

Leishmaniose Visceral Canina: um problema de saúde pública em expansão

Canine Visceral Leishmaniasis: an expanding public health problem

DOI:10.34119/bjhrv6n1-286

Recebimento dos originais: 17/01/2023

Aceitação para publicação: 16/02/2023

Thiago Pasqua Narciso

Doutor em Ciências Veterinárias

Instituição: Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS) - Programa de
Medicina Veterinária

Endereço: Rua Padre José Poggel, 506, Padre Dehon, Lavras - MG, CEP: 37203-593

E-mail: thiagopasqua@unilavras.edu.br

Ana Paula Peconick

Doutora em Ciências Veterinárias

Instituição: Universidade Federal de Lavras (UNILAVRAS) - Departamento de
Medicina Veterinária

Endereço: Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos, Lavras - MG, CEP: 37203-202

E-mail: anapeconick@ufla.br

Angélica Terezinha Barth Wouters

Doutora em Ciências Veterinárias

Instituição: Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS) - Programa de
Medicina Veterinária

Endereço: Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos, Lavras - MG, CEP: 37203-202

E-mail: angelica.wouters@ufla.br

Tarcísio de Freitas Milagres

Mestre em Parasitologia

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Endereço: Farroupilha, Porto Alegre - RS, CEP: 90010-150
E-mail: tarcisiodefritasmilagres@gmail.com

Ricardo Toshio Fujiwara

Doutor em Parasitologia

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências
Biológicas - Departamento de Parasitologia
Endereço: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte – MG,
CEP: 31270-901
E-mail: fujiwara@icb.ufmg.br

Luiza Almeida Figueiredo

Doutora em Parasitologia

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências
Biológicas - Departamento de Parasitologia
Endereço: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte – MG, CEP:31270-901
E-mail: luiza.almeida.figueiredo@gmail.com

Agostinho Gonçalves Viana

Doutor em Biologia Celular

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências
Biológicas - Departamento de ParasitologiaEndereço: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte – MG,
CEP: 31270-901

E-mail: agostinhogv@yahoo.com.br

Ingrid Marciano Alvarenga

Mestre em Ciências da Saúde

Instituição: Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS)

Endereço: Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos, Lavras - MG, CEP: 37203-202

E-mail: dizi_alvarenga@hotmail.com

Richardson Costa Carvalho

Mestre em Ciências da Saúde

Instituição: Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS)

Endereço: Rua Padre José Poggel, 506, Padre Dehon, Lavras - MG, CEP: 37203-593

E-mail: rickcc@hotmail.com

Thales Augusto Barçante

Doutor em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais

Instituição: Universidade Federal de Lavras - Núcleo de Pesquisa Biomédica - Departamento
de Medicina (UNILAVRAS- NUPEB)

Endereço: Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos, Lavras - MG, CEP: 37203-202

E-mail: thales.abarcante@ufla.br

José Cherem

Mestre em Ciências da Saúde

Instituição: Universidade Federal de Lavras - Núcleo de Pesquisa Biomédica - Departamento
de Medicina (UNILAVRAS- NUPEB)

Endereço: Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos, Lavras - MG, CEP: 37203-202

E-mail: jose.cherem@ufla.br

Joziana Muniz de Paiva Barçante

Pós-doutorado em Imunoparasitologia

Instituição: Universidade Federal de Lavras - Núcleo de Pesquisa Biomédica - Departamento
de Medicina (UNILAVRAS- NUPEB)

Endereço: Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos, Lavras - MG, CEP: 37203-202

E-mail: joziana@ufla.br

RESUMO

As leishmanioses são doenças negligenciadas de grande importância em saúde pública. Esta doença, causada por parasitos do gênero *Leishmania* e transmitidos por insetos vetores pode se manifestar sob as formas visceral, cutânea e muco-cutânea. A leishmaniose visceral ganhou importante destaque na abordagem da “Saúde Única” em função da interface humana, veterinária e ambiental. Neste contexto, a detecção de novas áreas com ocorrência de casos autóctones de LV canina é o marco para iniciar a investigação, vigilância e monitoramento epidemiológico. O município de Lavras era considerado área silenciosa e não vulnerável para leishmaniose visceral canina até o ano de 2013. Diante da necessidade de confirmação da

infecção canina, o objetivo do presente trabalho foi confirmar a ocorrência de casos autóctones de LV canina no município de Lavras – MG, com técnicas parasitológicas, sorológicas e moleculares. A partir da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real – *qPCR*, foi analisada a carga parasitária de amostras de baço e medula óssea de nove cães naturalmente infectados, sabidamente positivos para LVC nos testes DPP® e EIE LVC Bio-Manguinhos®. Foram observadas quatro amostras positivas para *Leishmania infantum* em medula óssea, e cinco amostras positivas de baço. Não houve diferença significativa para os valores de carga parasitária entre os dois tipos de tecido analisados. A confirmação da infecção por *L. infantum* em cães realizada neste estudo é a primeira na macrorregião de Lavras - sul do estado de Minas Gerais, e serve de alerta para implementação das ações de vigilância e controle, no sentido de evitar a dispersão da doença e a ocorrência de casos humanos.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, diagnóstico molecular, carga parasitária.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease of great importance in public health. This vector-borne disease can manifest in visceral, cutaneous, and mucocutaneous forms. Visceral leishmaniasis has gained important prominence in the context of "One Health" due to the human, veterinary and environmental interface. In this context, the detection of new areas with the occurrence of autochthonous cases of canine LV is the milestone to initiate research, surveillance, and epidemiological monitoring. The municipality of Lavras was considered a silent area and not vulnerable to canine visceral leishmaniasis. In order to confirm canine infection, the objective of the present study was to establish the occurrence of autochthonous cases of canine VL in the city of Lavras-MG with serological and molecular techniques. The quantitative polymerase chain reaction - *qPCR* was employed to determine the positivity and parasite load of spleen and bone marrow samples from nine naturally infected dogs, previously positive for LVC in the DPP® and EIE LVC Bio-Manguinhos® tests. The results from *qPCR* indicate the presence of *Leishmania infantum* in four out of nine bone marrow samples and five out of nine spleen samples. No significant differences in the parasite load between the two analyzed tissue samples were observed. The confirmation of *L. infantum* infection in dogs in this study is the first one in the municipality of Lavras and it serves as an alert for the implementation of surveillance and control actions, in order to avoid the spread of the disease and the occurrence of human cases.

Keywords: *Leishmania infantum*, molecular diagnosis, parasite load.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é considerada uma doença negligenciada de importância mundial, que afeta principalmente populações marginalizadas e contribui para perpetuação dos ciclos de pobreza. Hoje, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para leishmaniose e correm risco de infecção. Estima-se que 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos de LC ocorram anualmente (WHO, 2023). Nas Américas, a LV corresponde a um ciclo de transmissão zoonótico, que tem o cão doméstico como principal reservatório da doença no meio urbano e o protozoário *Leishmania infantum* como responsável

pela forma visceral da doença em humanos e também nos cães (Alvar 2004, Baneth et al. 2008, Dantas-Torres 2012). A transmissão entre animais susceptíveis e humanos ocorre principalmente pela picada de fêmeas do flebotomíneo também conhecido como mosquito-palha, asa-dura, cangalhinha, entre outros. Nas Américas, *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie envolvida na transmissão de *L. infantum*, seguida de *L. cruzi* e *L. evansi* (Young & Arias 1992, Ribeiro et al. 2005, Laison & Rangel 2005, Bauzer et al. 2007, Missawa et al. 2011, Belo et al. 2013).

Desde a década de 1990, tem se verificado no país uma expansão da doença, acompanhada de um processo de urbanização que culminou com a instalação definitiva da doença nas grandes cidades brasileiras (Barçante 2016). Em 1990, mais de 90% dos casos de LV eram registrados na região Nordeste. Hoje, a doença atinge as cinco regiões brasileiras e 21 de seus estados. Apesar do aumento da dispersão da doença em diferentes partes do Brasil, a região Nordeste ainda permanece como responsável por quase 50% dos casos do país (Barçante 2016). O Brasil está entre os seis países responsáveis por albergar 90% dos casos de LV do mundo (Souza-Gomes et al. 2017) e com relatos frequentes de ocorrência de novos casos em áreas previamente indenes, demonstrando que enxergamos somente "a ponta de um iceberg" em um ciclo de transmissão bem estabelecido e um processo de disseminação da LV para todo o território nacional (Werneck 2017).

Apesar dos esforços para o controle de vetores e reservatórios, a LV encontra-se em rápida expansão territorial, acometendo indivíduos de difere disso, é preciso identificar estratégias de acompanhamento e monitoramento dos casos (PAHO, 2021). ntes grupos de idades (Brasil 2014).

Um agravante do controle decorre da pandemia da COVID-19, uma vez que as atividades de busca ativa, detecção precoce e tratamento de casos, bem como outras atividades de campo, foram reduzidas. Entre os desafios destaca-se a necessidade de os países retomarem as atividades e avançarem no diagnóstico e tratamento dos casos das diferentes formas clínicas da doença. Além

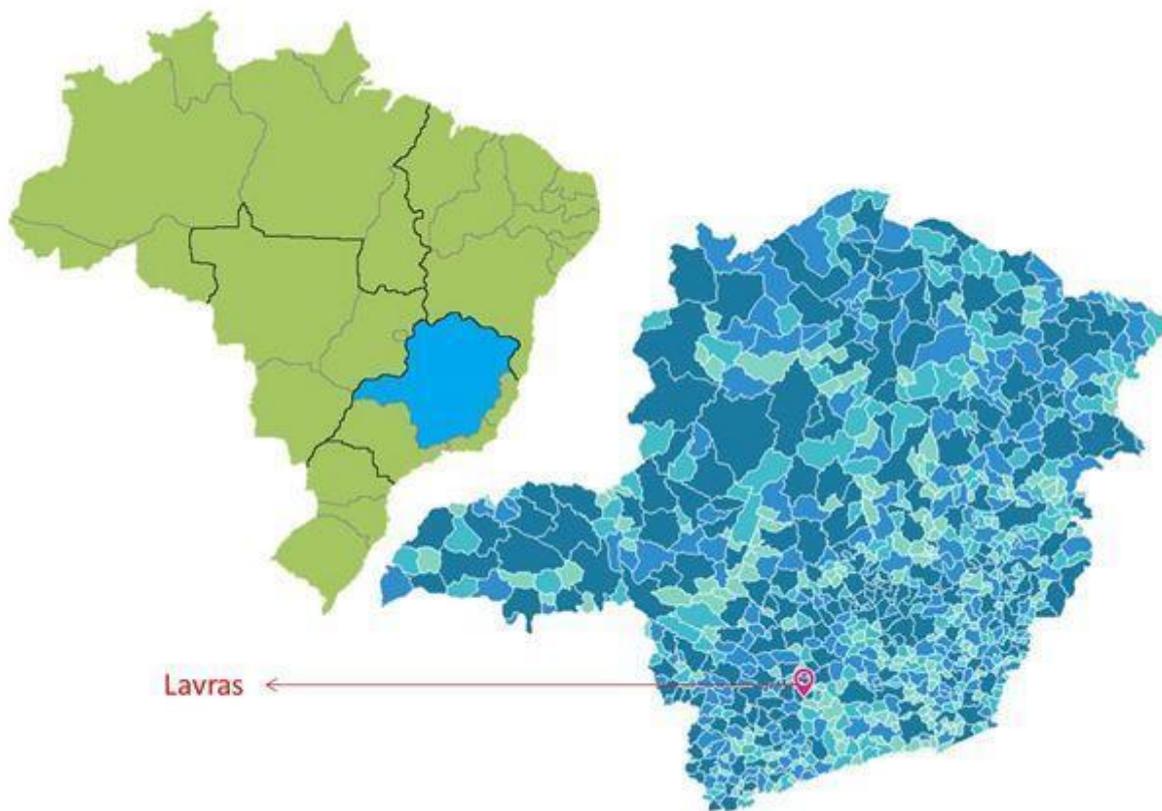
O município de Lavras, localizado na região dos Campos das Vertentes, sul do Estado de Minas Gerais, era considerado, até o ano de 2013, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (Brasil 2014), área silenciosa e não vulnerável para a LV. A partir de um estudo sobre a fauna flebotomínica do município, foi possível detectar a presença de flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* (Barçante et al. 2015).

Neste contexto, a investigação da ocorrência de casos autóctones de leishmaniose visceral é importante para controlar a dispersão da doença no estado e conseqüentemente para outras regiões do país e do mundo. Assim, o presente estudo foi conduzido para investigar a ocorrência do primeiro surto de LVC no município de Lavras, Minas Gerais, Brasil, assim como conduzir a análise parasitológica, sorológica e molecular de amostras isoladas de cães.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo. O presente trabalho foi realizado no município Lavras, localizado ao Sul do Estado de Minas Gerais, na macrorregião Campos das Vertentes (Figura 1). A população estimada em 2017 era de 102.124 habitantes e uma densidade demográfica de 163,26 hab/km² (IBGE). A população canina estimada é de 20.000 animais.

Fig.1. Mapa do estado de Minas Gerais, com destaque ao município de Lavras



Fonte: Adaptado de IBGE, 2018.

Ação ensino-serviço. A realização do presente trabalho se deu a partir da parceria entre a Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a Prefeitura Municipal de Lavras (PML).

Realização dos testes sorológicos. Para investigação do primeiro caso de leishmaniose canina, a equipe de Vigilância Ambiental realizou uma triagem sorológica em vinte animais

nascidos no município de Lavras e sem histórico de viagens. Os animais foram submetidos ao teste imunocromatográfico de plataforma dupla (DPP[®]) e ao ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (EIE LVC Bio-Manguinhos[®]) para triagem e confirmação do diagnóstico de LVC, respectivamente.

Amostras. Em acordo com a recomendação do Ministério da Saúde (Brasil 2014), os animais com sorologia positiva nos dois exames preconizados DPP[®] e EIE LVC Bio-Manguinhos[®] foram encaminhados para eutanásia. No Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA foi realizada a eutanásia, seguida de coleta de material para análises parasitológicas e moleculares. De cada animal foi feita a coleta de amostras de 1cm de baço e aspirado de medula óssea para realização do mielograma e PCR. As amostras destinadas à análise molecular foram mantidas em freezer -80°C para posterior análise.

Quantificação da carga parasitária. A quantificação das amastigotas de *L. infantum* das amostras de baço e medula óssea foi realizada no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas – ICB da UFMG utilizando a técnica de *qPCR*.

O DNA dos tecidos foi extraído utilizando *DNeasyBlood & Tissue Kit* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A carga parasitária foi estimada utilizando os iniciadores direto, 5' TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG 3' e reverso, 5' GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3', que amplificam um fragmento de 90pb do gene de cópia única DNA polimerase de *L. infantum* (GenBank acesso número AF009147). O gene constitutivo canino β -actina foi utilizado como controle endógeno para normalização inicial de concentrações de DNA e para verificar a integridade da amostra. Os iniciadores utilizados para amplificar um fragmento de 307pb do gene foram os seguintes: direto 5' CTTCTACAACGAGCTGCGCG 3' e reverso 5' TCATGAGGTAGTCGGTCAGG. A reação foi realizada em um volume final de 10 μ L, sendo 4 μ L da amostra de DNA (5ng/ μ L), 1 μ L dos iniciadores direto e reverso previamente homogeneizados (0,2 μ M) e 5 μ L de *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, Inc., USA). A reação foi iniciada com a pré-desnaturação do DNA a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. As amplificações foram realizadas no equipamento 7500 Software v2.0.1 (Thermo Fisher, EUA) e o resultado determinado pelo método de curva-padrão como descrito por Ferreira et al. 2012. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata.

Cálculo estatístico. Todas as análises foram feitas utilizando o software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Inc. EUA). Para os valores de carga parasitária dos tecidos analisados utilizou-se o Teste T (dados paramétricos) ao nível de significância para valores de $p < 0,05$.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA (CEUA/UFMG, Protocolo 44/2012) e de Ética em Pesquisa – COEP (CAAE – 00842112.2.0000.5149) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3 RESULTADOS

Dos vinte animais inicialmente incluídos no presente estudo, nove apresentaram sorologia positiva nos testes de triagem e confirmatório. Em dois (animal 01 e animal 04), dos nove animais positivos sorologicamente, foi possível a confirmação de formas parasitárias, morfologicamente compatíveis com amastigotas de *Leishmania*.

Com relação à análise molecular, verificou-se que dos nove animais, cinco apresentaram DNA de *Leishmania* em amostras de tecido (Quadro 1).

Quadro 1. Avaliação sorológica por DPP® e EIE LVC Bio-manguinhos® e análise molecular por qPCR em amostras de baço e medula óssea de nove cães do Município de Lavras (MG)

Código do Animal	Sorologia		Análise molecular (qPCR)			
	DPP	EIE	Baço		Medula Óssea	
			DNA total (ng/μL)	Parasitas/mg de tecido	DNA total (ng/μL)	Parasitas/mg de tecido
01	+	+	21x10 ³	48x10 ⁶	21x10 ³	29x10 ⁶
02	+	+	17x10 ³	14x10 ⁶	25x10 ³	11x10 ⁶
03	+	+	17x10 ³	32x10 ⁴	18x10 ³	8x10 ⁵
04	+	+	14x10 ³	3x10 ⁹	13x10 ³	4x10 ⁹
05	+	+	9x10 ³	13x10 ³	-	-
06	+	+	-	-	-	-
07	+	+	-	-	-	-
08	+	+	-	-	-	-
09	+	+	-	-	-	-
Média dos animais PCR positivos			16x10 ³	8x10 ⁸	19x10 ³	11x10 ⁸

Em quatro amostras de medula óssea (MO) foi possível a detecção de DNA de *Leishmania*, com uma média de 11x10⁸ parasitos/mg de MO.

Cinco amostras de baço foram positivas para a presença de DNA de *Leishmania*, com uma carga parasitária média de 8x10⁸ parasitos/mg de baço.

Dos nove animais sorologicamente positivos, somente em quatro foi possível a detecção de DNA de *Leishmania* simultaneamente, em amostras de baço e MO. Um animal apresentou DNA de *Leishmania* somente na amostra de baço, e quatro animais foram negativos para pesquisa de DNA nas amostras de baço e MO.

Não houve diferença significativa para os valores de carga parasitária entre os dois tipos de tecido analisados.

4 DISCUSSÃO

A LV é uma das doenças mais importantes no contexto da saúde pública, uma vez que provoca em média 59.000 óbitos anualmente e é responsável pela perda de mais de 2 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (Alvar, Yactayo, Bern et al. 2006), além dos casos agravados de co-infecção LV/HIV (Souza et al., 2020). Neste sentido, é fundamental o acompanhamento eficaz no que tange a vigilância desse agravo, visto que o cão doméstico é o principal reservatório no ambiente urbano, e que a endemia canina precede o aparecimento de casos humanos (Werneck 2008, Quinnel & Courtenay 2009, Brasil 2014, Silva et al., 2020). Nesta perspectiva, a detecção de novas áreas com ocorrência de casos autóctones de LV canina é o marco para iniciar a investigação, vigilância e monitoramento epidemiológico (Quinnel & Courtenay 2009), incluindo o inquérito sorológico canino, o estudo da fauna flebotomínica e as ações de educação em saúde, a fim de evitar a ocorrência de novos casos caninos e ocorrência de casos humanos (Brasil 2014).

Nesse contexto, de acordo com a Nota técnica Nº 33/2010 – SUB-ZUR/CGDT/DEVEP/SVS/MS, foi seguido o protocolo de investigação dos primeiros casos suspeitos de leishmaniose visceral canina em um município indene. Assim, foram realizados os exames sorológicos (DPP® e EIE LVC Bio-Manguinhos®), seguido da confirmação de autoctonia e coleta de material biológico para investigação por método parasitológico indireto através de PCR quantitativa - *qPCR*. Atualmente, esta técnica vem sendo utilizada por diversos autores para o diagnóstico ou monitoramento da evolução da LVC através da quantificação da carga parasitária, em substituição a outras técnicas, como por exemplo testes sorológicos e PCR convencional, pois apresenta altos valores de sensibilidade, precisão e reprodutibilidade (Vitale et al. 2004, Manna et al. 2006, Leontides et al. 2002).

Considerada um dos principais tecidos linfoides, a medula óssea atua como importante local de armazenamento de *Leishmania* sp. em cães infectados (Tropia de Abreu et al. 2011). O baço, por sua vez, é um órgão no qual ocorre intensa interação entre o parasito e o sistema imune, exercendo importante função na manutenção da infecção durante todo o curso da LVC (Santana et al. 2008, Reis et al. 2006). No presente estudo, os valores de frequência para amostras positivas e negativas de medula óssea foram de 45% e 55%, e nas amostras de baço, 55% e 45% respectivamente. Estes resultados diferem daqueles encontrados em trabalhos que utilizaram *qPCR* em cães sorologicamente positivos, nos quais 100% dos animais apresentaram

parasitos nos tecidos analisados (Ramos et al. 2013, Reis et al. 2013). A ocorrência de amostras negativas na avaliação molecular por *qPCR* pode estar relacionada a uma baixa carga parasitária como já relataram Solcà (2012) e Ramos (2013) em estudos prévios utilizando amostras de baço e medula óssea.

Os resultados do presente trabalho apontam para um importante e conhecido desafio no âmbito da LV canina: o diagnóstico. Dos nove animais com confirmação sorológica por DPP[®] e EIE LVC Bio-Manguinhos[®], somente cinco apresentaram confirmação molecular, utilizando *qPCR*. No Brasil, uma das medidas preconizadas nos casos de cães positivos é a eutanásia, uma vez que os cães são considerados fontes de infecção para o inseto vetor e o principal reservatório da doença urbana (Brasil 2014). Nesse contexto, o diagnóstico desempenha um papel fundamental no controle da doença (Faria & Andrade 2012).

Além do diagnóstico, um importante desafio a ser transposto no caso da LV é a implementação de programas de monitoramento e controle da doença, que encontra-se em franca expansão. Nesse sentido, as ações que integram ensino, serviço e comunidade são essenciais para efetiva prevenção de novos casos. No presente estudo, a parceria entre universidade e prefeitura foi essencial para coleta e análise dos dados com consequente implementação do Programa de Controle da LV no município de Lavras, no qual a universidade fornece conhecimento científico para os servidores do município, a prefeitura supre as necessidades técnicas e estruturais da instituição de ensino e a sociedade é beneficiada pela soma de esforços em prol de um objetivo comum.

5 CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho foram confirmados e notificados os primeiros casos de LV canina, no município de Lavras, Minas Gerais. Adicionalmente, a presença de *L. longipalpis* (Barçante et al. 2015), considerado o principal transmissor de *L. infantum* nas Américas, reforça a importância das medidas de vigilância para prevenção da expansão da doença canina e humana.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos setores de Vigilância Ambiental e Vigilância Epidemiológica da Prefeitura Municipal de Lavras, particularmente nas pessoas Antonio Reginaldo da Costa Ribeiro, Maria Cristina Amarante Botelho, Julio Cesar Wallwitz Cardoso ao Laboratório de

Biologia Parasitária da Universidade Federal de Lavras (BIOPAR-UFLA) pelo suporte técnico e científico durante toda a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

- Alvar J. 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57:1-88.
- Alvar J., Yactayo S. & Bern C. 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 22:552-557.
- Baneth G., Koutinas A.F., Solano-Gallego L., Bourdeau P. & Ferrer L. 2008. Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 24:324–330.
- Barçante J.M.P.B. 2016. Urbanização e leishmaniose. *Revta Pré-Univesp* 161:1.
- Barçante T.A., Soares G.D.T., Botelho M.C.A., Freitas H.F. & Barçante J.M.P. 2015. First report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz, Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in southern Minas Gerais State, Brazil. *J. Vector Ecol.* 40:412-414.
- Bauzer L.G.S.R., Souza N.A., Maigon R.D.C. & Peixoto A.A. 2007. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102:1-12.
- Belo V.S., Werneck G.L., Barbosa D.S., Simões T.C., Nascimento B.W.L., Silva E.S. & Strchiner C.J. 2013. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7(5):e2182.
- Brasil Ministério da Saúde 2014. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília/DF, p.18-29.
- Brasil Ministério da Saúde 2011. Nota técnica conjunta nº 01/2011. CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS-MS, Brasília, p.1-3.
- Dantas-Torres F. 2012. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitol.* 28(12):531-538.
- Faria A.R. & Andrade H.M. 2012. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amaz Saude [online]* 3(2):47-57.
- Laison R. & Rangel E.F. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100:811-882.
- Leontides L.S., Saridomichelakis M.N., Billinis C., Kontos V., Koutinas A.F., Galatos A.D. & Mylonakis M.E. 2002. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol.* 109(1-2):19-27.
- Manna L., Reale S., Viola F., Vitale F., Foglia-Manzillo V., Pavone L.M., Caracappa S. & Gravino A.E. 2006. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet. Parasit. New York* 142:271-280.

Missawa N.A., Veloso M.A.E., Maciel G.B.M., Michalsky E.M. & Dias S.D. 2011. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. *Revta Soc. Bras. Med. Trop.* 44:76-78.

PAHO. Pan American Health Organization. 2021. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas, No. 10 (December 2021). Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55368>

Quinnell R.J. & Courtenay O. 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitol.* 136(14), 1915-1934.

Reis A.B., Teixeira-Carvalho A., Vale A.M., Marques M.J., Giunchetti R.C., Mayrink W., Guerra L.L., Andrade R.A., Correa-Oliveira R. & Martins-Filho O.A. 2006. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112:102-116.

Reis L.E.S. 2013. Detecção de *Leishmania* por PCR e suas variações (seminested PCR e PCR em tempo real), em fragmentos de pele e de baço de cães com leishmaniose visceral. Dissertação de Mestrado, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, MG. 85p.

Ribeiro V.M., Rajão R.A., Araújo Diniz S. & Marques-Michalick M.S. 2005. Evaluation of the potential transmission of visceral leishmaniasis in a canine shelter. *Revue Méd. Vét.* 156:20-22.

Santana C.C., Vassallo J., de Freitas L.A., Oliveira G.G., Pontes-de-Carvalho L.C. & dos-Santos W.L. 2008. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol.* 30:515-524.

Silva J.S., Silva F.F., Miranda F.S., Moreira J.A., Carvalho A.C., Cossolosso, E.H.S., Castro, P.S., Jedlicka, L.D.L. 2020. Ações de combate e controle da leishmaniose no município de Marabá - PA. *Braz. J. Hea. Rev.* 3(2):3061-3068. Available from <<https://doi.org/10.34119/bjhrv3n2-146>>

Solcà M.S. 2012. Uso de PCR no diagnóstico da leishmaniose visceral canina: uma abordagem comparativa de diferentes protocolos e tecidos. 88f. Dissertação de Mestrado, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal da Bahia, BA. 88p.

Sousa-Gomes M.L., Romero G.A. & Werneck G.L. 2017. Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11(9):e0005772.

Souza E.C., Braga K.L., Silva T.K. & Silva M. L. 2020. Apresentação clínica da leishmaniose visceral em pacientes portadores do HIV: Análise dos Fatores Relacionados ao Aparecimento da Doença. *Braz. J. Hea. Rev.* 3(2):1766-1777. Available from <<https://doi.org/10.34119/bjhrv3n2-037>>

Tropia de Abreu R., Carvalho M.G., Carneiro C.M., Giunchetti R.C., Teixeira-Carvalho A., Martins-Filho O.A., Coura-Vital W., Correa-Oliveira R. & Reis A.N. 2011. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *PloS One* 6(5):e18873.

Vitale F., Reale S., Vitale M., Petrotta E., Torina A. & Caracappa S. 2004. TaqMan-Based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1026(1):139-143.

Werneck G.L. 2008. Fórum: expansão geográfica e urbanização da leishmaniose visceral no Brasil. Introdução. Cad. Saúde Pública [online] 24(12):2937-2940.

WHO - World Health Organization. Leishmaniasis. Available from: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1

Young D.G. & Arias J.R. 1992. Flebotomos: Vectores de Leishmaniasis en las Americas. Org. Pan. Salud. 33.