

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

**JAQUELINE DOS SANTOS AZEVEDO**

**Estudo retrospectivo de casos de leishmaniose visceral  
canina atendidos em um hospital veterinário de uma área  
endêmica para a doença**

Araçatuba – SP

2019

**JAQUELINE DOS SANTOS AZEVEDO**

**Estudo retrospectivo de casos de leishmaniose visceral  
canina atendidos em um hospital veterinário de uma área  
endêmica para a doença**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica)

**Orientadora: Profa. Associado Mary Marcondes**

**Coorientador: Prof. Dr. Wagner Luis Ferreira**

ARAÇATUBA – SP

2019

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA/UNESP

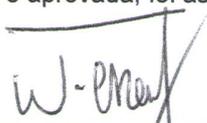
A994e	<p>Azevedo, Jaqueline dos Santos</p> <p>Estudo retrospectivo de casos de leishmaniose visceral canina atendidos em um hospital veterinário de uma área endêmica para a doença / Jaqueline dos Santos Azevedo. -- , 2019</p> <p>70 f. : il., tabs. + 1 CD-ROM</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara,</p> <p>Orientadora: Mary Marcondes</p> <p>Coorientador: Wagner Luis Ferreira</p> <p>1. Leishmania. 2. Estudo retrospectivo. 3. Sinais clínicos. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JAQUELINE DOS SANTOS AZEVEDO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA.**

Aos 01 dias do mês de julho do ano de 2019, às 14:00 horas, no(a) Sala nº 2 da Central de Salas de Aula da Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública; composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA do(a) Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp, Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI do(a) Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp, Profa. Colaboradora KARINA YUKIE HIRATA do(a) Setor de Veterinária e Produção Animal / Universidade Estadual do Norte do Paraná/UENP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de JAQUELINE DOS SANTOS AZEVEDO, intitulada **Estudo retrospectivo de casos de leishmaniose visceral canina atendidos em um hospital veterinário de uma área endêmica para a doença de 2007-2016**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.



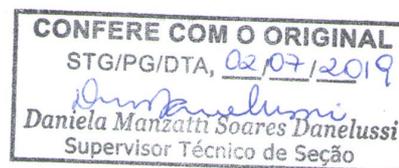
Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA



Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI



Profa. Colaboradora KARINA YUKIE HIRATA



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Estudo retrospectivo de casos de leishmaniose visceral canina atendidos em um hospital

Título: veterinário de uma área endêmica para a doença

AUTORA: JAQUELINE DOS SANTOS AZEVEDO

ORIENTADORA: MARY MARCONDES

COORIENTADOR: WAGNER LUIS FERREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



Profa. Colaboradora KARINA YUKIE HIRATA

Setor de Veterinária e Produção Animal / Universidade Estadual do Norte do Paraná/UENP

Araçatuba, 01 de julho de 2019.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Elvira Aparecida dos Santos e Luiz Roberto de Azevedo, por todo amor e apoio para que eu chegasse até aqui.

Amo vocês!!

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por TUDO!!! Pelo amor incondicional, por cuidar de todos os detalhes da minha vida.

À minha mãe Cida que é o meu porto seguro e está sempre ao meu lado em todas as circunstâncias, me apoiando e fortalecendo com suas palavras de calma e conforto. Eu amo muito você

Ao meu pai Luiz que não mede esforços para me ajudar e incentivar. Obrigada por tudo o que fez por mim. Eu amo muito você.

Ao meu irmão Alan por me ajudar sempre em tudo o que eu precisar. Amo você.

As minha sobrinhas Lara e Alana por alegrarem os meus dias. Amo vocês.

As minhas primas Karen e Vanessa por todo as reflexões, conversas e risadas. Amo vocês.

Ao Danilo por todo companheirismo e suporte que me proporciona há anos. Obrigada por facilitar tudo pra mim. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Amo você.

Aos amigos que amo:

À minha amiga Bia, que é uma parceira pra vida toda. Àquela que ouve minhas lamentações, me faz rir, me acalma e incentiva.

À minha amiga Alessandra, que é sinônimo de admiração, parceria e companheirismo.

À minha amiga Stefani, que mesmo longe sempre estará ao meu lado. Muita saudade de conviver com você.

À Gisele Reis por todo o incentivo e força. Também pelas conversas reflexivas.

À minha amiga Karina não tenho palavras para agradecer todo o apoio, por me socorrer em cada momento de dificuldade. Ka, você é luz na vida das pessoas ao seu redor. Sorte de quem te tem como amigo. Obrigada por tudo.

Aos meus novos amigos: Pâmela, Cadu, Juliane, Talita, Renato e Marcelo obrigada por deixarem meus dias mais leves e engraçados.

Ao professor Wagner Luis Ferreira por toda a orientação durante o período de graduação e residência. O senhor me inspira há muito tempo como pessoa e profissional. Muito grata por ter sido sua aluna.

À professoras Kátia Denise Saraiva Bresciani e Daniela Bernadete Rozza pela disponibilidade e pela contribuição na banca de exame geral de qualificação e defesa. Também por compartilhar todo seus conhecimentos durante a graduação.

Aos pacientes atendidos no hospital, mesmo sem compreenderem a importância do estudo. Todo respeito.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA - UNESP), por todo conhecimento adquirido durante a graduação e pós graduação. Muito orgulho e carinho pela FMVA.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço especialmente a minha orientadora Mary Marcondes, pela paciência, dedicação, ensinamentos, opiniões, confiança. Professora obrigada por compartilhar sua imensa sabedoria e experiência comigo. Você me ensinou e ensina muito muito muito. Imenso orgulho de ser orientada por você.

## EPÍGRAFE

*“Neste mundo não existe verdade universal. Uma mesma verdade pode apresentar diferentes fisionomias. Tudo depende das decifrações feitas através de nossos prismas intelectuais, filosóficos, culturais e religiosos.”*

*Dalai Lama*

AZEVEDO, J S. **Estudo retrospectivo de casos de leishmaniose visceral canina atendidos em um hospital veterinário de uma área endêmica para a doença.** 2019. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

## RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram verificar, em uma população de cães com leishmaniose visceral, atendida em um hospital veterinário de área endêmica para a doença no Brasil, as principais alterações clínicas observadas, os métodos utilizados para confirmar o diagnóstico, o tempo decorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico e a utilização de métodos de prevenção da doença. Os prontuários dos cães atendidos durante o período do estudo foram avaliados afim de selecionar àqueles que possuíam diagnóstico da doença. Na população estudada machos e cães de raças definidas apresentaram uma maior predisposição ao desenvolvimento da doença. Dentre as alterações clínicas mais frequentemente observadas destacam-se linfadenomegalia, lesões dermatológicas, alterações gastrointestinais, anorexia ou hiporexia, perda de peso e alterações oftálmicas. Mais de 80% dos cães apresentava hiperproteinemia. Em 59,52% dos animais o diagnóstico foi confirmado apenas por meio de exame parasitológico direto, sendo em 56,34% por citologia de punção biopsia aspirativa de linfonodos. O tempo de evolução da doença no momento da primeira consulta no hospital veterinário variou de uma semana a mais de um ano, com 42,86% dos animais apresentando sintomas entre um e 12 meses. Cerca de metade dos cães já havia recebido algum tipo de tratamento para os sintomas, sem diagnóstico de leishmaniose visceral canina. Somente quatro cães faziam uso de coleiras inseticidas como método preventivo. Os achados permitem afirmar que muitos animais doentes não são diagnosticados precocemente e nem incluídos como suspeitos para a doença, agravando a situação epidemiológica país. Ainda, chama atenção a quase completa ausência de métodos preventivos para a doença.

**Palavras-chave:** *Leishmania infantum*. Cães. Sintomas. Diagnóstico. Prevenção.

AZEVEDO, J. S. **Retrospective study of canine visceral leishmaniosis in a veterinary teaching hospital of an endemic area for the disease.** 2019. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

## **ABSTRACT**

The aim of the present study was to verify, in a population of dogs with visceral leishmaniosis referred to a veterinary teaching hospital in an area endemic for the disease in Brazil, the main clinical signs observed, the time elapsed between onset of symptoms and diagnosis, the methods used to confirm the diagnosis, and the use of preventive methods. The medical records of the dogs attended during the study period were evaluated in order to select those who had a diagnosis of the disease. In the studied population, males and pure breed dogs showed a greater predisposition to the development of the disease. Among the most frequently observed clinical signs are lymphadenomegaly, anorexia or hyporexia, weight loss, dermatological, gastrointestinal and ophthalmic alterations. More than 80% of the dogs had hyperproteinemia. In 59.52% of the animals the diagnosis was confirmed only by means of direct parasitological examination, and in 56.34% by cytology of lymph nodes. Symptoms lasted from one week to more than one year at the moment of the consultation at the veterinary hospital, with 42.86% of the dogs presenting symptoms between one and 12 months. About half of the dogs had already received some sort of treatment for the symptoms, with no diagnosis of canine visceral leishmaniosis. Only four dogs used insecticidal collars as a preventive method. The findings allow to affirm that many diseased animals are not diagnosed early and nor included as suspects for the disease, aggravating the country epidemiological situation. Still, it calls attention to the almost complete absence of preventive methods for the disease.

**Keywords:** *Leishmania infantum*. Dogs. Clinical signs. Diagnosis. Prevention.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –** Principais alterações clínicas observadas em 504 cães com diagnóstico de leishmaniose visceral, atendidos no hospital veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Araçatuba, em um período de 10 anos (2007-2016). (Araçatuba-SP, 2019)..... 30
- Figura 2 –** Principais alterações hematológicas observadas em 344 cães com leishmaniose visceral, atendidos no hospital veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Araçatuba, em um período de 10 anos (2007-2016). (Araçatuba-SP, 2019)..... 32

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 –** Número e percentagem, segundo o sexo, padrão racial e faixa etária do total de pacientes e de cães com leishmaniose visceral (LV), atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Araçatuba em um período de 10 anos (2007-2016). (Araçatuba-SP, 2019)..... 28
- Tabela 2 –** Métodos utilizados para o diagnóstico de leishmaniose visceral em 504 cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Araçatuba, em um período de 10 anos (2007-2016). (Araçatuba-SP, 2019) ..... 34
- Tabela 3 –** Tempo decorrido entre o início dos sintomas e a instituição do diagnóstico de leishmaniose visceral em 504 cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Araçatuba, em um período de 10 anos (2007-2016). (Araçatuba- SP, 2019)..... 35

## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPP - *Dual path platform*

ELISA - Ensaio imunoenzimático indireto

IgG - Imunoglobulina G

LV - Leishmaniose visceral

LVC - Leishmaniose visceral canina

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS - Ministério da Saúde

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RK 9 - Antígeno recombinante 39

RK 26 - Antígeno recombinante 26

RK 28 - Antígeno recombinante 28

RK 39 - Antígeno recombinante 39

SP - São Paulo

spp. - Espécie

Ta 1 - células T auxiliares tipo 1

Ta 2 - células T auxiliares tipo 2

UNESP - Universidade Estadual Paulista

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Delineamento experimental	23
3.2 Colheita de sangue total	24
3.2.1 Análise hematológica	24
3.2.2 Determinação de creatinina sérica	24
3.3 Diagnóstico	25
3.3.1 Exames citológicos e histopatológicos	25
3.3.1.1 Exame citológico de nódulos cutâneos, linfonodos e medula óssea	25
3.3.1.2. Exame citológico de sangue periférico e efusão peritoneal	25
3.3.1.3. Exame histopatológico de lesão cutânea	25
3.3.2 Provas Sorológicas	26
3.3.2.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	26
3.3.2.2 Teste Rápido TR DPP® LVC	26
3.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	26
3.4 Análise estatística	27
4 RESULTADOS	27
4.1 Animais	27
4.2 Alterações clínicas	28
4.3 Exames complementares	31
4.4 Diagnóstico	32
4.5 Profilaxia	34
4.6 Tempo de evolução da doença e tratamentos anteriores	34
4.7 Eutanásia	36
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48

## 1. INTRODUÇÃO

Leishmaniose é uma doença cosmopolita, zoonótica, de caráter tropical, negligenciada, que afeta milhares de pessoas todos os anos. Em seres humanos, pode ser classificada como tegumentar ou visceral, o que confere quatro formas de apresentação clínica: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral, a última mais grave e fatal quando não tratada (WHO, 2018). Causada por protozoários do gênero *Leishmania*, a doença é transmitida por meio da picada de fêmeas de flebotômios que inoculam o protozoário quando fazem o repasto sanguíneo. Más condições sanitárias estão relacionadas com o aumento dos casos de leishmaniose, uma vez que criam condições para aumentar a proliferação de flebotomos (BANETH; SOLLANO-GALLEGO, 2015)

Sob o ponto de vista epidemiológico o cão é considerado o principal reservatório urbano de *Leishmania infantum* (syn *Leishmania chagasi*), agente causador da leishmaniose visceral nas Américas (SOLLANO-GALLEGO et al. 2011). Dado que corrobora com o fato de que em uma região endêmica o aumento da prevalência da doença em cães pode estar relacionado ao aumento da incidência de casos humanos (BELO et al., 2013; BRASIL, 2006; CAMARGO-NEVES et al., 2001; CARNEIRO et al., 2004). Dessa forma, salienta-se a importância do conhecimento das várias formas de apresentação clínica da leishmaniose visceral canina (LVC), bem como de métodos de diagnóstico, tratamento e prevenção, de modo a minimizar o número de cães infectados em uma população.

Em virtude da importância desta zoonose em saúde pública, o objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo retrospectivo dos casos de leishmaniose visceral canina atendidos, evidenciando o tempo decorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico, os métodos utilizados para confirmar o diagnóstico, as principais alterações clínicas observadas e a utilização de métodos de prevenção da doença de uma população canina atendida em um hospital veterinário de área endêmica para leishmaniose visceral no estado de São Paulo, Brasil.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose é uma enfermidade zoonótica, de grande importância mundial, causada por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*. Infecta anualmente 700.000 a um milhão de pessoas em todo mundo (WHO, 2018). Consiste em uma enfermidade tropical negligenciada, transmitida por vetores, com mais de 90% dos casos da forma visceral, a mais severa da doença, concentrando-se no Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2018).

No Brasil a LV encontrava-se originalmente limitada à região nordeste, principalmente em ambientes rurais; no entanto, ao longo do tempo, houve uma transição epidemiológica, com incidências crescentes em áreas urbanas, associada à colonização por flebotomos e à disseminação e adaptação de reservatórios naturais a esses ambientes domésticos, com a doença se espalhando para o centro-oeste, sudeste e sul do país (MARCONDES: DAY, 2019). São Paulo é o estado brasileiro mais rico e populoso, com mais de 45 milhões de habitantes em 2018 (IBGE, 2018). De 1999 a 2017 foram notificados 7328 casos de leishmaniose visceral em humanos no estado de São Paulo, com uma média anual de 150 casos e uma letalidade de 8,6% (BEPA 2019). Araçatuba foi o primeiro município do estado a confirmar casos autóctones de LV canina e humana, em 1998 e 1999, respectivamente (COSTA et al., 2018). O município localiza-se na região noroeste do estado, e em 2017 possuía cerca de 195 mil habitantes (IBGE, 2018). Nos últimos 15 anos Araçatuba tem sido considerada uma área altamente endêmica para a doença em humanos (BEPA 2019) e em cães (COSTA et al., 2018).

Sob o ponto de vista epidemiológico o cão representa o principal reservatório doméstico do parasito e potencial fonte de infecção para os seres humanos (SHAW, 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2011), observando-se uma associação entre a ocorrência da infecção em cães e o risco da ocorrência da doença em seres humanos (BELO et al., 2013; BRASIL, 2006; CAMARGO-NEVES et al., 2001; CARNEIRO et al., 2004). Os vetores responsáveis pela

transmissão da leishmaniose visceral (LV) são flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo. Embora outras espécies tenham sido identificadas, a *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal transmissora da LV no Brasil (BRASIL, 2014). A prevalência da LVC no Brasil, em média, varia de 1,9 a 35% em áreas endêmicas, podendo alcançar até 53,4% em algumas regiões (BARATA et al., 2013; DANTAS-TORRES et al., 2006; FUJIMORI et al., 2016; LOPES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2010; PIMENTEL et al., 2015).

A cadeia epidemiológica inicia-se com o repasto sanguíneo de fêmeas infectadas com as formas promastigotas, que são inoculadas na epiderme do hospedeiro e fagocitadas pelo sistema fagocítico monocuclear. No interior do macrófago diferenciam-se em formas amastigotas (aflageladas) e multiplicam-se por intensa divisão binária. Os macrófagos repletos rompem-se e as formas livres passam a ser fagocitadas por novas células, disseminando-se para vários órgãos como fígado, baço, linfonodos e medula óssea, dentre outros, estabelecendo-se a infecção sistêmica (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2015).

A evolução e os sintomas da enfermidade estão associados à resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro frente à infecção. Um estudo demonstrou que cerca de 60% dos cães que vivem em área endêmica tiveram contato com o protozoário, constatado através da detecção de anticorpos ou demonstrado através de resposta celular específica (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Assim, a imunidade protetora é mediada por células (CD4 +) e depende do fenótipo do linfócito T auxiliar ativado. Se forem ativadas preferencialmente as células T auxiliares tipo 1 (Ta1) ocorre uma resposta imune predominantemente celular, podendo haver controle do parasitismo e ausência de quadro clínico da doença. Em contraste, quando a infecção está associada com a ativação preferencial de linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Ta2), ocorre a proliferação de células B com subsequente produção de imunoglobulinas e desenvolvimento da doença (CIARAMELLA; CORONA, 2003; PINELLI et al., 1994). Os complexos imunes formados podem agravar a doença por serem depositados em diversos órgãos e tecidos, como rins e articulações, levando a uma lesão renal com desenvolvimento de poliúria e polidipsia, e a quadros de poliartrite, dentre outros

(CIARAMELLA et al., 1997; CIARAMELLA; CORONA, 2003; PEÑA et al., 2008). A doença renal pode ser uma das únicas manifestações nos pacientes infectados, e é a principal causa de óbito em cães com LV (GRAUER, 2005; ROURA et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Alterações oftálmicas, como blefarite, ceratoconjuntivite e uveíte são comumente observadas e podem ser causadas por ação direta do parasito ou por deposição de imunocomplexos (BRITO et al., 2010; FREITAS et al., 2017; MANNA, 2009).

No que concerne aos achados dermatológicos, a forma cutânea clássica é uma dermatite esfoliativa não pruriginosa, que acomete principalmente a região periocular, ponte nasal e borda dos pavilhões auriculares, podendo ser difusa por todo o corpo. Esta pode ser acompanhada de áreas de rarefação pilosa ou alopecia, com presença de pápulas eritematosas. Pode-se observar também uma dermatite ulcerativa, relacionada à vasculite ou a uma ação direta do parasito, particularmente em saliências ósseas, cabeça, junções mucocutâneas e coxins. Formas atípicas como dermatite nodular e dermatite papular, são menos frequentemente observadas. Muitos cães apresentam onicogribose devido à presença do parasito estimulando a matriz ungueal (BANETH et al., 2008; CIARAMELLA et al., 1997; FREITAS, et al., 2012; KOUTINAS et al., 2010; LOMBARDO, et al., 2014; MARCONDES, 2016; SARIDOMICHELAKIS; KOUTINAS, 2014). Embora com menor frequência, é possível observar alterações hepáticas (CIARAMELLA et al., 1997), cardíacas (MELÉNDEZ-LAZO, 2018) e neurológicas (LIMA et al., 2003; MACAU et al., 2017) em pacientes com LVC.

Apesar de a LVC desencadear uma gama de alterações clínicas, grande parte dos cães infectados permanecem assintomáticos. Esse fato é preocupante, visto que vários estudos demonstraram que cães assintomáticos permanecem com capacidade infectiva ao vetor (BORJA et al., 2016; LAURENTI et al., 2013; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016), tendo sido igual ou até superior que a de cães sintomáticos em dois deles (BORJA et al., 2016; LAURENTI et al., 2013).

Os achados laboratoriais frequentemente encontrados nesses pacientes compreendem alterações bioquímicas como hiperproteinemia (hiperglobulinemia), hipoalbuminemia, aumento da atividade de enzimas hepáticas e azotemia (CIARAMELLA et al., 1997; GIUDICE; PASSANTINO, 2011; KOUTINAS et al., 2001; PALTRINIERI et al., 2010; PALTRINIERI et al., 2016; PETANIDES et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Naqueles que apresentam doença renal, é frequente a observação de proteinúria relacionada à glomerulonefrite (BRAGA et al., 2015; KOUTINAS et al., 2001). Muitos cães apresentam uma anemia não regenerativa decorrente de doença inflamatória crônica (redução de ferro sérico por retenção anormal deste composto pelos macrófagos, típicos da anemia de distúrbios crônicos), disfunção (hipoplasia ou aplasia) da medula óssea com eritropoiese reduzida devido ao parasitismo neste local, como consequência da doença renal crônica e diminuição da produção de eritropoetina e, finalmente, por um aumento da hemólise pelo baço e fígado, associado a uma resposta à infecção por *L. infantum* (DIAS et al., 2012; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018; MOMO et al., 2014; NICOLATO, et al., 2013; TOMMASI et al., 2014).

Em referência ao leucograma, tanto leucopenia quanto leucocitose podem ser encontradas (CIARAMELLA et al., 1997). Uma leucocitose por neutrofilia pode ser observada quando há infecção bacteriana secundária, enquanto linfopenia, linfocitose ou eosinofilia aparecem ocasionalmente (NICOLATO et al., 2013). Ademais, pode-se observar uma monocitose, relacionada à estimulação antigênica crônica, como observado em outras doenças transmitidas por vetores incluindo anaplasiose e erliquiose (HARRUS et al., 1999). Trombocitopenia é um achado comum em cães infectados por *L. infantum*, supostamente por sequestro plaquetário e consumo durante o processo de coagulação, produção de megacariócitos diminuída ou prejudicada, e, também, decorrente de processos imunomediados (GIUDICE; PASSANTINO, 2011; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

O diagnóstico definitivo da LVC constitui-se um desafio. Existem métodos considerados “diretos”, os quais permitem visualizar a forma amastigota do

parasito e, os “indiretos”, que avaliam a resposta imune do hospedeiro frente à infecção, através da detecção de anticorpos séricos (GOMES et al., 2008; GRAMICCIA, 2011). Ainda, a amplificação do DNA do parasito pode ser realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). O teste parasitológico é considerado o “teste ouro” para o diagnóstico da doença. Tal avaliação microscópica pode ser realizada por meio de exames citológicos de aspirados de linfonodos, baço, medula óssea ou lesões cutâneas (ALVAR et al., 2004; GIUNCHETTI et al., 2008, SOLANO-GALLEGO et al., 2009), em que são visualizadas formas amastigotas do parasito. A sensibilidade depende do grau de parasitemia, do tipo de material biológico coletado e da experiência do avaliador com a leitura de lâmina. Em alguns pacientes a visualização de parasitos é muito laboriosa e os resultados negativos não são incomuns, especialmente em animais assintomáticos (IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006), já que a sensibilidade diminui significativamente nestes (SARIDOMICHELAKIS, et al. 2005). Um estudo comparando métodos de diagnóstico para LVC demonstrou uma sensibilidade de 75,61% e 39,13% em cães sintomáticos e assintomáticos, respectivamente, quando realizaram exame citológico de linfonodo (MOREIRA, et al. 2007).

A detecção de anticorpos anti-*L. infantum* pode ser realizada por meio de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), por reação de imunofluorescência indireta (RIFI), e por testes imunocromatográficos, dentre outros. Animais doentes desenvolvem principalmente uma resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania*. A soroconversão pode ocorrer em um período que varia de três meses a dois anos após a infecção e os títulos permanecem elevados por, pelo menos, dois anos (OLIVA et al., 2006). Entretanto, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e falham em detectar cães infectados no período pré-patente e antes da soroconversão, cães que nunca farão soroconversão, e cães soropositivos que se convertem em soronegativos mas ainda permanecem infectados (IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006).

Por fim, as ferramentas moleculares são meios precisos para abordagem diagnóstica. A amplificação do DNA do parasito por PCR pode ser realizada em vários tecidos tais como sangue, linfonodos, medula óssea, baço, pele e conjuntiva. A sensibilidade diagnóstica depende da técnica e do tecido empregado (MAIA et al., 2009; SOLLANO-GALLEGO et al., 2007, 2009). Atualmente, considera-se a PCR em tempo real (qPCR) como um dos métodos mais sensíveis para o diagnóstico da LVC, uma vez que esta técnica é capaz de identificar níveis extremamente baixos de parasitos e, ainda, pode fornecer a quantificação da carga parasitária, útil para avaliar a resposta ao tratamento (MANNA et al., 2008; PENNISI et al., 2005).

Até 2011, os testes de triagem e confirmação adotados pelo MS em inquéritos sorológicos caninos para LV eram, respectivamente, ELISA (kit EIE-LVC; Bio-Manguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), e RIFI (kit IFI-LVC; Bio-Manguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), ambos utilizando antígenos de promastigotas de *Leishmania major* (LIRA et al., 2006). Em dezembro de 2011, devido à limitações dessas técnicas, as autoridades de saúde pública brasileiras substituíram os métodos usados para diagnosticar a LVC, que passaram a ser um teste rápido imunocromatográfico que utiliza como antígeno uma proteína recombinante (rk28) derivada da expressão de rk9, rk26 e rk39, TR DPP® LVC (Bio-manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) como teste de triagem, e o teste de ELISA (kit EIE-LVC; Bio-Manguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), como confirmatório, em um esforço para aumentar a especificidade, precisão e velocidade do diagnóstico de LVC (BRASIL, 2011).

No que diz respeito ao tratamento da doença em cães no Brasil, devido à recomendação de eutanásia de animais soropositivos, o tratamento não era uma opção possível. Para reforçar esse fato, em 2008 foi publicada uma Portaria Interministerial, do Ministério da Saúde (MS) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), proibindo o tratamento de cães com LV com medicamentos de uso humano e que não estivessem licenciadas pelo MAPA (portaria MAPA 1.426 de 11/07/2008). Entretanto, em setembro de 2016 o MAPA concedeu uma licença (001/2016 – MAPA/MS) para a venda de Mitelforan®

(Virbac Saúde Animal, Brasília-DF, Brasil), o primeiro medicamento para o tratamento de LVC no Brasil, à base de miltefosina, que passou a ser comercializado a partir de janeiro de 2017.

Medidas preventivas para evitar a infecção de cães por *L. infantum* são indispensáveis, visto o potencial zoonótico da enfermidade. Assim, a prevenção deve incluir medidas direcionadas ao animal e ao meio ambiente (OTRANTRO; DANTAS-TORRES, 2013). O uso de inseticidas no local onde encontra-se o hospedeiro pode auxiliar na redução da população de flebotomíneos porém, os locais naturais de descanso e oviposição dos flebotomos podem ser difíceis de encontrar (MAROLI et al., 2010). Estes fazem oviposição em locais ricos em matéria orgânica, portanto, a limpeza de quintais é essencial como medida de prevenção da doença (CLABORN, 2010). O uso de produtos à base de piretroides é o meio mais eficaz para prevenção da infecção de cães. Estes possuem ação repelente, anti-alimentação e inseticida, evitando o repasto sanguíneo e provocando a morte do flebotomo (OTRANTRO; DANTA-TORRES, 2013). As coleiras impregnadas com deltametrina a 4% ou com flumetrina 4,5% são medidas de escolha utilizadas para reduzir a transmissão da infecção para cães (OTRANTO et al., 2013).

A vacinação pode auxiliar na proteção individual de cães, no entanto não possui uma ação efetiva no controle epidemiológico da doença, uma vez que cães vacinados podem se infectar mesmo sem o desenvolvimento de sintomas, e permanecer com capacidade infectiva a vetores (REGINA-SILVA et al., 2006). Por essa razão, o controle da doença deve ser baseado no uso de inseticidas tópicos, e as vacinas são apenas uma ferramenta a mais para auxiliar na proteção de cães (MARCONDES; DAY, 2019). Atualmente, no Brasil, existe apenas uma vacina canina licenciada para comercialização, cujo antígeno é a proteína recombinante A2 de *Leishmania donovani* associada à saponina (Leish-Tec<sup>®</sup>, CEVA Saúde Animal Ltda, Paulínia-SP, BRASIL). Um experimento a campo conduzido em uma área endêmica para a doença, demonstrou que a eficácia vacinal foi da ordem de 71,4% quando foram levados em consideração os resultados de exames parasitológicos realizados por meio de impressão

citológica, cultura, histopatologia de pele, linfonodos, baço e medula óssea. Quando os autores associaram os resultados de xenodiagnóstico aos exames parasitológicos a eficácia vacinal passou a ser de 58,1% (REGINA-SILVA et al., 2006).

Um modelo matemático usado para comparar a eficácia de medidas de controle para LV (vacinas, eutanásia de cães soropositivos e uso de coleiras impregnadas com inseticida), demonstrou que as três medidas, em coberturas diferentes, estavam associadas à diminuição na prevalência de infecção em cães e pessoas. No entanto, o uso de coleiras impregnadas com inseticida teve o mais alto nível de eficácia (SEVÁ et al., 2016). Quando usadas na quase totalidade da população de cães, as coleiras impregnadas com inseticida foram capazes de diminuir grandemente a prevalência da doença em cães e a incidência da doença em humanos (CAMARGO-NEVES et al., 2004; GAVGANI et al., 2002). Em áreas endêmicas, todos os cães deveriam fazer uso de coleiras inseticidas, inclusive os tratados e vacinados, uma vez que permanecem com capacidade infectiva ao vetor (MARCONDES, 2016).

A eutanásia de cães soropositivos, uma das medidas de controle da LV no Brasil (BRASIL, 2014), é uma medida controversa. A experiência brasileira mostrou que essa prática não está associada à redução do número de casos humanos e caninos (COURA-VITAL et al., 2014; COURTENAY et al., 2002; DIETZE et al., 1997; MARCONDES; DAY, 2019). Em contrapartida, o número total de casos humanos no país aumentou e a doença tornou-se um grave problema de saúde pública (MARCONDES, DAY; 2019).

Um dos grandes problemas enfrentados no controle da LV no Brasil é a falta de conhecimento da população no que diz respeito à métodos preventivos, que deveriam ser utilizados particularmente em áreas endêmicas para a doença. Um estudo retrospectivo longitudinal, caso-controle, conduzido por Borges e colaboradores (2008) em Belo Horizonte, área endêmica para LV e LVC, ressaltou que o conhecimento da população sobre medidas preventivas contra as duas enfermidades é ínfimo, demonstrando a importância de orientar adequadamente a população.

Assim, os objetivos do presente trabalho foram realizar um estudo retrospectivo e verificar, em uma população canina atendida em um hospital veterinário de área endêmica para leishmaniose visceral no estado de São Paulo, o tempo decorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico, os métodos utilizados para confirmar o diagnóstico, as principais alterações clínicas observadas e a utilização de métodos de prevenção da doença pelos tutores.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento experimental

Durante o período de 2007 a 2016 foram atendidos 18.285 cães no Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, UNESP, câmpus de Araçatuba. Nesse período o hospital veterinário não possuía um sistema informatizado para preenchimento dos dados clínicos dos animais. Por essa razão, do total de cães atendidos no período, foi possível obter com segurança apenas informações como o diagnóstico, sexo e padrão racial (raça definida ou sem raça definida). Apesar de a idade dos animais constar nos prontuários, o sistema computacional não permitiu fazer um levantamento de faixa etária de todos os animais no período. Assim, foram identificados todos os cães com diagnóstico de LV durante o período de 10 anos. Os prontuários foram cuidadosamente avaliados a fim de selecionar os animais para o presente estudo, e os dados de resenha, anamnese, exame físico, exames complementares e condutas pós-diagnóstico foram tabulados individualmente.

Utilizou-se como critério de inclusão animais que possuíam diagnóstico da doença confirmado pela presença de formas amastigotas do parasito identificadas em: exame citológico obtido por meio de punção biopsia aspirativa de linfonodos, medula óssea e/ou nódulos cutâneos; citologia de conjuntiva ocular, efusão peritoneal e/ou esfregaço sanguíneo; exame histopatológico de biopsia de lesão cutânea; aqueles com resultado positivo em técnicas sorológicas, a saber, ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e/ou TR DPP® LVC (Bio-manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), ou naqueles em que foi amplificado o fragmento do DNA de *Leishmania* spp. por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real em sangue ou medula óssea. O teste rápido TR DPP® LVC (Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) só esteve disponível para utilização no hospital veterinário por um período de aproximadamente um ano, entre os anos de 2014 e 2015.

## **3.2 Colheita de sangue total**

Durante o atendimento hospitalar, após a antissepsia do local, era colhida uma amostra de sangue por meio de venopunção de jugular. O material obtido era armazenado em microtubos contendo EDTA para realização de hemograma completo, e em tubos de ensaio sem anticoagulante para separação de soro por centrifugação (3000 rpm por 5 minutos), para dosagem de creatinina e realização de técnicas sorológicas.

### **3.2.1 Análise hematológica**

A contagem total de eritrócitos e leucócitos, e a determinação do teor de hemoglobina foram realizadas no laboratório clínico do hospital veterinário, em contador eletrônico de células sanguíneas (Celm – CC530 Veterinário, Barueri, São Paulo, Brasil). O volume globular foi determinado pelo método microcapilar de Strumia em centrífuga para microhematócrito (Centrífuga Micro Evlab EV:024, Londrina, Paraná, Brasil). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com corante hematológico (Panótico Rápido<sup>®</sup>, Laborclin, Pinhais- PR, Brasil). As proteínas plasmáticas foram determinadas por refratometria e confirmadas pelo sistema colorimétrico de proteínas totais (Labtest<sup>®</sup>). Valores de referência foram considerados de acordo com Meinkoth e Clinkenbeard (2000).

### **3.2.2 Determinação de creatinina sérica**

A determinação da concentração sérica de creatinina foi realizada no laboratório clínico do hospital veterinário pelo método cinético - Picrato em meio alcalino (kit Creatinina<sup>®</sup> Biosystems, Barcelona, Espanha), com o uso de um analisador bioquímico automatizado (Analisador automático BTS, mod. 370 plus, BioSystems, Barcelona, Espanha). Os valores de referência foram considerados de acordo com Kaneko e colaboradores (1989).

### **3.3. Diagnóstico**

#### **3.3.1 Exames citológicos e histopatológicos**

##### **3.3.1.1 Exame citológico de nódulos cutâneos, linfonodos e medula óssea**

Os exames citológicos eram realizados nos ambulatórios de atendimento do hospital veterinário, por meio da punção aspirativa por agulha fina de nódulos cutâneos ou linfonodos poplíteos e/ou pré-escapulares, ou com a utilização de agulha hipodérmica 40x16 mm para obtenção de medula óssea, mediante punção na crista ilíaca. Os esfregaços do material obtido eram realizados imediatamente após a colheita, secos ao ar e corados com kit Panótico Rápido® (Laborclin, Pinhais-PR, Brasil), para posterior observação ao microscópio óptico, com objetiva de 100x, em imersão, e pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp.

##### **3.3.1.2. Exame citológico de sangue periférico e efusão peritoneal**

Os esfregaços de sangue periférico foram realizados a partir de amostra de sangue colhida na veia jugular encaminhada para realização de hemograma completo. O exame citológico de líquido peritoneal foi realizado por meio de colheita da amostra por abdominocentese realizada na linha alba, seguida de centrifugação e confecção do esfregaço. Os esfregaços foram corados com kit Panótico Rápido® (Laborclin, Pinhais-PR, Brasil), para posterior observação ao microscópio óptico, com objetiva de 100x, em imersão.

##### **3.3.1.3. Exame histopatológico de lesão cutânea**

As biopsias cutâneas foram colhidas com o auxílio de um “punch” e uma pinça anatômica, abrangendo área íntegra e lesionada, após sedação e anestesia local. O fragmento foi encaminhado ao serviço de patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Unesp, Câmpus de Araçatuba, e

processado de acordo com a rotina do serviço, com coloração por hematoxilina-eosina (HE).

### **3.3.2 Provas Sorológicas**

#### **3.3.2.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

A técnica de ELISA foi realizada conforme descrito por Lima e colaboradores (2003). As microplacas eram sensibilizadas com antígeno total de *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/72) numa concentração de 20 µg/mL em tampão carbonato 0,05 M e pH 9,5. Foram utilizados como anticorpo secundário e revelador, respectivamente, a Proteína A marcada com peroxidase (Sigma-Aldrich Brasil LTDA, cod. P8651) e a solução de tetrametilbenzidina dihidroclorada TMB 0,4 mg/ml (BD-TMB substrate reagent cod. 555214). A reação era interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a densidade óptica (D.O.) avaliada com o leitor de ELISA a 450nm (Labsystems Multiskan EX). Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida dos soros em duplicata. Foram considerados positivos os títulos de anticorpos com valores acima de 0,270.

#### **3.3.2.2 Teste Rápido TR DPP® LVC**

Para a realização do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso, TR DPP® LVC (Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro- RJ, Brasil) utilizou-se amostras de soro dos animais, de acordo com as instruções do fabricante.

#### **3.3.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR)**

Para a realização da técnica de PCR em tempo real foram colhidas amostras de sangue ou medula óssea. As amostras eram encaminhadas para o Laboratório de Diagnóstico Molecular Veterinário (LDMVET-Botucatu, São Paulo), onde foram processadas como descrito por Rolão e colaboradores (2004).

### 3.4 Análise estatística

O conjunto de dados foi analisado com a estatística descritiva e inferencial. O teste qui-quadrado foi utilizado para verificar associação entre a presença e ausência de infecção por *Leishmania* spp. com as variáveis sexo e raça dos animais. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Animais

Do total de cães atendidos no período de 10 anos, 56,83% (10.391/18.285) eram fêmeas, 43,17% (7.894/18.285) machos, 62,47% (11.423/18.285) possuíam raça definida e 37,53% (6.862/18.285) não apresentavam definição racial. Não foi possível obter a faixa etária do total de pacientes uma vez que o programa computacional do Hospital Veterinário não fornece essa informação. A prevalência de casos de LVC na população avaliada foi de 2,75% (504/18.285), destes 87,50% (441/504) viviam área urbana e 12,50% (63/504) em área rural. Entre os cães com diagnóstico de LV, 51,19% (258/504) era fêmeas e 48,81% (246/504) machos, 56,94% (287/504) possuíam definição racial e 43,05% (217/504) não possuíam raça definida. Ainda, 9,72% (49/504) possuíam menos de um ano, 53,37% (269/504) possuíam de um a cinco anos, 26,19% (132/504) de cinco anos e um mês a 10 anos, e 10,71% (54/504) apresentavam mais que 10 anos. A distribuição dos animais atendidos no período e daqueles com diagnóstico de leishmaniose visceral, segundo o sexo, raça e faixa etária, encontram-se apresentados na Tabela 1. De acordo com os prontuários avaliados, 6,74% (34/504) dos cães com LV possuíam contactantes com sintomas da doença, porém nem todos com o diagnóstico definitivo da enfermidade. Machos ( $p < 0.0109$ ) e cães com raça definida ( $p < 0.0107$ ) apresentaram uma predisposição para o desenvolvimento de LVC.

**Tabela 1 – Número e percentagem, segundo o sexo, padrão racial e faixa etária do total de pacientes e de cães com leishmaniose visceral (LV), atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Araçatuba em um período de 10 anos (2007-2016). (Araçatuba-SP, 2019)**

		População total (n=18.285)	Cães com LV (n=504)
Sexo			
	Fêmeas	10.391 (56,83%)	258 (51,19%)
	Machos	7.894 (43,17%)	246 (48,81%)
Raça			
	Raça definida	11.423 (62,47%)	287 (56,94%)
	Sem raça definida	6.862 (37,53%)	217 (43,05%)
Idade			
	< 1 ano	-	49 (9,72%)
	1 - 5 anos	-	269 (53,37%)
	> 5 anos – 10 anos	-	132 (26,19%)
	>10 anos	-	54 (10,71%)

## 4.2 Alterações clínicas

De todos os pacientes atendidos com diagnóstico de LVC, apenas quatro não apresentavam sintomas da doença. Estes foram diagnosticados por apresentarem alterações em exames laboratoriais. Dos quatro, três foram levados ao hospital veterinário para procedimentos cirúrgicos e um por escorpionismo.

Dentre as alterações clínicas mais frequentemente observadas destacam-se a linfadenomegalia em 72,22% (364/504) dos cães, lesões dermatológicas em 64,09% (323/504), alterações gastrointestinais (êmese, diarreia, hematoquezia, melena, regurgitação e disquezia) em 47,42% (239/504), anorexia ou hiporexia em 42,66% (215/504), emagrecimento em 38,49% (194/504) e alterações oftálmicas (conjuntivite, blefarite, uveíte e ceratoconjuntivite) em 33,73% (170/504).

Com relação às alterações dermatológicas, verificou-se com maior frequência áreas de alopecia e/ou rarefação pilosa em 35,91% (116/323) dos animais, seguida de lesões ulceradas/crostas em 35,60% (115/323), descamação cutânea em 34,67% (112/323), lesões descamativas e ulceradas em ponta de orelha em 22,60% (73/323), onicogribose em 17,46% (56/323) e lesões nodulares em 0,18% (1/504). Dos animais com lesões cutâneas, 27,83% (90/323) apresentavam prurido. A respeito da localização dessas lesões, 55,11% (178/323) dos cães possuíam lesões generalizadas, 31,58% (102/323) apresentavam lesões apenas em cabeça, 20,74% (61/323) em membros e 8,97% (29/323) na cauda. Alguns pacientes apresentavam lesões em mais de uma região. Em um cão (0,18%) foram observados nódulos em flanco, região dorsal e região parapieniana.

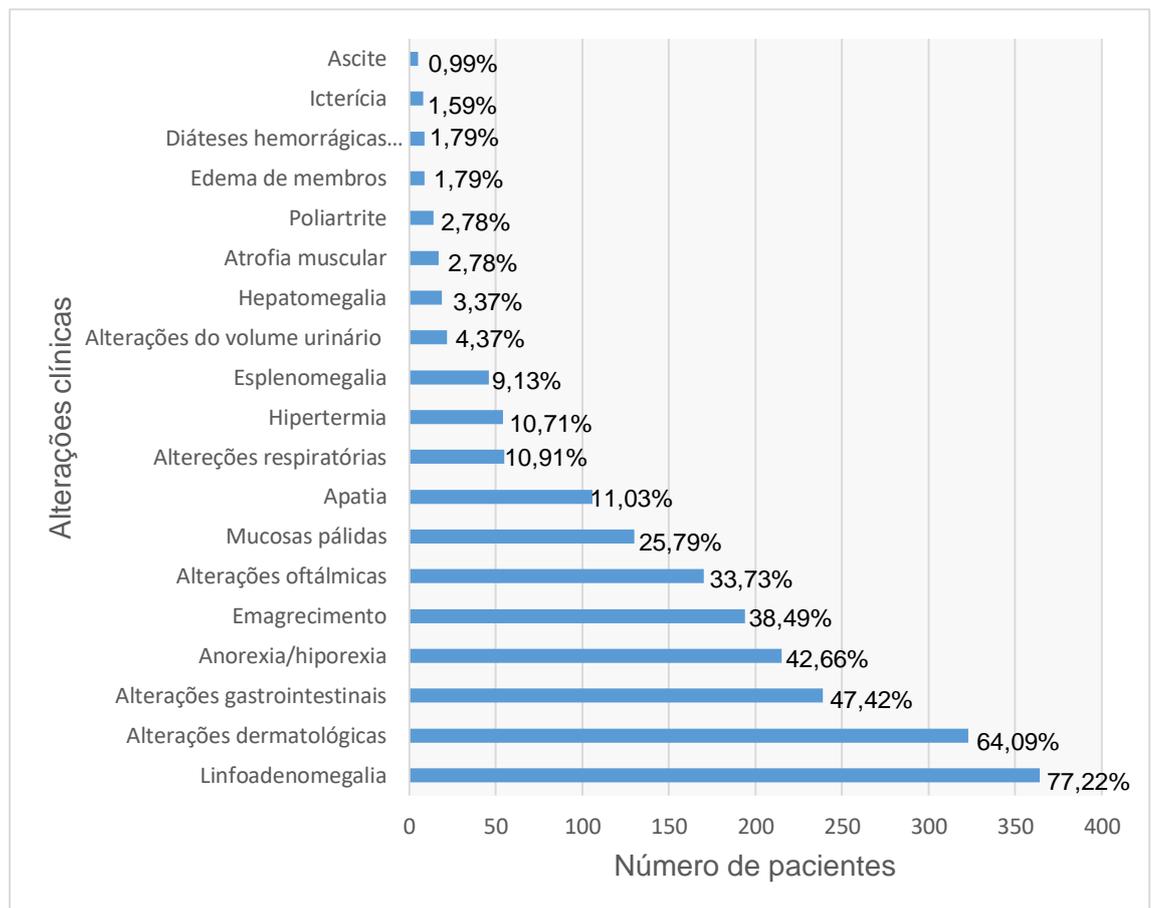
Ainda, 25,79% (130/504) dos animais apresentavam mucosas pálidas, 21,03% (106/504) apatia, 10,91% (55/504) alterações respiratórias (secreção nasal, espirro, dispneia, tosse), 10,71% (54/504) hipertermia, 9,13% (46/544) esplenomegalia, 5,75% (29/504) alterações do volume urinário (poliúria/polidipsia, oligúria), 4,17% (21/504) epistaxe, 3,77% (19/504) hepatomegalia, 3,37% (17/504) atrofia muscular, 2,78% (14/504) poliartrite, 1,79% (9/504) edema de membros, 1,79% (9/504) diáteses hemorrágicas (petéquias/ecmose/sufusões), 1,59% (8/504) icterícia e 0,99% (5/504) ascite.

Nos 13,29% (67/504) dos animais que apresentaram sinais neurológicos, os mais frequentemente observados foram ataxia em 26,86% (18/67) e convulsões em 16,41% (11/67), com evolução precisa indeterminada pelos tutores. Do total de cães com diagnóstico de LV, em 0,99% (5/504) foi confirmada coinfeção com o vírus da cinomose. No entanto, nos outros 62 animais com alterações neurológicas não foi avaliada uma possível coinfeção com agente etiológico ou ocorrência de lesões encefálicas que pudessem justificar o quadro neurológico, uma vez que não houve o consentimento do tutor em realizar outros exames complementares e os animais foram submetidos à eutanásia sem

realização de necropsia. Deste modo, não é possível afirmar que as alterações neurológicas eram decorrentes de LVC.

As alterações clínicas mais frequentemente observadas na população em questão encontram-se apresentadas na Figura 1.

**Figura 1- Principais alterações clínicas observadas em 504 cães com diagnóstico de leishmaniose visceral, atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Araçatuba, em um período de 10 anos (2007-2016). (Araçatuba- SP, 2019).**



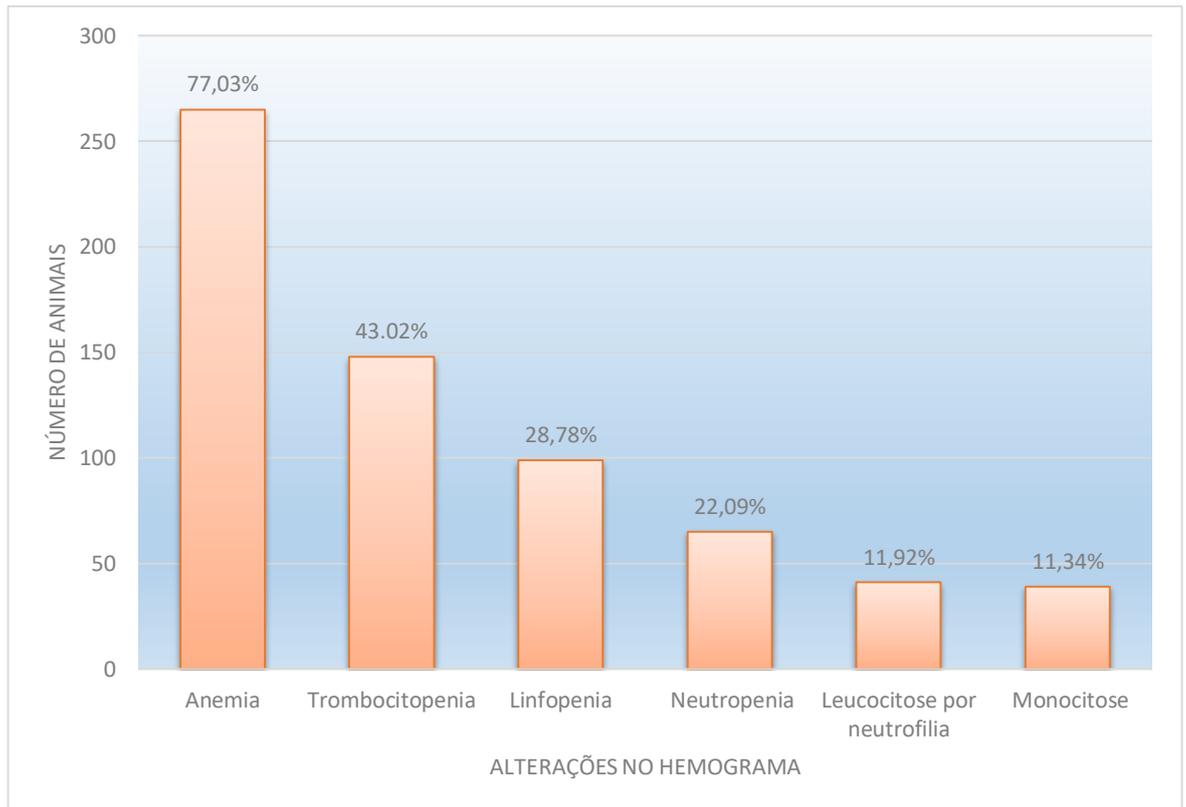
Fonte: Elaborado pelo Autor

### 4.3 Exames complementares

Em 68,25% (344/504) dos cães realizou-se hemograma e determinação da proteína plasmática total. As alterações hematológicas mais frequentemente observadas foram anemia e trombocitopenia, em 77,03% (265/344) e 43,02% (148/344) dos cães, respectivamente. No que se refere à anemia, em 72,83% (193/265) dos casos ela foi do tipo normocítica normocrômica. Também se observou linfopenia em 28,78% (99/344), neutropenia em 22,09% (76/344), leucocitose por neutrofilia em 11,92% (41/344) e monocitose em 11,34% (39/344) dos pacientes avaliados. Ainda, em 1,38 % (7/504) animais foram observadas formas amastigotas do parasito em esfregaço de sangue periférico. Hiperproteinemia foi identificada em 85,17% (293/344) dos cães. As principais alterações hematológicas observadas nos cães com LV encontram-se apresentadas na Figura 2.

Em 24,60% (124/504) dos cães foi realizada a determinação das concentrações de creatinina sérica. Destes, em 36,29% (45/124) verificou-se elevação de creatinina sérica, compatível com quadro de insuficiência renal.

**Figura 2 - Principais alterações hematológicas observadas em 344 cães com leishmaniose visceral, atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Araçatuba, em um período de 10 anos (2007-2016). (Araçatuba- SP, 2019)**



Fonte: Elaborado pelo Autor

#### 4.4 Diagnóstico

No tocante ao diagnóstico, em 77,18% (389/504) dos animais a suspeita clínica de que se tratava de LVC ocorreu durante a primeira consulta no hospital veterinário. Nos outros 22,8% (115/504) a suspeita foi levantada durante, ou após, o segundo atendimento. Do total de cães com LV, em 59,52% (300/504) o diagnóstico foi confirmado apenas por meio de exame parasitológico direto, sendo 56,34% (284/504) por citologia de punção biopsia aspirativa de linfonodos; 2,18% (11/504) por citologia de medula óssea e 0,99% (5/504) por exame

citológico dos dois tecidos. O diagnóstico da doença baseou-se exclusivamente em técnicas sorológicas em 20,04% (101/504) dos cães, sendo que em 16,26% (82/504) somente nos resultados de ELISA; em 1,78% deles (9/504) apenas nos resultados do TR DPP® LVC e em 1,98% (10/504) nos resultados dos dois testes sorológicos. Todos os pacientes diagnosticados exclusivamente por métodos sorológicos apresentaram diversas manifestações clínicas, exceto por dois; um cuja avaliação sorológica foi realizada como parte de exame pré-operatório e o outro que foi atendido por escorpionismo, e apresentava alterações hematológicas compatíveis com LVC. Ambos apresentavam soroconversão nas duas técnicas sorológicas. Em 17,86% dos casos (90/504) o diagnóstico sorológico foi confirmado por meio de exame parasitológico direto (citologia de linfonodos, medula óssea, citologia de nódulos cutâneos, impressão citológica de lesões cutâneas) ou PCR em tempo real de sangue.

Em 0,59% dos cães (3/504) o diagnóstico baseou-se exclusivamente no achado de formas amastigotas do parasito em esfregaço de sangue periférico durante realização de hemograma; em 0,19% (1/504) em impressão citológica de lesões cutâneas; em 0,19% (1/504) em exame citológico de nódulos cutâneos; em 0,19% (1/504) em exame citológico de líquido ascítico e em 0,19% (1/504) em exame histopatológico de lesão cutânea. Houve a necessidade de realização da técnica de PCR em tempo real para confirmação do diagnóstico da doença em 0,59% (3/504) dos cães, sendo que em dois cães houve amplificação do DNA de *Leishmania* spp. em medula óssea e em um em sangue periférico. Em 0,99% (5/504) dos cães o diagnóstico baseou-se na associação de duas ou mais técnicas citológicas, como citologia de linfonodos e de nódulos cutâneos em um cão, ou citologia de medula óssea e achado de amastigotas em esfregaço sanguíneo em quatro animais. No total, em 1,38% (7/504) dos cães foram observadas formas amastigotas em esfregaço de sangue periférico. Os métodos utilizados para confirmar o diagnóstico da doença nos cães do presente estudo encontram-se apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2 - Métodos utilizados para o diagnóstico de leishmaniose visceral em 504 cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Araçatuba, em um período de 10 anos (2007-2016). (Araçatuba- SP, 2019)**

Métodos diagnósticos		n	%	n	%
Citologia de órgãos linfoides	Linfonodos	284	56,3	300	59,52
	Medula óssea	11	2,2		
	Linfonodos + medula óssea	5	1,0		
Sorologia	ELISA	82	16,2	101	20,04
	TR DPP® LVC	9	1,8		
	ELISA + TR DPP® LVC	10	2,0		
Citologia de nódulos cutâneos				1	0,2
Impressão citológica de lesões cutâneas				1	0,2
Citologia de esfregaço sanguíneo				3	0,6
Citologia de líquido ascítico				1	0,2
Duas ou + técnicas citológicas				3	0,6
Citologia + sorologia				90	17,9
Histopatologia de pele				1	0,2
PCR em tempo real				3	0,6
<b>Total</b>				<b>504</b>	<b>100</b>

#### 4.5 Profilaxia

Dos animais que compuseram o estudo, somente 0,79% (4/504) dos cães fazia uso de coleiras inseticidas, entretanto os tutores não souberam informar o intervalo de tempo entre as trocas de coleiras e nem o nome do produto utilizado. Por outro lado, 5,36% (27/504) receberam vacina contra LVC. Desses, nenhum tutor soube informar com quantos meses aplicou-se a primeira dose, há quanto tempo fez-se a última aplicação e nem o nome da vacina utilizada.

#### 4.6 Tempo de evolução da doença e tratamentos anteriores

O tempo de evolução da doença no momento da primeira consulta no hospital veterinário variou de uma semana a mais de um ano, sendo que 48,80% (246/504) dos cães já havia passado por consulta em clínico particular antes de procurarem o hospital veterinário. De acordo com a informação fornecida pelos

tutores, 16,67% (84/504) dos cães apresentavam sintomas há menos de uma semana, 24,80% (125/504) de duas semanas a um mês, 29,17% (147/504) entre um a três meses, 8,53% (43/504) de três a seis meses, 5,16% (26/504) entre seis meses e um ano e 2,78% (14/504) há mais de um ano. Não foi possível determinar o tempo de evolução dos sintomas em 12,90% (65/504) dos cães, cujos tutores não sabiam fornecer essa informação. O tempo de evolução da doença até que o diagnóstico de leishmaniose visceral fosse instituído nos animais do presente estudo encontra-se apresentado na Tabela 3.

Dos cães avaliados, 47,62% (240/504) havia recebido algum tipo de tratamento anterior, prescrito por colega em clínica particular, sem que tenha sido firmado um diagnóstico de LVC. Por outro lado, 1,19% (6/504) receberam diagnóstico prévio de LVC, com instituição de tratamento para a doença baseado no uso de alopurinol (quatro cães), alopurinol associado a prednisona (um cão) e alopurinol associado a anfotericina B (um animal). Destes, dois apresentaram melhora parcial do quadro clínico e em quatro não se observou melhora clínica.

**Tabela 3 – Tempo decorrido entre o início dos sintomas e a instituição do diagnóstico de leishmaniose visceral em 504 cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Araçatuba, em um período de 10 anos (2007-2016). (Araçatuba- SP, 2019)**

<b>Tempo</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
< 1 semana	84	16,67
2 semanas - 1 mês	125	24,80
1 - 3 meses	147	29,17
3 - 6 meses	43	8,53
6 - 12 meses	26	5,16
>12 meses	14	2,78
Indeterminado	65	12,90
<b>Total</b>	<b>504</b>	<b>100</b>

## **4.7 Eutanásia**

Dos 504 cães com diagnóstico da doença, em 55,95% (282/504) foi realizada a eutanásia no hospital veterinário após a confirmação do diagnóstico. Os demais pacientes não retornaram para novas consultas.

## 5. DISCUSSÃO

A prevalência de LVC na população estudada foi de 2,75%, valor inferior a faixa de 7,9% a 25,9% obtida durante o primeiro estudo epidemiológico realizado no município de Araçatuba, em 1999 (CAMARGO-NEVES et al., 2001), também aos 30,6% observada por Nunes e colaboradores (2008) em um bairro de Araçatuba em 2002, e de 8,1% observada em um estudo realizado em área urbana de Araçatuba (COSTA et al., 2018). Tal valor pode ser decorrente do fato de que no presente estudo quase 60% dos cães tiveram confirmação baseada em exame parasitológico, o que diminui a probabilidade de resultados falso-positivos obtidos por meio de exames sorológicos (LAURENTTI, et al., 2014; MARCONDES, et al., 2011; ZANETTE, et al., 2014). Houve um maior número de casos em cães que viviam em área urbana (87,50%), no entanto esses valores podem refletir a população atendida no Hospital Veterinário.

Houve uma maior predisposição à infecção por *L. infantum* em machos, concordando com relatos anteriores (FISA et al., 1999; PALTRINIERI et al., 2010; ZIVICNJAK et al., 2005), embora muitos autores afirmem não haver predisposição sexual na LVC (CIARAMELLA et al. 1997; COSTA et al., 2018; DANTAS-TORRES et al., 2006; FREITAS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2010; SEIXAS et al., 2013; SILVA et al., 2018).

Cães de raça definida também foram mais predispostos, entretanto sem identificação de uma raça específica, uma vez que não foi possível obter essa informação de todos os cães atendidos no período no hospital veterinário. Alguns autores relatam maior predisposição em cães das raças Boxer, Cocker, Rottweiler, Doberman e Pastor Alemão (FRANÇA-SILVA et al., 1999; PALTRINIERI et al., 2010; PENAFORTE et al., 2013; SIDERIS et al., 1999). Sugere-se que essas raças são mais expostas ao vetor pois são, por vezes, utilizados como cão de guarda, permanecendo fora das residências (COSTA et al., 2018; PENAFORTE et al., 2013; SIDERIS et al., 1999). Embora tenha sido identificada uma maior predisposição em cães de raça definida, não podemos

afirmar que todos os cães de fato possuíam definição racial, uma vez que muitos tutores informam a raça do animal baseado do fenótipo do mesmo.

No tocante a faixa etária, apesar de aproximadamente metade (53,37%) dos cães com LV apresentarem de um a cinco anos, também não é possível afirmar se existiu uma prevalência desta faixa etária, por falta de informação no sistema de dados do hospital veterinário sobre a idade de todos os animais atendidos no período do estudo. Enquanto alguns autores sugerem que cães adultos são mais predispostos (OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2018), outros observaram uma distribuição bimodal da doença quanto à faixa etária, prevalecendo a infecção em cães com menos de três e mais de sete anos, como consequência do estado imunológico do hospedeiro (GALVÉZ et al., 2010; MIRÓ et al., 2012).

As alterações clínicas observadas nos pacientes do presente estudo foram anteriormente relatadas por inúmeros autores (ALMEIDA et al., 2005; BANETH et al., 2008; CIARAMELLA et al., 1997; FEITOSA et al., 2000; KOUTINAS et al., 1999, MARCONDES, 2016; PENTAFORTE et al., 2013; WILSON et al., 2017). O achado mais frequente no exame físico dos pacientes foi a ocorrência de aumento de volume de linfonodos, observada em 72,22% dos cães, concordando com os relatos de Baneth e colaboradores (2008), que descrevem a ocorrência de linfadenomegalia em 62 a 90% dos cães sintomáticos. O aumento de linfonodos na LVC é decorrente do aumento do número e tamanho dos folículos linfóides, e por acentuada hiperplasia/hipertrofia das células do sistema fagocitário mononuclear (BANETH et al., 2008; MOREIRA, et al., 2010). A presença de linfonodos hipertrofiados em grande parte dos animais avaliados seguramente facilitou o achado de formas amastigotas do parasito no exame citológico desse tecido linfoide.

As alterações dermatológicas, observadas em 64,09% dos cães, foram o segundo achado mais comum. De acordo com Marcondes (2016), lesões dermatológicas são as manifestações clínicas mais comuns na LVC, sendo evidenciadas em 50 a 90% dos cães com quadro clínico da doença. As formas cutâneas clássicas da doença, caracterizadas por dermatite esfoliativa e

ulcerativa, foram evidenciadas na totalidade dos cães com lesões dermatológicas. Além de descamação cutânea, é frequente a ocorrência de rarefação pilosa ou alopecia, ulceração da pele, contaminação bacteriana secundária, e presença de onicogribose (BANETH et al., 2008; COLOMBO et al., 2016; MARCONDES, 2016; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). As lesões cutâneas na LVC são provocadas pela resposta inflamatória desenvolvida pela presença do parasito na pele ou por uma vasculite que leva à necrose tecidual. Todavia, aqueles pacientes sem lesões dermatológicas aparentes também podem abrigar parasitos na pele (MARCONDES, 2016; PAPADOGIANNAKI, et al., 2005; SILVA et al., 2016).

Formas cutâneas atípicas tais como a dermatite papular, que pode estar presente como a única manifestação clínica da LVC, indicando uma imunocompetência do hospedeiro (LOMBARDO et al., 2014) ou a dermatite pustular, com presença de pústulas estéreis (COLOMBO et al., 2016), não foram relatadas nos prontuários dos cães. Entretanto, isso não exclui a possibilidade de sua ocorrência, uma vez que muitas vezes, com a confirmação do diagnóstico de LVC, dava-se pouca importância à descrição do exame dermatológico desses animais. Embora 27,83% dos cães tenham apresentado prurido associado ao quadro dermatológico da LVC é possível que este estivesse associado à infecção bacteriana secundária ou a ocorrência de coinfeções de pele. A distribuição das lesões, generalizadas em cerca de metade dos cães, na cabeça em 31,58% dos pacientes e menos frequentemente observadas apenas em membros (20,74%) ou cauda (9%), foi semelhante a descrita por outros autores (FEITOSA et al., 2000; MARCONDES, 2016).

Embora problemas digestórios tenham sido observados em 47,42% dos cães, não é possível afirmar que todos estivessem relacionados diretamente ao sistema gastrointestinal. Cães que apresentavam êmese ou sangramento intestinal poderiam ter como causa primária uma disfunção renal, fato que não pôde ser confirmado na maioria dos animais pela falta de poder aquisitivo dos tutores para realizar exames complementares. Um estudo conduzido com cães atendidos no mesmo hospital veterinário no ano de 1999 evidenciou sintomas

relacionados ao sistema digestório em aproximadamente a mesma percentagem de cães com LV (FEITOSA et al., 2000).

Anorexia ou hiporexia, observadas em 42,66% dos pacientes, e emagrecimento em 38,49%, também foram relatadas com elevada frequência em estudos anteriores (BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al. 2009). A respeito das lesões oculares encontradas em 33,73% dos cães, as mais frequentes foram uveíte, ceratoconjuntivite, blefarite e conjuntivite, bem como uma combinação destes, confirmando relatos anteriores (ALMEIDA et al., 2005; BRITO et al.2006; CIARAMELLA et al., 1997; FREITAS, et al., 2017; SOLANO-GALLEGO et al., 2009;). Essa percentagem pode ser ainda maior, uma vez que, nem todos pacientes diagnosticados com LVC passaram por avaliação oftálmica. Lesões oculares podem ser a única queixa em até 16% dos pacientes sintomáticos (BANETH, et al., 2008), embora no presente estudo essas alterações virem acompanhadas sempre de outro sinal clínico ou alteração em exame físico.

Todas as alterações clínicas observadas em menor frequência nos animais avaliados, foram também relatadas por outros autores (BANETH et al., 2008; FEITOSA et al., 2000; SOLANO-GALLEGO et al., 2009), em maior ou menor proporção. Alterações neurológicas foram evidenciadas em 67 cães (13,29%), caracterizadas principalmente pela ocorrência de ataxia e convulsões. Lesões do sistema nervoso central (SNC) e sintomas neurológicos têm sido relatados em cães com LV (LIMA et al., 2003; MACHADO et al., 2010; MELO et al., 2012), no entanto, podem estar relacionados a coinfeções por outros agentes infecciosos como *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* e *Toxoplasma gondii*, cujo DNA já foi amplificado no SNC de cães com LV (CARDINOT et al., 2016). Em apenas cinco cães foi confirmada a coinfeção pelo vírus da cinomose, embora a doença seja bastante frequente na região, uma vez que os tutores não tinham interesse em realizar outros exames laboratoriais diante da suspeita clínica de LVC e possível eutanásia dos animais. Deste modo, não é possível afirmar que nos demais as alterações neurológicas fossem decorrentes de LVC.

Durante a anamnese, 6,75% dos tutores informaram que na mesma residência havia outros cães possivelmente com sintomas de LVC. Costa et al. (2018), em um estudo conduzido no município de Araçatuba, evidenciaram que a presença de mais de um cão na residência aumenta a probabilidade de adquirir a infecção, uma vez que um maior número de cães representa uma maior fonte de alimentação para os vetores. Deve-se orientar tutores a testar todos os animais da residência quando de um caso de LVC, independente ou não da presença de sintomas da doença. Aqueles assintomáticos devem ser testados também por meio da técnica de PCR em tempo real (MARCONDES, 2016). Estudos utilizando PCR em áreas endêmicas confirmaram que a prevalência da infecção em cães é muito maior do que a percentagem de cães que efetivamente desenvolve sintomas da doença (BANETH et al., 2008). Cães assintomáticos possuem uma importância epidemiológica no ciclo da doença, uma vez que são capazes de infectar flebótomos e, desta forma, transmitir a doença para outros animais (BORJA et al. 2016; LAURENTI et al., 2013; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016).

Durante o atendimento no hospital veterinário, parte dos tutores dá preferência à realização apenas dos testes específicos para LVC, para posteriormente, caso necessário, realizar outros exames complementares. Isto se deve, muitas vezes, ao poder aquisitivo dos mesmos, que não possuem condições de pagar por vários exames laboratoriais. Desta forma, do total de cães diagnosticados com LV, em 68,25% (344 cães) realizou-se uma avaliação hematológica, cujos achados mais frequentes foram anemia (na maior parte dos casos do tipo normocítica normocrômica) em 77,03% e trombocitopenia em 43,02% dos animais. Uma anemia normocítica normocrômica, característica de doenças crônicas, é normalmente observada em 50 a 70% dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* (CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; MELÉNDEZ-LALO et al., 2018; PALTRINIERI et al., 2016). A patogênese da anemia pode incluir também um distúrbio na linhagem eritróide da medula óssea, hemólise e sequestro esplênico e hepático, e mecanismos tais como uma diminuição da síntese de eritropoietina devido a uma doença renal

crônica (NICOLATO et al., 2013; PALTRINIERI et al., 2016). Uma trombocitopenia, de leve a moderada, também pode ser observada em cães com LV sem infecções concomitantes, cujo provável mecanismo é uma destruição periférica imunomediada de plaquetas circulantes. Ainda, pode estar relacionada a uma diminuição da produção plaquetária na medula óssea (PALTRINIERI et al., 2016). Embora seja descrita como uma alteração pouco frequente em cães com LV (CIARAMELLA et al., 2005; COSTA-VAL et al., 2007; MELÉNDEZ-LALO ET al., 2018), seu achado frequente pode ser observado em casos de coinfeção com outros agentes infecciosos tais como *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys* (PALTRINIERI et al., 2016), o que pode justificar a ocorrência de trombocitopenia em cerca de 40% dos cães avaliados.

Grande parte dos animais possuía valores de leucograma dentro dos limites de normalidade, concordando com relatos anteriores (COSTA-VAL et al., 2007; MELÉNDEZ-LALO et al., 2018; RIBEIRO et al., 2013). As alterações observadas na série leucocitária foram também relatadas em outros estudos (CIAMARELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; MELÉNDEZ-LALO et al., 2018), e podem ser decorrentes de stress ou infecções secundárias (COSTA-VAL et al., 2007; MELÉNDEZ-LALO et al., 2018). Embora raramente observada, em alguns cães podem apresentar pancitopenia, secundária à disfunção medular, particularmente em estágios bem avançados da doença (MELÉNDEZ-LALO et al., 2018), fato não observado nos cães do presente estudo. Em 1,38% (7/504) dos cães foram observadas formas amastigotas do parasito em esfregaço de sangue periférico, valor este superior aos achados de Giudice e Passantino (2011), que avaliando 1438 cães infectados por *L. infantum* identificaram formas amastigotas do parasito no sangue periférico de 0,28% destes.

Um achado frequente foi a ocorrência de hiperproteinemia em 85,17% (293/504) dos cães. Esta é um achado comum, geralmente decorrente de uma hipergamaglobulinemia (CIAMARELLA et al., 1997; COSTA-VAL et al., 2007; KOUTINAS et al., 1999; PALTRINIERI et al., 2010; PALTRINIERI et al., 2016).

Nos cães do presente estudo não foi realizada a eletroforese de proteínas séricas e nem determinada a relação albumina/globulina, o que poderia auxiliar na caracterização da disproteinemia.

Dos 124 pacientes em que a creatinina sérica foi mensurada, a mesma encontrava-se elevada em 36,29%, sugerindo possível acometimento renal, uma vez que tal alteração é frequentemente observada na LVC (BRAGA et al., 2015; FREITAS et al., 2012; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; WILSON et al., 2017). Um estudo avaliando 51 cães no momento do diagnóstico de LV demonstrou que a ocorrência de azotemia foi menos frequente (6%) do que de proteinúria (48%) (MELÉNDEZ-LALO et al., 2018). Esta última é geralmente decorrente de um dano glomerular por deposição de imunocomplexos (BRAGA et al., 2015), fato que não pode ser avaliado no presente estudo uma vez que um exame de urina foi raramente solicitado nos animais atendidos.

O diagnóstico da LVC é complexo devido à grande variedade de alterações clínico-patológicas, e ao fato de que parte dos animais pode apresentar doenças concomitantes, tornando o diagnóstico um desafio em muitos casos (MARCONDES, 2016; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). No presente estudo, embora 48,80% (246 animais) dos cães já tivessem passado por consulta em clínicas particulares e recebido algum tipo de tratamento para os sintomas apresentados, em apenas 1,19% (6/504) o diagnóstico da doença havia sido firmado. Muitos animais diagnosticados por meio de exames não onerosos e simples de serem realizados, como punção biópsia aspirativa de linfonodos, deixaram de ser diagnosticados precocemente e permaneceram nas suas residências por períodos que chegaram a um ano ou mais. Cerca de 40% dos cães apresentava sintomas da doença por um período variando de um a seis meses, permanecendo no ambiente doméstico com capacidade infectiva ao vetor. A gravidade desta ocorrência deve-se ao fato de que, do ponto de vista epidemiológico, o cão representa o principal reservatório doméstico do parasito e potencial fonte de infecção para os seres humanos (SHAW, 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Em áreas endêmicas para LVC a suspeita clínica da doença deveria ser considerada em todos os animais atendidos em clínicas

veterinárias, especialmente devido ao potencial zoonótico da enfermidade (MARCONDES, 2016).

No hospital veterinário o diagnóstico da doença baseou-se exclusivamente na realização de exame citológico de tecidos linfóides (linfonodos e medula óssea) em 59,52% dos cães, demonstrando que o uso dessa técnica auxilia grandemente no diagnóstico de LVC. Dos 300 cães cujo diagnóstico foi firmado desta forma, em 94,66% (284 cães) o achado de formas amastigotas foi obtido exclusivamente em citologia de punção biopsia aspirativa de linfonodos, em 3,66% (11 cães) por meio de punção de medula óssea e em 1,66% (cinco cães) por exame dos dois tecidos. Além de simples, é um exame que não possui um custo elevado, e que pode ser realizado em qualquer consultório que tenha um microscópio, desde que o clínico tenha experiência na identificação do parasito. A avaliação citológica permite a detecção microscópica de formas amastigotas de *Leishmania* spp. no interior de macrófagos ou extracelulares, na dependência da carga parasitária (PALTRINIERI et al., 2010). A elevada percentagem de animais diagnosticados por meio de exame parasitológico deve-se, também, ao fato de que se tratava de animais com quadro clínico da doença, em sua grande maioria com hipertrofia de linfonodos, o que facilita o encontro de formas amastigotas do parasito (MARCONDES, 2016). Dependendo do quadro clínico do paciente, particularmente em animais assintomáticos, a sensibilidade desta técnica pode diminuir muito (MARCONDES, 2016; PINELLI et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Embora não seja frequente, o achado ocasional de formas amastigotas do parasito em líquido ascítico, líquido sinovial e em esfregaços sanguíneos, pode auxiliar no diagnóstico da doença (GIUDICE; PASSANTINO, 2011; MARCONDES, 2016; SANTOS et al., 2006), como evidenciado no presente estudo.

No presente estudo, embora o diagnóstico da doença tenha sido baseado em exames sorológicos confirmados por meio de exame parasitológico direto ou PCR em 17,86% dos animais (90 cães), em 20% dos pacientes (101 animais) baseou-se exclusivamente em técnicas sorológicas, sendo que em 16% (82

cães) foi baseado apenas nos resultados do ELISA, em 1,78% (nove cães) nos resultados do TR DPP® LVC e em 1,98% (10 cães) no resultado associado dos dois testes. Apesar de todos os animais diagnosticados por meio de sorologia apresentarem quadro clínico compatível com a doença, exceto dois, estes resultados por si só não são suficientes para confirmar a ocorrência de LVC (MARCONDES, 2016; PALTRINIERI et al., 2010; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Embora em inquéritos epidemiológicos o MS considere infectado um cão que apresente soroconversão nas duas técnicas oficiais (TR DPP® LVC e ELISA), independente do título apresentado na técnica de ELISA (BRASIL, 2014), de acordo com os guias internacionais os exames sorológicos só confirmam o diagnóstico de LVC, sem a necessidade de comprovação por exame parasitológico, quando os títulos de anticorpos estiverem de três a quatro vezes acima do ponto de corte do laboratório (PALTRINIERI et al, 2010; SOLANO-GALLEGO et al. 2011).

Os resultados da técnica de ELISA empregada para o diagnóstico da doença no hospital veterinário são apresentados como sororeagente ou não, sem a identificação do título de anticorpos, o que por si só não permite o estabelecimento do diagnóstico de LVC. Ainda, testes rápidos como o DPP, devem ser utilizados apenas como métodos de triagem e não como técnicas confirmatórias de LVC (MARCONDES, 2016). Outro problema em relação à sorologia, é que não existe uma padronização entre os vários laboratórios e a sensibilidade e especificidade dos testes variam muito em função do tipo de antígeno utilizado (MARCONDES, 2016; PALTRINIERI et al., 2010; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Técnicas que empregam antígenos brutos, como é o caso do ELISA “*in-house*” utilizado nos animais avaliados, favorecem a ocorrência de reações cruzadas com outros patógenos, tais como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Trypanosoma cruzi*, como já comprovado em estudos anteriores (LAURENTI et al., 2014; MARCONDES et al., 2011; VIOL, et al., 2011; ZANETTE et al., 2014).

Em referência à métodos de prevenção da doença, apenas quatro cães faziam uso de coleira inseticida, entretanto seus tutores não sabiam informar o

nome do produto e nem o tempo entre trocas de coleiras de acordo com as instruções do fabricante. Por outro lado, 27 cães haviam sido vacinados contra LVC, porém, de forma semelhante, nenhum tutor soube informar com quantos meses aplicou-se a primeira dose, há quanto tempo fez-se a última aplicação e nem o nome da vacina utilizada. Esses dados refletem a falta de informação da população residente em área endêmica para LV no que diz respeito ao uso de métodos de prevenção da doença em cães domésticos. O uso de inseticidas tópicos, principalmente coleiras, pode reduzir o risco de infecção por *L. infantum* em cães, representando uma ferramenta que poderia ser integrada aos programas de controle da LVC (MARCONDES; DAY, 2019; MIRÓ et al., 2008; REITHINGER et al., 2004).

Como a comercialização da miltefosina para o tratamento da LVC ocorreu apenas a partir do ano de 2017, nenhum dos animais atendidos durante o período do estudo (2007 a 2016) foi tratado para a doença no hospital veterinário. Desta forma, realizou-se a eutanásia de 55,95% dos cães do presente estudo após o diagnóstico da doença, seguindo as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2006). Os outros animais não retornaram à consulta após o diagnóstico da doença quer seja pelo fato de que seus tutores optaram por encaminhá-los ao Centro de Controle de Zoonoses do município ao invés de realizar o procedimento no hospital veterinário, ou porque não concordavam com a realização da eutanásia e optaram por procurar outra alternativa junto a clínicas particulares que realizavam o tratamento, mesmo contrariando as normas do MS, fato observado em 1,19% dos cães atendidos durante o período do estudo.

## **6. CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos nas condições do presente estudo permitem concluir que, apesar de os animais naturalmente acometidos por LV apresentarem alterações clínicas amplamente descritas na literatura, muitos clínicos veterinários ainda não incluem a doença entre os diagnósticos diferenciados quando do atendimento de cães em áreas endêmicas, permitindo que estes permaneçam infectados por períodos que podem chegar a um ano, transmitindo a doença para vetores e agravando a situação epidemiológica da LV no Brasil. Além disso, exames simples, que poderiam auxiliar no diagnóstico precoce da LVC, tais como exame citológico de órgãos linfoides, particularmente linfonodos, não parecem ser rotineiramente utilizados nos consultórios veterinários. Finalmente, chama a atenção a quase completa ausência do uso de métodos preventivos para a doença em cães, tais como coleiras impregnadas com inseticidas, demonstrando a falta de conhecimento por parte da população, em parte, provavelmente, por falta de orientação de médicos veterinários.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. A. O, JESUS; E. E. V., SOUSA-ATTA, M. L. B; ALVES, L. C.; BERNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet Parasitol**, v. 127, p. 227-232, fev. 2005.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J.; Canine leishmaniasis. **Adv in Parasitol**, v. 57, p. 1–88, 2004.

ALVES, G. B. B.; PINHO; F. A.; SILVA, S. M. M. S.; CRUZ, M. S. P.; COSTA, F. A. L. Cardiac and pulmonar alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Braz J Med Biol Res**, v. 423, n. 3, p. 310-315, mar. 2010.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 7, p. 324-330, jul. 2008.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. In: **GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015. p. 768-784.

BARATA, R. A.; PEIXOTO, J. C.; TANURE, A.; GOMES, M. E.; APOLINÁRIO, E. C.; BODEVAN, E. C.; ARAÚJO, H. S.; DIAS, E. S.; PINHEIRO, A. C. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in a Reemerging Focus of Intense Transmission in Minas Gerais State, Brazil. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 1-7, jul. 2013.

BELO, V. S.; STRUCHINER, C. J.; WERNECK, G. L.; BARBOSA, D. S.; OLIVEIRA, R. B.; TEIXEIRA NETO, R. G. T.; SILVA, E. S. A systematic review

and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. **Vet Parasitol**, v. 195, n. 1-2. p. 1–13, jul. 2013.

BORGES, B. K. A.; SILVA, J. A.; HADDAD, J. P. A.; MOREIRA, E. C.; MAGALHÃES, D. F.; RIBEIRO, L. M. L.; FIÚZA, V. O. P. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Cad Saude Publica**, v. 24, n. 4, p. 777-784, abr. 2008.

BORJA, L. S.; SOUSA, O. M. F.; SOLCÀ, M. S.; BASTOS, L. A.; BORDONI, M.; MAGALHÃES, J. T.; LARANJEIRA, D. F.; BARROUIN-MELO, S. M.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. **Vet Parasitol**, v. 229, p. 110-117, out. 2016.

BRAGA, E. T.; LEITE, J. H. A. C.; ROSA, F. A.; TRIVELLI, P.; ARAUJO, A. M.; ALMEIDA, B. F. M.; FERRARI, H. F.; CIARLINI, P. C.; MACHADO, G. F.; MARCONDES, M. Hipertension and its correlatios with renal lesions in dogs with leishmaniosis. **Rev Bras Parasitol Vet, Jaboticabal**, v. 24, n. 1, p.45-51, mar. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Ministério da Saúde. Registro do produto de uso veterinário denominado Milteforan 2% Solução Oral para cães. **Nota técnica conjunta nº001/2016- MAPA/MS, de 17 de agosto de 2016**. Disponível em <<http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/notatecnica.pdf>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina; **Nota técnica conjunta nu 01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS**, de 29 de dezembro de 2011.

Disponível em: <[http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/nota-tecnica-no.-1-2011\\_cglab\\_cgdt1\\_lvc.pdf](http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/nota-tecnica-no.-1-2011_cglab_cgdt1_lvc.pdf)>. Acesso em: 31 jan. 2019.

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, 2006, 120p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 122p.

BRITO, F. L. C.; LAUS, J. L.; TAFURI, W. L.; FIGUEIREDO, M. M.; JÚNIOR, V. A. S.; MAIA, F. C. L.; ALVES, L. C. Histopathological findings and detection of parasites in the eyes of dog infected naturally with *Leishmania chagasi*. **Cienc Rural**, v. 40, n. 5, p. 1141-1147, mai. 2010.

BRITO, F. L. C.; ALVES, L. C.; MAIA, F. C. L.; SANTOS, E. S. C.; LAUS, J. L.; MEUNIER, I. M. J. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 58, n. 5, p. 768-775, out. 2006.

CAMARGO-NEVES, V. L.; KATZ, G.; RODAS, L. A.; POLETTO, D. W.; LAGE, L. C.; SPÍNOLA, R. M. F.; CRUZ, O. G.; Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, Sao Paulo, Brazil, 1998–1999. **Cad Saude Publica**, v. 17, p. 1263–1267, set-out. 2001.

CAMARGO-NEVES, V.L.F., RODAS, L.A.C., PAULIQUÉVIS JR., C. (2004). "Avaliação da efetividade da utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para o controle da leishmaniose visceral americana no Estado

de São Paulo: resultados preliminares." São Paulo: **Bol Epidemiol Paul (BEPA)**, p 1-9, mai. 2004.

CARDINOT, C. B.; SILVA, J. E. S.; YAMATOOGI, R. S.; NUNES, C. M.; BIONDO, A. W.; MARCONDES, M. Detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, and *Toxoplasma gondii* DNA in the brain of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*, **J Parasitol**, v. 102, n. 2, p. 275-279, abr. 2016.

CARNEIRO, D.; BAVIA, M.; ROCHA, W.; LOBÃO, J.; MADUREIRA-FILHO, C.; OLIVEIRA, J.B.; SILVA, C.E.; BARBOSA, M.G.; RIOS, R. Identificação de áreas de risco para a leishmaniose visceral americana, através de estudos epidemiológicos e sensoriamento remoto orbital, em Feira de Santana, Bahia, Brasil (2000–2002). **Rev Baiana de Saúde Pública**, v. 28, p. 19–32, jun. 2004.

CIARAMELLA, P.; OLIVE, G.; LUNA, R. D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, A.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine in 150 dogs naturelly infected by *Leishmania infantum*. **Vet Rec**, v.141, n.21, p. 534-543, nov. 1997.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compend Contin Educ Vet**, v. 25, n. 5, p. 358-368, mai. 2003.

CIARAMELLA, P.; PELAGALLI, A.; CORTESE, L.; PERO, M. E.; CORONOA, M.; LOMBARDI, P.; AVALLONE, L.; PERSECHINO, A. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet J**, v. 169, n. 3, p. 465-467, mai. 2005.

CLABOR, D. M.; The Biology and Control of Leishmaniasis Vectors. **J Glob Infect Dis**, v .2, n. 2, ago. 2010.

COLOMBO, S.; ABRAMO, F.; BORIO, S.; ALBANESE, F.; NOLI, C.; DEBOLA, C.; LEONE, F. Pustular dermatitis in dog affected by leishmaniosis: 22 cases. **Vet Dermatol**, v. 27, p. 9-e4, jan. 2016.

COSTA F. A. L.; GOTO, H.; SALDANHA, L. C. B.; SILVA, S. M. M. S.; SINHORINI, I. L.; SILVA, T. C.; GUERRA, J. L. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Vet Pathol** v. 40, n. 6, p. 677-684, nov. 2003.

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. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 2, abr. 2011.

COSTA, D. N. C. C.; BLANGIARDO. M.; RODAS, L. A. C.; NUNES, C. M.; HIRAMOTO, R. M.; TOLEZANO, J. E.; BONFIETTI, L. X.; CODEÇO, C. T.; CHIRAVALLLOTI-NETO, F. Canine visceral leishmaniasis in Araçatuba, state of São Paulo, Brazil, and its relationship with characteristics of dogs and their owners: a cross-sectional and spatial analysis using a geostatistical approach. **BMC Vet Res**, v. 14, n. 229, p. 1-13, jul. 2018.

COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK M. S. M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Vet J**, v. 174, n. 3, p. 636-643, nov. 2007.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MOREIRA, N. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; VIEIRA, P. M.; CARNEIRO, C. M.; CORRÊA-PLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A; CARNEIRO, M.; REIS, A. B. Humoral and cellular immune responses in dog with

inapparent natural *Leishmania infantum* infection. **Vet J**, v. 190, n. 3 p. e43-e47, nov. 2011.

COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D.; LEAL, G. G. A; MOREIRA, N.D.; OLIVEIRA, L.A.M.; MACHADO, E. M. M.; MORAIS, M. H. F.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis, **PLoS One**, v. 7, n. 3 p. e91009, mar. 2014.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J Infect Dis**, v.186, p. 1314–1320, nov. 2002.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban área of Brazil. **Vet Parasitol**, v.140, n. 1-2, p. 54-60, ago. 2006.

De TOMMASI, A. S.; OTRANTO, D.; FURLANELLO, T.; TASCA, S.; CANTACESSI, C.; BREITSCHWERDT, E. B.; STANNECK, D.; DANTAS-TORRES, F.; BANETH, G.; CAPELLI, G.; de CAPRARIIS, D. Evaluation of blood and bone marrow in selected canine vector-borne diseases marrow in selected canine vector-borne diseases. **Parasit Vectors**, v.7, n. 534, dez. 2014.

DIAS, E. L.; BATISTA, Z. S.; GUERRA, R. M. S. N. C.; CALABRESE, K. S.; LIMA, T. B.; ABREU-SILVA, A. L. Canine Visceral Leishmaniosis (CVL): Seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar Municipality, Maranhão State, Brazil. **Ci Anim Bras**, v. 9, n. 3, p. 740-745, set. 2008.

DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of Eliminating Seropositive Canines on the Transmission of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Clin Infect Dis**, v. 25, n. 5 p.1240-1242, nov. 1997.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C.; PERRI, S. H. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clin Vet**, n. 28, set-out. 2000.

FISA, R. GALLEGU, M.; CASTILLEJO, S.; AISA, M. J.; SERRA, T.; RIERA, C.; CARRIÓ, J.; GALLEGU, J.; PORTÚS, M. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) The example of the Priorat focus. **Vet Parasitol**, v. 83, n. 2, p. 89-97, jun. 1999.

FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic área of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 111, n. 2-3, p.161-173, fev. 2003.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGU, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of a real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v. 137, n. 3-4, p. 214–221, abr. 2006.

FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S., NETO, B. E. L.; SANTOS, G. J. L.; ABREU, C. R. A.; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. M.; OLIVEIRA, L. R. O. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 1, p. 24-29, jan-fev. 2012.

FREITAS, M. V.; BRUN, C. F. L.; RODRIGUES, M. C.; ALVES, G. B. B.; LEAL, A. F.; CARVALHO, E. M.; GROLLI, S. L.; QUESSADA, A. M. Ocular diseases in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí, Brazil. **Cienc Rural**, v. 47, n. 10, set. 2017.

FUJIMORI, M.; ALMEIDA, A. B. P. F.; DIAS, A. F. L. R.; RODRIGUES, J. Y.; NAKAZATO, L.; MADEIRA, M. F.; SOUSA, V. R. F. Prevalence and associated factors of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Maro Grosso, Brazil. **Acta Sci Vet**, v. 44, n. 1424, dez. 2016.

GÁLVEZ, R.; MIRÓ, G.; DESCALZO, M.A.; NIETO, J.; DADO, D.; MARTÍN, O.; CUBERO, E.; MOLINA, R. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). **Vet Parasitol**, v. 169, n. 3-4, p. 327-334, mai. 2010.

GAVGANI, A. S. M.; HODJATI, M. H.; MOHITE, H.; DAVIES, C. R. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomized trial. **Lancet**, v. 360, p. 374-379, ago. 2002.

GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 121, n. 1-2, p. 23–33, jan. 2008.

GIUDICE, E.; PASSANTINO, A. Detection of leishmania amastigotes in peripheral blood from four dogs – short communication. **Acta Vet Hung**, v. 59, n. 2, p. 205–213, abr. 2011.

GOMES, Y. M.; CAVALCANTI, M. P.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis:biotechnological advances. **Vet J**, v. 175, n. 1, p. 45–52, jan. 2008.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Vet Parasitol**, v. 181, n. 1 p. 23-30, set. 2011.

GUARGA, J. L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA, M. J.; PERIBÁÑEZ, M. A.; ALVAR, J.; CASTILLO, J. A. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. **Res Vet Sci**, v. 69, n. 3, p. 249-253, dez. 2000.

GRAUER, G. F. Canine glomerulonephritis: a new thought on proteinuria and treatment. **J Small Anim Pract**, v. 46, p. 469-478, out. 2005.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A. W.C.A. Recents advances in determining the pathogenesis of canine monocytic erlichiosis. **J Clin Microbiol**, v.37, n. 9, p. 2745-2749, set. 1995.

HIRAMOTO, R, M.; OLIVEIRA, S. S.; RANGEL, O.; HENRIQUE, L.F.; TANIGUCHI, H. H.; BARBOSA, J. E. R.; CASANOVA, C.; JUNIOR, A. V.; SAMPAIO, S. M.; SPINOLA, R.; REHDER, S.; LINDOSO, J. A. L.; TOLEZANO. Classificação epidemiológica dos municípios do Estado de São Paulo segundo o Programa de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral, 2017. **Bol Epidemiol Paul (BEPA)**. v. 16, n. 182, p. 11- 35, fev. 2019.

**INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE)**. Censo demográfico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE). Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/aracatuba/panorama>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

**INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE).**

*População estimada; Trabalho e rendimento 2018.* Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/panorama>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

JAIN, N. C. Examination of the Blood and Bone Marrow. In: **Essentials of Veterinary Hematology**. 1<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. p.1-18.

KANEKO, J. J. Appendices. In: **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 4<sup>a</sup> ed. California: Academic Press, 1989. p.878-901.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K. G. Clinical considerations on Canine Visceral Leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 35, n. 5, p. 376-383, set-out. 1999.

KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS M. N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L.; POLIZOPOULOU, Z.; BILLINIS, C.; ARGYRIADIS, D.; DIAKOU, N.; PAPADOPOULOS, O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v. 98, n. 4, p. 247-261, jul. 2001.

KOUTINAS, A. F.; CARLOTTI, D. N.; KPUTINAS, C.; PAPADOGIANNAKIS, E. I.; SPANAKOS, G. K.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. **Vet Dermatol**, v. 21, n. 6, p. 572-577, out. 2010.

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L. R.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania*

(*Leishmania infantum chagasi*) to the natural vector. **Vet Parasitol**, v. 196, n. 3-4, p. 296–300, set. 2013.

LAURENTI, M.D.; LENDRO JR, M.V.S.; TOMOKANE, T.Y.; DE LUCCA, H.R.L.; ASCHAR, M.; SOUZA, C.S.F.; SILVA, R.M.; MARCONDES, M.; MATTA, V.L.R. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 205, n. 3-4, p. 444–450, set. 2014.

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, IKEDA, F.A.M.E.; LUVIZOTTO, M.C. R.; FEITOSA, M.M. Anti-*leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 4, p. 485-489, abri. 2003.

LIMA, W. G. L.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. I.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Trop**, v. 92, n. 1 p. 43-53, set. 2004.

LIRA, R. A.; CAVALCANTI, M. P.; NAKAZAWA, M.; FERREIRA, A. G.; SILVA, E. D.; ABATH, F. G.; ALVES, L. C.; SOUZA, W. V.; GOMES, Y. M. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhost and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Vet Parasitol**. v. 137, n. 3-4, p. 11–16, abr. 2006.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; CHICHARRO, C.; SOLANO-GALLEGO, L. Papular dermatitis due to *Leishmania infantum* infection in seventeen dogs: diagnostic features, extent of the infection and treatment outcome. **Parasit Vectors**, v. 7, n. 120, p. 1-11, mar. 2014.

LOPES, J. V.; MICHALSKY, E. M.; SILVA, F. O. L.; LIMA, A. C. V. M. R.; AVELAR, D. M. COSTA, A., A. J.; FRANÇA-SILVA, J. C.; REGINA-SILVA, S.; FORTE-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Seroprevalence and molecular characterization

of *Leishmania* in dogs from an endemic area of zoonotic leishmaniasis in Brazil. **Inter J Vet Med Sci**, v. 5, n. 1, p. 70-74, jun. 2017.

MACAU, W. L.; SÁ, J. C.; SILVA, A. P. C.; ROCHA, A.L.; MONDÊGO-OLIVEIRA, R.; ANDRADE, F. H. E.; CUNHA, C.M.; CALABRESE, K.S.; ABREU-SILVA, A. L. Main lesions in the central nervous system of dogs due to *Leishmania infantum* infection. **BMC Vet Res**, v. 13, n. 255, ago. 2017.

MACHADO, G. F.; MELO, G. D.; MORAES, O. C.; SOUZA, M. S.; MARCONDES, M.; PERRI, S. H. V.; VASCONCELOS, R. O. Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 136, n. 3-4, p. 340-345, ago. 2010.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T.; MOTO, T. F.; PORFIRIO-PASSOS, G.; LARANJEIRA, D. F.; FRANKE, C.R.; BARROUIN-MELO, S. M. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. **Vet Parasitol**, v. 223, p. 120-126, jun. 2016.

MAIA, C.; RAMADA, J.; CRISTOVAO, J. M.; GONCALVES, L.; CAMPINO, L.; Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. **J Vet**, v. 179, n. 1, p.142-144, jan. 2009.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; PICILLO, E.; PAVONE, L. M. GRAVINO, A. E. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol, **J Vet**, v. 177, n. 2, p. 279-282, ago. 2008.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; GRAVINO, A. R; Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Res Vet Sci**, v. 87, n. 1, p. 76-78, ago. 2009.

MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; GOMES, A. A. D.; SILVA, A. R. S.; VIEIRA, R. F. C.; CAMACHO, A. A.; QUINN, J.; CHANDRASHEKAR, R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Vet Parasitol**, v. 175, n.1-2, p. 15-19, jan. 2011.

MARCONDES, MARY. Leishmaniose. In: LARSSON, C, E.; LUCAS, R. **Tratado de Medicina Externa - Dermatologia Veterinária**. 1ª ed. São Caetano do Sul: Interbook editora Ltda, 2016, p.313-344.

MARCONDES M, DAY M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Res Vet Sci**, v. 123, p. 261-272, abr. 2019.

MAROLI, M.; MIZZONI, V.; SIRAGUSA, C.; D'ORAZI, A.; GRADONI, L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. **Medical and Med Vet Entomol**, v. 15, p. 358-363, dez. 2001.

MAROLI, M.; GRANDONI, L.; OLIVA, G.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; LUBAS, G.; PALTRINIERI, S.; ROURA, X.; ZINI, E.; ZATELLI, A. Guidelines for prevention of leishmaniasis in dog. **J Vet Med Educ**, v. 236, n. 11, p. 1200-1206, jun. 2010.

MEINKOTH J.H.; CLINKENBEARD, K.D. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary hematology**. 5ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 1057-1063.

MELÉNDEZ-LAZO, A.; ORDEIX, L.; PLANELLAS, M.; PASTOR, J.; SOLANO-GALLEGO. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. **Res Vet Sci**, v. 117, p. 18-27, abr. 2018.

MELO, G. D.; MARCONDES, M.; MACHADO. Canine cerebral leishmaniasis: Potential role of matrix metalloproteinase-2 in the development of neurological disease. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 148, n. 3-4, p. 260-166, ago 2012.

MIRÓ, G.; CHECA, R.; MONTOYA, A.; HERNÁNDEZ, L.; DADO, D.; GÁLVEZ, R. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain, **Parasit Vectors**, v. 5, n. 60, mar. 2012.

MOMO, C.; JACINTHO, A.P.P.; MOREIRA, P.R.R.; MUNARI, D.P.; MACHADO, G.F.; VASCONCELOS, R. de O. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. **Vet Med Int**, v. 2014, p. 1-5, mar 2014.

MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with diferente clinical signs. **Vet Parasitol**, v. 145, n. 3-4, p. 245-252, abr. 2007.

MOREIRA, P. R. R.; VIEIRA, L. M.; ANDRADE, M. M. C.; BANDARRA, M. B.; MACHADO, G. F.; MUNARI, D. P.; VASCONCELOS, R. O. Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitol Res**, v. 107, p. 605-613, mai. 2010.

NICOLATO, R. de C.; de ABREU, R. T.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; REIS, L. E. S.; CARVALHO, M. G.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; BOUILLET, L. E. M.; LEMOS, D. S.; COURA-VITAL, W.; REIS, A. B. Clinical forms of canine visceral leishmaniosis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82947, dez. 2013.

NUNES, C. M.; LIMA, V. M. F.; PAULA, H. B.; PERRI, S. H. V.; ANDRADE, A. M.; DIAS, F. E. F.; BURATTINI, M. N. Dog culling and replacement in na área

endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet Parasitol**, v. 153, n. 1-2, p. 19-23, mai. 2008.

OLIVA, G.; SCALONE, A.; MANZILLO, V. F.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; DI MUCCIO, T.; GRADONI, I. Incidence and Time Course of *Leishmania infantum* Infections Examined by Parasitological, Serologic, and Nested-PCR Techniques in a Cohort of Naive Dogs Exposed to Three Consecutive Transmission Seasons, **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 4, p. 1318-1322, abr. 2006.

OLIVEIRA, L. C. P.; ARAÚJO, R. R.; ALVES, C. R.; MOUTA-CONFORT, E.; LÓPEZ, J. A.; MENDONÇA-LIMA, F. W. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dia D'Ávila, State of Bahia, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 400-404, jul-ago. 2010.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; de CAPRARIIS, D.; DI PAOLA, G.; TARALLO, V. D.; LATROFA, M. S.; LIA, R. P.; ANNOSCIA, G.; BRETSHWERDT, C. C.; CAPELLI, G.; STANNECK, D. Prevention of canine leishmaniasis in a hyper-endemic area using a combination of 10% Imidacloprid/4,5% Flumethrin. **PLoS One**, v. 8, n.2, p. e56374, fev. 2013.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends Parasitol**, v. 29, n. 7, p. 339-345, jul. 2013.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRANDONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 236, n. 11, jun. 2010.

PALTRINIERI, S.; GRANDONI, L.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Vet Clin Pathol**, v. 45, n. 4, p. 552-578, nov. 2016.

PAPADOGIANNAKIS, E.I.; KOUTINAS, A.F.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; VLEMMAS, J.; LEKKAS, S.; KARAMERIS, A.; FYTIANOU, A. Canine immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*), **Vet Immunol Immunopathol**, v. 104, n. 3-4, p. 227-237, abr. 2005.

PEÑA, M. T.; NARANJO, C.; KLAUSS, G.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.; ROURA, X.; DAVIDSON, M. G.; DUBIELZIG, R.R. Histopathological features of ocular leishmaniasis in the dog. **Comp Clin Path**, v. 138, n. 1, p. 32-39, nov. 2008.

PENAFORTE, K. M.; BELO, V. S.; TEIXEIRA-NETO, R. G.; RIBEIRO, R. A. N.; OLIVEIRA, R. B.; SCHETTINI, D. A.; SILVA, E. S. *Leishmania* infection in a population of dogs: an epidemiological investigation relating to visceral leishmaniasis control. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 22, n. 4, p. 592-596, out-dez. 2013.

PENNISI, M.G.; REALE, S.; GIUDICE, S.L.; MASUCCI, M.; CARACAPPA, S.; VITALE, M.; VITALE, F. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. **Vet Res Commun**, v. 29 n. 2 (Supplement), p. 301-303, ago. 2005.

PEREIRA, V. F.; BENASSI, J. C.; STARKE-BUZETI, W. A.; SILVA, D. T.; FERREIRA, H. L.; KEID, L. B.; SOARES, R. M.; RUIZ, V. L. A.; OLIVEIRA, T. M. F. S. Detection of canine leishmaniasis by conjunctival swab PCR. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 1, p. 104-106, jan-fev. 2016.

PETANIDES T. A.; KOUTINAS A. F.; MYLONAKIS, M. E.; DAY, M. J. SARIDOMICHELAKIS, M. N.; LEONTIDES, L. S.; MISCHKE, R.; DINIZ, P.;

BREITSCHWERDT, E. B.; KRITSEPI, M.; GARIPIDOU, V. A.; KOUTINAS, C. K.; LEKKAS, S. Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **J Vet Intern Med**, v. 22, n. 4 p. 866-872, jul. 2008.

PIMENTEL, D. S.; RAMOS, R. A. N.; SANTANA, M. A.; MAIA, C. S.; CARVALHO, G. A.; SILVA, H. P.; ALVES, L. C. Prevalence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs in an endemic area of Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, n. 4, p. 491-493, jul-ago. 2015.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, G.; RUITENGER, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun**, v. 62, n. 1, p. 229-235, jan. 1994.

REGINA-SILVA, S.; FERES, A. M. L. T.; FRANÇA-SILVA, J. C. DIAS, E. S.; MICHALSKY, E. M.; ANDRADE, H. M.; COELHO, E. A. F.; RIBEIRO, G. M.; FERNANDES, A. P.; MACHADO-COLEHO, G. L. L. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec<sup>®</sup> vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v. 34, n. 19 p. 2233-2239, abr. 2016.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res Vet Sci**, v. 81, p. 68-75, ago. 2006.

RIBEIRO, R. R.; SILVA, S. M.; FULGÊNCIO, G. O.; MICHALICK, M. S. M.; FRÉZARD, F. J. G. Relationship between clinical and pathological signs and

severity of canine leishmaniasis. **Ver Bras Parasitol Vet**, v. 22, n. 3, p.373-378, jul-set. 2013.

RIBEIRO, R. R.; MICHALICK, M. S. M.; SILVA, M. E.; SANTOS, C. C. P.; FRÈZARD, F. J. G.; SILVA, S. M. Canine Leishmaniasis: na Overview of the Current Status and Strategies for control. **Biomed Res Int**, v. 2018, p. 1-13, mar. 2018.

ROLÃO, N.; CORTES, S.; RODRIGUES, O. R.; CAMPINO, L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzymelinked immunosorbent assay. **J Parasitol**, v. 90, n. 5, p. 1150-4, out. 2004.

ROURA, X.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRANDONI, L.; MAROLI, M. OLIVA, G.; PALTRINIERI, S.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report, **Vet J**, v. 198, n. 1, p. 43-47, out. 2013.

SANTOS, M.; MARCOS, R.; ASSUNÇÃO, M. MATOS, A. F. F. Polyarthrititis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. **Vet Parasitol**, v. 141, n. 3-4, p. 340-344, nov. 2006.

SARIDOMICHELAKIS, M.N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L. S.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V. I. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, n. 1, p. 82-56, jul. 2005.

SARIDOMICHELAKIS, M.N.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous involmente in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **Vet Dermatol**, v. 25, n. 2, p. 61-e22, abr. 2014.

SASSAKI, C. Y.; COLODEL, M. M.; FERREIRA, I.; NOGUEIRA, F. S.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H.; ROCHA, N. S.; Comparison of different diagnostic test in dogs uninfected and naturally infected with visceral leishmaniasis. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 17, n. 3, p. 348-352, jun. 2011.

SEIXAS, M. M.; JUNIOR, J. T. M.; FRANKE, C. R.; BARROUIN-MELO, S. M. Positividade para Leishmaniose Visceral: existem fatores caninos que contribuem? **Rev Baiana de Saúde Pública**, v. 36, n. 2, p. 358-367, abr-jun. 2012.

SEVÁ, A. P.; OVALLOS, F. G.; AMAKU, M.; CARILLO, E.; MORENO, J.; GALATI, E. A. B.; LOPES, E. G.; SOARES, R. M.; FERREIRA, F. Correction: Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. 1-20, jul. 2016.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the etiological agent of American visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 577-579, ago. 2006.

SIDERIS, V.; PAPADOPOULOU, G.; DOTSIKA, E.; KARAGOUNI, E. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. **Eur J Epidemiol**, v. 15, p. 271-276, mar. 1999.

SILVA, C. J.; ZACARIAS, D. A.; SILVA, V. C.; ROLÃO, N.; COSTA, D. C.; COSTA, C. H. N.; Comparison of optical microscopy and quantitative polymerase chain reaction for estimating parasitemia in patients with kala-azar and modelling infectiousness to the vector *Lutzomyia longipalpis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 517-522, ago. 2016.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; TEIXEIRA, A. C.; DE SOUZA, C. M.; FIGUEIREDO, F. B.; Laboratory tests performed on Leishmania seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Vet Parasitol**, v. 179, n.1-3, p. 257–261, jun. 2011.

SILVA, D. T.; STARKE-BUZETTI, W. A.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M. S.; TEONÓRIO, M. S.; LOPES, M. L. M. Comparative evaluation of several methods for canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 23, n. 2, p. 179-186, abr-jun, 2014.

SILVA, F.M.F.; SANTOS, E. S.; TORRES,S. M.; YAMASAK,E.M.; RAMOS, R.A.N.; ALVES,L.C. Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with leishmaniasis. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 25, n. 1 p. 127-130, jan-mar. 2016.

SILVA, R. B. S.; PORTO, M. L.; BARBOSA, W. O.; SOUZA, H. C.; MARQUES, N. F. S. P.; AZEVEDO, S. S.; ANDRADE, P. P.; MELO, M. A. Seroprevalence and risk factors associated with canine visceral leishmaniasis in the State of Paraíba, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 51, n. 5, p. 683-688, set-out. 2018.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on Several Tissues and Serology. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 2, p. 560-563, fev. 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRIGUEZ-CORTES, A.; TROTTA M.; ZAMPIERON, C.; RAZIA, L; FURLANELLO, T.; CALDIN, M.; ROURA, X.; ALBEROLA, J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v. 145, n. 3-4, p. 315-319, abr. 2007.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G.; Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, out. 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit Vectors**, v. 86, n. 4, p.1-16, mai. 2011.

TRAVI, B. L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G. Canine leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 1, p. 1-13, jan. 2018.

VIOL, M. A.; LIMA, V. M. F.; AQUINO, M. C. C.; GALLOS, G.; ALVES, I. P.; GENEROSO, D.; PERRI, S. H. V.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H.; NUNES, C. M.; BRESCIANI, K. D. S. Detection of cross infections by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Parasitol Res**, v. 111, n. 4, jul. 2012.

WHO (World Health Organization). Leishmaniasis. World Health Organization). 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 21 jan 2019.

WILSON, T.; MAGALHÃES, L. F.; SOUZA, R. R.; MEDEIROS-RONCHI, A.A.; LIMONGI, J. E. Renal lesions in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **J Biosc**, v. 33, n. 4 p. 990-995, jul-ago. 2017.

ZANETTE, M. F.; LIMA, V. M. F.; LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma*

*cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* chagasi tests in dogs. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n.1, p. 105-107, jan-fev. 2014.