100809](https://doi.org/10.3390/pathogens9100809)

HOSEIN, S.; BLAKE, D.P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v. 144, p.95– 115, 2017.

IARUSSI, F. *et al.* Comparison of two dosing regimens of Miltefosine, both in combination with Alopurinol, on clinical and parasitological findings of dogs with Leishmaniosis: A pilot study. **Frontiers in Veterinary**

Science, v.7, Article 577395, 2020.

IKEDA, F. A. **Avaliação hematológica, bioquímica e parasitológica de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, submetidos a diferentes protocolos de tratamento.** 2004.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

JARA, M. *et al*, 2013. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. **Journal of Clinical Microbiology**, Peru, v. 51, p. 1826-33, 2013.

JULIÃO, F.S. **Uso de método de biologia molecular quantitativo (PCR real-time) na avaliação de reservatórios para Leishmaniose Visceral.** 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia em saúde e medicina investigativa) - Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2011.

KOLTAS, S.I. *et al*. A comparative analysis of different molecular targets using PCR for diagnosis of Old World Leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, Turkey, 2016.  
[doi: 10.1016/j.exppara.2016.02.007.](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.02.007)

KOUTINAS, A. F. *et al*. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology** v. 98, p. 247–261, 2001.

KULLBERG, M. *et al*. Housekeeping genes for phylogenetic analysis of eutherian relationships. **Molecular Biology Evolution** v. 23, p. 1493–1503, 2006.

KUHLS, K. *et al*. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, Germany, v. 7, p. 1224–1234, 2005.

LACHAUD, L. *et al*. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, v. 25, p.197-207, 2002.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 100, n. 8, p.811-27, 2005.

LAMOTHE, J. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. **The Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 42, n. 4, p.170-175, 2001.

LAMOTHE, J. Treatment of canine leishmaniasis from A (Amphotericin B) to Z (Zyloric®). In: KILLICK-KENDRICK, R. (ed.). **Canine leishmaniasis: an update**. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain. Hoechst Roussel Vet., Germany, p.12-17, 1999.

LAURENTI, M. D. *et al.* Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.196, n.3-4, p.296-300, 2013.

LAURENTI, M.D. *et al.* Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 205, n. 3-4, p. 444-450, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.002>.

LEAL, R. O. *et al.* Granulomatous rhinitis secondary to feline leishmaniosis: report of an unusual presentation and therapeutic complications. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 4, p. 1–7, 2018.

LEISHVET. LeishVet guidelines for the practical management of canine and feline leishmaniosis: a brief for the practicing veterinarian. 2018. <http://www.leishvet.org/wp-content/uploads/2018/09/EN-Guidelines.pdf>.

LEWIS, D. J. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). **Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology**, Londres, v. 45, p. 121-209, 1982.

LISBOA, J.C.L. *et al.* Acompanhamento clínico e laboratorial de cães parasitologicamente positivos para leishmaniose Visceral e submetidos à terapia com miltefosina associada ao alopurinol. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 16, n. 3, p. 79-80, 2018.

LOMBARDO, G. *et al.* Papular dermatitis due to *Leishmania infantum* infection in seventeen dogs: diagnostic features, extent of the infection and treatment outcome. **Parasitology Vectors**, v. 7, p. 120, 2014.

LOPES, E. G. *et al.* Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five

seronegative dogs are infected. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 145, n.12, p. 2436-2444, 2017.

LUCIANO, R. M. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania spp Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 181-187, 2009.

LUZ, Z. M. F. Changes in the Hemoculture Methodology Improve the Test Positivity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 295-298, 1999.

MAGALHÃES, D.F. *et al.* Dissemination of information on visceral leishmaniasis from school children to their families: a sustainable model for controlling the disease. **Caderno de Saúde Pública**, [s. l], v. 25, p. 1642-1646, 2009.

MAIA, C.; DANTAS-TORRES, F.; CAMPINO, L. Parasite biology: The reservoir hosts. In: BRUSCHI, F.; GRADONI, L. **The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases**. © Springer International Publishing. 2018. Cap. 4, p. 97.

[https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0_4)

MAIA, C. *et al.* Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **The Veterinary Journal**, v. 179, p.142–144, 2009.

MANNA, L. *et al.* Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Italy v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.019>

MANNA, L. *et al.* *Leishmania* DNA Quantification by Real-time PCR in Naturally Infected Dogs Treated with Miltefosine. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases**: Ann. N.Y. Acad. Sci, v. 1149, p. 358–360, 2008. [doi: 10.1196/annals.1428.018](https://doi.org/10.1196/annals.1428.018)

MANNA, L. *et al.* Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 441–445, 2009.

MARCELINO, A. P. *et al.* Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* naturally infected dogs. **Acta Tropica**, v. 207, 2020. [doi:10.1016/j.actatropica.2020.105495](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105495)

MATEO, M. *et al.* Comparative study on the short term efficacy and

adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. **Parasitol Res**, v. 105, p. 155– 62, 2009. doi: 10.1007/s00436-009-1375-3

MELÉNDEZZ-LAZO, A. *et al.* Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. **Research in Veterinary Science**, v.117, p.18–27, 2018.

MENZ, I. Enfermidades transmitidas por vetores: leishmaniose visceral canina no Brasil. **Boletim BAYER VET**, ano 1, edição 5, 2014.

MICHALSKY, E. M. *et al.* Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sandflies. **Veterinary Parasitology**, Minas Gerais, v. 147, n.1-2, p. 67-76, 2007.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. **Parasitologia Humana**.11ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2011. capítulo 10, p.67-68

MIRÓ, G. *et al.* Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 20, n. 5-6, p. 397-404, 2009.

MIRÓ, G.; LÓPEZ-VELEZ, R. Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p.151–9, 2018.

MOHAMMADIHA, A. *et al.* Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. **Experimental Parasitology**, Iran, v. 133, n. 1, p. 89-94, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.10.017>.

MOLINA, R. *et al.* Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royale Society of the Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 44, p. 491–493, 1994. pmid:7570854

MONTEIRO, E.M. *et al.* Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38 n.2, p.147-52, 2005.

MORGENSTERN, H.; KLEINBAUM, D. G.; KUPPER L. L. Measures of diseases incidence used in epidemiology research. **International journal of epidemiology**, London, v. 9, n.1, p. 97-104,1980.

NAUCKE, T.J.; AMELUNG, S.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites Vectors.**, Germany, v. 1(5), p. 67. 8, 2016.

NERY, G. *et al.* Avaliação da infectividade parasitária a *Lutzomyia longipalpis* por xenodiagnóstico em cães tratados para leishmaniose visceral naturalmente adquirida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Salvador, v. 37, n. 7, p. 701-707, 2017. [DOI: 10.1590/S0100-736X2017000700009](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000700009)

NOGUEIRA, F.S. *et al.* Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, São Paulo, 12:79, 2019.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 16, n. 4, p.213-232, 2005.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, London, v. 9, n..2, p. 1624, 1999.

NOLI, C.; SARIDOMICHELAKIS, M.N. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn.*L. chagasi*). **The Veterinary Journal**, v. 202, p. 425–435, 2014.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Canine visceral leishmaniasis case investigation in the jacare region of niteroi, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 57(4), p. 325-332,2015.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2019.

OPAS, 2019. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas, Organização Pan-Americana da 14 Saúde, Washington,

ORTIZ, R. C.; ANVERSA, L. Epidemiologia da leishmaniose visceral em Bauru, São Paulo, no período de 2004 a 2012: um estudo descritivo. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v.24, n.1, p.97-104, 2015.

OWENS, S.D. *et al.* Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, United States, v. 219, p. 1076–83. doi:10.2460/javma.2001.219.1076

PACE, D. Leishmaniasis. **The Journal of infection**, London, v. 69, Suppl 1, p.10-8, 2014.

PAIVA-CAVALCANTI, M. *et al.* Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, Recife, v. 5:31, 2015. DOI 10.1186/s13578-015-0021-2.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; RÉGIS DA SILVA, C. G.; GOMES, Y. M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.16 (4), p. 537-542, 2010.

PAIXÃO-MARQUES *et al.* First isolation of *Leishmania infantum* by blood culture in bovines from endemic area for canine visceral leishmaniasis. **Parasitology**, São Paulo, 1–3. <https://doi.org/10.1017/S0031182019000088>

PALATNIK-de-SOUZA, C.B.; DAY, M.J. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, Rio de Janeiro, v. 4, p.197, 2011.  
<http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/197>

PALTRINIERI, S. *et al.* Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Javma**, Itália, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, jun. 2010.

PANGRAZIO, K.K. *et al.* Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. **Veterinary Parasitology**, Belo Horizonte, v.165, n. 3-4, p. 327-31, 2009.

PARADIES, P. *et al.* Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Journal**, v. 186, p. 370– 373, 2010.

PARIS, C. *et al.* Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, France, v. 48, n. 3, p. 852–859, 2004.

PASSANTINO, A.; RUSSO, M.; COLUCCI, P. Canine leishmaniosis and euthanasia in Italy: a critical legal-ethical analysis. **Revue Scientifique et Technique – Office international des épizooties**, Italy, v. 29(3), p. 537-548, 2010.

PEIXOTO, H.M. *et al.* Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine and International Health**, Brazil, v. 20, p. 334-352, 2015.

PENNA, H. Leishmaniose visceral no Brasil. **O Brazil Médico**, Rio de Janeiro, v. 46, p. 949-952, 1934.

PENNISI, M. G. *et al.* LEISHMANIOSIS IN CATS ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, [S.L.], v. 15, p. 638–642, 2013.

PENNISI, M. G. *et al.* LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites Vectors**, Italy, v. 8:302, 2015a. [DOI 10.1186/s13071-015-0909-z](https://doi.org/10.1186/s13071-015-0909-z)

PENNISI, M. G. *et al.* Leishmaniosis of companion animals in Europe: Anup date. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 35–47, 2015b.

PENNISI, M. G.; PERSICHETTI, M.F. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? **Veterinary Parasitology**, Italy, v. 251, p. 131–137, 2018.

POURABBAS, B. *et al.* Quantification of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA for monitoring the response to meglumine antimoniate therapy in visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Iran, v. 88, n. 5, p. 868–71, 2013.

PROVÉRPIO, D. *et al.* Case Report: Failure of Miltefosine Treatment in Two Dogs with Natural *Leishmania infantum* Infection. **Case Reports in Veterinary Medicine**, v. 2014, Article ID 640151, 6 pages, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/640151>

QUARESMA, P.F. *et al.* Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v. 111, p. 289–294, 2009.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, Leeds, Inglaterra, v. 36, p.1915-1934, 2009.

RAMIREZ, C. A.; REQUENA, J.M.; PUEERTA, C. J. Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus: genomic organization and UTRs characterization. **Parasites & Vector**, Colômbia, n. 166, 2011.

RAMOS-AUGUSTO, L. C. **Estudo de Leishmania spp. em amostras provenientes de cães e humanos e suas implicações em saúde pública na região de Bauru, São Paulo**. 2018. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

REIS, A. B. *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 68–75, 2006.

RIBEIRO, V. M. *et al.* Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. **Parasites & Vectors**, v. 6, n.8, 2013. doi:10.1186/1756-3305-6-8

RIBALDI, E. *et al.* Molecular method confirms canine *Leishmania* Infection detected by serological methods in non-endemic area of Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 56 (1), p.11–19,2015.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America: a systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Brasília, v. 4(1): 584, 2010. [doi:10.1371/journal.pntd.0000584](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584)

ROUGIER, S. *et al.* Determination of the duration of canine leishmaniasis treatment with marbofloxacin tablets: a clinical pilot study. France: **Vétoquinol S.A.**, France, 2006.

SALANT, H. *et al.* Early onset of clinical leishmaniosis in a litter of pups with evidence of in utero transmission. **Parasites Vectors**, Israel, v. 14, p. 326, 2021.

SANTIAGO, M.E.B *et al.* An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis spp.* from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 283–290, 2007.

SANTOS, S. N.; RIBEIRO, A. P. C.; CONTI, A. C. M. Miltefosine in Treating dogs with leishmaniosis and its hematological and biochemical effects. **Facit Business and Technology Journal**, v.18, n.4, p. 174-207, 2020.

SCORZA, B. M. *et al.* *Leishmania infantum* xenodiagnosis from Vertically infected dogs reveals significant skin tropism. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, United States, v. 15(10):e0009366.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009366>

SCHÖNIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO, I. L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology**, Germany, v. 138, p. 405–425, 2011.

doi:10.1017/S0031182010001538

SCHRAMM, J.M. *et al.* Transição epidemiológica e o estudo de carga de doença no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9(4), p. 897-908.

SERAFIM, T. D.; IGUINEZ, E.; OLIVEIRA, F. *Leishmania infantum*.

**Trends Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 80-81, 2020.

[doi:10.1016/j.pt.2019.10.006](https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.006)

SEGARRA, S. *et al.* Randomized, allopurinol-controlled trial of the effects of dietary nucleotides and active hexose correlated compound in the treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 239, p. 50-56, 2017.

SEGARRA, S. Nutritional Modulation of the Immune Response Mediated by Nucleotides in Canine Leishmaniasis. **Microorganisms**, Spain, v. 9, 2601, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122601>

SINDERMANN, H.; ENGEL, J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 100, Suppl 1, p. S17-20, 2006.

SILVA, A.O. Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Leishmania* (*Viannia*) spp. Dissertação. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, 2017.

SILVA, F.L. *et al.* Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Belo Horizonte, v. 160, p. 55–59, 2009.

SILVA, M.; PACHECO W.L.; SAUERBIER, G. O gerenciamento ambiental e seu impacto na Leishmaniose. **Revista Multidisciplinar Em**

Saúde, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 61, 2021.  
<https://doi.org/10.51161/remis/1466>.

SILVEIRA NETO, O. J. *et al.* Design of primer pairs for species-specific diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* using PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 21, n.3, p. 304-307 2012.

SINDERMANN, H.; ENGEL, J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 100S, S17—S20, 2006.

SIVERA, F. *et al.* Multinational evidence-based recommendations for the diagnosis and management of gout: integrating systematic literature review and expert opinion of an abroad panel of rheumatologists in the 3e initiative. **Annals of Rheumatic Diseases**, Spain, v. 73, p. 328–335, 2014. [doi:10.1136/annrheumdis-2013-203325](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203325)

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Espanha, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites Vectors**, Londres, v. 4, p. 86-102, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Early reduction of *Leishmania infantum* specific antibodies and blood parasitemia during treatment in dogs with moderate or severe disease. **Parasites & Vectors** 9:235, 2016.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Diagnostic Challenges in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. **Trends Parasitology**, v. 33, p. 706–17, 2017.

SOUZA, A.I. *et al.* Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. **Veterinary Parasitology**, Minas Gerais, v. 129, p. 51–54, 2005.

SOUZA FILHO, J.A. *et al.* Performance of Alere™ immunochromatographic test for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Minas Gerais, v. 225, p.114-116, 2016.

SRIVIDYA, G.; KULSHRESTH, A. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitology Research**, v. 110, p.

1065–1078, 2012. DOI [10.1007/s00436-011-2680-1](https://doi.org/10.1007/s00436-011-2680-1)

STRAUSS-AYALI, D. *et al.* Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, Israel, v.189, p.1729–33, 2004.

SUNDAR, S., RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, n. 5, p. 951–958, 2002.

SVOBODOVA, V. *et al.* Canine leishmaniosis in three consecutive generations of dogs in Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v. 15(237), p. 122–4, 2017.

TEAM, R. Core. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016. P. 860-864, 2017.

TEIXEIRA, L. V. *et al.* Punção aspirativa por agulha fina como método de coleta de material para a histopatologia no osteossarcoma canino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, 2010.

TERRAZANO, G. *et al.* Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.110, p. 331–337, 2006.

THERNEAU, T. M.; LUMLEY, T. Package survival, **R Topics Documented**, 128, 2015.

TOEPPE, A.J.; PETERSEN, C. A. The Balancing Act: Immunology of Leishmaniosis. **Researche in Veterinary Science**, United States, v.130, p. 19–25, 2020. doi:10.1016/j.rvsc.2020.02.004.

TOLEZANO, J. E. Leishmaniose visceral americana (LVA) em Araçatuba, região Oeste do Estado de São Paulo. Investigações laboratoriais e diagnóstico de uma doença emergente em terras paulistas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 32 (Supl): 218, 1999.

TORRES, M. *et al.* Adverse urinary effects of allopurinol in dogs with leishmaniasis. **The Journal of small animal practice**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 299-304, 2016.

TRAVI, B. L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for

sand flies. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 64, p. 119–24, 2011.

TRAVI, B. L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12(1): e0006082, 2018 .<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006082>

TRONCARELLI, M. Z. *et al.* *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.164, p.118–123, 2009.

TRÓPIA DE ABREU, R. *et al.* Influence of Clinical Status and Parasite Load on Erythropoiesis and Leucopoiesis in Dogs Naturally Infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **PLoS ONE**, v. 6 (5), e18873, 2011.

TSOKANA, C. N. *et al.* Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis. In: CLABORN, D. **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**, chapter 8, p. 161193, 2014.

ULBRICHT, C. *et al.* An evidence-based systematic review of active hexose correlated compound (AHCC) by the Natural Standard Research Collaboration. **Journal of Dietary Supplements**, London, v. 10, n. 3, p. 264-308, 2013.

UNGER, C. *et al.* In vivo antileishmanial activity of hexadecylphosphocholine and other alkylphosphocholines. **Drugs of Today**, Barcelona, v. 34, p.133-140, 1998.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3010-3015, 2004.

VERMA, R. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. **Journal Cell Communication and Signaling**, India, v. 10, p. 61–70, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12079-015-0302-x>.

VIEIRA, A. **Leishmaniose canina: estudos de casos clínicos**. 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal, 2013.

WEIRATHER, J.L. *et al.* Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3892–904,

2011.

WHO. Control of the Leishmaniases: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the 10 Control of Leishmaniases, World Health Organization, Geneva, 2010.

WHO. Leishmaniasis. World Health Organization, Geneva, 2020.  
<https://www.who.int/news-room/fact13-sheets/detail/leishmaniasis>

WHO. Leishmaniasis, number of cases of visceral leishmaniasis reported. 2021, pp. 27–28. Available:  
[http://apps.who.int/neglected\\_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html](http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html)

WILLS, T. B.; WARDROP, K. J. Pseudothrombocytopenia Secondary to the Effects of EDTA in a Dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 44, n. 2, p. 95–97, 2008. [doi:10.5326/0440095](https://doi.org/10.5326/0440095)

WOERLY, V. *et al.* Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitology Research**, Berlin, v. 105, n. 2, p. 463-469, 2009.

XAVIER, S.C. *et al.* Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, Belo Horizonte, v. 2:17, 2006.

YAN, S. *et al.* Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promoter. **Molecular and Biochemical Parasitology**, United States, v. 103, p. 197 – 210, 1999.

YASUR-LANDAU, D. *et al.* Allopurinol resistance in *Leishmania infantum* from dogs with disease relapse. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 1, 2016.

von ZUBEN, A.P.B.; DONALÍSIO, M.R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Caderno de Saúde Pública**, Campinas, v. 32(6), 2016.



# Manual técnico

## **8. Manual técnico**

Foi elaborado um manual técnico direcionado aos médicos veterinários com as informações importantes sobre a problemática das leishmanioses, bem como o tratamento clínico dos cães. A sua elaboração foi pensada em uma linguagem acessível e ilustrativa com o objetivo de oferecer conhecimentos que possam contribuir para a melhoria das práticas e ampliação dos conhecimentos.

# MANUAL TÉCNICO

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA



VALÉRIA MEDINA CAMPRIGHER  
VIRGÍNIA BODELÃO RICHINI PEREIRA

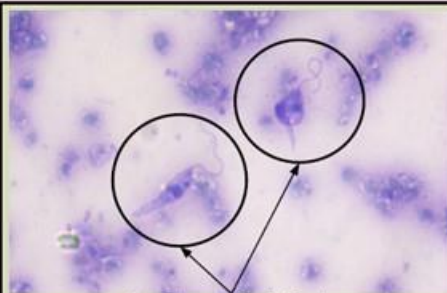


## SUMÁRIO

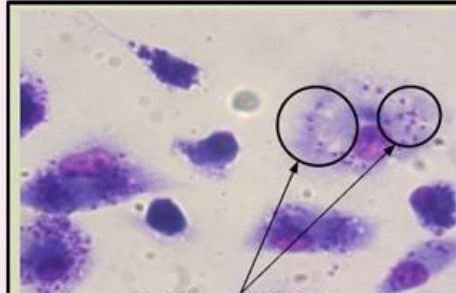
INTRODUÇÃO.....	PAG. 3
SINTOMAS.....	PAG. 5
ALTERAÇÕES LABORATORIAIS.....	PAG. 6
DIAGNÓSTICO.....	PAG. 7
TRATAMENTO.....	PAG. 9
PREVENÇÃO.....	PAG. 11
OBSERVAÇÕES.....	PAG. 12
REFERÊNCIAS.....	PAG. 13



# 1. INTRODUÇÃO



*Leishmania infantum*  
forma promastigota



*Leishmania infantum*  
forma amastigota



flebotomíneo (*Lutzomya longipalpis*).

A LEISHMANIOSE VISCERAL (LV) É UMA IMPORTANTE ZOOSE QUE ACOMETE OS ANIMAIS DOMÉSTICOS, SILVESTRES E O HOMEM. A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC) É CAUSADA PELO PROTOZOÁRIO *Leishmania infantum* E SUA PRINCIPAL FORMA DE TRANSMISSÃO É VETORIAL POR MEIO DA PICADA DE UM FLEBOTOMÍNEO (*Lutzomya longipalpis*).

## 1. INTRODUÇÃO



AS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NOS CÃES  
PODEM VARIAR DA FORMA MULTISSISTÊMICA  
ATÉ A AUSÊNCIA COMPLETA DE SINAIS.

OS CÃES SÃO OS  
PRINCIPAIS  
RESERVATÓRIOS DA  
LEISHMANIOSE VISCERAL  
EM ÁREA URBANA, PELA  
ALTA DENSIDADE  
POPULACIONAL DA  
ESPÉCIE, PELO ÍNTIMO  
CONVÍVIO COM O SER  
HUMANO E PELA ALTA  
PREVALÊNCIA DE  
PORTADORES  
ASSINTOMÁTICOS E  
OLIGOSSINTOMÁTICOS  
(80% DOS INFECTADOS).

## 2. SINTOMAS



### SINAIS CLÍNICOS

LINFADENOMEGALIA	PRURIDO
DESCAMAÇÃO	HIPERPIGMENTAÇÃO
CONJUNTIVITE	EPISTAXIS
ONICOGRIFOSE	CLAUDICAÇÃO
ANOREXIA/HIPOREXIA	SINTOMAS NEUROLÓGICOS
CERATITE	FEBRE
ÚLCERAS	ATROFIA MUSCULAR
ALOPECIA	EMAGRECIMENTO

### SINAIS CLÍNICOS.

(EM NEGRITO SÃO OS MAIS COMUNS RELATADOS NA LITERATURA)



**Descamação**



**Alopecia**



**Onicogribose**



**Assintomático**

### 3. ALTERAÇÕES LABORATORIAIS

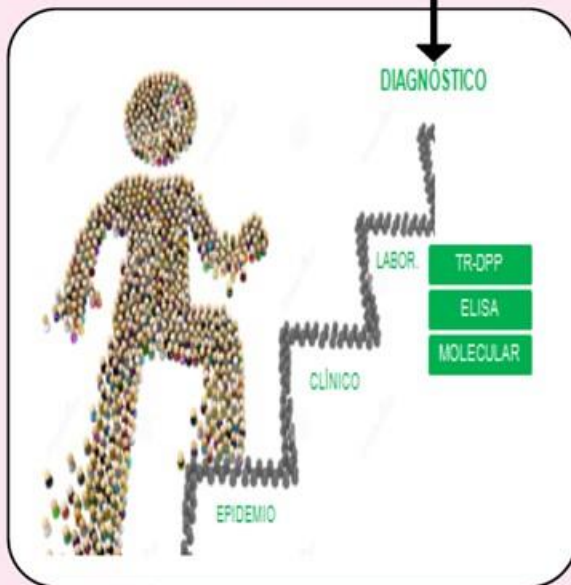


ALTERAÇÕES LABORATORIAIS MAIS COMUNS	<b>CAUSAS DA TROMBOCITOPENIA NA LVC:</b> DEPLEÇÃO DA TROMBOCITOPOESE FATORES IMUNOMEDIADOS DESTRUIÇÃO PLAQUETÁRIA VASCULITE PSEUDOTROMBOCITOPENIA POR VENOPUNÇÃO TRAUMÁTICA
DIMINUIÇÃO NO NÚMERO DE HEMÁCEAS	<b>CAUSAS DE ANEMIA NA LVC:</b> CRONICIDADE DA DOENÇA INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA SANGRAMENTOS (EPISTAXIS GASTROENTERITES HEMORRÁGICAS) DEPRESSÃO DE MEDULA ÓSSEA HEMÓLISE IMUNOMEDIADA SEQUESTRO ESPLÊNICO
DIMINUIÇÃO VOLUME GLOBULAR	
DIMINUIÇÃO NO NÚMERO DE PLAQUETAS	A RELAÇÃO ALBUMINA-GLOBULINA (A/G) DIMINUÍDA É O ACHADO LABORATORIAL MAIS COMUM NA LVC. A PROTEÍNA SÉRICA ELEVADA OCORRE DEVIDO À HIPERGLOBULINEMIA E PODE ESTAR ASSOCIADA À HIPOALBUMINEMIA (PROTEINÚRIA, DESNUTRIÇÃO). <b>IMPORTANTE:</b> <b>A REDUÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS PARA NÍVEIS NÃO SIGNIFICATIVOS É TARDIA E NÃO ESTÁ RELACIONADA À MELHORA CLÍNICA.</b>
POUCAS ALTERAÇÕES EM SÉRIE BRANCA	
PROTEÍNA TOTAL AUMENTADA	
HIPERGAMAGLOBULINEMIA	
HIPOALBUMINEMIA	
RELAÇÃO ALBUMINA/GLOBULINA DIMINUÍDA	

## 4. DIAGNÓSTICO



CÃO INFECTADO É DIFERENTE DE CÃO DOENTE.



NÃO HÁ TESTE PADRÃO OURO PARA O DIAGNÓSTICO DA LVC, O QUE GERA OBSTÁCULOS E RETARDA O TRATAMENTO DO ANIMAL E O CONTROLE DA DOENÇA.

OS CÃES APRESENTAM GRANDE VARIEDADE DE SINTOMAS, DE ASSINTOMÁTICOS A SINTOMÁTICOS, FATO QUE DIFICULTA O DIAGNÓSTICO CLÍNICO, DEVENDO SER SEMPRE ACOMPANHADO DE UMA COMBINAÇÃO DE EXAMES LABORATORIAIS.

A PROCEDÊNCIA DO ANIMAL DEVE SER INVESTIGADA (DIAGNÓSTICO EPIDEMIOLÓGICO).

PARADIGMA: OS PROFISSIONAIS DE SAÚDE DEVEM TER CONHECIMENTO SUFICIENTE PARA DIFERENCIAR UM CÃO INFECTADO SADIO DO CÃO DOENTE.

## 4. DIAGNÓSTICO



TESTE RÁPIDO COMO TRIAGEM.  
TESTE ELISA COMO CONFIRMATÓRIO.

A ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E EPIDEMIOLÓGICOS DEVEM ESTAR ASSOCIADOS PARA O DIAGNÓSTICO DEFINITIVO DA DOENÇA; JÁ QUE TESTES SOROLÓGICOS PODEM IDENTIFICAR EXPOSIÇÃO AO PARASITO, MAS NÃO PODEM INDICAR INFECÇÃO ATIVA.



## 5. TRATAMENTO



MILTEFOSINA 2 mg/kg	- por via oral uma vez ao dia por 28 dias;
ALOPURINOL 20 mg/kg	-por via oral duas vezes ao dia por 6 meses;
- ALOPURINOL 10 mg/kg	uso contínuo 2x ao dia;
DOMPERIDONA 0,5 - 1 mg/kg	- por via oral duas vezes ao dia durante 30 dias a cada 6 meses;
PREDNISONA 0,5 mg/kg	- por via oral duas vezes ao dia, se necessário;

O GRUPO LEISHVET ORIENTA QUE CÃES NO ESTADIO I (BAIXO TÍTULO DE ANTICORPOS E SOMENTE UM OU DOIS SINTOMAS DE LVC) NÃO DEVEM SER TRATADOS. RECOMENDAM QUE SEJAM SOMENTE MONITORADOS E MEDICADOS COM DOMPERIDONA, POIS AFIRMAM QUE O TRATAMENTO PODE CAUSAR UM DESEQUILÍBRIO NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA.

## 5. TRATAMENTO



A MILTEFOSINA TEM SIGNIFICANTE EFICÁCIA TERAPÊUTICA E BOA TOLERÂNCIA PARA O TRATAMENTO DA LVC, COM POUCOS, AUTOLIMITANTES E TRANSITÓRIOS EFEITOS COLATERAIS. OS EVENTOS ADVERSOS, ESTÃO RELACIONADOS À AÇÃO DIRETA DO FÁRMACO NO SISTEMA GASTROINTESTINAL E NÃO DEVIDO A ALTERAÇÕES SISTÊMICAS; COM BAIXO IMPACTO NO QUE SE REFERE À FUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA.

## 6. PREVENÇÃO



COLEIRA IMPREGNADA  
COM DELTAMETRINA.

POSSUI AÇÃO  
REPELENTE E INSETICIDA  
SOBRE O FLEBOTOMÍNEO  
E DEVE SER USADA NOS  
CÃES:

- COMO MEDIDA DE SAÚDE PÚBLICA
- PARA A PREVENÇÃO DA LVC
- PARA EVITAR A REINFECÇÃO NOS ANIMAIS EM TRATAMENTO.

## 7. OBSERVAÇÕES



EUTANÁSIA NÃO É A ÚNICA OPÇÃO.



A REDUÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS PARA NÍVEIS NÃO SIGNIFICATIVOS, SEGUNDO ALGUNS AUTORES, OCORRE AO LONGO DO TEMPO, COM A TERAPIA CONTINUADA COM ALOPURINOL E NÃO ESTÁ RELACIONADA À MELHORA CLÍNICA.

OS MÉDICOS VETERINÁRIOS  
PODEM REALIZAR O TRATAMENTO,  
SEMPRE QUE POSSÍVEL.  
OPTE PELA VIDA  
O CÃO MERECE.



## 8. REFERÊNCIAS



- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion o Leishmania Parasites and Sandflies, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Nice, França, v.10 (3): e0004349, 2016. doi:10.1371/journal.pntd.0004349.
- AMUSATEGUI, I., *et al.* Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, v.18, n. 2, p. 147–156, 2003. doi:10.1023/a:1023090929302
- BANETH, G. *et al.* Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 24, n.7, p.324-330, 2008.
- BANETH, G. *et al.* Leishmania infection in cats and dogs housed together in an animal shelter reveals a higher parasite load in infected dogs despite a greater seroprevalence among cats. **Parasites Vectors**, Israel, v. 13(1):115, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3989-3>
- BARATA, R. A. *et al.* Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Minas Gerais, v. 38(5), p. 421-425, 2005.
- BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, Liverpool, v. 37(10), p. 1097–106, 2007.
- BURZA, S.; CROFT, S.L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, Londres, v. 392, p. 951-970, 2018. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- CABRÉ, M. *et al.* Is signalment associated with clinicopathological findings in dogs with leishmaniosis? **Veterinary Record**; e451, 2021.
- CIARAMELLA, P. *et al.*, "A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum," **Veterinary Record**, vol. 141, no. 21, p. 539–543, 1997.

## 8. REFERÊNCIAS



COURA-VITAL, W. *et al.* Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLOS One**, Ouro Preto, v. 9, e91009, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0091009

DANTAS -TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.48, n.3, p.151-156, 2006.

DA SILVA *et al.* Immunohaematological and rheological parameters in canine visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 211-217, 2018.

Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-296120180021>

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. *et al.* Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, Recife, v. 5:31, 2015. DOI 10.1186/s13578-015-0021-2.

DIAS, A. F. R. L. *et al.* Comparative study of the use of miltefosine, miltefosine plus allopurinol, and allopurinol in dogs with 1 visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 217, October 2020, 107947

DORLO, T. P. *et al.* Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2576-97, 2012. doi: 10.1093/jac/dks275

FARIA, R. S., ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, fac .2, pag. 47-57, 2012.

FREITAS J. C. C. *et al.* Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Fortaleza, v. 45(1), pag. 24-29, 2012.

FERREIRA, M. G.P.A. *et al.* Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.165, n.1-2, p.150-154, 2009.

## 8. REFERÊNCIAS



FRAGA, D. B.M. *et al.* The rapid test based on leishmania infantum chimeric rK28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Salvador, v. 10, e0004333, 2016.

GEBREYES, W. A. The Global One Health Paradigm: Challenges and Opportunities for Tackling Infectious Diseases at the Human, Animal, and Environment Interface in Low Resource Settings. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, United States, v. 8(11), e3257, 2014.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

HONG, A., *et al.* One Health Approach to Leishmaniasis: Understanding the Disease Dynamics through Diagnostic Tools. **Pathogens**, São Paulo, v. 9, 809; 2020. doi:10.3390/pathogens9100809

IARUSSI, F. *et al.* Comparison of two dosing regimens of Miltefosine, both in combination with Alopurinol, on clinical and parasitological findings of dogs with Leishmaniasis: A pilot study. **Frontiers in Veterinary Science**, v.7, Article 577395, 2020.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 100, n. 8, p.811-27, 2005.

LEISHVET. LeishVet guidelines for the practical management of canine and feline leishmaniasis: a brief for the practicing veterinarian. 2018.

<http://www.leishvet.org/wp-content/uploads/2018/09/EN-Guidelines.pdf>.

MELÉNDEZZ-LAZO, A. *et al.* Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. **Research in Veterinary Science**, v.117, p.18–27, 2018.

MIRÓ, G. *et al.* Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 20, n. 5-6, p. 397-404, 2009.

## 8. REFERÊNCIAS



NOLI, C., SARIDOMICHELAKIS, M.N. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn.L. chagasi). **The Veterinary Journal**, v. 202, p. 425–435, 2014.

PALATNICK-de-SOUZA, C.B.; DAY, M. J. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, Rio de Janeiro, v. 4, p.197, 2011. <http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/197>

PALTRINIERI, S. *et al.* Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniosis in dogs. **Javma**, Itália, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, jun. 2010.

PARADIES, P. *et al.* Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Journal**, v. 186, p. 370–373, 2010.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniosis. **Parasitology**, Leeds, Inglaterra, v. 36, p.1915-1934, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Espanha, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>.

WOERLY, V. *et al.* Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitology research**, Berlin, v. 105, n. 2, p. 463-469, 2009.

XAVIER, S.C. *et al.* Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, Belo Horizonte, v. 2:17, 2006

***Manuscrito***

## **9. Manuscrito**

O manuscrito foi elaborado e submetido à revista *Veterinary Parasitology* no dia 15/08/2023.

### **Evaluation of dogs in treatment for the visceral leishmaniasis in the municipality of Bauru - São Paulo**

#### **ABSTRACT**

Visceral Leishmaniasis is a neglected tropical disease that has been showing significant geographic expansion. One of the pillars of Public Surveillance Policies is the control of the source of canine infection. Miltefosine is the drug approved for the treatment of dogs in Brazil. The aim of this study was to evaluate the treatment, clinical evolution, parasitic load and laboratory parameters of seropositive dogs; that can contribute to the surveillance and control measures for Visceral Leishmaniasis in the municipality of Bauru – São Paulo, Brazil. Thirty-four dogs were evaluated quarterly for one year, and 19 dogs completed the treatment. Of the 15 losses, eight were due to treatment abandonment and seven were death; being four due to leishmaniasis. In the first evaluation, the most frequent symptoms were lymphadenopathy, desquamation, conjunctivitis and onychogryphosis. After one year, 19 animals that remained in the treatment were asymptomatic. The most altered patterns in the blood tests were: erythrocytes, hemoglobin, packed cell volume, platelets, total protein, albumin, globulin and albumin-globulin ratio. At the end of the evaluation, there was an improvement in the hematimetric and biochemical parameters. qPCR showed greater sensitivity than cPCR in monitoring the parasite load; which decreased over the period, suggesting efficacy in the treatment of dogs with CVL; even though there is no parasitic cure. Thus, our results demonstrate that the treatment of dogs can be incorporated into public health policy strategies. It is essential to strengthen and integrate health

surveillance, research and technological innovation, in accordance with the principles of the Unified Health System (SUS, in Portuguese), for the protection, prevention and promotion of health, and improvement of the population's quality of life.

**Keywords:** Leishmaniasis, Dogs, Polymerase Chain Reaction, Single Health, Public Health Surveillance.

## 1. Introduction

One Health approaches should be emphasizing collaboration between human, animal and environmental health. Due to the risk of transmission of infectious agents between them, and, associated with environmental factors, it is suggested that research aimed at disease control should be carried out by interdisciplinary teams with a comprehensive vision (Palatnik-de-Souza, Day, 2011; Gebreys *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2020; Shaheen, 2022).

Leishmaniasis are zoonoses that fit into this concept: parasitic diseases, associated with environmental degradation and affecting animals and susceptible human population transmitted by vectors and caused by protozoa belonging to the genus *Leishmania*. They are classified according to the clinical presentations in Cutaneous Leishmaniasis (CL), Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL), Mucocutaneous Leishmaniasis (MCL) and Visceral Leishmaniasis (VL) (Bates, 2007; Palatnik-de-Souza, Day, 2011; Akhoundi *et al.*, 2016; Burza *et al.*, 2018).

As Brazil is one of the six countries with the highest number of human cases; representing 16% of global cases and 97% of the Americas, disordered urban occupation, poor sanitation and housing conditions, malnutrition, environmental destruction with changes in the habitats of the species involved in the transmission cycle have increased the importance of VL in the public health context (Cerbino Neto *et al.*, 2009; Brasil, 2006;

Baneth *et al.*, 2008; Who, 2010; Alvar *et al.*, 2012; Pace, 2014; Akhoundi *et al.*, 2016; Opas, 2019; Who, 2021).

Dogs are the main reservoirs of VL in urban areas due to their high population density, close contact with humans, high prevalence of asymptomatic and oligosymptomatic carriers and being a source of food for phlebotomines (Dantas-Torres, Brandão-Filho, 2006; Baneth *et al.*, 2008; Quinnell, Courtenau, 2009; Paltrinieri *et al.*, 2010; Baneth *et al.*, 2020).

The realization of canine seroepidemiological surveys for the identification of infected animals with subsequent collection and euthanasia aiming at the reduction of domestic reservoirs demand great effort from municipal zoonosis control agencies, from Public Health laboratories for its operationalization. Currently, the euthanasia of seropositive animals is increasingly contested by different segments of society, including the scientific community, with a consequent increase in refusals both for the diagnosis of CVL and for the euthanasia of infected dogs (Passantino *et al.*, 2010; Costa, 2011; Dantas-Torres *et al.*, 2018).

Canine treatment is still a challenge due to its complex pathogenesis and miltefosine is currently the authorized drug for CVL in Brazil (Brasil, 2016). In addition, studies show that the association of miltefosine with allopurinol is a promising alternative for treatment, which can minimize relapses (Manna *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2020).

Considering the importance of the dog as a reservoir of *Leishmania* and its role in maintaining the zoonotic cycle of transmission of urban visceral leishmaniasis; considering the growing process of urbanization, expansion and re-emergence of leishmaniasis in Brazil and worldwide; considering the difficulty in controlling the disease using current protocols; considering the growing demand for alternative methods to canine euthanasia and the possibility of the development and use of drugs as an auxiliary measure to the control of the disease; the study evaluated the treatment of infected dogs through clinical, laboratory and parasite load

analyzes to produce new knowledge for the review of CVL surveillance and control actions with a view to incorporating strategies for public health policies, with a focus on reducing or even interrupting transmission to humans, based on the reduction of CVL incidence (Baneth, *et al.*, 2008; Harhay *et al.*, 2011; von Zuben, Donalísio, 2017; Nogueira *et al.*, 2019).

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Animals and treatment*

Based on an initial CVL prevalence (Matsumoto *et al.*, 2021), four neighborhoods were selected for further investigating dog cohorts, i.e., Pq. Jaraguá, Pousada da Esperança, Geisel, and Beija-flor (Matsumoto *et al.*, 2022) From these cohorts, 34 seropositive dogs were evaluated and selected for treatment against VL (Figure 1). The addresses of the canine cases or human cases were geocoded by Addresses using a Google API (Geary, 2021) and the coordinates were plotted in ArcGIS Pro 2.9.5.

Dogs with renal failure, pregnant and lactating females, with a concomitant disease, previously treated with leishmanicidal or leishmanistatic drugs, were excluded.

The treatment was as follows: miltefosine (2mg/Kg/day/28 days, orally), allopurinol (20mg/kg/twice daily/6 months, orally). After, allopurinol (10mg/kg/twice daily/continuous), domperidone (0.5-1.0mg/kg/twice daily/30 days, orally), prednisone (0.5-1.0mg/kg/twice daily/if necessary). To prevent reinfection, before starting treatment all dogs received deltamethrin-impregnated collar (Scalibor®, MSD Animal Science).

The dogs were monitored with clinical, and laboratory and evaluations were performed before (T-0), and every three months (T1, T2, T3, T4).

### *2.3. Serological evaluation*

The serological investigation was performed by means of the immunochromatographic Dual-Path Platform (DPP® rapid test Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil), as screening test and the immunoenzymatic test (EIE-LVE - Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil), as confirmatory test.

#### *2.4. Haematological and biochemical evaluation*

Biological samples were collected for haematological and biochemical tests and performed using commercial kits Bioclin® (MG, Brazil), by an automated biochemical analyser Mindray BS-200 (China) and haematological analyser Nihon Kohden MEK-6500 (Japan), as described by the manufacturer. The following parameters were analyzed: red blood cells, hemoglobin, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, total blood protein, leukocytes, segmented, rods, basophils, monocytes, eosinophils, lymphocytes, platelets, urea, creatinine, total serum protein, albumin, globulin and albumin/globulin ratio.

#### *2.5. Molecular analyzes*

The DNA extractions were performed using the automated extractor (Loccus, Biotecnologia, Brasil), and magnetic bead extraction kits (MTTD-P016 FAST T), and following the manufacturer's instructions (Loccus, Biotecnologia, Brasil). The quantification was evaluated in a spectrophotometer (Epoch-Biotek, USA).

To evaluate the quality of the extracted DNA and the possible presence of PCR inhibitors in the samples, the following *primers* for amplifying the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene were utilized, according to Kullberg *et al.* (2006): GAPDH-F: 5'-AGGCTGAGAACGGGAAACTT-3' and GAPDH-R: 5'-ATTAAGTTGGGGCAGGGACT-3'.

Molecular detection was carried out through PCR by using the primer pair LINR4 (5'-GGGGTTGGTGTAATAAGGG-3') e LIN19 (5'-CAGAACGCCCCTACCCG-3') (Aransay *et al.*, 2000).

The reactions (25µl final volume) were run with the following reagents: 20mM Tris HCl pH 8.4, 50mM KCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2µM dNTP, 0.2µM of each primer, 0.2 units of *Taq* DNA polymerase, and 10ng DNA template. The amplification mixture was incubated in a Veriti™ 96-Well Thermal Cycler" (Life Technologies, Carlsbad, USA).

Aliquots of the PCR products and a 100-bp DNA ladder (Invitrogen) were loaded onto 1.5% agarose gel (Invitrogen) stained with SYBR® safe (Invitrogen) and subjected to electrophoresis in TBE buffer (89 nM Tris-HCl, 89 mM boric acid and 20 mM EDTA) for 60min at 65V (Electrophoresis Power Supply Model EPS 301; GE Healthcare.). The amplified DNA fragments were visualized in an image analyzer Syngene® (DigiGenius, USA) by using the EOS utility® Software (Canon, USA).

To determine the parasitic load, the SYBR® Green system was used in the StepOne™ Plus Real Time PCR System (Life Technologies®, Carlsbad, USA). The standard curve was performed with the DNA samples from reference strains from the Leishmanias Collection of the Oswaldo Cruz Institute (CLIOC FIOCRUZ) at the decreasing concentrations of parasites/ml 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup> and 10<sup>0</sup>. The target sequence used was 70 kDa heat shock protein (hsp70), HSP70F (5'-AGGTGA AGGCGACGAACG-3') and HSP70R (5'- CGCTTGTCCATCTTTGCTTC-3') (Hernández *et al.*, 2014). The reactions were under the following conditions: 12.5 µL of Power SYBR® Green PCR master Mix (Life Technologies®, USA), 5 µM of each primer, 8.5 µL ultrapure water and 2 µL of sample, totaling a final volume of 25 µL. The amplification profile used was: 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 minute and one step for the dissociation curve of 95°C for 15s, 60°C for 1 minute and 95°C for 15s. The amount of DNA present in the samples was expressed in relation to the standard curve

of each assay.

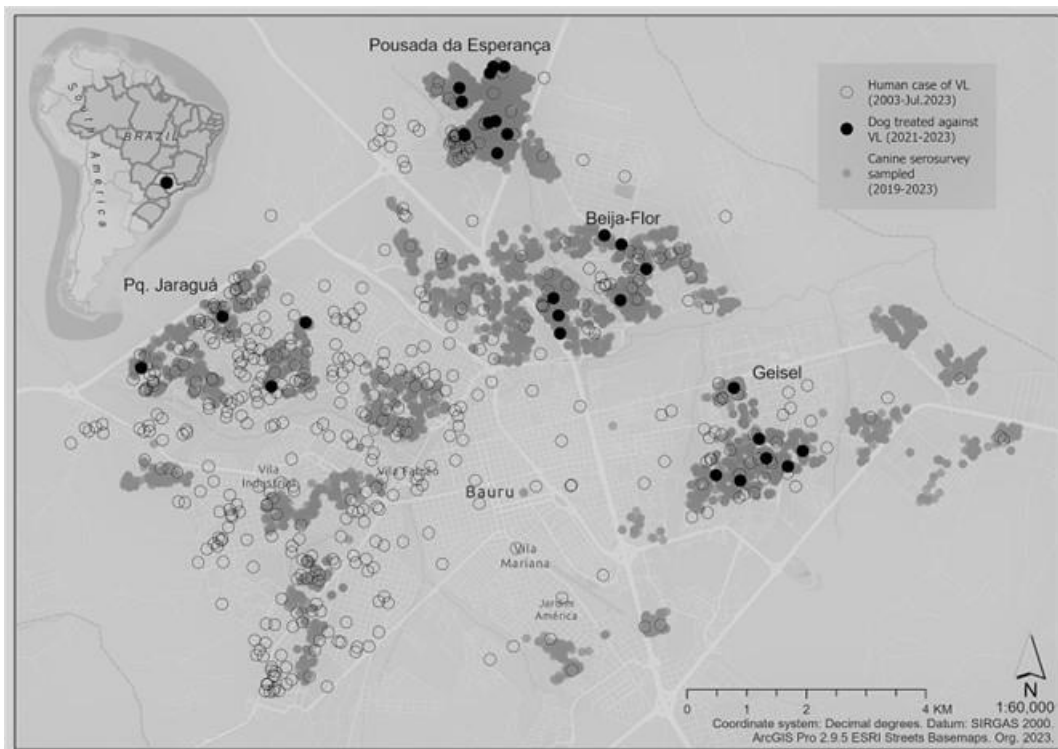
## 2.6. Ethical statement

The present study was approved by the Ethics Committee on the use of Animals n. 02/2020 and Research Ethics Committee of Adolfo Lutz Institute n. 59L-2019.

## 3. Results

Figure 1 shows the geographic location of the 34 animals, correlating with the historical series (2003-July 2023), referring to the occurrence of human cases of visceral leishmaniasis.

**Figure 1:** Geographic location of 34 animals, treated for visceral leishmaniasis in the municipality of Bauru, correlating with cases of human visceral leishmaniasis.



### *Clinical evaluation*

Table 1 showed some characteristics of clinical-pathological abnormality associated with the disease, in the five treatment phases (times 0 to 4).

**Table 1** - Dynamics of clinical signs commonly reported for Canine Visceral Leishmaniasis in animals submitted to treatment over 12 months

	Times		Zero		1		2		3		4	
	Number of animals		34		30		27		22		19	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Clinical signs	Lymphadenomegaly	18	52.94	11	36.66	5	18.51	3	13.63	0	0.00	
	Scaling	10	29.41	3	10.00	4	14.81	0	0.00	0	0.00	
	Conjunctivitis	10	29.41	4	13.33	4	14.81	2	9.09	1	5.26	
	Onychogryphosis	8	23.52	5	16.66	4	14.81	2	9.09	0	0.00	
	Anorexia/hyporexia	1	3.00	1	3.33	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
	Keratitis	3	8.82	1	3.33	1	3.7	1	4.54	0	0.00	
	Ulcers	2	6.00	2	20.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
	Alopecia	1	3.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
	Pruritus	14	41.17	5	16.66	5	18.51	0	0.00	0	0.00	
	Hyperpigmentation	1	3.00	1	3.33	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
	Epistaxis	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	4.54	0	0.00	
	Onychogryphosis	8	23.52	5	16.66	4	14.81	2	9.09	0	0.00	
	Claudication	1	3.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
	Neurological symptoms	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
	Fever	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
	Muscle atrophy	1	3.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	

The animals were evaluated at the beginning of treatment (T0) and at T1 (3 months), T2 (6 months), T3 (9 months) and T4 (12 months) after the first dose of treatment.

### *Laboratory evaluation*

The mean and standard deviation of the haematological findings are shown in Table 2.

**Table 2** - Effects of treatment miltefosine on haematological parameters in dogs with visceral leishmaniasis at times 0 to 4.

Hematological parameters	Time 0	Time 1	Time 2	Time 3	Time 4
	M - DP	M - DP	M - DP	M - DP	M - DP
Red blood cells - million/mm <sup>3</sup>	6.5 – 1.9	7.3 – 1.3	7.3 – 1.4	7.4 – 1.2	7.4 – 1.2
Hemoglobin - g/dl	14.6 – 4.0	15.6 – 3.4	16.0 – 3.2	16.0 – 2.7	16.5 – 2.6
GV - %	42.0 – 12.0	45.4 – 10.0	46.4-8.8	47.0 – 7.6	48.0 – 7.6
MGV - u <sup>3</sup>	64.0 – 4.7	64.3 – 4.0	63.6 – 3.3	63.0 – 3.5	6.3 – 8.3
MCH - pg	22.0 – 1.2	22.0 – 0.9	22.0 – 1.1	22.0 – 1.1	22.0 – 1.4
MCHM – g/dl	34.4 – 1.4	34.0 – 2.6	34.7 – 1.0	34.5 – 1.0	34.7 – 1.0
TP - g/dl	9.0 – 1.2	9.0 – 1.5	8.7 – 1.4	8.4 – 1.2	8.3 – 1.0
T-Leukocytes - mil/mm <sup>3</sup>	8.0 – 3.1	7.8 – 2.6	8,1 – 3.0	8.1 – 3.0	8.1 – 3.0
Segmented - mil/mm <sup>3</sup>	5060 - 2282	4929 - 2151	5516 - 2267	5365 - 2098	5223 - 1930
Rods - mil/mm <sup>3</sup>	0.0 – 0.0	0.0 – 0.0	0.0 – 0.0	0.0 – 0.0	0.0 – 0.0
Basophils - mil/mm <sup>3</sup>	0.0 – 0.0	0.0 – 0.0	0.0 – 0.0	0.0 – 0.0	0.0 – 0.0
Monocytes - mil/mm <sup>3</sup>	485 – 351	561 - 337	490 - 282	385 - 281	376 - 230
Eosinophils - mil/mm <sup>3</sup>	477-396	589 - 559	655 - 505	681 - 905	733 - 954
Lymphocytes - mil/mm <sup>3</sup>	1747 - 971	1590 - 751	1740 - 730	1588 - 809	1635 - 893
Platelets - mil/mm <sup>3</sup>	176 - 69	207 - 96	183 - 91	187 - 94	191 - 90
Urea - mg/dl	49.0 – 40.3	44.0 – 31.3	38.0 – 24.0	42.0 – 26.7	40.0 – 20.0
Creatinine - mg/dl	1.0 – 0.3	0.9 – 0.3	0.9 – 0.3	0.96 – 0.4	0.94 – 0.34
TP - g/dl	7.8 – 1.0	7.6 – 1.4	7.4 – 1.0	7.0 – 1.3	7.0 – 1.1
Albumin - g/dl	3.0 – 1.5	3.0 – 0.6	3.1 – 0.6	3.3 – 0.9	3.3 – 0.6
Globulin - g/dl	4.8 – 1.7	5.0 – 1.5	4.2 – 1.5	4.0 – 1.5	3.7 – 1.4
A/G ratio	0.7 – 0.4	0.77 – 0.41	0.85 – 0.4	0.9 – 0.4	1.0 – 0.4

Legenda: GV (Globular Volume); MGV (Mean Globular Volume); MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin); MCHM (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration); TP (Total Proteins).

The amplification of *Leishmania* parasite DNA in the cPCR analysis was observed in Table 3 and the Table 4, the distribution of parasite load in qPCR.

**Table 3:** Distribution of positivity for *Leishmania* spp. in different samples, in cPCR, at different times of treatment.

Samples	T-0	T-1	T-2	T-3	T-4
Blood	32.35% (11/34)	16.66% (5/30)	11.11% (3/27)	4.54% (1/22)	5.26% (1/19)
Serum	11.76% (4/34)	3.33% (1/30)	7.4% (2/27)	4.54% (1/22)	5.26% (1/19)
Lymph node	50% (9/18)	45.45% (5/11)	40% (2/5)	33.33% (1/3)	0% (0/0)

**Table 4** - Distribution of parasite load for *Leishmania* spp. in different samples, in qPCR, at different treatment times.

qPCR	Time 0			Time 1			Time 2			Time 3			Time 4		
Parasite/mL	Lin	B	Sor	Lin	B	S	Lin	B	S	Lin	B	S	Lin	B	S
N	18	34	34	11	30	30	5	26	26	3	21	21	0	18	18
negative	0	13	21	2	23	24	0	19	23	1	20	18	0	17	17
>1 ≤ 10 <sup>2</sup>	2	7	5	4	2	2	3	3	1	2	0	0	0	1	1
>10 <sup>2</sup> ≤ 10 <sup>3</sup>	4	3	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
>10 <sup>3</sup> ≤ 10 <sup>4</sup>	8	8	6	4	4	4	1	2	2	0	0	2	0	0	0
>10 <sup>4</sup> < 10 <sup>5</sup>	4	3	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0

Legenda: qPCR (Real-time polymerase chain reaction); Lin (Lymphnode); B (Blood); S (Serum).

#### 4. Discussion

Throughout the treatment it was possible to observe that there was a decrease in the number of animals analyzed. In our studies, the percentage of treatment dropout was 23.5% (8/34). The rate of loss of animals over an analysis period is common in studies (Reithinger *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2018). Regarding deaths, Andrade *et al.* (2011) obtained 14.3% of dog deaths after treatment with miltefosine alone and Lisboa *et al.* (2018) obtained 24% of death in animals with the associated treatment of miltefosine with allopurinol. In our studies, there were seven deaths, but four

(11.76%) occurred from CVL. Thus, our rates are considered lower than those of other related studies.

The treatment of dogs with miltefosine associated with allopurinol has been reported by several authors, with different results (Manna *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2009; Woerly *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2019; Iarussi *et al.*, 2020; Ayres *et al.*, 2022).

According to the guidance of the LEISHVET group, which classifies dogs with CVL into stages (according to clinical and laboratory evaluation) and with the support of other researchers, animals in stage I (low antibody titer and with only one or two symptoms of CVL) should not be treated. They recommend that they are only monitored and medicated with Domperidone as they state that the treatment can cause an imbalance in the immune response (Miró *et al.*, 2018; Leishvet, 2018).

Some authors have stated that the end of treatment should be conditional on three conditions: disappearance of symptoms, normalized hematological, biochemical and urinary profile and in the serological evaluation (quantitative) the result should be below the cut-off value (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

We started with 34 animals (time zero) and, at this time, most of the dogs were oligosymptomatic - subclinical infection. According to many authors, clinical disease is much less frequent than subclinical disease. There are reports that in endemic regions there is a 60% prevalence of infected animals detected by molecular diagnosis and only 5% of sick animals (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Hosein *et al.*, 2017; Marcondes, Day, 2019; Alcover *et al.*, 2021).

The symptoms that predominated at the beginning of treatment were: lymphadenomegaly (popliteal), onychogryphosis, conjunctivitis and cutaneous signs of desquamation, which corroborate the findings of other authors (Ciamarella *et al.*, 1997; Amusatogui *et al.*, 2003; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Meléndez-Lazo *et al.*, 2018; Ayres *et*

*al.*, 2022).

Although there are many papers reporting improvement of clinical signs, some symptoms persist during and at the end of treatment. The most frequent are lymphadenomegaly and dermatitis (Miró *et al.*, 2009, Iarussi *et al.*, 2020), lymphadenomegaly and conjunctivitis (Dias *et al.*, 2021), lymphadenomegaly, dermatitis and ophthalmic changes (Ayres *et al.*, 2022). There are no reports of complete remission of symptoms associated with absence of laboratory changes (Andrade *et al.*, 2011; Nogueira *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2020).

At the end of the evaluation at one year of treatment, absence of clinical signs related to CVL was observed in the 19 animals; however, one female showed weight loss as she developed pseudocyesis and another maintained signs of chronic conjunctivitis that was followed since the first evaluation.

In the first evaluation (time zero), the most frequent hematological changes observed were a moderate decrease in the number of red blood cells in 27.27% of the animals, as well as in the concentration of hemoglobin (30.30%), globular volume (27.27%) and platelets (45.45%). The values of red blood cells, hemoglobin and VG improved during the evolution of the treatment, corroborating the data in the literature (Ciamarella *et al.*, 1997; Amusatogui *et al.*, 2002; Noli, Saridomichelakis, 2014; Meléndez-Lazo *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018; Dias *et al.*, 2020; Cabré, *et al.*, 2021).

There were few changes in the white series, a fact also observed by other authors (Ciamarella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 2001; Gaskin *et al.*, 2002; Corona *et al.*, 2004). Platelets remained decreased during and at the end of the evaluation, with percentages of T0-45.45%, T1- 37.93%, T2-52%, T3-52.38% and T4- 57.89% of the dogs, as reported by other authors (Santos *et al.*, 2020).

The causes of thrombocytopenia in CVL are related to depletion of thrombocytopoiesis, immune-mediated factors, platelet destruction and

vasculitis (Ciaramella *et al.*, 2005; Terrazano *et al.*, 2006.; Freitas *et al.*, 2012). The persistence of thrombocytopenia could be related to traumatic venipuncture, as reported and termed pseudothrombocytopenia (Wills, Wardrop, 2008). In dogs with CVL, anemia can be explained by chronicity of the disease, chronic renal failure, bleeding (epistaxis, gastroenteritis), bone marrow depression, immune-mediated hemolysis, and decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane and subsequent splenic sequestration. (Koutinas *et al.*, 1999; De Luna *et al.*, 2000; Trópia de Abreu *et al.*, 2011).

At the beginning of treatment, total protein levels were increased in 50% of the dogs, albumin decreased in 47.05% and globulin increased in 38.23% of them. The albumin-globulin (A/G) ratio was decreased in 29.11% of the animals evaluated, results widely described in the literature as the most common laboratory finding in CVL (Ciaramella *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 2011; Noli, Saridomichelakis, 2014; Da Silva *et al.*, 2018).

Elevated serum protein occurs due to hyperglobulinemia and may be associated with hypoalbuminemia (proteinuria, malnutrition) (Koutinas *et al.*, 1999). The reduction of antibody titers to non-significant levels, according to some authors, occurs over time with continued allopurinol therapy and is not related to clinical improvement (Miró *et al.*, 2009; Iarussi *et al.*, 2020).

At the end of treatment, the values of red blood cells and globular volume improved, however there was a slight decrease in hemoglobin, with 78,94%, 73,68% and 57,89% respectively of normal frequency. Platelets remained decreased in 57,89% of the animals. Urea values remained constant, with a slight worsening in creatinine values (T0-100% normal, T4-89,47%).

The increase in creatinine levels can be explained by accumulation of antigen-antibody precipitate in the nephrons and not by miltefosine, since the drug is not nephrotoxic (Esch *et al.*, 2015; Dorlo *et al.*, 2012).

However, PT (total protein) remained high in 42,10% of the animals; albumin decreased by 47,05% at time zero and 21,05% at time four.

Globulin was increased in 38,23% of the animals at T0 and in 26,31% at T4. The albumin/globulin ratio remained low, ranging from 29,11% at T0 to 26,31% at T4.

In general, we can state that there was an improvement in the hematological and biochemical parameters of the animals; taking into account that the increased levels of total protein and decreased A/G ratio are directly related to the amount of antibodies, which tends to decrease late in life (Miró *et al.*, 2009; Iarussi *et al.*, 2020).

Some authors reported improvement in most hematological and biochemical indices (Bianciardi *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2016; Iarussi *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2020). Dias *et al.* (2020) e Mateo *et al.* (2009) obtained the same results, with the exception of globulin levels and the A/G ratio which remained high.

Other hematimetric values improved in 56% of the treated animals; however, the A/G ratio improved only in 25% (Woerly *et al.*, 2009).

Research has shown that the values of red blood cells, globulins and A/G ratio would be the most important for monitoring treatment (Koutinas *et al.*, 2001; Iarussi *et al.*, 2020). Other authors have stated that the A/G ratio is the best parameter for the clinical evaluation of animals (Amusatogui *et al.*, 2003; Costa Val, 2004; Reis *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2013).

Of the four deaths related to the progression of CVL, the possible causes observed were: misunderstandings in the administration of medication by the guardian - under- or overdoses, discontinuation of treatment, difficulty in understanding the intervals between doses and the dosage; little interest - little bond between the owner and their dog, lack of understanding of the importance of treatment for the animal and for public health; loss of medication; absence from scheduled returns - without necessary clinical and laboratory follow-up; various socioeconomic difficulties - lack of financial resources for complementary examinations in animals with suspected comorbidities and to fuel the vehicle and transport

their animal (Provérbio *et al.*, 2014). According to all the difficulties listed above, we understand that we cannot attribute the deaths that occurred to the ineffectiveness of the drugs used, but to other extrinsic factors that hindered the efficiency of the treatment.

Blood samples are considered less invasive and, for this reason, well accepted by animal owners; in addition to having good sensitivity, according to some authors. They are a good option for large-scale diagnosis (Maia *et al.*, 2009). However, they are not suitable for treatment follow-up due to the transience of parasitemia during the course of the disease and should be replaced by other tissues - lymph node aspirate or skin biopsy. They also emphasized that, although the lymph node is a good tissue, it needs to be enlarged enough to perform the aspiration puncture; a fact that usually does not occur in asymptomatic dogs (Manna *et al.*, 2004; Mohammadiha *et al.*, 2012).

Urine can also be a good option, both for diagnosis and for treatment follow-up when the disease progresses to nephropathy associated or not with hematuria. It is not considered invasive and, in these cases, the parasite load can be high and higher than in blood samples (Manna *et al.*, 2008).

Other authors have stated that the presence of the parasite in blood and serum are inconsistent (Tsokana *et al.*, 2014; Dantas-Torres, *et al.*, 2016). In our studies, we found that samples from lymph node punctures proved to be the best tissue type for diagnosis and follow-up of CVL treatment (Manna *et al.*, 2009).

Studies consider the spleen and lymph nodes to be the best samples for diagnosis, as they are tissues of choice for leishmania (invasion and multiplication) and that bone marrow aspirate could be an option when the animal does not present lymphadenomegaly; although there are variations in the distribution of parasites in this tissue, which may alter the results of the parasite load (Maia *et al.*, 2009). In our study, the absence of

lymphadenomegaly in some animals affected the molecular assessment of parasite load in that tissue (Manna *et al.*, 2004).

Among the seropositive animals evaluated, 47,06% were positive in cPCR in at least one of the samples evaluated (blood, serum or lymph node). According to Lopes *et al.* (2016), cPCR is a very efficient method, presenting better results when using more than one sample from the same animal, because some biological samples are more sensitive than others. Another important point to highlight is that the association between two samples increases the sensitivity of the molecular diagnosis of leishmaniasis.

In endemic areas, serological tests are usually more sensitive, as there is a great exposure of the dog to the parasite (Martinez *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2017). In an endemic region of Pernambuco, the positivity values obtained in serological tests were 71,4% (127/178) with TR-DPP®, 70,2% (125/178) EIE and 50,6% (90/178) with RIFI and in molecular tests, positivity was 20,2% (36/178) in cPCR and 38,8% (69/178) in qPCR (Evaristo *et al.*, 2021). In a study in the same region as ours, when performing molecular assays on TR-DPP®-positive samples, 63,9% of the samples were positive for cPCR and 65% for qPCR (Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2010; Ramos-Augusto, 2018).

The performance of cPCR is still a matter of discussion in leishmaniasis, as some authors have presented results with high sensitivity (Fisa *et al.*, 2001; Lachaud *et al.*, 2002; Manna *et al.* 2004), while others showed lower sensitivity when compared to qPCR; in addition to stating that the cPCR technique requires electrophoresis (agarose gel run), the risk of contamination of samples and intoxication of the researcher by the presence of the ethidium bromide reagent (Silva *et al.*; 2001; Ramos, *et al.*; 2012; Borja *et al.*, 2016).

In addition, some factors may interfere with PCR, including the presence of inhibitors, factors related to primers and the DNA extraction

protocol, as well as the sensitivity of cPCR may depend on the type of sample evaluated (Silva *et al.*, 2017).

Parasite load in blood tends to vary over time and can give false negative results if collected at a time when it is low (Strauss-Ayali *et al.*, 2004). In addition, blood is a passage tissue, as the parasite has a predilection for organs such as the lymph node, liver, spleen, bone marrow and skin (Oliveira *et al.*, 2015). Thus, DNA detection may be lower compared to other tissues due to low and transient parasitemia (Lopes *et al.*, 2017; Riboldi *et al.*, 2018).

In one study, parasite load was assessed by comparing skin, lymph node, bone marrow and conjunctival swab samples. The skin was the one that showed the best result with the highest amount of parasites and the conjunctival swab the worst. They observed that the sensitivity of lymph node and bone marrow samples was the same in the majority of CVL animals (Chagas *et al.*, 2021). It should be considered that lymph node sampling is much less invasive and faster in its execution when compared to bone marrow sampling (Marcelino *et al.*, 2020).

Skin samples, in the opinion of several authors, allow the assessment of the risk of transmission from the vector to the dog and are the best option for diagnosis and follow-up of infection when compared to blood and spleen samples (Chagas *et al.*, 2021; Scorza *et al.*, 2021; Ayres *et al.*, 2022). However, these studies are recent and at the time of the experimental design of our work, skin collection was not included.

Thus, the work demonstrated that qPCR is a good method both for complementary diagnosis to be used in the monitoring of positive dogs, confirming the serological diagnoses of leishmaniasis, and for monitoring the parasite load throughout the treatment. It is important to note that the applicability of CVL diagnosis by molecular biology is not yet a reality for many laboratories, which lack physical structure, equipment and reagents, as well as trained human resources (Lopes *et al.*, 2017; Travi *et al.*, 2018),

but this diagnosis contributes to the surveillance and control actions of Canine Visceral Leishmaniasis in a more assertive and efficient way.

### **Acknowledgements**

This study was supported by The São Paulo State Research Foundation (FAPESP, protocol number 2018/ 25889-4 and 2017/50333-7 and the Secretary of Health of São Paulo State FESIMA/GAPS [number 2019/01057)

We thank the Bauru Center for Zoonoses Control staff, Adolfo Lutz Institute students and staff, and general collaborators from the Prefeitura Municipal de Bauru.

### **References**

Akhoundi, M., Downing. T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel,C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., Sereno, D., 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion o Leishmania Parasites and Sandflies, PLOS Neglected Tropical Diseases. Nice, França, 10(3): e0004349. doi:10.1371/journal.pntd.0004349.

Alcover, M.M., Basurco, A., Fernandez, A., Riera, C., Fisa, R., Gonzalez, A., Verde, M., Gonzalez, A., Garrido, A.M., Ruíz, H., Yzuel, A., Villanueva-Saz, S., 2021. A cross-sectional study of Leishmania infantum infection in stray cats in the city of Zaragoza (Spain) using serology and PCR. Parasites Vectors. 14, 178.

Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, B., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., "The Who Leishmaniasis Control Team, 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLOS One. Austrália, 7, e35671.

Amusatogui, I., Sainz, A., Rodriguez, F., Tesouro, M.A., 2003. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. European Journal of Epidemiology. 18(2),147–156. doi:10.1023/a:1023090929302.

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 Jr., M.L., Bartchewsky, S.J.H., Monte, 2011. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L.infantum*(=*L.chagasi*) in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 181, 83–90.

Aransay, A.M., Scoulica, E., Tselentis, Y., 2020. Detection and identification of *Leishmania* DNA within Naturally infected Sand Flies by Seminested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. *Applied Environmental Microbiology*. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.66.5.1933-1938.2000>>. Acesso em: 25 nov. 2022.

Ayres, E.C.B.S., Dias, A.F.R.L., Monteiro, B.R.G., Pazzini, S.S., Barbosa, M.E.C., Silva, E.B., Macedo, L.F.C., Sousa, V.R.F., Dutra, V., Nakazato, L., Almeida, A.B.P.F, 2022. Impacto clínico e parasitológico do tratamento de curta duração com miltefosina e alopurinol em monoterapia ou terapia combinada na leishmaniose visceral canina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. Mato Grosso, Brasil, 31(3). <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022040>.

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*. Oxford, 24 (7), 324-330.

Baneth, G., Nachum Biala, Y., Zuberi, A., Zipori Barki, N., Orshan, L., Kleinerman, G., ShmueliGoldin, A., Bellaiche, M., Leszkowicz Mazuz, M., Salant, H., Yasur Landau, D., 2020. *Leishmania* infection in cats and dogs housed together in an animal shelter reveals a higher parasite load in infected dogs despite a greater seroprevalence among cats. *Parasites Vectors*. Israel, v. 13(1):115. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3989-3>.

Bates, P.A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*. Liverpool, 37(10),1097–106.

Biancardi, P., Brovida, C., Valente, M.L. Aresu, L., Cavicchioli, L., Vischer, C., LUCIE Giroud, L., Castagnaro, M., 2009. Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy dogs: clinico pathological evaluation of the impact on the kidneys. *Toxicologic Pathology*. 37, 770-5. doi: 10.1177/0192623309344088.

Borja, L.S., Sousa, O.M.F., Solcà, M.S., Bastos, L.A., Bordoni, M., Magalhães, J.T., Larangeira, D.F., Barrouin-Melo, S.M., Fraga, D.B.M, Veras, P.S.P., 2016. A carga parasitária no sangue e na pele de cães

naturalmente infectados por *Leishmania infantum* está correlacionada com sua capacidade de infectar vetores de flebotomíneos. *Veterinary Parasitology*. 229, 110 -117.

Brasil, 2016. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ministério da Saúde. Nota Técnica Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA. Disponível em: <http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>.

Brasil, 2006. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde.

Burza, S., Croft, S.L., Boelart, M., 2018. Leishmaniasis. *The Lancet*. Londres, 392, 951-970, 2018. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2).

Cabré, M., Planellas, M., Ordeix, L., Solano-Gallego, L., 2021. Is signalment associated with clinicopathological findings in dogs with leishmaniosis? *Veterinary Record*. e451.

Cerbino Neto, J., Werneck, G. L., Costa, C.H.N., 2009. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*. 25(7), 1543-51. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2009000700012>.

Chagas, U.M.R., Avelar, D.M., Marcelino, A.P., Paz, G.F., Gontijo, C.M.F., 2021. Correlations between tissue parasite load and common clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*. Minas Gerais, 291, 109368.

Ciaramella, P., Oliva, G., De Luna, R., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., Persechino, A., 1997. "A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*," *Veterinary Record*. 141(21), 539–543.

Ciaramella, P., Pelagalli, A., Cortese, L., Pero, M.E., Corona, M.E., Lombardi, P., Avallone, L., Persechino, A., 2005. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Journal*. 169, 465–467.

Corona, M., Ciaramella, P., Pelagalli, A., Cortese, L., Pero, M.E., Santoro, D., Lombardi, P., 2004. Haemostatic Disorders in Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Research Communications*. 28, 331-

334.

Costa, C.H.N, 2011. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Brazil.* 44, 232-242.

Da Costa-Val, A. P., Cavalcanti, R.R., Gontijo, N.F., Michalick, M.S.M., Bruce, P., Williams, A., Melo, M.N., 2007. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. *The Veterinary Journal. Belo Horizonte,* 174, 636–643.

Dantas-Torres, F., Brandão-Filho, S.P., 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo,* 48(3), 151-156.

Dantas-Torres, F., Sales, K.G.S., Silva, L.G., Otranto, D. Figueredo, L.A., 2016. Rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. *Molecular and Cellular Probes.* doi: 10.1016/j.mcp.2016.08.006.

Dantas-Torres, F., Miró, G., Bowman, D.D., Gradoni, L., Otranto, D., 2018. Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. *Trends in Parasitology. Italy,* v.xx, n. yy.

De Luna, R., Ferrante, M., Severino, L., Ambrosio, R.D., Piantedosi, D., Gradoni, L., Lucisano, A., Persechino, A., 2000. Decreased Lipid Fluidity of the Erythrocyte Membrane in Dogs with Leishmaniasis associated Anaemia. *Journal of Comparative Pathology.* 122, 213–216.

Dias, A.F.R.L., Ayres, E.C.B.S., Martins, D.T.O., Maruyama, F.H.; Oliveira, R.G., Carvalho, M.R., Almeida, A.B.F., Teixeira, A.L.S., Mendonça, A.J., Souza, V.R.F., 2020. Comparative study of the use of miltefosine, miltefosine plus allopurinol, and allopurinol in dogs with visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology.* 217, 107947.

Donalisio, M.R., Paiz, L.M., da Silva, V.G., Pereira, V.B., von Zuben, A.P.B., Castagna, C.L., Motoie, G., Hiramoto, R.M., Tolezano, J.E., 2017. Visceral leishmaniasis in an environmentally protected area in southeastern Brazil: Epidemiological and laboratory cross-sectional investigation of phlebotomine fauna, wild hosts and canine cases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11: e0005666.

Dorlo, T.P.C., Balasegaram, M., Beijnen, J.H., Vries, P. J., 2012. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67, 2576–97. doi: 10.1093/jac/dks275.

Esch, J.K., Schaut, R.G., Ian M.L., Clay, G., Morais, A. L.M., Nascimento P.R.P., Whitley, E.M., Jeronimo, S.M.B., Sutterwala, F.S., Haynes, J.S. Petersen, C.A., 2015. Activation of Autophagy and NLR Family, Pyrin Domain Containing 3 Inflammasome during Q2 Q3 *Leishmania infantum* e Associated Glomerulonephritis. *The American Journal of Pathology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.04.017>.

Evaristo, A.M.C.F., Araujo, A.C., Costa, A.P., Sales, K.G.S., Silva, J.A.M., Dantas-Torres, F., Horta, M.C., 2021. Comparison of serological and molecular tests to investigate *Leishmania* spp. infections in stray dogs from an area of intense visceral leishmaniasis transmission in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. Pernambuco, 30(3): e00662.

Fisa, R., Riera, C., Gállego, M., Manubens, J., Portús, M., 2001. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology*. 99, 105-111.

Freitas, J.C.C., Nunes-Pinheiro, D.C.S., Lopes Neto, B.E., Santos, G.J.L., Abreu, C.R.A., Braga, R.R., Campos, R.M., Oliveira, L.F., 2012. Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Fortaleza, 45(1), 24-29.

Gaskin, A.A., Schantz, P., Jackson, J., Birkenheuer, A., Tomlinson, L., Gramiccia, M., Levy, Steurer, F., Kollmar, E., Hegarty, B.C., Ahn, A., Breitschwerdt, E.B., 2002. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Nova York, 16, 34–44.

Geary, W., 2021. Geocoding with Google sheets - API [WWW Document]. <https://github.com/nuket/google-sheets-geocoding-macro/blob/master/Code.gs> (accessed 11.23.21).

Gebreys, W.A., 2014. The Global One Health Paradigm: Challenges and Opportunities for Tackling Infectious Diseases at the Human, Animal, and Environment Interface in Low Resource Settings. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. United States, 8(11), e3257.

Haray, M.O., Olliaro, P.L., Costa, D.L., Costa, C.H.N., 2011. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology*. Brazil, 27 (9), 403-409.

Hernandez, C., Alvarez, C., Gonzáles, C., Ayala, M.S., León, C.M. Ramírez, J.D., 2014. Identification of Six New World Leishmania species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors*. 7, 501.

Hong, A., Zampieri, R.A., Shaw, J.J., Floeter-Winter, L.M., Laranjeira-Silva, M.F., 2020. One Health Approach to Leishmaniasis: Understanding the Disease Dynamics through Diagnostic Tools. *Pathogens*. São Paulo, 9, 809. doi:10.3390/pathogens9100809.

Hosein, S., Blake, D.P., Solano-Gallego, L., 2017. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology*. 144, 95–115.

Iarussi, F., Paradies, P., Foglia Manzillo, V., Gizzarelli, M., Caratozzolo, M.F., Navarro, C., Greco, B., Rubino, G.T.R., Oliva, G., Sasanelli, M., 2020. Comparison of Two Dosing Regimens of Miltefosine, Both in Combination With Allopurinol, on Clinical and Parasitological Findings of Dogs With Leishmaniosis: A Pilot Study. *Front. Vet. Sci*. 7:577395.

Koutinas, A.F., Saridomichelakis, M.N., Mylonakis, M.E., Leontides, L., Polizopoulou, Z., Billinis, C., Argyriadis, D., Diakou, N., Papadopoulos, O., 2001. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 98, 247–261.

Koutinas, A.F., Polizopoulou, Z.S., Saridomichelakis, M.N., Dimitrios, A., Fytianou, A., Plevraki, K.G., 1999. Clinical Considerations on Canine Visceral Leishmaniasis in Greece: A Retrospective Study of 158 Cases (1989–1996). *J Am Anim Hosp Assoc*. 35, 376–83.

Kullberg, M., Nilsson, M.A. Arnason, U., Harley, E.H., Janke, A., 2006. Housekeeping Genes for Phylogenetic Analysis of Eutherian Relationships. *Mol. Biol. Evol.* 23(8), 1493–1503. doi:10.1093/molbev/msl027.

Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Dereure, J., Lamothe, J.J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology*. 125, 197-207. doi: 10.1017/S003118200200208.

Leite, B.M.M., Solcà, M.S., Santos, L.C.S., Coelho, L.B., Amorim, L.D.A.F., Donato, L.E., Passos, S.M.S., Almeida, A.O., Veras, P.S.T., Fraga, D.B.M., 2018. The mass use of deltamethrin collars to control and prevent canine visceral leishmaniasis: A field effectiveness study in a highly endemic area. *PLoS Negl Trop Dis*.

12(5):e0006496.<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006496>.

Leishvet. LeishVet guidelines for the practical management of canine and feline leishmaniosis: a brief for the practicing veterinarian. 2018. <http://www.leishvet.org/wp-content/uploads/2018/09/EN-Guidelines.pdf>.

Lisboa, J.C.L., Urzulin, H.A., Araujo, K.S., Santana, M.A., Bento, S.G.R., Nogueira, F.S., 2018. Acompanhamento clínico e laboratorial de cães parasitologicamente positivos para leishmaniose Visceral e submetidos à terapia com miltefosina associada ao alopurinol. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP.* 16(3), 79-80.

Lopes, E.G., Geraldo Junior, C.A., Marcill, A., Silva, R.S., Keid, L.B., Oliveira, T.M.F.S., Soares, R.M., 2016. Performance of conventional PCRs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 58:41. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201658041>.

Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J.M., Gonçalves, G., Campino, L., 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal.* 179, 142–144.

Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Della Morte, R., Cringoli, G., Staiano, N., 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology.* Italy, 125(3-4), 251-262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.019>.

Manna, L., Gravino, A.E., Picillo, E., Nicola Decaro, N., Buonavoglia, C., 2008. Leishmania DNA Quantification by Real-time PCR in Naturally Infected Dogs Treated with Miltefosine. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149, 358–360. doi: 10.1196/annals.1428.018.

Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Picillo, S., Neglia, G., Francesco Vescio, F., Gravino, A.E., 2009. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *The Veterinary Journal.* 182, 441–445.

Marcelino, A.P., Filho, J.A. de S., Bastos, C.V., Ribeiro, S.R.; Medeiros, F.A.C., Reis, I.A., Lima, A.C.V.M., Rocha, Barbosa, J.R.; Paz, G.F.; Gontijo, C. M. F., 2020. Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Acta Tropica.* 207. 105495–doi:10.1016/j.actatropica.105495.

Marcondes, M., Day, M.J., 2019. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Research in Veterinary Science*. 123, 261–272.

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.

Mateo, M., Maynard, L., Vischer, C., Bianciardi, P., Miró, G., 2009. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniasis. *Parasitol Res.* 105, 155– 62. doi: 10.1007/s00436-009-1375-3.

Matsumoto, P.S.S., Hiramoto, R.M., Richini-Pereira, V.B., Camprigher, V.M., Taniguchi, H.H., Barbosa, J.E.R., Cortez, L.R.P.B., Fonseca, E.S., Guimarães, R.B., Tolezano, J.E., 2021. Impact of the dog population and household environment for the maintenance of natural foci of *Leishmania infantum* transmission to human and animal hosts in endemic areas for visceral leishmaniasis in São Paulo state, Brazil. *PLoS ONE* 16(8):e0256534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256534>.

Matsumoto, P.S.S., Taniguchi, H.H., Richini-Pereira, V.B., Hiramoto, R.M., Rampazzi, K.L., Barbosa, J.E.R., Puci Neto, R.A., Camprigher, V.M., Cortez, L.R.P.B., Rahaman, K.R., Novak, M., Tolezano, J.E. Efficacies of insecticide dog collars against visceral leishmaniasis in low and high-income areas and the effects for non-collared neighbor dogs. *Acta Tropica*, v. 235, p. 106626, 2022.

Meléndez-Lazo, A., Ordeix, L., Planellas, M., Pastor, J., Solano-Gallego, L., 2018. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. *Research in Veterinary Science*. 117, 18–27.

Miró, G., Oliva, G., Cruz, I., Canãvate, C., Mortarino, M., Vischer, C., Bianciardi, P., 2009. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. *Veterinary Dermatology*. Oxford, 20(5-6), 397-404.

Miró, G., López-Velez, R., 2018. Clinical management of canine leishmaniasis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. *Veterinary Parasitology*. 254, 151–9.

Mohammadiha, A., Mohebal, M., Haghghi, A., Mahdian, R. Abadi, A.R., Zarei, Z., Yeganeh, F., Kazemi, B., Taghipour, N., Akhoundi, M., 2013.

Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. *Experimental Parasitology*. Iran, 133(1), 89-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.10.017>.

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, 425–435.

Nogueira, F.S., Alvino, V.C., Galvis-Ovallos, F., Pereira-Chioccola, V., Moreira, M.A.B., Romariz, A.P.P., Molla, L.M., Menz, I., 2019. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & Vectors*. 12:19, São Paulo.

Oliveira, A.C., Figueiredo, F.B., Silva, V.L., Santos, F.N., Souza, M.B., Madeira, M.F., Abrantes, T.R., Périssé, A.R.S., 2015. Canine visceral leishmaniasis case investigation in the jacare region of niteroi, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop.* 57(4): 325-332.

OPAS, 2019. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas, Organização Pan-Americana da Saúde, Washington.

Pace, D., 2014. Leishmaniasis. *The Journal of infection*. London. 69(1), 10-8.

Paiva-Cavalcanti, M., Régis da Silva, C.G.; Gomes, Y.M., 2010. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 16(4), 537-542.

Palatnick-de-Souza, C.B., Day, M.J., 2011. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. Rio de Janeiro, 4, 197. <http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/197>.

Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M., Crotti, A., Maroli, M., Oliva, G., Roura, X., Zatelli, A., Zini, E., 2010. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Javma, Itália*, 236(11), 1184-1191.

Passantino, A., Russo, M., Colucci, P.C.L., 2010. Canine leishmaniosis and euthanasia in Italy: a critical legal-ethical analysis. *Revista Scient Technol Off int. Epiz. Italy*, 29(3), 537-548.

Proverbio, D., Spada, E., De Giorgi, G.B., Perego, R., 2014. Case Report: Failure of Miltefosine Treatment in Two Dogs with Natural *Leishmania infantum* Infection. *Case Reports in Veterinary Medicine*. Article ID 640151, 6 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/640151>.

Quinnel, R.J., Courtenay, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. Leeds, Inglaterra, 36, 1915-1934.

Ramos, R.A.N., Ramos, R.A.C., Jusi, M.M.G., Araújo, F.R., Machado, R.Z.; Faustino, M.A.G., Alves, L.C, 2012. Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of *Leishmania infantum* chagasi in dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal*, 2(3), 192-195, jul.-set.

Ramos-Augusto, L. C. Estudo de *Leishmania* spp. em amostras provenientes de cães e humanos e suas implicações em saúde pública na região de Bauru, São Paulo. 2018. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Carvalho, M.G., Mayrink, W., França-Silva, J.C., Rodolfo C. Giunchetti, R. C., Genaro, O., Corrêa-Oliveira, R., 2006. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*. 81, 68–75.

Reithinger, R., Coleman, P.G., Alexander, B., Vieira, E.P., Assis, G., Davies, C.R., 2004. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *International Journal for Parasitology*. 34, 55–62.

Ribeiro, V.M., Silva, S.M., Ingrid Menz, I., Tabanez, P., Nogueira, F.S.N., Werkhäuser, M., Fonseca, A.L.S., Filipe Dantas-Torres, F., 2013. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. *Parasites & Vectors*. 6(8). doi:10.1186/1756-3305-6-8.

Riboldi, E., Carvalho, F., Romão, P.R.T., Barcellos, R.B., Bello, G.L., Ramos, R.R., Dallegre, E., 2015. Molecular Method Confirms Canine *Leishmania* Infection Detected by Serological Methods in Non-Endemic Area of Brazil. *The Korean Journal of Parasitology*. 56 (1), 11–19.

Santos, S.N., Ribeiro, A.P.C., Conti, A.C.M., 2020. MILTEFOSINE IN TREATING DOGS WITH LEISHMANIOSIS AND ITS HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS. *Facit Business and Technology Journal*.

18(4), 174-207.

Shaheenn, M.N.F, 2022. The concept of one health applied to the problem of zoonotic diseases. *Rev Med Virol.* Jul, 32(4):e2326. doi: 10.1002/rmv.2326. Epub 2022 Jan 20. PMID: 35060214.

Scorza, B.M., Mahachi, K.G., Cox, A.C., Toepp, A.J., Leal-Lima, A., Kushwaha, A.K., Kelly, P., Meneses, C., Wilson, G., Gibson-Corley, K.N., Bartholomay, L., Kamhawi, S., Petersen, C.A., 2021. *Leishmania infantum* xenodiagnosis from Vertically infected dogs reveals significant skin tropism. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* United States, 15(10):e0009366. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009366>.

Silva, A. O., 2017. Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Leishmania* (*Viannia*) spp. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz.

Silva, E.S., Gontijo, C.M., Fernandes, O., Pirmez, C., Brazil, R.P., 2001. Short report: detection of leishmania DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65(6), 896–898. doi: 10.4269/ajtmh.2001.65.896.

Silva, J.N.D., Cotrim, A.C., Conceição, L.A.V.D., Marins, C.M.F., Marchi, P.G.F., Honorio-França, A.C., Almeida. A.D.B.P.F., França, E.L., Sousa, V.R.F., 2018. Immunohaematological and rheological parameters in canine visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet.* Apr-Jun; 27(2), 211-217. doi: 10.1590/s1984-296120180021. Epub 2018 May 24. PMID: 29846458.

Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, C., Baneth, G., 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites Vectors.* Londres, 4, 86-102.

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, C., Baneth, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology.* Espanha, 165(1-2), 1-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>.

Solano-Gallego, L., Di Filippo, L., Ordeix, L., Planellas, M., Xavier, R., Altet, L., Martínez-Orellana, P., Montserrat, S., 2016. Early reduction of *Leishmania infantum*-specific antibodies and blood parasitemia during treatment in dogs with moderate or severe disease. *Parasites & Vectors.*

9:235.

Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G., 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *Journal of Infectious Diseases*. Israel, 189, 1729-33.

Terrazzano, G., Cortese, L., Piantedosi, D., Zappacosta. S., Di Loria, A., Santoro, D., Ruggiero, G., Ciaramella, P., 2006. Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 110, 331-337.

Travi, B.L., Cordeiro-da-Silva, A., Dantas-Torres, F., Miró, G., 2018. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living amongus. *PLoS Negl Trop Dis*. 12(1): e0006082. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006082>.

Trópia de Abreu, R., Carvalho, M.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.

Tsokana, C.N., Athanasio, L.V., Valiakos, G., Spyrou, V., Manolakou, K., Billinis, C., 2014. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis. In: Claborn, D. *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. 161-193, 2014.

von Zuben, A.P.B., Donalísio, M.R., 2016. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. *Caderno de Saúde Pública*. Campinas, 32(6).

Wills, T.B., Wardrop, K.J., 2008. Pseudothrombocytopenia Secondary to the Effects of EDTA in a Dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 44(2), 95-97. doi:10.5326/0440095.

Woerly, V., Maynard, L., Sanquer, A., Eun, H.M., 2009. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. *Parasitology research*. Berlin, 105(2), 463-469.

WHO, 2010. Control of the Leishmaniases: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the 10 Control of Leishmaniases, World Health Organization, Geneva.

WHO, 2020. Leishmaniasis. World Health Organization, Geneva. <https://www.who.int/news-room/fact13-sheets/detail/leishmaniasis>.

WHO, 2021. Leishmaniasis, number of cases of visceral leishmaniasis reported. pp. 27–28. Available: [http://apps.who.int/neglected\\_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html](http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html).

Willis, T.B., Wardrop, K.J, 2008. Pseudothrombocytopenia Secondary to the Effects of EDTA in a Dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 44, (2), 95–97. doi:10.5326/0440095.

# Anexos

**Anexos**

**Anexo 1**



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO – CTC / IAL



São Paulo, 14 de junho de 2023.

Projeto: **CTC-IAL 59-L/2019**

**“Uso da miltefosina como tratamento em cães sorologicamente positivos para Leishmaniose visceral no município de Bauru - São Paulo”**

Coordenação: **Virgínia Bodelão Richini Pereira**

Prezado(s) Coordenador(es)

Comunicamos que o projeto **CTC-IAL 59-L/2019** foi **cadastrado** no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação quanto o mérito científico e após aprovação quanto aos aspectos éticos pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz em 27 de outubro de 2020 (Protocolo CEUA-IAL 02/2020).

Atenciosamente,

  
ADRIANA PARDINI VICENTINI  
Presidente do CTC/IAL

1ª Via: Coordenador  
2ª Via : Diretor de Núcleo  
3ª Via: Diretor de Centro  
4ª Via: CTC

**Anexo 2**



Governo do Estado de São Paulo  
Secretaria da Saúde  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - IAL

Parecer Técnico

**Número de Referência:** Parecer CEUA/IAL n° 02/2020  
**Documento de Referência:** Projeto de Pesquisa 01/2020  
**Interessado:** Virgínia Bodelão Richini Pereira  
**Assunto:** Uso da miltefosina como tratamento em cães sorologicamente positivos para Leishmaniose visceral no município de Bauru ? São Paulo

Vimos pelo presente informar que o Projeto de Pesquisa Científica "Uso da miltefosina como tratamento em cães sorologicamente positivos para Leishmaniose visceral no município de Bauru - São Paulo", sob coordenação da Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira, foi **APROVADO**, sendo autorizada a utilização de 50 (cinquenta) cães domésticos (*Canis lupus familiaris*), com grupo definido com animais de gêneros, massa e idade variáveis.

É importante salientar que a autorização supra é válida pelo período de 3 (três) anos a partir da emissão deste parecer, conforme indicado no projeto apresentado, e ressaltamos que quaisquer alterações nos protocolos de pesquisa, assim como necessidades de interrupção ou extensão dos protocolos, deverão ser comunicadas à CEUA-IAL.

Outrossim, informamos que deverão ser encaminhados relatórios anuais e relatório final para avaliação desta comissão com relação ao andamento ou conclusão do projeto.

Atenciosamente,

São Paulo, 27 de outubro de 2020.

Adriano Abbud  
COORDENADOR  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - IAL



Assinado com senha por ADRIANO ABBUD - 27/10/20 às 17:15:32.  
Documento Nº: 9872109-3132 - consulta à autenticidade em  
<https://www.documentos.spsempapel.sp.gov.br/sigaex/public/app/autenticar?n=9872109-3132>

Classif. documental	001.01.05.006
---------------------	---------------



SIGA

**CENTRO DE LABORATÓRIOS REGIONAIS – CLR II – BAURU**

Gostaríamos de convidá-lo para participar da pesquisa de nome “Uso da Miltefosina como tratamento em cães sorologicamente positivos para Leishmaniose Visceral no município de Bauru-São Paulo”

A Leishmaniose Visceral é uma importante zoonose, que acomete os homens e os animais. Na zona urbana, os cães são os animais comumente afetados, e, assim como os homens, adoecem e podem morrer. O tratamento canino não é mais proibido, desde que sejam seguidos todos os protocolos.

Este documento informa que o projeto citado acima tem o objetivo de oferecer gratuitamente o tratamento aos cães infectados, acompanhamento por meio de exames laboratoriais e encoleiramento durante dois anos, tudo sob supervisão veterinária. Os animais serão avaliados a cada 4 meses, em local e hora previamente acordado, sempre priorizando não interferir na rotina da família.

Dessa forma, fica esclarecida sua participação voluntária nesta pesquisa, sendo possível dela não participar ou se retirar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo, caso decida pela eutanásia do seu animal. Qualquer dúvida que o (a) senhor (a) ou seus familiares possam ter, podem ser respondidas pelas pesquisadoras responsáveis, Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira e Valéria Medina Camprigher, nos telefones e endereço abaixo.

Portanto, dou meu consentimento livre e esclarecido.

Nome do Participante \_\_\_\_\_

Assinatura do Participante ou Responsável \_\_\_\_\_

Nome dos Pesquisadores: Virgínia Bodelão Richini Pereira, Valéria Medina Camprigher

Assinatura do Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

Endereço: Rua Henrique Hunzicker, quadra 1, S/N, fone 3103-8050 e 99793-0975

Data:...../...../.....